

# 不同季节桑叶中1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量的测定

欧阳臻, 陈 钧

(江苏大学生物与环境工程学院制药工程系 江苏 镇江 212013)

**摘 要:**建立了柱前荧光衍生-高效液相色谱法测定桑叶中1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量的方法。并对不同生长季节桑叶药材的DNJ含量进行测定。桑叶经0.05mol/L盐酸提取,在pH8.5的硼酸盐缓冲液条件下,用茚甲氧酰氯(FMOC-Cl)与DNJ反应生成荧光产物,然后用高效液相色谱-检测器测定。流动相为乙腈-0.1%醋酸(55:45,V/V);流速:1.0ml/min;柱温25℃;荧光检测器激发波长254nm,发射波长322nm。线性范围为0.567~34μg/ml( $r=0.9999$ ),平均回收率为97.2%。测定结果表明,桑叶中DNJ含量与生长季节、温度有关,七、八月份DNJ含量最高。该方法准确、灵敏度高,重现性好,可用于桑叶中DNJ的定量分析。

**关键词:**桑叶;1-脱氧野尻霉素(DNJ);高效液相色谱法;荧光衍生化

## Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. Leaves in Different Seasons

OUYANG Zhen, CHEN Jun

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatographic method for the determination of DNJ in *Morus alba* L. leaves with fluorimetric detection after precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was established. The contents of DNJ in *Morus alba* L. collected within different vegetative periods were determined. DNJ in *Morus alba* L. leaves was extracted with 0.05mol/L HCl, derivatized with FMOC-Cl, and analyzed by high performance liquid chromatography equipped with fluorescence detector. Mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% aqueous acetic acid (55:45, V/V) with a flow rate of 1.0ml/min. The calibration curve was linear over the concentration range from 0.567 μg/ml to 34 μg/ml, the correlation coefficient was 0.9999. the average recovery was 97.2%, RSD was 1.97 (n=6). The results showed that the content of DNJ in leaves of *Morus alba* L. is relative to the vegetative periods and temperature, the highest content of DNJ in leaves of *Morus alba* L. collected at July and August. The method used this paper was reliable, accurate and stable. It can be used for determination of the DNJ in leaves of *Morus alba* L.

**Key words:** Leaves of *Morus alba* L.; 1-deoxynojirimycin; high performance liquid chromatography; precolumn derivatization

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)10-0211-04

桑叶为桑科 Moraceae 植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,始载于《神农本草经》,味苦、甘,性寒,归肺、肝经,具有疏风清热、平肝明目的功效;历代中医药书籍中记载桑叶能够治疗消渴症,近代医家也常将桑叶用于治疗糖尿病,且取得满意疗效。现代药理研究表明桑叶有效成分之一多羟基生物碱具有显著的降

血糖作用<sup>[1,2]</sup>,而1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)为桑叶中多羟基生物碱的一种特征性成分(一种糖苷酶抑制剂)<sup>[3]</sup>,是降血糖的主要活性成分,因此建立一种可靠的桑叶中DNJ的含量测定方法以控制药材质量很有必要。目前, DNJ主要是采用硅烷衍生化后用GC-MS法鉴定其结构<sup>[4-7]</sup>,因其分子结构中缺少发色团,很难

收稿日期: 2004-07-04

基金项目: 江苏省农业科技攻关项目(BE2004352)

作者简介: 欧阳臻(1964-),女,博士,副教授,主要从事天然产物有效成分的研究及新药开发。

采用高效液相色谱法直接测定含量。有关采用高效液相色谱法对桑叶中DNJ进行含量测定的文献报道较少<sup>[8]</sup>。本实验利用荧光试剂茚甲氧酰氯(FMOC-Cl)与DNJ柱前衍生,然后用高效液相色谱法进行分离测定,方法简便快速,灵敏准确,并具有衍生反应可于室温下进行,反应速度快,操作步骤简单,衍生物稳定等特点。本方法用于桑叶中DNJ的测定,取得了满意的效果,并对不同生长季节桑叶药材的DNJ含量进行测定,从而初步揭示了桑叶中1-脱氧野尻霉素含量随季节变化的规律。国内尚未见同类报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器

JASCO LC1500高效液相色谱系统 日本分光公司,配有JASCO FP-1520智能荧光检测器, JASCO PU-1580泵, JASCO DG-1580-54四通道脱气器, JASCO LG-1580-04四通道梯度器, JASCO CO-1560柱恒温箱; N2000色谱处理工作站 浙江大学智能研究所; METTLER AE240分析天平 上海托利多-梅特勒仪器有限公司; 台式冷冻高速离心机TGLL-18K 江苏太仓华美生化仪器有限公司; 电热恒温水箱 上海跃进医疗器械厂; 1810型双重纯水蒸馏器 上海申立玻璃仪器有限公司。

#### 1.1.2 材料和试剂

乙腈色谱纯 德国默克公司; 水为重蒸馏水 本实验室自制; FMOC-Cl Sigma公司; 甘氨酸 华美生物工程公司, 纯度大于98%; 其余试剂均为分析纯。DNJ标准品 日本北陆大学(Hokuriku University) 纯度大于98%; 桑叶 2003年5~11月采自江苏大学桑树种植园, 经镇江市药检所主任药师陈黎鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L.的叶, 低温干燥粉碎后(过40目筛)备用。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 色谱条件

色谱柱: HiQSi LC18分析柱(5 $\mu$ m, 250mm  $\times$  4.6mm)及ODS3预柱(5 $\mu$ m, 10mm  $\times$  4.6mm); 流动相: 乙腈-0.1%醋酸(55:45, V/V); 流速: 1.0ml/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 荧光检测器激发波长 254nm, 发射波长 322nm; 进样量 10 $\mu$ l。

### 1.2.2 样品处理

#### 1.2.2.1 桑叶中DNJ提取

准确称取0.2g干燥的桑叶粉末于10ml的离心管中, 加入10ml 0.05mol/L的盐酸溶液, 涡旋混合30s, 离心15min(转速12000r/min), 取上清液, 残渣再加入10ml 0.05mol/L的盐酸溶液同前重复提取一次, 合并两次提取液, 置50ml容量瓶中加蒸馏水定容至50ml, 备用。

#### 1.2.2.2 衍生化过程

取上述提取液10 $\mu$ l于1.5ml的离心管中, 加10 $\mu$ l硼酸盐缓冲液(pH8.5), 再加入20 $\mu$ l 5mmol/L FMOC-Cl的乙腈溶液, 混匀后于20 $^{\circ}$ C水浴反应20min, 之后加入10 $\mu$ l 0.1mol/L的甘氨酸, 让剩余的衍生化试剂反应, 最后加入950 $\mu$ l 0.1%(V/V)的醋酸水溶液, 混匀后用0.45 $\mu$ l的一次性针头过滤器过滤后, 取10 $\mu$ l进样分析。

#### 1.2.3 标准溶液的制备

称取3.4mg DNJ标准品定容于100ml蒸馏水中, 得标准溶液母液。用蒸馏水将母液稀释成0.567、1.133、2.266、3.399、5.67、11.33、34 $\mu$ g/ml的标准溶液系列。分别取10 $\mu$ l标准溶液, 同上述衍生化步骤衍生和液相色谱分析。

#### 1.2.4 空白溶液的制备

取蒸馏水10 $\mu$ l于1.5ml的离心管中, 加10 $\mu$ l硼酸盐缓冲液(pH8.5), 再加入20 $\mu$ l 5mmol/L FMOC-Cl的乙腈溶液, 混匀后于20 $^{\circ}$ C水浴反应20min, 之后加入20 $\mu$ l 0.1mol/L的甘氨酸, 让衍生化试剂反应, 最后加入950 $\mu$ l 0.1%(V/V)的醋酸水溶液, 混匀后用0.45 $\mu$ l的一次性针头过滤器过滤后, 取10 $\mu$ l进样分析。

#### 1.2.5 标准曲线的制作

取标准溶液系列进样测定。以标准溶液浓度X对色谱峰面积Y进行线性回归, 结果表明在0.567~34 $\mu$ g/ml浓度范围内成良好的线性关系, 回归方程 $Y=3204.4+36892X$ , 相关系数 $R=0.9999$ 。按三倍基线噪音计算检测限为0.03 $\mu$ g/ml。

#### 1.2.6 DNJ衍生物的稳定性试验

将衍生后的DNJ标准溶液置冰箱4 $^{\circ}$ C保存。于1、10、15、30d按上述色谱条件分别测定, 考察其稳定性。

#### 1.2.7 重现性试验

在上述色谱条件下, 对同一样品按1.2.2.1、1.2.2.2方法平行制备5份, 精密吸取10 $\mu$ l进样测定其DNJ含量。

#### 1.2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的桑叶药材粉末5份, 每份约0.1g, 分别加入标准溶液(34 $\mu$ g/ml)7ml, 按1.2.2.1、1.2.2.2方法制备, 精密吸取10 $\mu$ l进样测定, 按外标法测定其含量, 计算加样回收率。

#### 1.2.9 不同采集期桑叶中DNJ含量测定

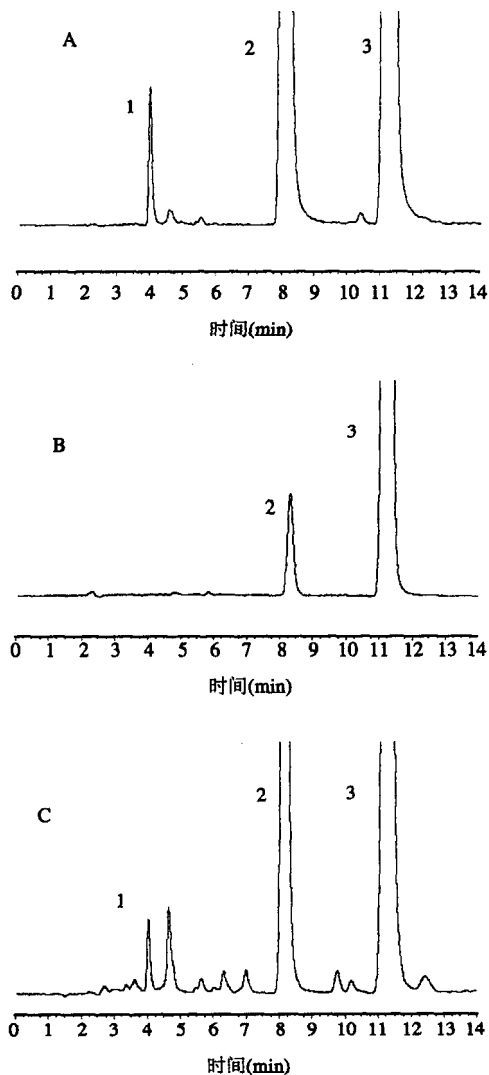
精密称取不同采集期的桑叶粉末各0.2g, 根据1.2.2.1、1.2.2.2方法制备样品溶液, 精密吸取10 $\mu$ l进样测定, 按外标法测定其含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

2.1.1 高效液相色谱图

在上述色谱条件下得到DNJ的标准色谱图(图1A),空白色谱图(图1B),桑叶药材样品色谱图(图1C)。从图1可以看出,样品中的DNJ与相邻组分均得到良好的基线分离,试剂的水解副产物FMOC-OH,和Gly-FMOC均不干扰组分的测定。



A. 标准色谱图; B.空白色谱图; C.桑叶药材样品色谱图  
1. DNJ-FMOC; 2. Gly-FMOC; 3. FMOC-OH

图1 样品高效液相色谱图

2.1.2 DNJ衍生物的稳定性 结果显示DNJ衍生物在4冰箱保存一个月基本稳定。RSD为3.85%。

2.1.3 重现性 以同批桑叶为样品测定其DNJ含量,检验此测定方法的重现性,结果见表1。DNJ的平均含量为0.243%,RSD为2.46%(n=5)。

2.1.4 回收率

表1 DNJ 重现性试验

样品号	1	2	3	4	5
DNJ 含量(%)	0.236	0.245	0.244	0.251	0.238

精密称取已知含量的桑叶药材粉末5份,测定加样回收率,结果见表2。

表2 DNJ加样回收率的试验

样品量(g)	样品中含量(mg)	标准加 入量(mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.1002	0.2404	0.238	0.4749	98.5		
0.1005	0.2412	0.238	0.4698	96.1		
0.1008	0.2419	0.238	0.4805	100.3		
0.1012	0.2429	0.238	0.4750	97.5	97.2	1.97
0.1004	0.2409	0.238	0.4677	95.3		
0.1007	0.2416	0.238	0.4694	95.7		

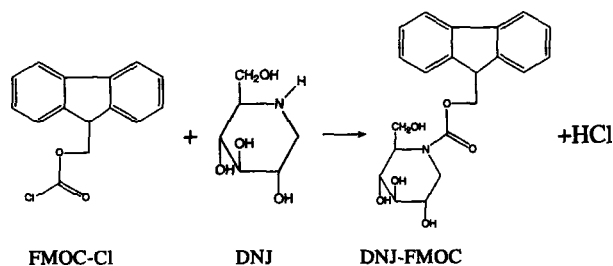
2.1.5 不同采集期桑叶中DNJ的含量测定 测定不同采集期桑叶样品中DNJ的含量,结果见表3。

表3 不同采集期桑叶中的DNJ含量测定结果(n=3)

样品	采集时间	DNJ 含量(%)	RSD(%)
1	2003.5	0.12	3.09
2	2003.6	0.17	2.06
3	2003.7	0.24	2.41
4	2003.8	0.24	3.16
5	2003.9	0.15	2.09
6	2003.10	0.084	4.01
7	2003.11	0.076	2.12

2.2 讨论

2.2.1 衍生化反应方程式



FMOC-Cl是一种较新的氨基酸衍生化试剂,主要用于伯胺和仲胺的衍生化,反应后的衍生物具有稳定的荧光强度。而DNJ分子中具有仲胺结构,因此可以采用FMOC-Cl作为衍生化试剂进行衍生化。由于FMOC-Cl本身具有强烈的荧光,所以衍生化反应后必须除去多余的试剂才能进入色谱柱。本实验在衍生化反应后加入一定量的甘氨酸以除去多余的荧光试剂。

### 2.2.2 检测波长的选择

取 DNJ 衍生化产物进行进样, 分别固定激发波长和发射波长进行扫描, 结果显示, DNJ 衍生物的最大激发波长为 254nm; 最大发射波长为 322nm。

2.2.3 在实验过程中发现缓冲液的 pH 值对衍生化反应影响最大, 保持缓冲液 pH8.5 时, 反应的衍生产物稳定性最好。

### 2.2.4 柱温、流速和流动相比比例的选择

保持其他条件不变, 对柱温(15~30)、流动相流速(0.5~1.5ml/min)、流动相比(乙腈:0.1%醋酸水比例 40:60~60:40)进行正交试验。结果在柱温 25、流速 1.0ml/min、流动相乙腈-0.1%醋酸水比例 55:45 的条件下, 峰型最佳, 峰的分离最好。

## 3 结论

柱前荧光衍生-高效液相色谱法用于测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量具有准确、选择性强、灵敏度高、重现性好等特点, 可用于桑叶中 DNJ 的定量分析。对不同生长季节桑叶中生物碱 DNJ 测定结果表明, 生物碱(DNJ)含量与生长季节有关, 5 月份含量较低, 6 月份逐渐增高, 7、8 月份最高, 9、10 月份又逐渐降低, 这些变化显示, 桑叶中生物碱 DNJ 含量与气候温度也有关, 7、8 月份气温较高, DNJ 含量最高, 9 月份后随着气温下降, DNJ 含量也逐渐下降, 初步揭示了桑叶中 1-脱氧野尻霉素含量随季节变化的规律。这为桑叶的开发利用提供了依据。

### 参考文献:

- [1] Asano N, et al. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 259(2):243.
- [2] Kimuar M, et al. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, 1995, 12(3):214-219.
- [3] Hiroshi Nojima, Ikuko Kimura, Fu-jun Chen, et al. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars from *xanthocercis aznbesia*, *morus bombycis*, *aglaonema treubii*, and *castanospermum australe* in streptozotocin-diabetic mice[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61:397-400.
- [4] Kite GC, Sharp HJ, Hill PS, et al. Polyhydroxyalkaloids in the Aroid Tribes Nephthytideae and Aglaonemateae: Phytochemical Support for an Intertribal Relationship[J]. *Biochem System Ecol*, 1997, 25:757-766.
- [5] Keiner CR, Drager B. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants[J]. *Plant Sci*, 2000, 150:171-179.
- [6] Asano N, Nishida M, Miyauchi M, et al. *Phytochem*, 2000, 53(3):379-382.
- [7] Kite, Geoffrey C. Taxonomic significance of the trihydroxypicolinic acid 'BR1' in *Baphiopsis parviflora* (Leguminosae) *Biochem[J]. System and Ecol Volume*, 2003, 31(1):45-50.
- [8] Kim J W, Kim S U, Lee H S, et al. *J Chromatogr A*, 2003, 1002(1-2):93-99.

邮局发行 代号32-31 欢迎订阅

## 《中国稻米》

《中国稻米》杂志, 是由农业部主管, 中国水稻研究所主办, 全国农业技术推广服务中心、农业部稻米及制品质量监督检验测试中心等单位共同协办的一份为稻与米生产和科技发展服务的全国性综合性杂志, 兼有技术性、信息性、学术性、知识性和趣味性等特点, 遵循提高与普及相结合, 重在普及的办刊方针, 着重介绍全国各地水稻新品种、稻作新技术及生产经营经验, 包括稻田开发、稻谷(米)深加工、稻农致富有关的题材。本刊为双月刊, 标准大 16 开本, 单月 20 日出版。每期定价 5.00 元, 全年 30.00 元, 公开发行, 邮发代号: 32-31, 欢迎新老读者及时到当地邮局订阅, 如错过订期, 也可直接汇款至本刊编辑部订阅。另, 附邮资 1 元即可试读一期。愿意代理发行的请与编辑部联系。

地址: 杭州市体育场路 359 号 邮政编码: 310006

电话(传真): (0570)63370271

E-mail: zgdm@163.com

网址: www.zgdm.net