

干酪素法测定新疆不同产地石榴皮中鞣质的含量

张笑颖, 帕丽达·阿不力孜*, 朱 焱, 米热古丽

(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘 要: 建立采用干酪素法测定石榴皮中鞣质含量的方法。结果表明, 鞣质含量在 1.02~6.12 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈线性关系, $r=0.9993$; 方法平均加样回收率为 97.4%, $\text{RSD}=1.21\%$ ($n=6$)。和田地区的皮山和策勒两县石榴皮鞣质含量略低于喀什地区的疏附、疏勒和叶城地区。此方法准确可靠、重现性好, 可以作为石榴皮药材质量控制的方法。

关键词: 石榴皮; 鞣质; 干酪素法

Determination of Tannin in Pomegranate Peel in Different Areas of Xinjiang by Casein Method

ZHANG Xiao-ying, PALIDA Abu-lizi*, ZHU Yan, MIREGULI

(School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: The casein method was established to determine the content of tannin in pomegranate peel in different areas of Xinjiang. The results showed that there is good relationship between gallic acid concentration and absorbance of gallic acid-phosphomolybdenumtungstic acid-sodium carbonate system at 760-nm wavelength in the linear range of 1.02 to 6.12 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0.9993$); The average spike recovery is 97.4% with the RSD of 1.21% ($n=6$); The contents of tannin in pomegranate peel in Pishan and Cele counties are lower than those in Shufu, Shule and Yecheng counties. The method is accurate, credible and reproducible, so it can be applied to the quality control of pomegranate peel as medicinal material.

Key words: pomegranate peel; tannin; casein method

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0260-03

石榴皮是石榴科石榴(*Punica granatum* L.)的干燥果皮, 味酸、涩, 性温, 有毒, 入大肠、肾经, 作为传统中药在我国历版药典中均有收载, 有涩肠止泻、止血、驱虫等作用^[1]。石榴皮富含鞣质, 是石榴皮中的有效成分。近年来研究表明, 鞣质能清除生物体内过剩的自由基, 维护细胞膜的流动和蛋白质的构象, 防止辐射诱发的 DNA 断裂, 从而在抑制脂质过氧化心血管病、抗癌、抗突变、抗衰老、抗白内障等方面有独特的功效。石榴皮鞣质的研究已成为研究石榴的热点之一。本实验以 2005 版药典干酪素法为基础, 进行进一步研究, 以期对石榴皮药材质量控制建立较稳定的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

石榴皮采自新疆叶城、皮山等地区。

没食子酸 中国药品生物制品鉴定所; 磷钼钨酸试剂按 2005 版药典配制^[1]; 取钨酸钠 100g、钼酸钠 25g, 加水 700ml 使溶解, 加盐酸 100ml, 磷酸 50ml, 加热回流 10h 放冷, 再加硫酸锂 150g、水 50ml 和溴 0.2ml, 煮沸除去残留的溴(约 15min 冷却), 加水稀释至 1000ml, 滤过, 即得; 干酪素(分析纯); 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

721 型紫外分光光度计 上海第三分析仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 标准品溶液的制备

精密称取没食子酸 0.0510g 置于 100ml 棕色容量瓶中, 加水溶解, 定容, 得标准品储备液。精密量取 5ml, 置 100ml 棕色容量瓶中, 加水溶解, 定容, 混匀, 得标准品溶液(每 ml 含没食子酸 0.0255mg)备用。

收稿日期: 2008-06-08

作者简介: 张笑颖(1982-), 女, 硕士, 主要从事新疆优势资源的基础研究。E-mail: z-x-y-1982@163.com

* 通讯作者: 帕丽达·阿不力孜(1962-), 女, 副教授, 博士, 主要从事维吾尔药及天然产物化学的应用基础研究。

E-mail: palida3345@yahoo.com.cn

1.3.2 测定波长的选择

精密吸取没食子酸对照品溶液 2ml, 置于 25ml 棕色容量瓶中, 各加入磷钼钨酸试剂 1ml, 再加入水 10ml, 用 20% 碳酸钠溶液稀释到刻度, 摇匀, 放置 30min, 以相应试剂为空白, 按照紫外-可见分光光度法^[2], 在 400~760nm 的波长范围内进行扫描, 结果表明在波长 760nm 处有最大吸光度, 故选定 760nm 为没食子酸的检测波长。

1.3.3 标准曲线的制定

精密量取没食子酸标准品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml 分别置于 25ml 棕色容量瓶中, 各加入磷钼钨酸试剂 1ml, 再分别加入水 11、10、9、8、7、6ml 用 20% 碳酸钠溶液稀释到刻度, 摇匀, 放置 30min, 以相应试剂为空白, 用紫外-可见分光光度法, 在 760nm 波长处测定吸光度, 分别为 0.124、0.245、0.354、0.451、0.576、0.667, 以吸光度为纵坐标, 没食子酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线。回归方程为 $A=0.1066C+0.0223$, $r=0.9993$, 结果表明在 1.02~6.12 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 没食子酸浓度和吸光度呈良好的线性关系。

1.3.4 供试品溶液的制备

精密称取石榴皮粉 1.0g, 置 250ml 棕色容量瓶中, 加 70% 丙酮 150ml, 放置过夜, 超声处理 30min, 过滤, 减压浓缩干燥, 置于 250ml 量瓶中用水稀释至刻度, 摇匀, 静置, 得供试品储备液, 精密量取 5ml, 置 100ml 棕色容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 备用, 得供试品溶液。

1.3.5 样品测定

1.3.5.1 总酚测定

精密量取供试品溶液 1ml, 置 25ml 棕色量瓶中, 照标准曲线的制定项下的方法, 自“各加入磷钼钨酸试剂 1ml”起, 加水 11ml, 依法测定吸光度, 从标准曲线中读出供试品溶液中没食子酸的浓度, 并计算样品溶液稀释的体积, 两者相乘即得总酚量。

1.3.5.2 干酪素的空白干扰实验

称取干酪素 0.6g, 置于 100ml 具塞锥形瓶中(共 5 份), 均加入蒸馏水 25ml, 置 30℃ 水浴中保温 1h, 持续振荡, 取出, 放冷, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2ml, 置 25ml 棕色容量瓶中, 照标准曲线的制定项下的方法, 自“各加入磷钼钨酸试剂 1ml”起, 加水 10ml, 测定吸光度。从标准曲线中读出干扰物相当于没食子酸的浓度, 并计算干酪素空白实验溶液体积, 即得干酪素空白实验多酚量。

1.3.5.3 不被吸附多酚的测定

精密量取供试品溶液 25ml, 加至已盛有干酪素 0.6g

的 100ml 具塞锥形瓶中, 密塞, 置 30℃ 水浴中保温 1h, 持续振荡, 取出, 放冷, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2ml, 置 25ml 棕色容量瓶中, 参照标准曲线制定的方法, 自“各加入磷钼钨酸试剂 1ml”起, 加水 10ml, 测定吸光度, 从标准曲线中读出干酪素吸附后滤液中多酚的浓度, 并计算出样品溶液稀释的体积, 即得样品被干酪素吸附后滤液中多酚量。因干酪素自身在测定波长处有吸收, 须增加干酪素空白实验, 计算不被吸附多酚量时扣除其干扰, 即: 不被吸附多酚量 = 样品被干酪素吸附后滤液中多酚量 - 干酪素空白实验多酚量。

鞣质含量 = 总酚量 - 不被吸附多酚量

2 结果与分析

2.1 稳定性实验

精密吸取没食子酸对照品溶液 3ml, 置于 25ml 棕色量瓶中, 各加入磷钼钨酸试剂 1ml, 再加入水 9.0ml, 用 20% 碳酸钠溶液稀释到刻度, 摇匀, 以相应试剂为空白, 分别在 10、20、30、40、50、60、70min 时间点, 测定吸光度, 分别为 0.354、0.348、0.343、0.342、0.340、0.336、0.334, 显色放置后, 吸光度有下降趋势, 在 70min 内较稳定。

2.2 精密度实验

精密吸取没食子酸标准品溶液 3ml, 置于 25ml 棕色容量瓶中, 各加入磷钼钨酸试剂 1ml, 再加入水 9ml, 用 20% 碳酸钠溶液稀释到刻度, 摇匀, 放置 30min, 以相应试剂为空白, 用紫外-可见分光光度法在 760nm 波长处测定吸光度, 重复 6 次, 求得 RSD 为 0.40%(n=6), 精密度良好。

2.3 重复性实验

精密称取叶城石榴皮粉 1.0g, 共 6 份, 按照 1.3.4 供试品溶液的制备和 1.3.5 样品测定的方法测定鞣质含量, RSD=1.13%(n=6), 重复性好。

表 1 加样回收率实验结果
Table 1 Average spike recovery of gallic acid

样品号	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	鞣质回收 率(%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	4.353	4.08	8.019	95.1	97.4	1.21
2	4.202	4.08	8.103	97.8		
3	4.064	4.08	8.006	98.3		
4	4.327	4.08	8.215	97.7		
5	4.289	4.08	8.171	97.6		
6	4.195	4.08	8.113	98		

2.4 加样回收率实验

精密称取已知样品含量叶城石榴粉末 1.0g, 共 6

份,按 1.3.4 配成供试品储备液。精密吸取供试品储备液 5ml,置 100ml 棕色容量瓶中(共 6 份),均加入没食子酸标准品储备液 8ml,加水定容,摇匀。并按 1.3.5 方法测定鞣质含量,计算平均回收率为 97.4%, RSD=1.21%,准确度高,方法可行。结果见表 1。

2.5 样品测定结果

精密称取疏附等五个产地石榴皮粉 1.0g,测定鞣质含量,结果见表 2。

表 2 不同产地鞣质含量测定结果
Table 2 Determination results of tannin content in pomegranate peel in different areas of Xinjiang

产地	总酚(%)	不被吸附多酚(%)	鞣质含量(%)
疏附	21.33	0.89	20.44
疏勒	24.50	1.36	23.14
叶城	22.74	1.08	21.66
皮山	18.46	0.93	17.53
策勒	19.10	1.11	17.99

2.6 碱液浓度的选择

中国药典 2005 年版规定,测定时碳酸钠溶液的浓度为 29%(m/V),但温度对碳酸钠的溶解度影响较大,且高浓度的碳酸钠较易析出晶体,影响测定结果,结合文献[3]多采用低浓度的碳酸钠溶液,拟考察 20%、25%、29% 碳酸钠的测定结果。结果表明,三者所测吸光度基本一致,综合考虑采用 20% 碳酸钠溶液测定。

3 讨论

鞣质的含量测定有多种方法可供选择。经典的含量测定方法有皮粉法、络合滴定法、干酪素法等。2005 版中国药典将鞣质的测定方法由样品价格昂贵用量多的皮粉法改为价格低廉用量少的干酪素法。在实验中干酪素作为鞣质吸附剂,可以选择性的吸附有活性的鞣质。测定时以磷钼钨酸为显色剂,磷钼钨酸法的原理:在碱性溶液中,酚类化合物可以将钼钨酸还原(使 W^{6+} 变为 W^{5+}),生成蓝色的化合物,颜色的深浅与酚含量呈正相关,在约 760nm 波长处有最大吸收。在实验中发现干酪素含有干扰实验的物质,在测定波长处有吸收,明显影响“不被吸附多酚”的含量测定,使得样品鞣质含量测定结果偏低,不能准确反映鞣质的实际含量。因此本实验增加了干酪素的空白实验,在计算不被吸附多酚时扣除其吸收,即:不被吸附多酚量 = 样品被干酪素吸附后滤液中多酚量 - 干酪素空白实验多酚量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典: I 部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 XB.
- [2] 谢道刚, 宋光志, 刘静. 鞣质含量测定法(中国药典 2005 年版一部附录 XB)方法学验证[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(6): 50-53.
- [3] 朱慧瑜, 金哲雄. 干酪素法测定榛叶中鞣质类成分的研究[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(6): 440-441.