

HPLC 测定家蚕中 1-脱氧野尻霉素的含量

赵艳丽, 黄亦琦*, 胡珊梅, 杨辉

(厦门市医药研究所厦门市天然药物研究与开发重点实验室, 福建 厦门 361008)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 测定家蚕中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)的含量。方法: 采用 Hypersil NH₂ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(78:22)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm。结果: 家蚕中 DNJ 在 1.996 ~ 9.98 μg ($r=0.9996$) 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 平均加样回收率为 98.4%。结论: 该方法前处理简单、实用, 结果准确, 可用于家蚕及制品中 DNJ 的质量控制。

[关键词] 家蚕; 1-脱氧野尻霉素(DNJ); 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0124-03

[doi] 10.11653/syjf2013220124

Content Determination of Deoxynojirimycin in Silkworm Powder by RP-HPLC

ZHAO Yan-li, HUANG Yi-qi*, HU Shan-mei, YANG Hui

(Xiamen Institute of Medicine, Xiamen Key Laboratory of Natural Drug Research and Development, Xiamen 361008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish assaying methods for the determination of deoxynojirimycin in silkworm. **Method:** The content of DNJ was determined by RP-HPLC, using a Hypersil NH₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The column temperature was maintained at 30 °C. Acetonitrile-water (78:22) was used as mobile phase; the flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detecting wavelength was set at 203 nm. **Result:** The linear range was 1.996-9.98 μg ($r=0.9996$). The average recovery was 98.4%. **Conclusion:** This method is simple, practical and accurate. It could be used for quality control of silkworm.

[Key words] silkworm; deoxynojirimycin (DNJ); RP-HPLC

家蚕味咸、甘, 具有生津止渴、消食理气、活血通络、益气补虚等功效^[1], 主要用于治疗小儿疳热、消瘦、消渴(糖尿病)等。现代药理学实验证实家蚕富含多种活性物质, 如 1-脱氧野尻霉素(DNJ)、黄酮类化合物等。其中 DNJ 竞争性 α -糖苷酶结合, 阻碍 α -糖苷酶对二糖的水解, 使二糖不能被水解成单糖而直接送入大肠排泄, 从而有效地起到降血糖的作

用^[2-4]。因此, 建立一种快速、准确测定 DNJ 含量的方法对于筛选、开发高效降血糖新药, 制定药材质量标准具有重要意义。离子色谱测定法^[5]、RP-HPLC-荧光检测法^[6-7]或者紫外检测法^[8-9], 由于要求的检测器价格昂贵, 样品前处理操作繁琐, 限制了其普及及应用。为此, 本实验探讨了 RP-HPLC-UV 末端吸收测定 DNJ 含量, 为家蚕及其产品质量控制提供可靠的质量控制方法。

1 材料

Waters 高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器, Breeze 化学工作站(美国沃特斯公司), UV-2501PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), PE Savant ModulyoD 型冷冻真空干燥器(美国热电公司), BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司), SY5200DH 型超声波清洗器(上海超声波仪器公

[收稿日期] 20121231(002)

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2011D006); 厦门市科技计划项目(20124040)

[第一作者] 赵艳丽, 硕士, 从事中药复方药效物质基础研究, Tel: 18635881665, E-mail: zhaoyanli0307@163.com

[通讯作者] * 黄亦琦, 硕士研究生导师, 主任医师, 从事中药复方药效物质基础研究, Tel: 0592-2023035, E-mail: huangyq502@sina.com

司),UPW-10型超纯水器(北京市历元电子仪器贸易公司)。

全蚕粉为5龄3天家蚕(福建省桑蚕研究所提供),经福建中医药大学罗靖中教授鉴定品种为皓月×菁松。-70℃冷冻保存,冻干机冷冻干燥,高速粉碎机粉碎并过100目筛,常温避光保存,供实验用。

1-脱氧野尻霉素对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度>97%,批号20071003)。乙腈为色谱纯,纯化水用UPW-10型超纯水器自制,其他试剂皆为分析纯。中性氧化铝(厦门国药集团化学试剂公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil NH₂ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(78:22),流速1 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长203 nm。理论板数按1-脱氧野尻霉素峰计算不低于3 000,采用该色谱条件,供试品及对照品色谱分离度良好,见图1。

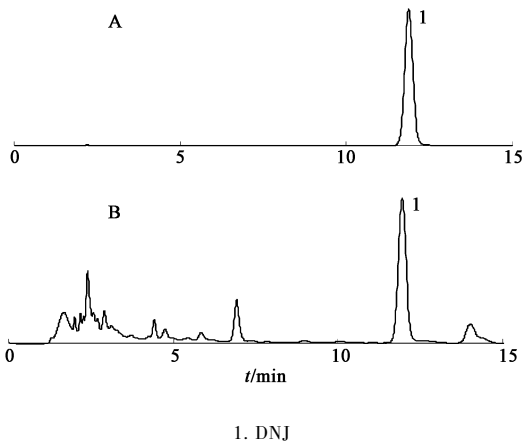


图1 DNJ对照品(A)及家蚕中DNJ(B)的HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取DNJ对照品10 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取全蚕粉1 g,置具塞三角烧瓶中,加入石油醚30 mL,在水浴中加热回流提取1 h,滤过,用少量石油醚洗涤残渣,弃去滤液,残渣挥干溶剂,精密加入甲醇30 mL,密塞,称定质量,超声提取1 h,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液20 mL浓缩至约3 mL,加于中性氧化铝柱(100~200目,5 g,内径1~1.5 cm)上,用0.02 mol·L⁻¹ HCL 100 mL洗脱,收集洗脱液,水浴上蒸至近干,残渣加甲醇适量溶解,转移至10 mL量瓶中,并稀释至刻度,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取2,4,6,8,10 mL对

照品液,分别置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,分别精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,以对照品进样量(μg)为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y = 259\ 001X + 20\ 804.4$ ($r = 0.999\ 8$),DNJ在1.996~9.98 μg,与对应的峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μL (DNJ为0.82 g·L⁻¹)注入液相色谱仪,连续进样5次,按上述测定方法进行测定,结果RSD 1.66% ($n = 5$)。说明仪器精密度符合要求。

2.6 重复性和稳定性试验 取同一批号全蚕粉6份,精密称定,按供试品溶液的制备方法制备样品,按上述测定方法,结果6份样品DNJ平均含量为0.59%,RSD 2.1%。表明本品含量测定方法的重复性良好。取同一份样品溶液,每隔12 h进样一次,共进5次,结果RSD 1.47% ($n = 5$),表明供试品中在72 h内稳定性良好,能够满足测定需要。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的全蚕粉6份,每份约0.5 g,精密称定,分别精密加入对照品适量,按照供试品溶液的制备方法制备样品溶液,测定。结果平均回收率为98.4%,RSD 2.26%。见表1。

表1 家蚕DNJ加样回收率试验

取样量/g	样中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.500 7	2.954	5.00	101.8		
0.502 3	2.964	4.94	98.3		
0.500 6	2.954	4.97	100.3		
0.502 9	2.967	4.92	97.2	98.4	2.26
0.508 5	3.000	4.93	96.0		
0.500 4	2.952	4.90	96.9		

注:加入量均为2.01 mg。

2.8 样品含量测定 取不同蚕龄样品7份,依法制备各样品溶液,分别精密吸取对照品和样品溶液10 μL,按照上述确定的色谱条件进样分析,测得峰面积,按外标法定量计算,测定结果见表2。

表2 不同批次家蚕样品测定

No.	饲养期	样品含量/%
1	38 d(2009年)	0.582 3
3	31 d	0.503 2
4	25 d	0.403 8
5	20 d	0.386 5
6	18 d	0.376 4
7	38 d(2008年)	0.484 8

3 讨论

3.1 提取方法的选择 家蚕粉中 DNJ 的提取一般以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸作为溶剂,采用旋涡混合提取法和超声波提取法^[10],实验证明以上 2 种方法,杂质多干扰严重,测得 DNJ 含量低。家蚕为动物药,含有一定脂溶性物质,因此增加石油醚脱脂步骤,甲醇提取液经过中性氧化铝柱,减少了杂质的干扰。考察了不同浓度的盐酸洗脱液(0.02, 0.05, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行洗脱,结果以 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸洗脱效果较好。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 测定波长的确定 DNJ 分子缺少共轭双键结构,紫外吸收较弱,对其进行紫外检测时需要衍生,或采用末端吸收。本实验在用高效液相色谱仪分析前,分别取供试品及对照品溶液,在 190 ~ 400 nm 进行紫外-可见光谱扫描,结果 *N*-甲基-1-脱氧野尻霉在 192 nm 处有末端吸收,最终选择 203 nm 为检测波长。

3.2.2 流动相的选择 当采用末端吸收波长进行检测时,流动相采用截止波长低的乙腈(紫外截止波长为 190 nm),可减少紫外末端吸收的干扰,本实验对乙腈和水的配比进行了优化,最终选择乙腈-水(78:22)作为流动相,能使成分得到基线分离,并且峰形较好。

3.2.3 色谱柱的选择 首先采用以十八烷基键合硅胶为固定相的色谱柱,结果发现 DNJ 在该色谱柱上无保留。分析原因,是由于家蚕中 DNJ 结构与糖非常相似,极性很大, C_{18} 柱不能有效保留,所以选用氨基色谱柱,能够将杂质和 DNJ 很好分离。这是由于在乙腈-水的流动相体系中, DNJ 分子中的羟基与强极性氨基键合硅胶固定相上的氨基之间有强的氢键结合能力,而与十八烷基键合硅胶固定相上的烷基之间难以产生较强的相互作用吸附。

3.3 饲养期与成分含量的关系 实验结果表明,蚕龄相对越大, DNJ 含量越高,并随着饲养时间的延长,蚕体内 DNJ 含量逐渐减少。这一变化规律显示出家蚕体存在有独特的 DNJ 代谢,其机制有待今后深入研究。因此建议用家蚕作原料时,必须用新鲜的 5 龄 3 天(即饲养 38 d)家蚕,以确保制剂的质量。

目前,对蚕体内 1-DNJ 含量研究报道颇多。沈以红等^[11]的研究旨在了解蚕体中 1-DNJ 的富集规律,建立一个简便、可控、准确测量蚕体内 DNJ 含量的方法。本实验对样品实行冷冻干燥处理,避免了高温对蚕体成分的影响。本实验供试品材料无须已报道的柱前衍生化,无复杂繁琐程序,样品前处理比较简单。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 5 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:659.
- [2] Yoshiki Yoshikuni. Inhibition of intestinal α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by moranoline and its *N*-alkyl derivatives [J]. *Agric Bio Chem*, 1998, 52(1):121.
- [3] 曹育,黄亦琦,黄恺飞,等. 全蚕粉对 2 型糖尿病大鼠胰岛素受体信号传导通路的影响[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3):126.
- [4] 曹育,黄亦琦,王梅兰,等. 复方全蚕粉胶囊对 2 型糖尿病大鼠糖、脂代谢的影响[J]. *中国实验方剂学杂志* 2011, 17(14):189.
- [5] 陈智毅,肖更生,陈卫东,等. 黄血蚕中 1-脱氧野尻霉素的离子色谱法测定[J]. *食品科学*, 2004, 25(1):150.
- [6] 谢慧明,吴方睿,杨毅. 柱前衍生化高效液相色谱-荧光检测法测定桑叶中的 1-脱氧野尻霉素[J]. *色谱*, 2008, 26(5):634.
- [7] 周惠燕,胡晓娟,马英. 桑叶中 1-野尻霉素的纯化及含量测定[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2008, 25(5):367.
- [8] 张旻,吴联,周乐. 柱前衍生化高效液相色谱法测定桑叶的 1-脱氧野尻霉素[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(6):258.
- [9] 朱见. 桑叶、蚕体中 1-脱氧野尻霉素的含量测定与分析[D]. 重庆:西南大学,2008:17.
- [10] 孙红,车庆明,孟繁敏. RP-HPLC 法测定桑叶中 *N*-甲基-1-脱氧野尻霉素[J]. *中草药*, 2007, 38(6):858.
- [11] 沈以红,朱见,代方银,等. 野桑蚕和不同家蚕品系幼虫体内 1-脱氧野尻霉素含量测定[J]. *蚕业科学*, 2007, 33(4):674.

[责任编辑 顾雪竹]