

酸水解 HPLC 测定桑叶中槲皮素及山柰酚含量

吴好好¹, 孙冬黎¹, 钱文春², 楼丽静², 蒋惠娣^{1*} (1.浙江大学药学院药物分析研究室, 杭州 310058; 2.浙江省湖州市蚕业技术推广站, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 建立桑叶中水解黄酮苷元(槲皮素、山柰酚)的含量测定方法,并考察湖州地区不同品种、不同采摘时间、不同种植基地桑叶中上述成分的含量差异。方法 粉碎的桑叶样品经甲醇-盐酸混合溶液提取水解后,用反相高效液相色谱法,以 Zorbax SB C₁₈ 为分离柱,甲醇-0.2%磷酸(55:45)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 370 nm。结果 经方法学验证,本方法各项指标均符合中药成分含量测定要求;不同品种、不同种植基地、不同采集时间桑叶中上述 2 种成分含量均有较大变化;同一基地、同一品种,冬桑叶中上述 2 成分的含量明显高于其他季节采集的桑叶。结论 水解后经 HPLC 测定桑叶中槲皮素、山柰酚含量方法可用于桑叶药材质量控制。桑叶中水解槲皮素及山柰酚含量受多种因素影响。**关键词:** 桑叶; 高效液相色谱法; 水解; 槲皮素; 山柰酚; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0248-04

Acid Hydrolysis Followed by HPLC for Simultaneous Determination of Quercetin and Kaempferol in Folium Mori

WU Haohao¹, SUN Dongli¹, QIAN Wenchun², LOU Lijing², JIANG Huidi^{1*} (1.Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Sericulture Technical Extension Station, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an acid hydrolysis followed by HPLC method for determination of quercetin and kaempferol in Folium Mori, and compare the content of these components in Folium Mori from different harvest time, sources and species. **METHODS** 0.25 g powder of Folium Mori was extracted and hydrolyzed by HCl-methanol mixed solution at 90 °C for 2 h. Quantification was performed by HPLC at 35 °C using Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), methanol-0.2% phosphoric acid (55:45) was applied as mobile phase and DAD detector was set at 370 nm. **RESULTS** The results of assay validation were satisfied. The contents of quercetin and kaempferol varied obviously among mulberry leaves from different plant sites, different species, and the contents of the two ingredients of the samples collected in winter were higher than those harvested in other seasons. **CONCLUSION** The developed hydrolysis/HPLC method is able to quantify quercetin and kaempferol in Folium Mori leaves. The contents of quercetin and kaempferol are influenced by some factors.

KEY WORDS: Folium Mori; HPLC; hydrolysis; quercetin; kaempferol; determination

桑叶(Folium Mori)异名铁扇子,为桑属植物桑树(*Morus alba* L.)的树叶,为药食两用的中药材之一,在现代医药和食品领域得到了广泛的应用。桑叶中含有黄酮、绿原酸、生物碱等活性成分,其中黄酮类化合物是桑叶中重要的一类有效成分,与桑叶的许多保健和治疗作用密切相关^[1]。因此对黄酮类化合物的质量研究,有助于桑叶药材及桑叶提取物的质量控制。然而,以比色法测定总黄酮含量,由于药材及提取物中其他共存物质(如绿原酸)的干扰,往往使测定结果偏高。桑叶中

含有多种黄酮类成分,且多是槲皮素和山柰酚的糖苷^[2-3],如异槲皮苷、芦丁、紫云英苷、槲皮苷、异戊烯基黄酮等。因此对这些黄酮苷的总含量测定是对桑叶进行质量控制的有效方法。然而,目前多数黄酮苷对照品还没有商品化供应,因此,分别测定黄酮苷含量作为桑叶的质量控制在实际应用中尚有一定的困难。研究表明,极大多数黄酮苷类化合物口服后,首先在消化道上皮细胞水解酶及/或肠道微生物作用下,转变成相应的黄酮苷元而被吸收,口服黄酮苷类化合物的效应成分

基金项目: 浙江省教育厅(G20050668)、浙江省中医药局(2006C091)资助项目

作者简介: 吴好好,女,硕士 Tel: (0571)85463889 E-mail: haohao@zj165.com
88208408 E-mail: hdjiang@zju.edu.cn

*通信作者: 蒋惠娣,女,博士,教授 Tel: (0571)

多为其苷元^[4]。鉴于上述原因,本试验首先建立酸水解提取-HPLC 测定桑叶中槲皮素和山柰酚的含量,并利用建立的方法考察浙江湖州市不同品种、不同采摘时间和不同种植基地桑叶中槲皮素及山柰酚的含量,为桑叶的质量控制及开发利用提供参考。

1 仪器和试剂

仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括四元泵、在线脱气机、柱温箱、DAD 检测器、HP ChemStation 色谱工作站。色谱纯乙腈购自默克公司(Merck),超纯水,其余试剂均为分析纯。对照品:槲皮素(批号: 0861-200002,纯度: 99.5%)和山柰酚(批号: 100081-200406,纯度: 99.5%)购自中国药品生物制品检定所。生药样品:桑叶样品主要采摘于浙江省湖州市各桑叶种植基地,经湖州市蚕业技术推广站钱文春高级农艺师鉴定为桑属植物桑树 *Morus alba* L.。所得样品分装密封后 4 ℃贮存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温 35℃;流动相: 甲醇-0.2%磷酸(55: 45);流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 370 nm,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,槲皮素保留时间 6.3 min,山柰酚保留时间为 9.7 min,两者基线分离,样品中其他成分不影响测定,见图 1。理论板数按槲皮素计,不低于 5 000,按山柰酚计不低于 10 000。

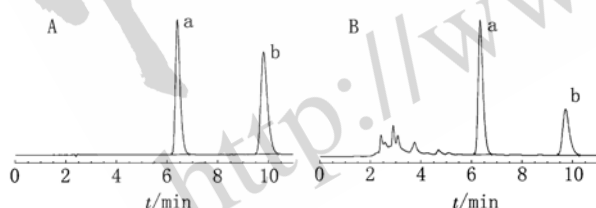


图 1 HPLC 色谱图

A-混合对照品; B-桑叶样品; a-槲皮素; b-山柰酚

Fig 1 The HPLC chromatograms

A-standards; B-sample; a-quercetin; b-kaempferol

2.2 水解及提取条件的确定

精密称取桑叶粉末 0.25 g,置于 50 mL 锥形瓶中,并加入 25 mL 的盐酸甲醇溶液。按表 1 拟定 4 个因素,每个因素选取 3 个水平,按 L₉(3⁴)正交表对桑叶中的槲皮素和山柰酚进行分析,结果见图 2。

表 1 正交试验的因素与水平

Tab 1 The factors and levels for the orthogonal design of hydrolysis and extraction

水 平	A 盐酸浓度/ mol·L ⁻¹	B 甲醇浓度/ %	C 水解温度/ ℃	D 水解时间/ h
1	0.8	40	80	0.5
2	1.6	60	90	1
3	2.4	80	100	2

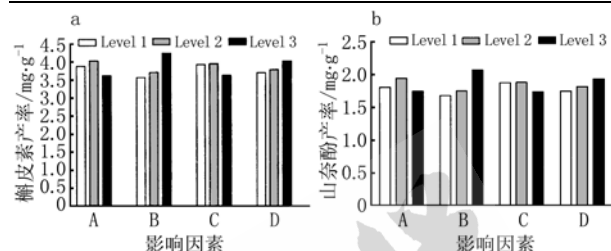


图 2 各因素对槲皮素和山柰酚水解效率的影响

a-槲皮素; b-山柰酚

Fig 2 The hydrolytic efficiencies of quercetin and kaempferol under orthogonal conditions

a-quercetin; b-kaempferol

由图 2 可知,甲醇浓度(B)对槲皮素和山柰酚产率影响最大,盐酸浓度(A)次之,水解温度(C)、水解时间(D)影响较小。桑叶药材水解的最优水平组合为 A2B3C2D3,即盐酸浓度 1.6 mol·L⁻¹、甲醇浓度 80%、水解温度 90 ℃、水解时间 2 h。

为进一步明确水解及提取条件,向水解后的残渣中再加入 25 mL 盐酸甲醇溶液,再一次水解提取并测定,几乎未检测到槲皮素和山柰酚。

因此,本正交试验确定的水解及提取条件能满足桑叶药材定量分析要求。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取桑叶粗粉 0.25 g,加 25 mL 盐酸甲醇溶液,使盐酸终浓度为 1.6 mol·L⁻¹、甲醇体积分数为 80%,90 ℃回流水解 2 h,迅速冷却,过滤,残渣用 50%甲醇洗涤,合并滤液,以 50%甲醇定容至 100 mL,摇匀。0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液为供试品溶液。

2.4 线性范围考察

精密称取一定量的槲皮素和山柰酚对照品,用甲醇分别配制含 924.0 μg·mL⁻¹ 的槲皮素和 994.0 μg·mL⁻¹ 的山柰酚对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液,以 50%甲醇稀释成系列浓度槲皮素(1.155, 2.310, 4.620, 9.24, 18.48, 36.96 μg·mL⁻¹)和山柰酚(1.242, 2.485, 4.970, 9.940, 19.88, 39.76 μg·mL⁻¹)混合对照液,按“2.1”色谱条件进行测定。以对照品溶液浓度 X(μg·mL⁻¹)为横

坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 槲皮素在 $1.155\sim 36.96\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 山柰酚在 $1.242\sim 39.76\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内具有良好线性关系。槲皮素和山柰酚的线性方程分别为: $Y=77.17X-2.78(r=0.999\ 9, n=6)$; $Y=76.57X-1.77(r=0.999\ 9, n=6)$ 。

2.5 仪器精密度试验

取槲皮素浓度为 $9.240\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚浓度为 $9.940\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品混合液, 按“2.1”色谱条件进样, 重复 6 次, 计算峰面积 RSD 值, 得槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为: 0.72% , $0.44\%(n=6)$ 。

2.6 样品稳定性试验

取同一份样品(农桑 14 苗叶, 南太湖基地, 04-12-07)溶液, 在避光条件下, 于 0, 1, 2, 4, 6, 24 h 分别进样, 测得峰面积, 计算得槲皮素、山柰酚的 RSD 分别为 1.1% , $0.8\%(n=6)$, 表明样品在避光条件下 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

日内精密度考察: 取同一样品(农桑 14 苗叶, 南太湖基地, 04-12-07)5 份, 同一天提取, 测定槲皮素、山柰酚的含量, 得其 RSD 分别为: 1.8% , $1.3\%(n=5)$ 。

日间精密度: 取同一样品(农桑 14 苗叶, 南太湖基地, 04-12-07)5 份, 于不同天内提取, 测定槲皮素、山柰酚的含量, 得其 RSD 分别为 2.3% , $2.0\%(n=5)$ 。

表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

精密称取已测知含量的桑叶样品(农桑 14 苗叶, 南太湖基地, 04-12-07)9 份, 每 3 份一组, 按低、中、高 3 个水平分别精密加入一定量对照品, 按“2.3”项下操作, 进样, 计算回收率。结果槲皮素低、中、高 3 个加入量的回收率($n=3$)分别为 102.5% , 101.6% , 101.3% , 平均回收率($n=9$)为 101.8% , RSD 为 1.1% 。山柰酚低、中、高 3 个加入量的回收率($n=3$)分别为 97.2% , 100.7% , 96.8% , 平均回收率($n=9$)为 98.2% , RSD 为 2.4% 。

2.9 样品测定

将不同采摘时间、不同种植基地、不同品种的桑叶样品, 按“2.3”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”色谱条件进样, 测得峰面积, 外标法计算槲皮素、山柰酚含量。

2.9.1 不同采摘时间桑叶中槲皮素和山柰酚的含

量 表 2 是同一种植基地(浙江湖州南太湖基地)不同采摘季节桑叶中槲皮素和山柰酚的含量。从表 2 可知, 本研究考察的 4 个桑叶品种, 冬季(11 月、12 月)桑叶中上述成分含量明显高于夏季(5 月)及秋季(8 月、9 月)桑叶。

表 2 不同采摘季节桑叶中槲皮素和山柰酚的含量

Tab 2 The contents of quercetin and kaempferol in Folium Mori harvested at different time

样 品	采集时间	槲皮素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	山柰酚/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
农桑 14 号	04-11-27	5.03	1.98
	05-05-23	3.35	1.01
	05-08-17	3.32	1.10
	05-09-21	2.91	1.09
	05-11-21	4.41	1.76
盛东 1 号	04-11-27	6.27	2.50
	05-05-23	2.59	0.85
	05-08-17	3.19	1.20
	05-09-21	3.00	1.10
	05-11-21	4.45	1.84
湖桑 197	04-11-27	5.96	1.55
	05-05-23	5.33	1.26
	05-08-17	4.18	1.30
	05-09-21	2.79	0.84
	05-11-21	5.46	1.52
果桑大 10	04-12-07	3.82	1.38
	05-05-23	2.25	0.61
	05-08-17	2.87	0.94
	05-09-21	2.44	0.90
	05-11-21	3.64	1.42

注: 表中所有样品均采自浙江湖州南太湖基地

Note: All samples in the table were collected from Nantaihu Folium Mori plant site in Huzhou, Zhejiang, China.

2.9.2 不同品种冬季桑叶中槲皮素和山柰酚的含量 表 3 是同一种植基地(浙江湖州南太湖基地)同一季节(冬季)不同品种的桑叶中槲皮素和山柰酚的含量。结果表明, 盛东 1 号、湖桑 197、农桑 14 号桑叶中水解槲皮素及山柰酚的含量相对较高。

表 3 不同品种冬季桑叶中槲皮素和山柰酚的含量

Tab 3 The contents of quercetin and kaempferol in different varieties of mulberry leaves

样 品	采集时间	槲皮素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	山柰酚/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
盛东 1 号	04-11-27	6.27	2.50
湖桑 197	04-11-27	5.96	1.55
农桑 14 号	04-11-27	5.03	1.98
农桑 14 号(苗叶)	04-12-07	4.92	2.39
农桑 8 号	04-11-27	4.64	1.43
桐乡青	04-11-27	4.03	1.37
9102	04-11-27	3.98	1.27
农桑 12 号	04-11-27	3.84	1.72
果桑大 10	04-12-07	3.82	1.38

注: 表中所有样品均采自浙江湖州南太湖基地

Note: All samples in the table were collected from Nantaihu Folium Mori plant site in Huzhou, Zhejiang, China.

2.9.3 不同种植基地桑叶中槲皮素及山柰酚的含量比较 表4为湖州市及浙江省农科院3个主要桑叶品种中槲皮素及山柰酚的含量,同一品种,不同种植基地桑叶中2种成分的含量也有较大的区别。

表4 不同种植基地冬季桑叶中槲皮素和山柰酚含量

Tab 4 The contents of quercetin and kaempferol in mulberry leaves harvested from different plant sites in winter

样 品	采集地	槲皮素/mg·g ⁻¹	山柰酚/mg·g ⁻¹
盛东1号	南太湖	4.45	1.84
	塘甸大钱	5.87	2.12
	省农科院	3.33	1.38
农桑14号	练市朱家兜	2.85	1.10
	南太湖	4.41	1.76
	省农科院	3.42	1.34
农桑12号	南太湖	3.95	1.73
	练市镇大洪桥	1.79	0.59
	省农科院	1.94	0.85

注:表中所有样本均采于2005年11月21日

Note: All samples in the table were harvested on 21, November, 2005

3 讨论

据文献报道黄酮苷水解所需的酸浓度通常在1~2 mol·L⁻¹[5],该条件与本试验中水解正交试验结果一致,盐酸浓度太高或太低均会导致水解产率偏低。除正交试验中考察的盐酸浓度外,笔者还在固定其他条件(最优化条件),平行比较了2.0, 1.6, 1.2 mol·L⁻¹3个盐酸浓度下的水解物产率,结果显示1.6 mol·L⁻¹盐酸浓度的产率最高。甲醇浓

度对水解物产率有较大的影响,可能是较高的甲醇浓度有利于黄酮苷的溶出及其苷元的溶解。

槲皮素易发生光解,对照品与水解样品制备及贮存过程中均应注意避光。

本试验测定的水解黄酮苷元仍以冬桑叶为高,与芦丁及异槲皮苷的变化趋势一致^[6],也与中医强调采用“霜桑叶”或“冬桑叶”理念一致。

REFERENCES

- [1] KIM S Y, GAO J J, LEE W C, et al. Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba* [J]. Arch Pharm Res, 1999, 22(1): 81-85.
- [2] KAYO D, TAKASHI K, MITSUKO M, et al. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(2): 151-153.
- [3] WU H H, LI F, QIAN W C, et al. Development of HPLC-fingerprint analysis for the quality assessment of Folium Mori in Huzhou [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28(3): 390-393.
- [4] LIU Y, HU M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(4): 370-377.
- [5] NUUTILA A M, KAMMIOVIRTA K, CALDENTY O, et al. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis [J]. Food Chem, 2002, 76(4): 519-525.
- [6] WU H H, GAO C H, JIANG H D, et al. Determination of chlorogenic acid and main flavone glycosides in Folium Mori [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27(3): 65-68.

收稿日期: 2009-07-13