

桑叶中 1 脱氧野尻霉素的纯化及含量测定

周惠燕,胡晓渝,马英 (浙江医药高等专科学校药学系,浙江 宁波 315100)

摘要:目的 提取纯化桑叶中 1 脱氧野尻霉素 (DNJ),并用柱前衍生化高效液相法进行含量测定。方法 桑叶加 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液超声提取,提取物进行反相柱色谱纯化,纯化物用柱前衍生化 高效液相 荧光检测法测定 DNJ 的含量。结果 桑叶中 DNJ 的含量为 $0.27\% \sim 0.49\%$,纯化物中 DNJ 的含量达到了 10.7% ,DNJ 在 $0.6 \sim 60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内浓度与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9997$),平均回收率为 104.46% 。结论 运用反相色谱技术分离纯化 DNJ 简单易行,含量测定方法精确,重复性好。

关键词:桑叶;1 脱氧野尻霉素;纯化;柱前衍生化;HPLC

中图分类号:R284.2;R917.791;R17.101

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2008)05-0367-03

Purification and Determination of DNJ from Leaves of *Morus alba*

ZHOU Hui-yan, HU Xiao-yu, MA Ying (Department of Pharmacy, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To extract and purify 1-deoxynojirimycin (DNJ) from leaves of *Morus alba* L. and establish a precolumn derivatization HPLC method to determine the content of DNJ. **METHODS** DNJ in *Morus alba* L. leaves were extracted crudely with $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl by ultrasonic, the crude extracts were isolated and purified with reversed-phase column chromatography, then the purified products were determined by HPLC. **RESULTS** Three leave materials collected from different areas were determined and the contents of DNJ in leave were fluctuated from 0.27% to 0.49% . The DNJ content in purified products was 10.7% . The calibration curve was linear over the range of $0.6 \sim 60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9997$) and the average recovery was 104.46% . **CONCLUSION** A simple technology for the extraction and purification of DNJ in *Morus alba* L. Leaves is investigated. The determination method for DNJ is accurate and repeatable.

基金项目:2005年浙江省青年教师资助计划项目(编号:245)

作者简介:周惠燕,女,硕士,讲师

Tel: (0574) 88222793

E-mail: hzhxiaohui@hotmail.com

1-脱氧野尻霉素 (1-脱氧氮杂-D-葡萄糖, 1-deoxynojirimycin), 简称为 DNJ 是存在桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 桑叶和桑皮中的主要活性成分。DNJ 能有效抑制所有哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶, 对糖尿病、肿瘤、病毒感染 (特别是 HIV) 等显示出良好的生物活性^[1-3]。目前已经发现 DNJ 在天然产物中有两大来源: 植物来源和微生物来源。其中以桑叶及桑根皮中的含量相对较高。DNJ 的合成目前仅仅处于实验室研究阶段, 现有的 DNJ 实验室合成路线长, 步骤烦琐, 技术要求高, 而且收率低, 因此不能实现工业化的生产^[4]。本实验以桑叶为原料提取 DNJ 以反相柱色谱 MCI gel CHP 20P 和 Sephadex LH-20 纯化 DNJ 并用柱前衍生化-高效液相-荧光检测法测定提取物中 DNJ 的含量。

1 药材、仪器与试剂

药材采自宁波市鄞州高教园区; RE-52C 旋转蒸发仪; Waters 600-996 高效液相, Waters Bondapak C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); MCI gel CHP 20P (三菱化学); Sephadex LH-20 由瑞典 Pharmacia 公司生产, 上海试剂集团进口分装; 乙腈: 色谱纯 (Merck); DNJ 对照品 (Sigma 公司), 芴甲氧羰酰氯 (FMOC-Cl), 盐酸, 硼酸钾 (K_3BO_4), 甘氨酸, 醋酸均为分析纯。

2 提取纯化

桑叶 100 g 加 1 L 的 0.05 mol·L⁻¹ HCl 超声 60 min 得提取液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 取上清液浓缩干燥得固体 I, 固体 I 以适量水溶解过 MCI gel CHP 20P 柱色谱, 以不同浓度的甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 收集含 DNJ 洗脱液并浓缩; 浓缩液过 Sephadex LH-20 色谱柱, 以不同浓度的甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 收集含 DNJ 洗脱液, 浓缩并干燥得到固体 II。

3 含量测定

3.1 样品溶液配制

桑叶 200 mg 加 30 mL 的 0.05 mol·L⁻¹ HCl 超声 30 min 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 取上清液至 50 mL 量瓶中, 水稀释至刻度。

精密称取 2 项下的固体 I 72.6 mg 于 50 mL 量瓶中, 加

水稀释至刻度。

精密称取 2 项下的固体 II 10.5 mg 于 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度。

3.2 对照品溶液配制

精密称取 12.0 mg DNJ 对照品, 加蒸馏水配成 60 μ g·mL⁻¹ 的储备液; 用蒸馏水将储备液稀释为 0.6, 3, 12, 18, 24, 30, 60 μ g·mL⁻¹ 的对照品溶液。

3.3 衍生化方法

分别取上述样品溶液、对照品溶液或空白溶液 10 μ L, 加 10 μ L 的 0.2 mol·L⁻¹ K_3BO_4 (pH 7.0) 缓冲液, 20 μ L 的 5 mmol·L⁻¹ FMOC-Cl (乙腈配置), 摇匀, 20 $^{\circ}$ C 放置 20 min, 再加 10 μ L 0.1 mol·L⁻¹ 甘氨酸, 0.1% 醋酸 950 μ L, 混匀, 取 100 μ L 进样。

3.4 色谱条件

色谱柱: Waters Bondapak C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 25 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1% 醋酸 (50:50); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; λ_{ex} 254 nm; λ_{em} 322 nm; 进样量: 100 μ L。

3.5 线性关系考察

分别取一系列浓度的对照品溶液按“3.3”项的方法进行衍生化, 衍生化后取 100 μ L 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 所得峰面积响应值 A 与样品浓度 C (μ g·mL⁻¹) 进行线性回归, 得线性方程 $A = 214\,650C + 120\,672$ $r = 0.9997$, 表明 DNJ 在 0.6~60 μ g·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系。色谱图见图 1。

3.6 重复进样精密度试验

按照设定的色谱条件进行测定, 同一份对照品溶液衍生化后进样 100 μ L, 重复进样 5 次, 仪器精密度 RSD = 0.75%。

3.7 DNJ 衍生物稳定性考察

同一对照品溶液衍生化后, 在 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 测定, 结果表明 DNJ 衍生物在 12 h 之内是稳定的, RSD 为 0.68%。

3.8 回收率试验

精密称取已知含量的桑叶粉末 6 份, 分别加入对照品溶液 (24 μ g·mL⁻¹) 适量, 按含量测定方法进行测定, 计算加样回收率。结果平均回收率为 104.46%, RSD 为 4.9%。

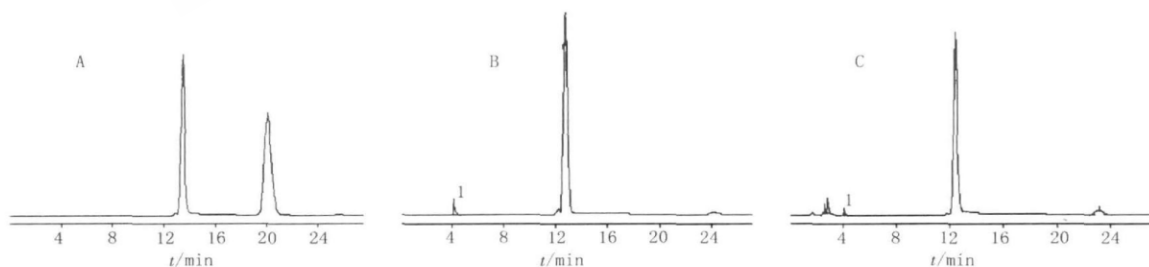


图 1 高效液相色谱图

A-空白色谱图; B-标准品色谱图; C-样品色谱图; 1- DNJ-FMOC1

Fig 1 HPLC chromatogram

A- blank; B- standard; C- sample; 1- DNJ-FMOC1

表 1 加样回收率试验测定结果

Tab 1 Absolute recovery of the assay

桑叶重 /g	桑叶中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率 /%	RSD /%
0.024 7	0.113 7	0.06	0.177 9	107.0	104.46	4.9
0.022 1	0.084 0	0.06	0.148 3	107.2		
0.020 6	0.078 3	0.09	0.171 7	103.8		
0.021 3	0.080 9	0.09	0.179 2	109.2		
0.020 5	0.077 9	0.12	0.203 7	104.8		
0.020 8	0.079 0	0.12	0.192 7	94.76		

3.9 重复性试验

取同一桑叶,按照“3.1”项制备样品溶液,平行制备 6 份,按上述方法测定 DNJ 的含量,结果显示,样品的分析结果稳定,样品峰面积的 RSD 为 0.68%,表明该方法的重复性良好。

3.10 样品测定

取不同采集地点的桑叶样品,以及桑叶经提取纯化后的固体按含量测定方法测定,按外标法计算样品中 DNJ 的含量,结果见表 2。

表 2 不同样品 DNJ 含量测定结果

Tab 2 Results of samples determination

样品	DNJ 含量 /%
桑叶 1	0.49
桑叶 2	0.38
桑叶 3	0.27
固体 I	1.5
固体 II	10.7

4 讨论

FMOC-Cl 是一种氨基衍生化试剂, DNJ 分子中含有胺基结构可和 FMOC-Cl 反应生成具有强烈荧光的衍生物, FMOC-Cl 本身具有强烈的荧光,多余的试剂可加甘氨酸除去。柱前衍生化-高效液相-荧光检测法测定 DNJ 的含量具有准确、选择性强、灵敏度高、重复性好等优点,可用于桑叶提取物中 DNJ 的定量分析。

DNJ 是极高性的化合物,因此本设计应用反相色谱柱分离纯化 DNJ。MCI gel CHP 20P 除了对极高性的糖、氨基酸基本没有吸附作用外,对大多数次级代谢产物均有不同程度的吸附作用。因此, MCI gel CHP 20P 可作为 DNJ 纯化第一步分离的首选担体。Sephadex LH-20 属于 Sephadex 系列担体。它对于非芳香化合物以分子大小的不同来分离。因此,在 DNJ 进一步纯化时选用 Sephadex LH-20。

REFERENCES

[1] HANG S K, YOUNG H K, YOUNG S H, *et al.* α -Glucosidase inhibitors from *comadina communis*[J]. *Hanta Med*, 1999, 65: 437-439.

[2] HIROSHI N, IKUKO K, FU Ch, *et al.* Antihyperglycemic effects of N-containing sugars from *xanthoxeris azmbesiaca*, *monsbombycis*, *aglaonematreubii*, and *castanospermum australe* in streptozotocin diabetic mice[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 397-400.

[3] BUDHAN S P, NAGARAJA M, INDER K. Role of sulfhydryl groups in the function of glucosidase from mammary gland [J]. *J Biol Chem*, 1993, 263(9): 6445-6452.

[4] TIAN L L, LI Z J, LI H. Synthesis of Deoxynojirimycin (DNJ) [J]. *Chin J App Chem(应用化学)*, 2004, 21(1): 13-15.

收稿日期: 2007-07-09