

• 制剂与质量 •

桑树资源中 1-脱氧野尻霉素的测定及其生物活性分析

耿 鹏¹, 朱元元², 杨 洋¹, 姜 楠¹, 白 钢^{1*}, 杨文博¹

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

摘 要:目的 测定桑树资源中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)并分析其生物活性。方法 以氯甲酸茚甲酯(FMOC-Cl)柱前衍生 RP-HPLC 荧光检测法对 DNJ 进行分析;在酶水平测定样品的 α -糖苷酶抑制曲线,在离体水平用反转肠囊实验测定样品的 α -糖苷酶抑制活性。结果 建立了 DNJ 的定量方法,并应用于桑树资源中 DNJ 的定量;这些中药材与 DNJ 对照品呈现了平行的 α -糖苷酶抑制曲线,对淀粉水解和葡萄糖吸收具有较好的抑制作用。结论 桑树资源可以作为 α -糖苷酶抑制剂治疗糖尿病。

关键词:桑树资源;1-脱氧野尻霉素; α -糖苷酶抑制剂;高效液相色谱

中图分类号:R286.02; R286.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)08-1151-04

Determination of 1-deoxynojirimycin from mulberry resources and analysis of their bioactivities

GENG Peng¹, ZHU Yuan-yuan², YANG Yang¹, JIANG Nan¹, BAI Gang¹, YANG Wen-bo¹

(1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: **Objective** To determine 1-deoxynojirimycin (DNJ) from mulberry resources and analyse their bioactivities. **Methods** Determination of DNJ by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) and followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and a fluorescence detector; the inhibitory curves on α -glucosidase at the enzymatic level and the activities to α -glucosidase *in vitro* were observed in the everted sac experiment. **Results** A reliable quantitative method suitable for assays of DNJ from mulberry resources has been developed. The inhibitory curves of the extracts on α -glucosidase were parallel to those of DNJ. The extracts can inhibit hydrolyzation of starch and absorption of glucose. **Conclusion** The medicinal parts from mulberry resources can be used for diabetic therapy as α -glucosidase inhibitor.

Key words: mulberry resources; 1-deoxynojirimycin(DNJ); α -glucosidase inhibitor; HPLC

桑枝、桑叶、桑白皮、桑椹、蚕砂都可以治疗消渴症,目前认为其作用机制之一就是它们都含有降血糖作用的生物碱,即 1-脱氧野尻霉素^[1~5]。1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)化学名为(2R, 3R, 4R, 5S)-2-(羟甲基)-3,4,5-三羟基哌啶,是一种天然糖的结构类似物,首次从桑树根和树干中分离得到。该化合物及其衍生物具有竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,可用于治疗糖尿病、肥胖症、病毒感染等疾病,同时也成为一种研究糖蛋白的成熟过程、设计新药及考察某种生化途径的有效工具^[6]。

为了准确分析桑树资源中的 DNJ,以及评价桑树资源中药材提取物作为糖苷酶制剂的降糖效果,本实验通过氯甲酸茚甲酯(9-fluorenylmethyl

chloroformate, FMOC-Cl)柱前衍生 HPLC 法,并结合酶学水平以及离体水平的抑制活性评价体系^[7],对桑树资源的部分中药材进行了考察。

1 实验材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,其中包括 Seal—wash、四元泵、DAD 紫外检测器、FLD 荧光检测器;1810B 型自动双重纯水蒸馏器(上海嘉定生声玻璃仪器厂);Bioelisa Reader ELX800 (Bio-Tek 公司)。

DNJ、FMOC-Cl 为美国 Sigma 公司产品,色谱纯乙腈为美国 Tedia 公司产品,色谱纯醋酸为天津试剂二厂产品,HPLC 用水均为双蒸去离子水, α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3.2.1.20)为日本和

收稿日期:2005-01-28

基金项目:“863 计划”创新药物和中药现代化资助项目(2003AA2Z3510);天津市自然科学基金资助项目(023803811)

作者简介:耿 鹏(1979—),男,天津人,硕士研究生,主要从事中药现代化的研究。E-mail: gengpeng_2001@163.com

* 通讯作者 白 钢 Tel: (022) 23508371 E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

光纯药工业株式会社产品,拜糖苹(Glucobay, Acarbose,阿卡波糖片)为拜耳医药保健有限公司产品,葡萄糖体外诊断试剂盒(GOD-PAP 法)为北京中生生物工程技术有限公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

不同批号的桑枝、桑叶、桑白皮、桑椹、蚕砂均由天津市中新药业集团公司提供。Wistar 大鼠,体重 120~140 g,雄性,二级实验动物,由军事医学科学院实验动物中心提供。

2 DNJ 的 HPLC 法测定

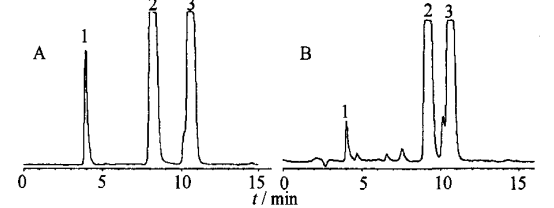
2.1 色谱条件:色谱柱:Inertsil ODS-2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%醋酸水溶液(50:50);体积流量:1 mL/min;荧光检测激发波长为 254 nm,吸收波长为 322 nm;柱温:室温;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备:准确称取 DNJ 对照品 5 mg,加 15 mL 水溶解,定容至 25 mL,配制成 0.2 mg/mL DNJ 对照品溶液。样品干燥粉碎(100 目粉末),准确称量 0.5 g,加 0.05 mol/L HCl 25 mL,超声波提取 10 min,8 000 r/min 离心 10 min,沉淀用上述方法重新提取 1 次,合并两次上清液,即制成 10 mg/mL 提取液。

2.3 衍生化处理:取 10 μL DNJ 对照品溶液或提取液,依次加入 10 μL 0.4 mol/L K₃BO₃ 缓冲液(pH 8.5)、20 μL 5 mmol/L FMOC-Cl 乙腈溶液,立即混匀,20 ℃反应 20 min,加入 10 μL 0.1 mol/L 甘氨酸水溶液中止反应,反应液再加入 950 μL 0.1%醋酸中,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后进行色谱分析。

2.4 色谱峰的定性:色谱图见图 1,衍生物包括 DNJ-FMOC、Gly-FMOC 和水解的 FMOC-OH 3 个色谱峰,其中 DNJ-FMOC 的保留时间为 3.96 min。

2.5 线性范围和检测限:分别取不同质量浓度的



1-DNJ-FMOC 2-Gly-FMOC 3-FMOC-OH

图 1 DNJ 对照品(A)和蚕砂提取液(B)衍生物的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of DNJ reference substance (A) and *Excrementa Bombycum* extract (B) derivatives

DNJ 对照品溶液(1、2.5、5、10、25、50、100 μg/mL)衍生物进样,连续进样 5 次,测定峰面积,结果表明 DNJ 质量浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系,线性方程为 $Y=45.161 X+623.04$, $r=0.999 1$ 。检测限为 0.1 μg/mL ($P/N>3$)。

2.6 加样回收率试验:取 10 mg/mL 提取液 100 μL,分别加入低、中、高 3 种不同质量浓度的 DNJ 对照品溶液 100 μL(含 DNJ 分别为 19.92、49.54、99.68 μg),衍生化处理,取 20 μL 进样测定,重复 5 次,结果回收率分别为 99.6%、99.1%、99.7%,RSD 分别为 3.06%、1.27%、1.28%。

2.7 样品中 DNJ 的测定:将不同批号的药材和新鲜采摘的桑树组织样品,分别制备提取液,取一定量衍生后进样测定,外标法计算提取液中的 DNJ,结果见表 1。结果表明,不同来源的桑枝、桑叶、桑白皮、桑椹以及蚕砂中 DNJ 有一定的差异,其中树皮中较多,而枝叶中较少。由于新鲜植物组织中大量水分的存在,其中的 DNJ 低于干燥的药材。

表 1 不同来源的中药中 DNJ 的测定结果

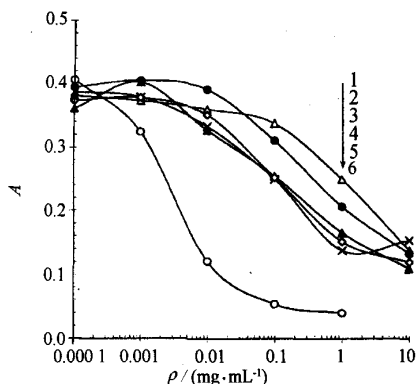
Table 1 Determination of DNJ from different medicinal parts in mulberry and *Excrementa Bombycum*

批号	$\omega/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$				
	桑枝	桑叶	桑白皮	桑椹	蚕砂
1	1.69	1.18	3.95	4.17	4.02
2	2.05	1.07	4.01	1.82	3.65
3	2.56	0.888	3.85	2.63	1.86
4	5.24	0.576	4.65	2.06	2.65
新鲜	0.119	0.573	2.50	0.550	

3 样品的 α-糖苷酶抑制剂活性考察

3.1 α-糖苷酶抑制曲线的测定:取 10 倍系列稀释的 DNJ 对照品溶液或提取液 200 μL,分别加入 α-糖苷酶(6 U/mL α-glucosidase,以 20 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 为溶剂, pH 7.0,含有 150 mmol/L NaCl、1%BSA) 100 μL,37 ℃水浴 15 min,再加 10 mg/mL 麦芽糖溶液 100 μL,混匀,37 ℃反应 20 min。沸水浴 2 min 终止反应,冷却后用葡萄糖体外诊断试剂盒测定葡萄糖生成量。以质量浓度为横坐标,490 nm 处吸光度为纵坐标作图绘制 α-糖苷酶的抑制曲线,结果见图 2。5 种中药材均与 DNJ 对照品呈现了平行的抑制曲线,它们对 α-糖苷酶的 IC₅₀值分别为 0.49、3.1、0.28、0.32、1.4 mg/mL。其中 DNJ 的质量分数较高的桑枝、桑白皮、桑椹、蚕砂的抑制作用较强,而 DNJ 的质量分数较低的桑叶抑制效果较弱。

3.2 反转肠囊实验:利用反转肠囊的方法在离体水



1-桑叶 2-蚕砂 3-桑枝 4-桑椹 5-桑白皮 6-DNJ
1-Folium Mori 2-Excrementa Bombycum 3-Ramulus Mori
4-Morus alba 5-Cortex Mori 6-DNJ

图 2 提取液对 α-糖苷酶的抑制曲线

Fig. 2 Inhibitory curves of extracts on α-glucosidase
平检测桑枝、桑叶、桑白皮、桑椹、蚕砂提取液对淀粉水解和葡萄糖吸收的抑制作用。取 Wister 大鼠，处死，在十二指肠末端切开并取出小肠，剥离肠系膜，用预冷生理盐水冲洗肠内容物，把小肠切成 3.5~4 cm 的小段，并反转小肠。反转的肠囊一端用棉线结扎，在另一端放一结扎线将 200 μL Krebs-Henseleit 缓冲液灌入肠囊后结扎。将肠囊放于盛有 4 mL 1% 淀粉溶液的试管中，其中添加或不加提取液，在 37℃ 振荡水浴中温孵 60 min，加入 10 μL 1 mol/L HCl 终止反应。分别收集试管中的液体(即肠囊外液)和肠囊里的液体(即肠囊内液)，离心后用葡萄糖体外诊断试剂盒测定肠囊外、内液葡萄糖的释放和吸收水平，结果见表 2。反转肠囊外液抑制率反映了药物对淀粉水解的抑制效果，反转肠囊内液抑制率反映了药物对葡萄糖吸收的抑制效果。可见，5 种提取液对淀粉水解和葡萄糖吸收具较好抑制作用。

抑制率(E/E_0)=提取液中葡萄糖/空白对照中葡萄糖

表 2 提取液的反转肠囊实验 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Everted sac experiment of extracts ($\bar{x} \pm s, n=5$)

糖苷酶	ρ /	抑制率/%	
抑制剂	(mg · mL ⁻¹)	外液	内液
空白对照	—	100.0	100.0
拜糖苹	0.1	26.8 ± 9.2**	42.1 ± 20.0**
桑枝	10.0	19.0 ± 7.9**	13.7 ± 8.2**
桑叶	10.0	64.5 ± 10.3**	55.9 ± 13.4**
桑白皮	10.0	48.7 ± 11.6**	67.5 ± 12.1**
桑椹	10.0	75.2 ± 17.3**	83.1 ± 16.3*
蚕砂	10.0	21.7 ± 10.2**	32.0 ± 6.8**

与空白对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

桑树资源中药材中含有具强烈 α-葡萄糖苷酶

抑制活性的 DNJ 成分，其可在小肠上部细胞刷缘处和寡糖竞争而与 α-葡萄糖苷酶相结合，占据酶上的位点，使寡糖的消化吸收即受阻碍，有效地降低餐后的血糖浓度，达到预防和治疗糖尿病的目的。因此，桑树资源中药材中 DNJ 的检测与评价有可能成为该类药材的质量控制标准之一。

由于 DNJ 的结构中没有共轭体系，不适用于紫外检测。蒸发光散射检测(ELSD)的灵敏度太低^[8]，而电化学检测又需专门的检测器^[9]。本实验采用的 FMOC-Cl 对 DNJ 进行柱前衍生的方法，不仅克服了 DNJ 分子极性过大与难以检测的缺点，便于应用 C₁₈ 柱对 DNJ-FMOC 进行分离，荧光检测器进行检测，而且排除了中药材中不含-NH 化合物的干扰，为 DNJ 的鉴定提供了极大的方便^[10]。

衍生原理为氯甲酸茚甲酯能在温和的条件下与 DNJ 中的仲胺基团反应生成稳定的荧光衍生物(图 3)。

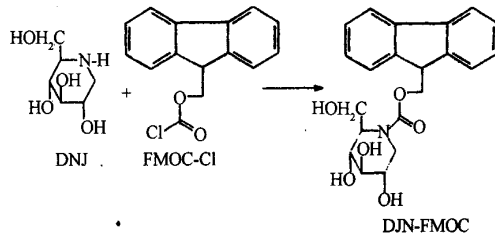


图 3 DNJ-FMOC 的形成

Fig. 3 Formation of DNJ-FMOC

本研究在体外的酶水平对含有 DNJ 的桑树资源中药材进行了抑制活性检测，并在此基础上应用反转肠囊技术在离体水平对上述中药材进行了药理与药效的初步评价。结果显示，5 种中药材虽然对淀粉水解和葡萄糖吸收均具有一定的抑制作用，但抑制效果和 DNJ 的量并不成正比关系，推测中药材所含的其他成分如多糖、黄酮等化合物干扰了 DNJ 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用^[2~5]。这也说明了中药成分的复杂性导致了其药效的复杂性的原因。因此，需要对这 5 种中药材的有效成分进行分离提取，再评价它们的药效，相关实验正在进行当中。另外，离体水平的药效评价方法也能模拟体内环境，为进一步确认桑树资源中药材的有效部位，并进行体内药理研究提供了参考依据。

References:

- [1] Ye F, Shen Z F, Qiao F X, et al. Experimental treatment of complications in alloxan diabetic rats with α-glucosidase inhibitor from the Chinese medicinal herb *Ramulus Mori* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37 (2): 108-122.
- [2] Sun L, Meng L, Yan C, et al. Active components of lowing blood glucose and their pharmacological effect of mulberry leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33

- (5): 471-473.
- [3] Liu X M, Xiao G S, Chen W D, *et al.* Advances in research and development of mulberry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (6): 569-571.
- [4] Zhong G L, Qiu L M, Gao X M, *et al.* The effect of extracted liquid of alcohol in *Cortex Mori* on glucose and serum lipid in diabetic rats [L]. *Lab Anim Sci Manage* (实验动物科学与管理), 2003, 20 (2): 24-25.
- [5] Zou Y X, Liao S T, Liu X M, *et al.* Diabetic therapy effects of mulberry resources on diabetes mellitus [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16 (3): 265-268.
- [6] 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, 117 (16): 456-460.
- [7] Vogel H G, Vogel W H. *Drug Discovery and Evaluation—Pharmacological Assays* (药物发现与评价——药理研究) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] Toshiyuki K, Kiyotaka N, Yuko S, *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: 1415-1418.
- [9] Mellor H R, Adam A, Platt F M, *et al.* High-performance cation-exchange chromatography and pulsed amperometric detection for the separation, detection, and quantitation of N-alkylated imino sugars in biological samples [J]. *Anal Biochem*, 2000, 284 (1): 136-142.
- [10] 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: 93-99.

HPLC 法测定雷公藤及其片剂中雷公藤红素

夏 焱¹, 王文燕², 张彦文³, 贺江萍¹, 高文远¹, 段宏泉^{3*}

(1. 天津大学药学院, 天津 300027; 2. 天津药物研究院, 天津 300193; 3. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要:目的 建立雷公藤及其片剂中雷公藤红素的 HPLC 测定方法。方法 HPLC 外标法。Agilent Zorbax SC-C₁₈柱为色谱柱, 甲醇-1%醋酸溶液(87:13)为流动相, 检测波长为 425 nm, 体积流量为 1.0 mL/min。结果 雷公藤红素线性范围为 40.96~204.8 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 药材的平均回收率为 98.37%, RSD 为 1.01% ($n=9$), 制剂的平均回收率为 98.59%, RSD 为 1.18% ($n=9$)。结论 本方法操作简便、准确, 可作为雷公藤类药物中雷公藤红素的定量分析方法。

关键词:雷公藤; 雷公藤红素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)08-1154-03

Determination of tripterine in *Tripterygium wilfordii* and its tablets by HPLC

XIA Yan¹, WANG Wen-yan², ZHANG Yan-wen³, HE Jiang-ping¹,

GAO Wen-yuan¹, DUAN Hong-quan³

(1. College of Pharmaceutics and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. College

of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To determine the content of tripterine in *Tripterygium wilfordii* and its tablets by HPLC. **Methods** An external standard method by HPLC with Zorbax C₁₈ column as fixed phase and methanol-1% HAc (87:13) as mobile phase was adopted. The detection wavelength was 425 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The linear range for tripterine was 40.96~204.8 μg/mL ($r=0.999\ 6$). The average recovery of Chinese medicinal materials was 98.37% and RSD was 1.01% ($n=9$); the average recovery of preparation sample was 98.59% and RSD was 1.18% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be adoptable for quantitative analysis of tripterine in the plants of *Tripterygium* L.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; tripterine; HPLC

雷公藤系卫矛科雷公藤属植物, 其根茎为主要药用部位, 具有抗炎、抗免疫、抗肿瘤、抗 HIV 等多

种药理活性, 对类风湿性关节炎、慢性肾炎等自身免疫性疾病具有显著疗效^[1-2]。同属植物还包括昆明山