

- 2006, 16(1): 32-33.
- [15] Lin L, Xu H H, Deng P F, *et al.* Influence of producing area on the chemical compound of *Radix Morindae Officinalis* [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 1994(2): 98-100.
- [16] Choi J, Lee K T, Choi M Y, *et al.* Antinociceptive anti-inflammatory effect of monotropein isolated from the root of *Morinda officinalis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1915-1918.
- [17] Choi J W, Lee K T, Choi M O, *et al.* Antinociceptive anti-inflammatory effect of monotropein isolated from the root of *Morinda officinalis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1915-1918.
- [18] Ding P. Study on the systematic establishment of quality control method of *Morinda officinalis* How. [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine* (广州中医药大学) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2004.
- [19] Zhan R T, Ding P, Pan C M, *et al.* Morphological comparison of different cultured variety of *Radix Morindae Officinalis* in GAP base [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 2003, 20(1): 72-75.
- [20] Ding P, Xu J Y, Chu T L. RAPD Analysis on germplasm resources of different farm races of *Morinda officinalis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2006, 29(1): 1-3.

HPLC 法测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素

欧阳华学^{1,2}, 黎源倩^{1*}, 肖全伟¹

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610064; 2. 四川省农业科学院分析测试中心, 四川 成都 610066)

据《中国药典》记载^[1], 桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶、白皮、树枝均可入药, 其中桑叶性甘、苦、寒, 归肺、肝经, 具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效。但是, 自从 20 世纪 70 年代 Yoshiaki 等首次从桑白皮和桑枝中分离出 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)后^[2], 桑叶的药效被进一步发掘, 国外学者对 1-脱氧野尻霉素的药理作用进行了广泛研究, 发现 1-脱氧野尻霉素能有效抑制 α -1, 4-葡萄糖苷酶, 减缓肠道对糖的吸收, 可用于治疗糖尿病、肥胖症, 并有高效低毒的特点, 可使患者摆脱磺胺脒、胰岛素等药物带来的许多不良反应。根据这些药理作用, 韩国已开发出以桑叶、桑蚕等为原料具有调节血糖作用的保健食品。此外, 研究还发现 1-脱氧野尻霉素能够抑制 HIV-1 复制, 中断感染循环, 在治疗艾滋病等病毒感染疾病方面具有很大的潜力^[3]。因此, 为了科学、全面地评价桑叶质量和更好地研究 1-脱氧野尻霉素的药理作用, 需要建立桑叶中 1-脱氧野尻霉素量的分析方法。

1-脱氧野尻霉素化学名为 (2R, 3R, 4R, 5S)-2-(羟甲基)-3, 4, 5-三羧基哌啶, 分子式为 $C_6H_{13}NO_4$, 1-脱氧野尻霉素具有 α -1, 4-葡萄糖类似结构, 分子中不含生色基团而且紫外吸收低, 因此, 难于直接进行可见-紫外光检测和荧光检测。目前, 1-脱氧野尻霉素的测定方法主要采用硅烷化衍生气相色谱-质谱法^[3]、柱前荧光衍生-高效液相色谱法^[4,5]、离子色谱法^[6]和高效液相色谱-蒸发光散射检测法^[7]。由于

硅烷化衍生产物会对气相色谱柱造成一定污染, 现已较少使用; 柱前荧光衍生化高效液相色谱法存在操作繁琐、衍生化反应需严格控制 pH 值以及衍生试剂干扰测定等缺点; 而离子色谱法和高效液相色谱-蒸发光散射检测法又需要专用的仪器。本实验根据 1-脱氧野尻霉素的结构特点, 建立了高效液相色谱-示差折光检测法直接测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素的方法, 本方法不需衍生, 具有操作简便、快速、准确的特点, 目前国内尚未见报道。

1 仪器与试剂

Agilent1100 液相色谱系统配有 G1379A 在线脱气机、G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1316A 检温箱、G1362A 示差折光检测器, 安捷伦色谱工作站(美国, 安捷伦公司)。盐酸 1-脱氧野尻霉(质量分数 > 99%, Fluka 公司), 乙腈(色谱纯, Tedia 公司), 甲醇(色谱纯, Tedia 公司), 实验用水为二次重蒸水。

桑叶样品分别购自成都、重庆、绵阳等地中药材公司, 并经四川省药品检定所鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax Carbohydrate (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水 (70 : 30), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测器温度 35 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备: 准确称取盐酸 1-脱氧野

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 欧阳华学, 男, 博士研究生。 Tel: (028)84504142 E-mail: ouyanghuaxue@163.com

* 通讯作者 黎源倩, 女, 教授, 博士生导师。 Tel: (028)85501301 E-mail: liyuanqian46@163.com

尻霉素 5.00 mg, 用蒸馏水溶解并定容至 10.00 mL, 于 4℃ 条件下保存。使用前用流动相稀释, 配制不同质量浓度的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 准确称取粉碎至 80~100 目干燥桑叶 0.50 g 置于 150 mL 三角瓶中, 加入 0.05 mol/L 盐酸 20 mL, 超声提取 20 min。离心(转速 4 500 r/min) 15 min, 取上清液。残渣中再加入 0.05 mol/L 盐酸 20 mL, 超声提取 15 min, 离心(转速 4 500 r/min) 15 min, 取上清液, 合并两次提取液, 置于 50 mL 量瓶中, 并用蒸馏水定容至刻度, 该溶液经 0.45 μm 的水系膜滤过, 滤液供 HPLC 分析。

2.4 线性范围及方法检出限: 取 1-脱氧野尻霉素对照品液, 分别制备质量浓度为 400.0、200.0、100.0、50.0、25.0、5.0 mg/L 的系列对照品溶液, 按上述色谱条件分别测定, 以峰面积(Y)对 1-脱氧野尻霉素的质量浓度(X)进行线性回归, 在质量浓度为 5.0~400.0 mg/L 与峰面积呈线性关系, 其回归方程为 $Y = 68.787X + 592$, $r = 0.9992$ 。根据信噪比 $S/N = 3$, 方法的最低检出限为 0.5 mg/kg。

2.5 精密度试验: 同一供试品溶液重复进样 5 次测定, 1-脱氧野尻霉素峰面积的 RSD 为 1.09% ($n = 5$)。

2.6 重现性试验: 准确称取粉碎至 80~100 目干燥桑叶 0.50 g (精确至 0.001 g) 3 份, 按 2.3 项制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件分别测定, 1-脱氧野尻霉素的质量分数的 RSD 为 2.36% ($n = 3$)。

2.7 稳定性试验: 同一供试品溶液每隔 12 h 进样一次测定, 连续测定 6 次, 1-脱氧野尻霉素的质量分数的 RSD 为 3.32% ($n = 6$)。

2.8 回收率试验: 在 0.50 g 桑叶样品中, 分别加入质量浓度为 100.0 mg/L 的 1-脱氧野尻霉素对照品溶液 10.0、5.0、1.0 mL 后, 按 2.3 项制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件重复测定 5 次, 3 个质量浓度水平的平均回收率分别为 96.2%、92.4%、92.0%, 其 RSD 分别为 2.31%、1.79%、3.82% ($n = 5$)。

2.9 样品的测定: 分别称取购自成都、重庆、绵阳等地中药材公司的桑叶样品 0.50 g, 按 2.3 项制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件分别测定 ($n = 3$), 测得不同产地桑叶中 1-脱氧野尻霉素质量分数分别为样 1: 1.51 mg/g, 样 2: 1.73 mg/g, 样 3: 1.24 mg/g。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择: 待测组分的化学结构和理化性质都对该组分在色谱柱上的保留有重要影响, 实验中首先采用文献报道^[4]中所使用的以十八烷基键合硅胶为固定相的色谱柱, 结果发现 1-脱氧野尻霉

素在该色谱柱上无保留。根据 1-脱氧野尻霉素的化学结构特点, 改用以强极性氨基键合硅胶为固定相的色谱柱, 取得了满意的效果, 这是由于在乙腈-水流动相体系中, 1-脱氧野尻霉素分子中的羟基与强极性氨基键合硅胶固定相上的氨基之间有强的氢键结合能力, 而与十八烷基键合硅胶固定相上的烷基之间却难以产生较强的相互作用所致。因此, 实验中选用强极性氨基键合硅胶为固定相的 Zorbax Carbohydrate 色谱柱作为分析柱。在检测器的选择上, 由于 1-脱氧野尻霉素的分子结构中不含生色基团, 难于直接用紫外检测器或荧光检测器进行检测, 但 1-脱氧野尻霉素具有 α-1,4-葡萄糖类似结构, 因此, 实验中选用示差折光检测器进行检测。

在实验中还分别考察了流动相中不同比例的乙腈和水对 1-脱氧野尻霉素和样品中其他组分分离的影响, 当流动相中乙腈量小于 60% 时, 1-脱氧野尻霉素的保留时间太短, 与样品中其他组分难以分离, 当流动相中乙腈量大于 80% 时, 1-脱氧野尻霉素的保留时间太长, 且色谱峰不对称。通过对流动相中乙腈比例的多次调整, 当 $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{水}} = 70 : 30$ 时, 1-脱氧野尻霉素与样品中其他组分在 15 min 内能达到基线分离, 对照品溶液和样品的色谱图见图 1。

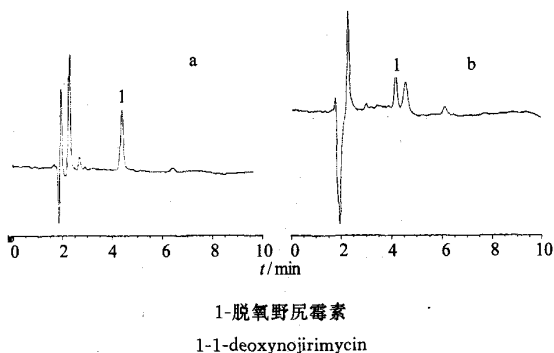


图 1 1-脱氧野尻霉素(a)和样品(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of DNJ (a) and sample (b)

3.2 样品提取条件的选择: 目前, 桑叶中 1-脱氧野尻霉素一般以 0.05 mol/L 盐酸作为提取剂, 采用旋涡混合提取法^[4]和超声波提取法^[5]。在提取温度和提取时间相同的条件下, 本实验比较了对于同一样品采用旋涡混合提取法和超声波提取法对桑叶中 1-脱氧野尻霉素的提取效果。实验结果表明, 超声波提取法的提取液中 1-脱氧野尻霉素的量为 1.51 mg/g, 而用旋涡混合提取法的提取液中 1-脱氧野尻霉素的量为 1.19 mg/g。因此, 实验中采用超声波提取法。

本实验首次报道了测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素的

不需衍生、直接测定的高效液相色谱-示差折光检测分析方法,该方法简便、快速,可用于桑叶、桑枝、桑白皮及其相关保健食品中1-脱氧野尻霉素的测定。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Yoshiaki A, Hivomu M. The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species [J]. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1976, 50(11): 571-573.
- [3] Lei X Y, Huang H H. The update on the pharmacological activities and synthetic methods of 1-deoxynojirimycin and its derivatives [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(6): 68-72.
- [4] Ou Y Z, Chen J. Determination of 1-deoxynojirimycin in

Morus alba L. leaves in different seasons [J]. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25(10): 190-193.

- [5] 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]. *Chromatogr A*, 2003, 1002(1-2): 93-99.
- [6] Chen Z Y, Xiao G S, Chen W D, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in yellow blood silkworm by ion chromatography [J]. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25(5): 129-130.
- [7] Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6): 1415-1418.

不同产地防风中4种色原酮成分比较研究

刘双利,张春红,张连学*

(吉林农业大学中药材学院,吉林 长春 130118)

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 未抽花茎植株的干燥根,主产于东北地区和华北地区。防风始载于《神农本草经》,列为上品,辛、甘、温,归膀胱、肝、脾经,解表祛风、渗湿、止痉,主要用于感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等^[1]。现代药理研究表明防风色原酮类成分具有解热、镇痛、镇静、抗炎、抗肿瘤、抗血小板聚集等多种功效^[2,3],用于治疗脑震荡、小儿呼吸道感染、过敏性皮炎、面神经炎、牙痛等^[4]。《中国药典》2005年版防风项下规定了防风中升麻苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷两种色原酮总量不得低于0.24%,在质量评价体系中也主要以两种色原酮成分的量作为评价指标,而对升麻素和亥茅酚苷二者没有规定量的限度。为此笔者对所采集的不同产地防风样品中4种色原酮的量进行测定分析,为其质量控制提供有效的检测方法,从而为评价不同产地防风品质提供科学依据。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪;SPD-10Avp 紫外检测器;N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);LD5-2A 离心机(北京医用离心机厂);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。升麻苷和5-O-甲基维斯阿米醇

苷对照品(中国药品生物制品检定所,供定量测定用,批号分别为1522、1523),升麻素和亥茅酚苷对照品(中国中医研究院中药研究所,质量分数均大于98%);甲醇(Fisher公司)为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。防风药材来源见表1,样品均经本院张连学教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:SHIM-PACK VP-ODS 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B)梯度洗脱程序:0~20 min A 由30%~45%,20~25 min A 由45%~60%,25~50 min A 由60%~90%;体积流量1 mL/min;波长254 nm;进样量20 μL;柱温40℃^[5]。在此色谱条件下,4种色原酮混合对照品储备液和防风药材色谱分离结果见图1,可见防风药材中4种色原酮得到了基线分离。

2.2 混合对照品溶液的配制:精密称量升麻素苷3.4 mg,5-O-甲基维斯阿米醇苷4.4 mg,升麻素4.4 mg,亥茅酚苷4.2 mg置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度线,摇匀备用。分别精密量取0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mL定容于5 mL量瓶中。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取防风药材粗粉0.5 g,置于15 mL离心管中,精密加入甲醇10 mL,浸泡过夜。超声提取30 min,4 500 r/min 离心15

收稿日期:2006-08-10

基金项目:国家“十五”攻关项目(2001BA701A62-6)

作者简介:刘双利(1980—),男,内蒙通辽人,医学硕士,研究方向为天然产物化学研究及其质量控制。

Tel:13504468873 E-mail:ls10431@yahoo.com.cn

* 通讯作者 张连学 Tel:(0431)84533086 E-mail:zlxbooksea@163.com