

桑寄生及其寄主植物桑树 1-脱氧野尻霉素含量相关性研究

李永华¹, 苏本伟¹, 张协君¹, 朱开昕², 裴河欢¹, 赵明惠¹, 卢栋^{2*}

(1. 钦州市中医药研究所, 广西 钦州 535000;

2. 钦州市中医院, 广西 钦州 535000)

摘要 目的: 考察桑寄生及其寄主植物桑树 1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量的关系。方法: 采用 RP-HPLC 测定寄生在桑树和非桑树寄主植物上的桑寄生及其寄主植物 DNJ 含量, 样品 DNJ 采用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液提取, 在 pH 8.0 的硼酸盐缓冲溶液条件下, 用茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)与 DNJ 反应生成荧光产物, 然后用高效液相-荧光检测器测定。色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 醋酸(51:49), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30 °C, 荧光检测器激发光 254 nm, 发射光 322 nm。结果: DNJ 的线性范围 3.72 ~ 37.2 mg · L⁻¹ ($r = 0.999$), 加样回收率为 96.42%, 桑树寄主及其桑寄生 DNJ 含量分别为 1.39 ~ 10.16 mg · g⁻¹ 和 0.46 ~ 2.72 mg · g⁻¹ 不等, 非桑树寄主及其桑寄生不含 DNJ, 桑寄生 DNJ 含量最高可达到其桑树寄主 DNJ 含量的 48.0%。结论: 桑寄生以一定量的形式累积其寄主植物桑树 DNJ 特征性成分, 本方法可作为对以桑树为寄主植物的桑寄生药材的质量控制方法。

关键词 桑寄生; 桑树; 1-脱氧野尻霉素; RP-HPLC; 荧光检测

1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)为呋啶类多羟基生物碱, 化学名为 3,4,5-三羟甲基四氢呋啶, 分子式 C₆H₁₃NO₄, 具有抑制 α-葡萄糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、肿瘤转移, 抗病毒, 减肥, 增加胰岛素敏感性生物功能等, 临床上已用于糖尿病治疗且具有显著疗效。作为一种天然产物广泛存在于桑科植物桑(mulberry)中, 桑叶、桑枝、桑白皮等都不同程度含有 DNJ, 作为一种天然产物广泛存在于桑科植物桑中, 桑枝、桑白皮等都不同程度含有 DNJ^[1-4]。桑寄生作为我国传统常用中药材, 自古以来以桑树为寄主的桑寄生得到普适性认同^[5]。本研究对以桑树为寄主的桑寄生及其寄主桑树 DNJ 成分采用 RP-HPLC 法进行分析测定, 并以非桑树寄主的桑寄生及其寄主为对照, 观察 DNJ 在桑寄生以及寄主植物中的含量状况, 为寄主植物对桑寄生药材质量影响评价提供实验依据。

1 材料

DNJ 对照品(Sigma 公司, 纯度 ≥ 98%); 茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl, 纯度 ≥ 99%, Sigma 公司); 乙腈(美国 Fisher 公司, 色谱纯); 桑寄生药材对照品(中国药品生物制品检定所, 批号为 121075-200402); 甘氨酸(Gly, 国药集团化学试剂有限公司, 批号为 F20090805), 水为超纯水, 其他化学试剂均为分析纯。以桑树为寄主的桑寄生采自钦州市中医药研究所桑寄生种植基地, 非桑树寄主的桑寄生采自广西钦州桑寄生生长的野生环境, 采集时间为 2010 年 7 月。桑寄生药材基原植物经中科院华南植物研究所丘华兴研究员鉴定为桑寄生科钝果寄生属广寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser, 寄主植物分别为鸡桑 *Morus australis* Poiret.、广东桑 *M. atropurpurea* Roxb.、夹竹桃 *Nerium indicum* Mill 等。将采集的样品洗净阴干, 枝、叶分开粉碎过 60 目备用。

高效液相色谱仪(Waters 公司, 2695 型), 荧光检测器(Waters 公司, 2475 型), Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Millennium 色谱数据处理工作站, 涡旋混合仪, 高速冷冻离心机, 可调式微量移液器(Thermo), 0.45 μm 微孔滤膜等。

稿件编号 20101106005

基金项目 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013264)

通信作者 * 卢栋, Tel(0777) 2878333, Fax(0777) 2878678, E-mail: qzszzyld@163.com

作者简介 李永华, 高级工程师, 主要从事天然药物开发研究工作, Tel: (0777) 2878443, Fax: (0777) 2878678, E-mail: liyonghua185@126.com

2 方法

2.1 样品及桑寄生药材对照品 DNJ 提取 准确称取样品或药材对照品 0.2 g, 加入 20 mL 0.05 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液, 超声波提取 30 min, 以 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 把沉淀样渣再加入 20 mL 0.05 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液超声重复提取 1 次, 离心, 合并 2 次上清液, 加蒸馏水定容至 50 mL, 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 DNJ 对照品 1.86 mg, 溶于 0.05 mol · L⁻¹ 盐酸溶液中并定容至 50 mL, 得标准溶液母液, 质量浓度为 37.2 mg · L⁻¹, 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 DNJ 衍生化硼酸盐缓冲液 pH 的确定 取 3 个 1.5 mL 离心管, 准确吸取样品溶液 10 μL, 分别加入 pH 7.50, 8.00, 8.50 硼酸盐缓冲液 10 μL, 再加入 20 μL 5 mmol · L⁻¹ FMOC-Cl 的乙腈溶液, 涡旋 30 s 混匀后 25 °C 水浴中反应 20 min, 加入 10 μL 0.1 mol · L⁻¹ 的 Gly, 中和剩下未反应的衍生化试剂, 中止反应, 再加入 950 μL 0.1% 的醋酸水溶液, 混匀后过 0.45 μm 微孔滤膜后取 10 μL 进样分析, 确定最佳的 DNJ 衍生化 pH。

2.4 对照品和样品衍生化反应 取对照品或样品溶液 10 μL 加入 1.5 mL 离心管中, 根据 2.3 实验结果加入 10 μL 硼酸盐缓冲液, 再加入 20 μL 0.5 mmol · L⁻¹ FMOC-Cl 的乙腈溶液, 涡旋 30 s 混匀后 25 °C 水浴中反应 20 min, 加入 10 μL 0.1 mol · L⁻¹ 的 Gly, 中和剩下未反应的衍生化试剂, 中止反应, 再加入 950 μL 0.1% 的醋酸水溶液, 混匀后过 0.45 μm 微孔滤膜后取 10 μL 进样分析。

2.5 空白对照衍生化反应 以蒸馏水代替对照品或样品溶液进行衍生化反应, 设加 Gly 或不加 Gly, 衍生化反应过程同 2.4, 过 0.45 μm 微孔滤膜后取 10 μL 进样分析。

2.6 RP-HPLC 流动相(乙腈-0.1% 醋酸)的确定 按照 2.4 依法衍生化后将对照品或样品进样, 流动相乙腈-0.1% 醋酸分别采用 56:44, 51:49, 46:54, 确定最佳的流动相比例为 51:49。

2.7 线性关系考察 取标准溶液母液用 0.05 mol · L⁻¹ 盐酸溶液依次稀释成质量浓度为 3.72, 7.44, 14.88, 22.32, 29.76, 37.2 mg · L⁻¹ 的 DNJ 对照品溶液, 分别吸取 10 μL 衍生化后进样测定峰面积, 以峰面积对 DNJ 浓度进行回归分析, 绘制标准曲线, 计

算回归方程。

2.8 DNJ 含量检测 取衍生化后样品或药材对照品溶液 10 μL 进行 RP-HPLC 检测。色谱条件 Agilent 色谱柱为 C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相采用 2.6 的确定结果, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长激发光 254 nm, 发射光 322 nm。

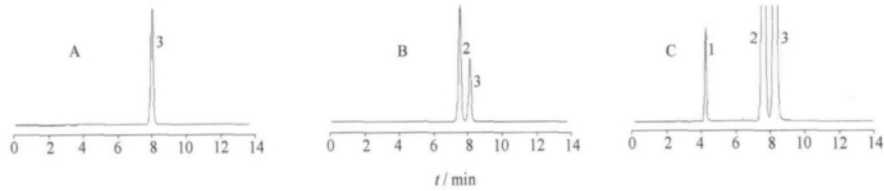
3 结果

3.1 对照品和样品 DNJ 衍生化硼酸盐缓冲液 pH 的确定 DNJ 衍生化反应条件温和, 主要受温度、缓冲液 pH、反应时间的影响。本实验对比分析了硼酸盐缓冲液 pH 7.50, 8.00, 8.50 条件下的实验结果, 发现硼酸盐缓冲液 pH 对衍生化反应影响最大, 影响检测峰型及衍生化效果等, 其中缓冲液 pH 8.0 时检测效果最好, pH 7.50 时衍生化反应不完全, 稳定性差, pH 8.50 时不仅峰形不好, 还出现了很多杂质峰, 稳定性也随之降低。

3.2 流动相对比对检测结果的影响 本实验考察不同配比的流动相对 DNJ 保留时间和峰形的影响。结果发现, DNJ 的保留时间和峰形受流动相的配比影响较大, 当乙腈-0.1% 醋酸 56:44 时, 不同峰之间距离过近, 目标峰与杂质峰不能很好分离; 当乙腈-0.1% 醋酸 46:54 时, 出峰时间延长, 峰与峰之间距离过远, 并有拖尾现象; 当乙腈-0.1% 醋酸 51:49 时, 目标峰与杂质峰能很好分离, DNJ 的保留时间、峰形都取得令人满意的结果。

3.3 DNJ 的 RP-HPLC 图谱峰确定 在上述确定的色谱条件下分析 DNJ 对照品和空白对照的衍生化反应产物, 色谱图结果见图 1, 不加 DNJ 和 Gly 的色谱图只显示出色谱峰 3, 不加 DNJ 但加 Gly 的色谱图显示出色谱峰 2 和色谱峰 3, 加 DNJ 对照品溶液和 Gly 的色谱图显示出 3 个主色谱峰, 分别为色谱峰 1、色谱峰 2 和色谱峰 3, 其中色谱峰 1 的峰面积随 DNJ 浓度变化而变化, 由此推断色谱峰 1 为 FMOC-DNJ 色谱峰, 色谱峰 2 为 FMOC-Gly 色谱峰, 色谱峰 3 为 FMOC-OH 色谱峰。从图 1 可以看出, DNJ 与 FMOC-Gly, FMOC-OH 得到良好的分离, 衍生化反应后的副产物 FMOC-OH 和 FMOC-Gly 均不会干扰 DNJ 成分的测定。

3.4 线性关系考察结果 根据测定结果绘制标准曲线得回归方程为 $Y = 96482X - 9250$, $r = 0.9999$ 。表明 DNJ 质量浓度在 3.72 ~ 37.2 mg · L⁻¹, 其浓度与对应的峰面积呈现良好的



A. 空白对照(未加 GLY); B. 空白对照(加 GLY); C. DNJ 标品; 1. FMOC-DNJ; 2. FMOC-Gly; 3. FMOC-OH。

图 1 DNJ 对照品以及空白对照色谱图

线性关系。

3.5 精密度 精密吸取同一批供试品衍生化液 10 μL , 重复进样 7 次, 分别测定 DNJ 的含量, RSD 0.69% ($n = 7$), 结果说明本设备精密度好。

3.6 稳定性 取同一批供试品衍生化液, 分别于 0, 4, 8, 16, 24, 48, 72 h 测定, RSD 1.2% ($n = 7$)。结果表明, DNJ 衍生化后在 72 h 内稳定。

3.7 重复性 精密称取样品 5 份, 依法提取及衍生化后测定 DNJ 含量, RSD 1.5% ($n = 5$)。结果表明, 本方法的重复性高。

3.8 加样回收率 精密称取已测知 DNJ 含量的样品 5 份, 分别精密加入一定量的 DNJ 标准品, 依法提取及衍生化后测定 DNJ 含量, 平均加样回收率为 96.42%, RSD 0.97%, 结果见表 1。本测定方法具有较高的回收率, 符合实验的要求。

表 1 1-脱氧野尻霉素加样回收率

样品质量/g	DNJ 量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.100 6	0.131 6	0.273 9	95.634 3	96.42	0.97
0.100 9	0.132 0	0.274 3	95.653 7		
0.101 2	0.132 4	0.278 2	98.029 1		
0.100 8	0.131 8	0.274 5	95.862 0		
0.100 9	0.132 0	0.276 2	96.919 7		

注: 加入量均为 0.148 8 mg。

3.9 样品 DNJ 含量测定 精密吸取各样品(包括药材对照品)溶液 10 μL , 依法衍生化后测定桑寄生药材及其寄主植物的 DNJ 含量。不同样品及对照药材的色谱图见图 2, 结果见表 2。

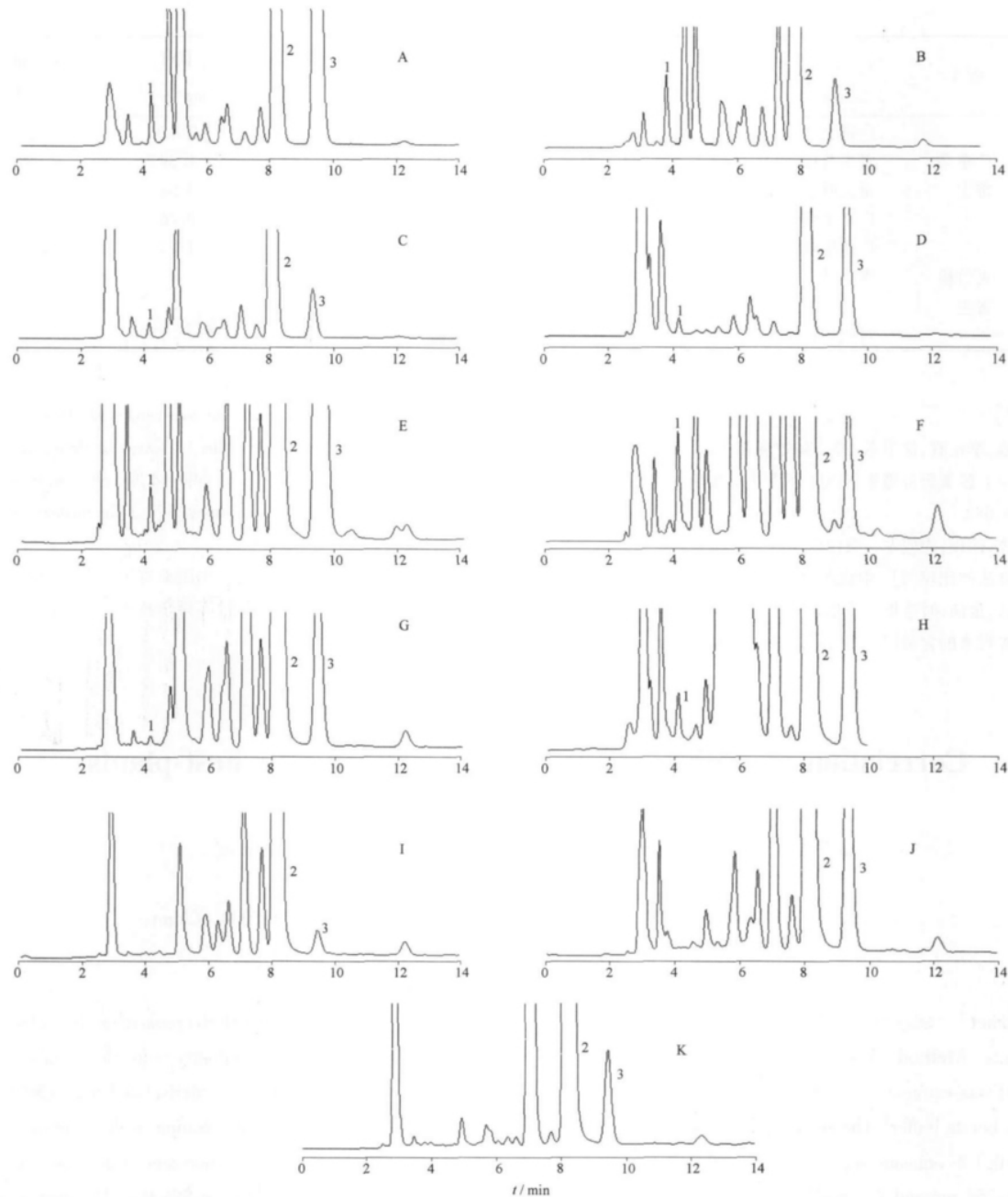
4 讨论

4.1 桑寄生及其寄主植物桑树 DNJ 含量 DNJ 的测定结果表明, 不同的寄主桑种类, DNJ 的含量也不同, 鸡桑比广东桑的 DNJ 含量高, 同样寄生在不同种类桑的桑寄生 DNJ 含量也不同, 寄生在鸡桑的桑寄生 DNJ 比寄生在广东桑的桑寄生高; 同一寄主植物的不同部位 DNJ 含量不同, 桑叶比茎枝含量高, 反映在同一寄主植物上的桑寄生药材叶也比桑寄生茎枝高, 桑寄生药材叶和茎枝与其寄主植物相应部位的 DNJ 相对含量达到 26.8% ~ 48.0% 不等。

4.2 寄主植物对桑寄生药材的质量影响 对以桑树和非桑树寄主的桑寄生及其寄主植物中 DNJ 含

量测定结果可以看出, DNJ 为寄主桑树(鸡桑、广东桑)的固有成分, 桑寄生因寄生在桑树寄主植物而含有 DNJ, 非桑树寄主植物(夹竹桃)没有 DNJ 成分, 寄生在非桑树寄主植物(夹竹桃)上的桑寄生也检测不到 DNJ 成分, 而桑寄生药材对照品因寄主不明, 检测不到 DNJ 成分, 推断其寄主可能亦是非桑树植物。实验结果提示桑寄生可能会以累积寄主固有物质的方式累积其桑树寄主的 DNJ, 在某种意义上也说明寄主植物通过其固有物质向桑寄生输送并在桑寄生中达到一定量的累积来影响桑寄生药材的质量。

由于 DNJ 属于桑树寄主植物的固有物质成分, 桑寄生因寄生在桑树寄主植物上而含有 DNJ 成分, 本方法对 DNJ 成分的检测可用于对以桑树为寄主植物的桑寄生药材质量控制, 并以此区别于其它非桑树寄主来源的桑寄生药材。



A. 寄主鸡桑茎枝; B. 寄主鸡桑叶; C. 桑寄生茎枝(鸡桑寄主); D. 桑寄生叶(鸡桑寄主); E. 寄主广东桑茎枝; F. 寄主广东桑叶; G. 桑寄生茎枝(寄主广东桑); H. 桑寄生叶(寄主广东桑); I. 寄主夹竹桃叶; J. 桑寄生叶(寄主夹竹桃); K. 桑寄生药材对照品; 1. FMOC-DNJ; 2. FMOC-Gly; 3. FMOC-OH。

图2 桑寄生及其寄主植物 HPLC 图

表2 桑寄生药材及其寄主植物中 DNJ 含量测定

No.	寄主	样品	称样量 /g	保留时间 /min	峰面积	DNJ /mg · g ⁻¹	相对含量/% (寄生/寄主)
1	鸡桑 寄主	寄主茎枝	0.203 4	4.118	1 420 849.3	5.96	
		寄主叶	0.202 2	4.131	2 409 763.3	10.16	
		广寄生茎枝	0.203 4	4.120	578 730.3	2.43	40.8

续表 2

No.	寄主	样品	称样量 /g	保留时间 /min	峰面积	DNJ /mg · g ⁻¹	相对含量/% (寄生/寄主)
2	广东桑 寄主	广寄生叶	0.203 5	4.130	648 918.0	2.72	26.8
		寄主茎枝	0.202 7	4.121	329 920.7	1.39	
		寄主叶	0.202 2	4.131	847 845.0	3.58	
		广寄生茎枝	0.200 7	4.122	107 319.5	0.46	33.1
		广寄生叶	0.202 6	4.116	408 065.5	1.72	48.0
3	夹竹桃	寄主叶	0.203 1	—	—	—	
	寄主	广寄生叶	0.203 8	—	—	—	
4		对照药材	0.204 6	—	—	—	

参考文献

- [1] 欧阳臻,李永辉,徐卫东,等. 高效液相色谱-荧光检测法测定桑叶中1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(9):682.
- [2] 陈正收,徐瑾,周应军. 桑白皮药材中1-脱氧野尻霉素的两种测量方法的比较[J]. 中成药,2007,29(11):1654.
- [3] 张作法,金洁,时连根. 反相高效液相色谱法测定桑枝中1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 中国药理学杂志,2007,42(7):535.
- [4] Jin-Won Kim,Soo-Un Kim,Heui Sam Lee, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A,2003,1002:93.
- [5] 李永华,阮金兰,陈士林,等. 中国桑寄生科 Lorantheaceae 药用植物资源学研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2009,11(5):665.

Correlation of DNJ between Taxilli Herba and its host-plants

LI Yonghua¹, SU Benwei¹, ZHANG Xiejun¹, ZHU Kaixin², PEI Hehuan¹,
ZHAO Minghui¹, LU Dong^{2*}

(1. Academy of Traditional Medicine and Pharmacy of Qinzhou, Qinzhou 535000, China;
2. Chinese Medicine Hospital of Qinzhou, Qinzhou 535000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation of 1-deoxynojirimycin (DNJ) between Taxilli Herba parasitized in mulberry and its host-plants. **Method:** The contents of DNJ of Taxilli Herba parasitized in mulberry and non-mulberry were determined by RP-HPLC. DNJ was extracted with 0.05 mol · L⁻¹ HCl, and then detected by fluorescence detector after derivatized with FMOC-Cl at pH8.0 with borate buffer. The separation was performed on an Agilent C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a mobile phase of acetonitrile-0.1% aqueous acetic acid (51:49) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The wavelength of fluorescence detector was operated at λ_{EX} = 254 nm and λ_{EM} = 322 nm. **Result:** The linear range of DNJ was 3.72-37.2 mg · L⁻¹ (r = 0.999 9). The average recovery was 96.42%. The contents of DNJ in mulberry and Taxilli Herba parasitized in mulberry were 1.39-10.16 mg · g⁻¹ and 0.46-2.72 mg · g⁻¹, respectively. However, the contents of DNJ could not be detected in Taxilli Herba parasitized in non mulberry and its host-plants. **Conclusion:** As the characteristic constituent of mulberry, DNJ was accumulated in Taxilli Herba. This method can be applied to the quality control of Taxilli Herba from mulberry.

[Key words] Taxilli Herba; mulberry; 1-deoxynojirimycin; RP-HPLC; fluorescence detection

doi: 10.4268/cjcm20111520

责任编辑 丁广治