

荧光衍生生化法测定不同季节桑叶中 1-脱氧野尻霉素的含量

李继文^{1,2} 郭晓燕² 王 腾² 李翠清^{2,*}

(1.北京化工大学化学工程学院 北京 100029;

2.北京石油化工学院化学工程学院 北京 102617)

摘要:目的:建立测定桑叶中1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)含量的方法,并比较不同季节桑叶中1-DNJ的含量。方法:采用高效液相色谱法测定,以茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)为柱前衍生生化试剂,对衍生生化条件进行了优化;色谱柱为Kromasil C₁₈柱(4.6mm×250mm 5μm),流动相为乙腈-0.1%醋酸(50:50),流速1.0mL/min,柱温30℃,荧光检测器激发波长254nm,发射波长322nm。结果:1-DNJ在10~35mg/L范围内线性良好($r=0.99959$),检测限为0.80mg/L(S/N=3),平均回收率为95.38%,相对标准偏差2.28%($n=5$)。桑叶中1-DNJ的含量在不同生长季节间存在显著差异。结论:方法简便、快速、准确,适用于桑叶中1-DNJ含量的定量分析。

关键词:桑叶 1-脱氧野尻霉素 高效液相色谱法 荧光衍生化

Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves of different seasons by fluorometric derivatization

LI Ji-wen^{1,2} GUO Xiao-yan² WANG Teng² LI Cui-Qing^{2,*}

(1.Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2.Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China)

Abstract: Objective: To develop a high performance liquid chromatographic method for the determination of 1-deoxynojirimycin (DNJ) in *Morus alba* L. leaves and contrast the content of 1-DNJ in different seasons. Methods: The separation was performed with a Kromasil C₁₈ column (4.6mm × 250mm 5μm) at 30°C and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% aqueous acetic acid (50:50), at the rate of 1.0mL/min. The 1-DNJ marked with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) was detected at excitation wavelength of 254nm and emission wavelength of 322nm. Results: The calibration curve was linear over the concentration range from 10mg/L to 35mg/L ($r=0.99959$), the limit of detection was 0.80mg/L (S/N=3) and the average recovery was 95.38% (RSD=2.28%). The results showed that the content of 1-DNJ was significantly different in different seasons. Conclusion: This method was simple, rapid and accurate and was suitable for the determination of 1-DNJ in *Morus alba* L. leaves. Key words: *Morus alba* L. leaves; 1-deoxynojirimycin; high performance liquid chromatography; fluorometric derivatization

中图分类号:TS207.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)12-0462-04

桑叶,是桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶子,异名“铁扇子”,始载于《神农本草经》,性寒、味甘苦,归肺、肝经,具有祛风清热、凉血明目等功效^[1]。1993年我国卫生部公布桑叶为药食两用品,而在《中华人民共和国药典》2010版中也收录桑叶主治风热感冒,肺热燥咳,头晕头痛,目赤昏花^[2]。现代药理学的研究表明,桑叶中含有的独特的生物碱1-脱氧野尻霉素(1-DNJ,结构见图1),是其主要的活性成分之一,

具有显著的药理作用。有研究认为,1-DNJ为α-糖苷酶抑制剂,能有效地降低餐后的血糖浓度,达到预防和治疗糖尿病的效果^[3-8]。我国是世界上最大的桑树种植国,桑树资源丰富,种类繁多,分布广泛,而1-DNJ在桑叶中的含量也随产地及品种的不同有所差异。有关不同产地不同品种桑叶中1-脱氧野尻霉素含量的分析已有报道^[9-10],而有关不同季节桑叶中1-DNJ含量的比较研究报道较少。本文参照国内外有关文献方法^[11-12],并加以优化,采用柱前衍生化高效液相色谱法建立了桑叶中1-DNJ含量的测定方法,并对北京市大兴区安定镇御林古桑园所产的不同生长季节桑叶中的1-DNJ的含量进行了测定,为今后该地区桑叶的综合开发利用提供了指导。

收稿日期:2011-08-29 * 通讯联系人

作者简介:李继文(1983-),男,硕士研究生,研究方向:天然产物化学。
基金项目:教育部科学技术研究重点项目(211003);北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM201110017002)。

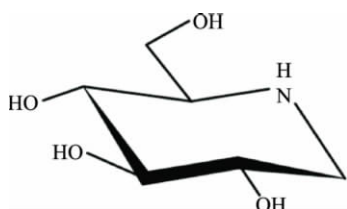


图1 1-脱氧野尻霉素的结构

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑叶 采自北京市大兴区安定镇御林古桑园(经中国食品药品检定研究院张继副研究员鉴定为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶); 1-脱氧野尻霉素标准品(纯度 $\geq 99\%$) 上海同田生物技术有限公司; 茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl) 美国ALDRICH公司; 色谱乙腈、甘氨酸、四硼酸钾 国药集团; 冰醋酸 北京化工厂; 实验用水 为娃哈哈纯净水; 其他试剂 均为分析纯。

Waters2695 高效液相色谱系统 配有Waters2475 荧光检测器和 Empower 操作系统, 美国Waters 公司; SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; SB-4200 DTN 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; 超级恒温水槽 上海跃进医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 桑叶样品的制备 准确称取不同季节的干燥桑叶粉末 1.0g, 加入 0.05mol/L 的盐酸溶液 25mL, 80℃ 下回流 30min, 抽滤, 取滤液, 滤渣再加入 0.05mol/L 的盐酸溶液 25mL 重复提取一次, 合并两次提取液, 浓缩, 置于 10mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 备用。

衍生化过程: 取上述提取液 20 μ L 置于 1.5mL 的离心管中, 加入 0.4mol/L 的硼酸盐缓冲液(pH = 8.5) 20 μ L 及 2mmol/L 的 FMOC-Cl 的乙腈溶液 40 μ L 振荡混匀, 于 25℃ 水浴中反应 20min, 加入 1mol/L 的甘氨酸 20 μ L, 静置 5min, 让多余的衍生化试剂反应完。最后加入 1.5mL 0.1% (V/V) 的醋酸水溶液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后取 10 μ L 进行色谱分析。

1.2.2 标准溶液的制备

1.2.2.1 标准储备溶液 精密称取一定量的 1-DNJ 标准品于 10mL 容量瓶中, 用纯净水定容, 得到浓度为 1.0g/L 的 1-DNJ 标准品储备液, 于 4℃ 避光保存。

1.2.2.2 标准系列溶液 将标准储备溶液用纯净水稀释至浓度为 10、15、20、25、30、35mg/L 的标准品系列溶液, 分别按上述方法衍生化后取 10 μ L 进行色谱分析。

1.2.3 空白溶液的制备 准确量取纯净水 20 μ L 置于 1.5mL 的离心管中, 加入 0.4mol/L 的硼酸盐缓冲液(pH = 8.5) 20 μ L, 及 2mmol/L 的 FMOC-Cl 乙腈溶液 40 μ L 振荡混匀, 于 25℃ 水浴中反应 20min, 加入 1mol/L 的甘氨酸 20 μ L, 静置 5min, 让多余的衍生化试剂反应完。最后加入 1.5mL 0.1% (V/V) 的醋酸水溶液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后取 10 μ L 进行色谱分析。

1.2.4 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 分析柱

(4.6mm \times 250mm 5 μ m) 及 SunFire C₁₈ 预柱(4.6mm \times 20mm 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1% 冰醋酸(50:50, V/V); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30℃; 荧光检测器激发波长 254nm, 发射波长 322nm; 进样体积: 10 μ L。

2 结果与讨论

1-DNJ 为典型的嘧啶型生物碱, 结构中并没有苯环、双键及羰基等发色团, 不适用于紫外检测, 且结构中含有多个羟基, 属氮杂糖类, 分子极性较大, 普通 C₁₈ 色谱柱难以保留, 定性定量分析均较困难。FMOC-Cl 是一种常见的衍生化试剂, 可用于仲胺和伯胺的衍生化, 结构中具有荧光发光基团, 衍生化产物具有稳定的荧光强度。本实验以 FMOC-Cl 作为衍生化试剂, 将 FMOC-Cl 在温和的条件下与 1-DNJ 中的仲胺基团反应生成稳定的荧光衍生物, 采用荧光检测器进行检测。解决了 1-DNJ 无紫外吸收难以检测的困难, 同时克服了 1-DNJ 极性过大, 普通 C₁₈ 色谱柱无法保留的缺点。衍生化反应方程式如图 2 所示。

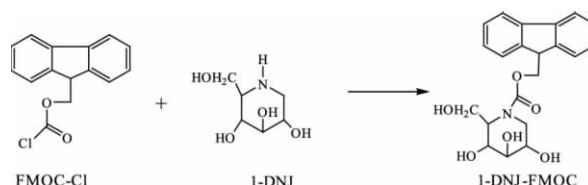


图2 1-DNJ 的衍生化反应方程式

2.1 系统适用性实验

2.1.1 检测波长的选择 参照文献[10-11]的方法, 选用激发波长 254nm, 发射波长 322nm 进行检测。

2.1.2 流动相比例的选择 流动相(乙腈-0.1% 醋酸)中 0.1% 醋酸比例大于 60% 时, 1-DNJ 的保留时间在 10min 左右, 但色谱峰未能达到良好的分离, 且水相比例过高后, 色谱柱柱压过高, 影响色谱柱的使用寿命。采用体积比 65:35 的乙腈-0.1% 醋酸作为流动相时, 保留时间过长。而选择体积比 50:50 的乙腈-0.1% 醋酸则能达到较好的分离效果且峰形良好, 因此流动相组成为乙腈-0.1% 醋酸(50:50)。

分别取空白溶液、标准品溶液及样品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 结果如图 3 所示。其中标准品溶液及样品溶液中色谱峰 1 的峰面积随 1-DNJ 浓度的变化而呈线性的变化, 而空白溶液中无色谱峰 1 出现, 且在同时不加 1-DNJ 和 Gly 的空白溶液中只有色谱峰 3 出现。因此推断, 色谱峰 1 为 1-DNJ-FMOC, 色谱峰 2 为 Gly-FMOC, 色谱峰 3 为 FMOC-OH。从图 3 中可以看出, 样品中的 1-DNJ 与相邻组分均得到了较好的分离, Gly-FMOC 及衍生化试剂的水解产物 FMOC-OH 均不干扰组分的测定。

2.2 衍生化反应条件的选择

2.2.1 衍生化反应试剂浓度的考察 以标准品系列溶液为对象考察了衍生化试剂 FMOC-Cl 的浓度对衍生化反应的影响, 在 FMOC-Cl 的浓度为 0~2mmol/L 的范围内, 衍生化产物随衍生化试剂浓度的增大而增加, 在衍生化试剂浓度为 2mmol/L 时, 衍生化产物峰面积达到最大。当衍生化试剂浓度超过

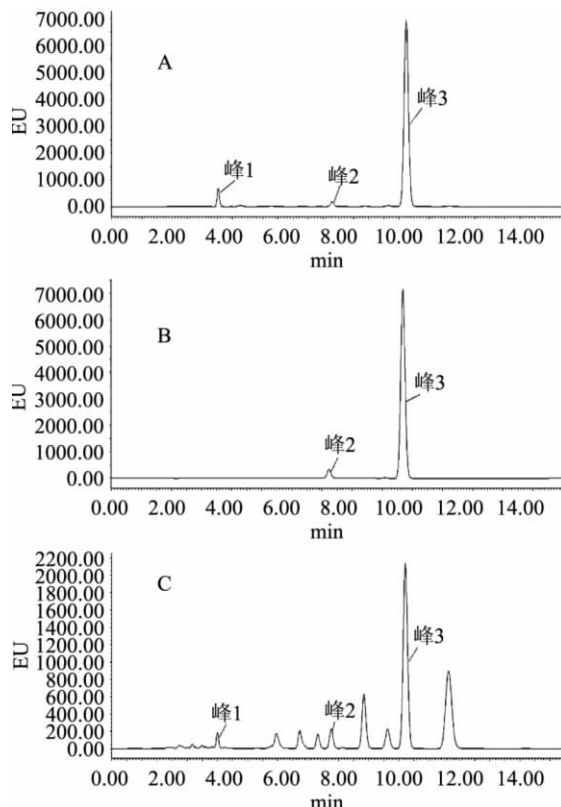


图3 样品高效液相色谱图

注: A-标准品 B-空白 C-桑叶样品。

3mmol/L时,Gly-FMOC及FMOC-OH的响应信号均超过了检测器检出限,因此最终选择2mmol/L作为衍生化试剂的最佳浓度。

2.2.2 衍生化反应时间及反应温度的考察 固定其他条件,将同一浓度的标准品溶液衍生化反应不同时间,衍生化时间分别为5、10、15、20、25min,结果表明:在衍生化反应20min后,衍生化产物的峰面积趋于稳定,因此本实验选择的衍生化反应时间为20min。固定其他条件,将同一浓度的标准品溶液在不同温度下衍生化反应20min,温度分别为20、25、30、35℃,结果表明:在25℃下,衍生化产物达到最大峰面积的时间最短,当衍生化反应温度超过30℃时,衍生化产物的最大峰面积反而降低。因此,本实验选择的衍生化温度为25℃。

2.3 标准曲线与检出限

分别取标准品系列溶液,按上述方法衍生化,取10 μ L按“1.2.4”色谱条件测定。以标准溶液浓度X对色谱峰面积Y进行线性回归,得回归方程:Y = 1742310X + 530220.71, r = 0.99959。结果表明,1-DNJ在质量浓度为10~35mg/L的范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系,测得信噪比(S/N)为3时,1-DNJ的最低检测限为0.80mg/L。

2.4 精密度实验

精密吸取同一批样品衍生化溶液,按“1.2.4”色谱条件连续进样6次,测得峰面积的RSD为0.58%(n=6),结果表明,本实验方法精密度良好。

2.5 重复性实验

取同一批桑叶样品,按“1.2.1”的方法平行制备6

份,按“1.2.4”色谱条件分别进样,测得峰面积的RSD为0.54%(n=6)。结果表明,本实验方法重复性良好。

2.6 稳定性实验

取同一批桑叶样品,按“1.2.1”的方法制备,置于冰箱中4℃避光保存,分别间隔12h按“1.2.4”色谱条件重复测定6次。结果表明,样品衍生化后在72h保持稳定,RSD为0.46%(n=6)。

2.7 加样回收率实验

准确称取已知1-DNJ含量的桑叶样品适量,平行称取5份,分别精密加入一定量的1-DNJ标准品,按“1.2.1”的方法制备,并按“1.2.4”色谱条件测定1-DNJ含量,结果见表1。平均回收率为95.38%,RSD为2.28%。

表1 1-DNJ加样回收率的测定(n=5)

样品中1-DNJ含量(mg)	标准品加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.412	0.45	0.82	95.13	95.38	2.28
0.464	0.45	0.91	99.56		
0.515	0.45	0.90	93.26		
0.567	0.45	0.96	94.40		
0.618	0.45	0.10	94.56		

2.8 不同季节桑叶中1-DNJ含量的测定

准确称取不同季节采集的桑叶样品,按“1.2.1”的方法制备,并按“1.2.4”色谱条件测定1-DNJ含量。结果见图4。

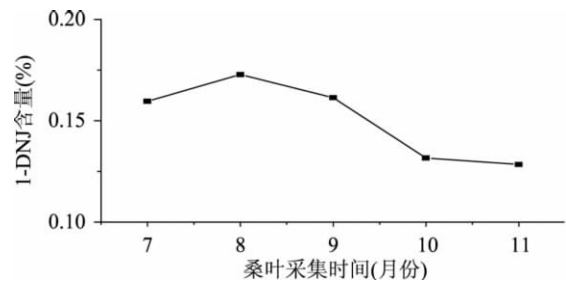


图4 不同季节桑叶中1-DNJ的含量变化

3 结论

本实验对产自北京市大兴区安定镇御林古桑园的不同季节的桑叶中1-DNJ的含量进行比较,结果表明在相同的提取和检测条件下,7、8、9月份桑叶中1-DNJ的含量明显高于10月和11月,其中8月份含量最高,说明桑叶中1-DNJ的含量可能与气候温度等因素有关,夏季(7、8、9月份)温度较高,雨水光线充足,桑叶较成熟,桑叶中1-DNJ的含量较高,秋季(10、11月份)温度较低,桑叶中1-DNJ的含量也随之减少。结果初步揭示了北京地区所产桑叶中1-DNJ的含量随季节变化的趋势,对推动该地区桑资源的开发利用,具有一定的指导意义。

高效液相色谱-荧光检测法检测桑叶中1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)的含量,具有准确性高、选择性强、重现性好等特点,可用于桑叶中1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)含量的测定。

(下转第467页)

表4 方法精密度验证数据

实验次数	1			2			3		
C ₁₃ 浓度(mg/mL)	8.064			8.045			8.045		
瓶号	3#	4#	5#	3#	4#	5#	3#	4#	5#
油剂称量(g)	0.1164	0.1163	0.1155	0.1305	0.1339	0.1276	0.1344	0.1366	0.1271
C ₁₃ 面积(pA·s)	682.49	662.19	686.49	663.87	635.04	668.85	633.54	626.20	617.95
ARA面积(pA·s)	896.16	860.43	880.23	991.31	954.86	978.74	962.03	977.21	888.99
ARA(%)	40.83	40.44	40.18	40.69	39.93	40.78	40.86	41.31	40.93
RSD(%)	0.81			1.15			0.59		
ARA(平均,%)				40.66					
RSD(平均,%)				0.85					

表5 方法重现性验证结果

实验员	B			C			D		
C ₁₃ 浓度(mg/mL)	8.064			8.045			8.045		
瓶号	1#	2#	6#	7#	6#	7#	6#	7#	
油剂称量(g)	0.1437	0.1452	0.1470	0.1477	0.1376	0.1470	0.1376	0.1470	
C ₁₃ 面积(pA·s)	1162.60	1249.40	596.75	656.42	603.12	611.41	603.12	611.41	
ARA面积(pA·s)	1885.97	1987.78	1000.15	1095.30	953.02	1002.23	953.02	1002.23	
ARA(%)	40.86	39.66	40.54	40.17	41.53	40.32	41.53	40.32	
ARA(平均,%)	40.26			40.36			40.92		
RSD(%)				0.74					

参考文献

- [1] Singh G, Chandra R K. Biochemical and cellular effects of fish and fish oils [J]. *Prog Food Nutr*, 1988, 12: 371-419.
- [2] Evans C T, Ratledge C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts [J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 130: 1693-1704.
- [3] Horrobin D F, Huang Y S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease [J]. *Int J Cardiol*, 1987, 17:

173-180.

[4] 可成有, 吴晓芳. 不饱和脂肪酸的气相色谱法同时测定 [J]. *中国卫生检疫杂志* 2005, 15(5): 528-535.

[5] 马文宏, 张燕, 薛刚, 等. 二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸(AA)在婴幼儿配方奶粉中的测定 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(8): 142-144.

[6] 李丽娜, 汤华成, 于长青. 深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的微波诱变育种 [J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(1): 117-121.

(上接第464页)

参考文献

- [1] 王丰俊, 王建中, 郝俊, 等. 响应面法优化超声波辅助提取桑叶多糖的工艺研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2007, 29(5): 142-146.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 279-280.
- [3] 顾关云. 桑的化学成分和生物活性研究进展 [J]. *国外医药·植物药分册*, 2007, 22(1): 12-17.
- [4] Asano N, Tomioka E, Kizu H, et al. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 259(2): 243-255.
- [5] Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, et al. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats [J]. *Plant Foods Hum Nutr* 2009, 64(2): 116-121.
- [6] Mudra M, Ercan-Fang N, Zhong L, et al. Influence of mulberry leaf extract on the blood glucose and breath hydrogen response to ingestion of 75g sucrose by type 2 diabetic and control

subjects [J]. *Diabetes Care* 2007, 30(5): 1272-1274.

[7] Wang LL, Zhou ZY. Effect of extracts of mulberry leaves processed differently on the activity of alpha-glucosidase [J]. *Int J Food Agr Environ* 2008, 6(3-4): 86-89.

[8] Hansawasdi C, Kawabata J. Alpha-glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2 [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(7-8): 568-573.

[9] 陈松, 刘宏程, 储一宁, 等. 12个桑树品种桑叶中的1-脱氧野尻霉素含量测定与分析 [J]. 2007, 33(4): 637-641.

[10] 孟夏, 欧阳臻, 常钰, 等. 不同产地桑叶的1-脱氧野尻霉素含量比较 [J]. 2008, 31(1): 8-10.

[11] 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): 682-685.

[12] Kim J W, Kim S U, Lee H S, 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(1-2): 93-99.