

HPLC 测定全蚕粉中槲皮素和山奈素的含量

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:建立全蚕粉中槲皮素、山奈素的含量测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),色谱柱为 Kromasil-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温为室温,流动相甲醇-0.4% 磷酸(50:50),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,进样量 10 μL。结果:槲皮素和山奈素得到良好分离,分别在 0.012 5~0.400 0 μg(*r*=0.999 8),0.014 0~0.448 0 μg(*r*=0.999 9)呈良好的线性关系,平均回收率分别为 97.53%(RSD 1.9%),100.3%(RSD 1.0%)。结论:该方法快速准确,可满足定量分析的需要。

[关键词] 全蚕粉; 槲皮素; 山奈素; 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(2012)18-0095-03

Content Determination of Quercetin and Kaempferol
in Silkworm Powder by RP-HPLC

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

(1. Xiamen Institute of Medicine, Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen 361012, China)

[Abstract] **Objective:** To establish assaying methods for the determination of quercetin and kaempferol in Silkworm Powder. **Method:** The content of quercetin and kaempferol was determined by RP-HPLC, using a Kromasil-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The column temperature was fixed on room temperature. Methanol-0.4% phosphoric acid (50:50) was used as mobile phase, flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detecting wavelength was set at 360 nm. **Result:** The linear range were 0.012 5-0.4 μg (*r*=0.999 8) and 0.014-0.448 μg (*r*=0.999 9). The average recoveries were 97.53% and 100.3%, with the RSD of 1.9% and 1.0%. **Conclusion:** The method established is rapid and accurate, which could be used for quality control of Silkworm Powder.

[Key words] Silkworm Powder; quercetin; kaempferol; RP-HPLC

全蚕粉由家蚕(品种为皓月×菁松),常规条件下桑叶饲养至 5 龄第 3 天,冻干制备而成,含有丰富的黄酮类化合物。韩国学者 Kang Sun Ryu^[1]首次报道了全蚕粉具有治疗糖尿病的功效并进行应用开发研究。药理研究证明全蚕粉能增强模型大鼠消除氧自由基的能力,减轻氧化应激对组织的损伤,保护胰

岛β细胞,防止糖尿病并发症的发生^[2-3]。槲皮素和山奈素为酚类抗氧化剂,有很强清除自由基、抗氧化作用。山奈素是四羟基黄酮,槲皮素有 5 个羟基,其苯环上又多了 1 个邻位羟基,清除氧自由基能力优于山奈素^[4]。槲皮素药理作用广泛,具有扩张冠状动脉、降血脂、抗血小板凝集、抗糖尿病并发症等多方面作用^[5]。目前尚未见全蚕粉中槲皮素、山奈素含量测定的文献报道。因此,本实验采用 RP-HPLC 法,对全蚕粉中的槲皮素、山奈素进行含量测定,为家蚕的开发利用提供可靠依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,VWD 可变波长紫外检测器(美国 Agilent 公司),UV-2501PC 型

[收稿日期] 20120202(005)
[基金项目] 福建省自然科学基金项目(面上项目 2011D016)
[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,硕导,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

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 Sartorius 公司),SY5200DH 型超声波清洗器(上海超声波仪器公司),UPW-10 型超纯水器(北京市历元电子仪器贸易公司)。

槲皮素和山奈素对照品购自中国药品生物制品检定所,纯度>98%,批号分别为100081-200406,110861-200405。甲醇为色谱纯,纯化水用UPW-10型超纯水器,其他试剂皆为分析纯。

全蚕粉为5龄3天家蚕(品种皓月×菁松,福建省桑蚕研究所提供),-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。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液(50:50),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,检测波长360 nm,进样量10 μL。在以上色谱条件下,全蚕粉中槲皮素和山奈素的色谱峰分离度良好。色谱图见图1。

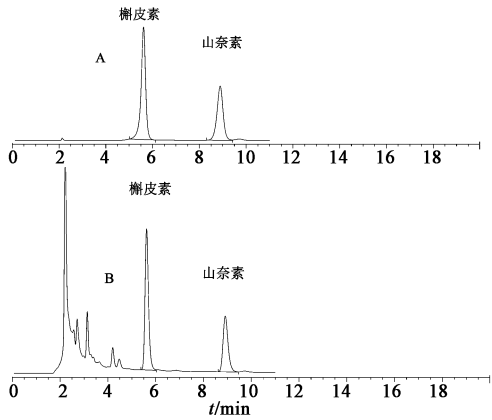


图1 对照品(A)和全蚕粉(B)的HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品、山奈素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含槲皮素0.05 mg、山奈素0.056 mg的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-25%盐酸溶液(4:1)混合溶液30 mL,密塞,称定质量,置水浴中回流40 min,立即冷却,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 依次吸取2.2项下对照品液0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。各进样10 μL,测定。以

质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,得回归方程 $Y_{\text{槲皮素}} = 3\,572.9X + 0.000\,2$ ($r = 0.999\,8$); $Y_{\text{山奈素}} = 3\,980.1X + 0.000\,1$ ($r = 0.999\,9$),槲皮素和山奈素的线性范围分别为0.012 5~0.4 μg,0.014~0.448 μg。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液10 μL,重复进样6次,测定峰面积,计算得槲皮素和山奈素峰面积的RSD分别为0.17%,0.098%,表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液10 μL,分别于0、2、4、6 h进样,测定峰面积,计算得槲皮素和山奈素RSD分别为1.16%,0.24%。表明样品在6 h内基本稳定。

2.7 重复性试验 取同一样品6份,分别按2.3项下方法制成供试品溶液,测定。槲皮素和山奈素平均质量分数分别为0.49、0.31 mg·g⁻¹,RSD分别为1.12%,1.77%。

2.8 加样回收率试验 称取已测知含量的全蚕粉样品(09批5龄3 d)6份,每份约0.5 g,分别加入槲皮素和山奈素混合对照品适量,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条件测定,槲皮素平均回收率97.53%,RSD 1.9%;山奈素平均回收率100.3%,RSD 1.0%。见表1、2。

表1 全蚕粉中槲皮素回收率试验

取样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.501 2	0.245	0.25	0.49	98.0	97.53	1.9
0.512 3	0.251	0.25	0.50	99.6		
0.514 5	0.252	0.25	0.49	95.2		
0.503 4	0.247	0.25	0.49	97.2		
0.511 6	0.251	0.25	0.50	99.6		
0.512 1	0.251	0.25	0.49	95.6		

表2 全蚕粉中山奈素回收率试验

取样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.501 2	0.155	0.16	0.31	99.4	100.3	1.0
0.512 3	0.159	0.16	0.32	100.6		
0.514 5	0.159	0.16	0.32	101.3		
0.503 4	0.156	0.16	0.31	98.8		
0.511 6	0.159	0.16	0.32	101.3		
0.512 1	0.159	0.16	0.32	100.6		

2.9 样品测定 取不同批次全蚕粉,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,依法测定,计算药材中槲皮素和山奈素的平均质量分数,结果见表 3。

表 3 全蚕粉样品 2 种成分测定 (n=3) mg·g⁻¹

样品	槲皮素	山奈素
09 批 5 龄 3 d	0.49	0.31
09 批 3 龄 4 d	0.39	0.27
06 批 5 龄 3 d	0.20	0.11

3 讨论

3.1 溶剂的选择 经比较,用甲醇提取黄酮类较为完全,再水解得到槲皮素,其他成分干扰小。所以本实验采用甲醇作为提取溶媒。

3.2 提取方法的选择 曾选用甲醇超声 60 min 后浓缩蒸干,再加甲醇-1.5 mol·L⁻¹ 盐酸(4:1)回流提取 2 h,结果含量下降;说明提取时间过长,成分已经降解,或是 HCl 浓度较低。改用盐酸浓度为 2 mol·L⁻¹,提取时间为 2.5 h,结果含量增加不是很明显。最后参考 2005 年版《中国药典》^[6] 瓦松中槲皮素和山奈素的提取方法,直接用甲醇-25% 盐酸(4:1)加热回流提取 1 h,结果含量升高。由于药典所载的提取时间为 1 h,本实验考虑到槲皮素受热不够稳定,优化提取时间为 40 min,结果显示与提取 1 h 无明显差异,故采用直接用甲醇-25% 盐酸(4:1)加热回流提取 40 min。

3.3 高效液相色谱条件的确定 由于黄酮类化合物常带有酚羟基^[7],在水中会形成氢键,而未解离的羟基与固定相作用较强,从而导致拖尾,所以需加入酸来调节 pH 以抑制解离、克服拖尾现象。故采用甲醇-0.4% 磷酸水作为流动相。

分别取供试品及对照品溶液,在紫外光波长范围内测定吸收曲线,结果发现 2 种溶液在 360 nm 处均有最大吸收,因此选择 360 nm 作为高效液相色谱的检测波长,结果满意。

3.4 槲皮素稳定性的考察 本实验发现样品中槲皮素不稳定,容易降解,原因可能如下:全蚕粉里含有微量元素 Zn,据报道 Zn²⁺ 对槲皮素溶液的稳定性有不利的影响^[8];槲皮素溶液在 pH 6.59 ~ 7.90 比较稳定^[9],而本实验所用供试品液 pH 4.79,可能

会影响到槲皮素的稳定性。实验也曾尝试加入 NaOH 调 pH 至中性,结果样品中杂质峰增加,主峰变小;槲皮素见光不稳定,应用棕色容器并避光操作^[10]。

3.5 不同批次蚕粉含量差异的考察 2009 批次全蚕粉中槲皮素和山奈素含量皆高于 2006 批次,说明 2 者含量随着时间的延长而降低。2009 批次中 5 龄 3 d 中槲皮素和山奈素含量皆高于 3 龄 4 d,说明蚕龄越小,其体内槲皮素和山奈素含量越低,具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kang Sun Ryu, Heui Sam lee, Sung Hyun Chung, et al. An aelrrity of lowing blood-glucose levels according to preparative contition of silkworm powder[J]. Koeran J Serie Sci, 1997, 39(1) :79.

[2] 康小红,黄亦琦,王梅兰,等. 全蚕粉对 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性的影响[J]. 福建中医药, 2008, 39(2) :49.

[3] 孙静,程嘉艺,滕丹,等. 槲皮素对 H₂O₂ 致内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5) :174.

[4] 陈季武,胡天喜,朱大元. 11 种黄酮类化合物清除超氧阴离子的构效关系研究[J]. 药物化学, 2002, 37(1) :57.

[5] 舒毅,谭陶,张思宇,等. 槲皮素的药理学研究进展[J]. 华西药学杂志, 2008, 23(6) :689.

[6] 中国药典. 一部[S]. 2005:47.

[7] 罗宏,尹海波. HPLC 同时测定鼠掌老鹳草中 5 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5) :83.

[8] 刘淑梅. 家蚕体主要药用活性成分的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.

[9] 鞠成国,王巍,赵焕君,等. HPLC 测定急性子中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1) :77.

[10] 李慧,许亮,徐保利,等. HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山奈素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7) :100.

[责任编辑 顾雪竹]