

# 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-C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>, 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-C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>. 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<sup>[1]</sup> 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清除氧自由基的能力, 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<sup>[2-3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。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, 硕士, 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 °C 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-C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>, 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。

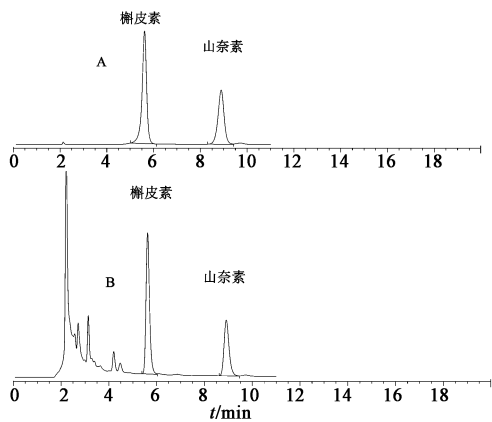


图 1 对照品(A)和全蚕粉(B)的 HPLC

**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<sup>-1</sup>, 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		
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	97.53	1.9
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		
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	100.3	1.0
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 ( $n=3$ )  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

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- $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  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  $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,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》<sup>[6]</sup> 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<sup>[7]</sup>,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  $\text{Zn}^{2+}$  对槲皮素溶液的稳定性有不利的影响<sup>[8]</sup>;槲皮素溶液在 pH 6.59 ~ 7.90 比较稳定<sup>[9]</sup>,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<sup>[10]</sup>。

**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 aelrity of lowing blood-glucose levels according to preparative contition of silkworm powder[J]. Koeran J Seric 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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]