

- Diabetes Res, 2001, 2 (2): 91-99.
- [6] Yamada T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273 (2 Pt 1): G355-364.

- [7] Liu J, Feng Y C, Dong R. Research on varying laws of the content of nitrogen, phosphorus and Potassium in *Dioscorea nipponica* Makino in growth period [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2005, 27 (1): 64-67.
- [8] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

RP-HPLC 测定不同地区、不同采集期桑叶中 1-脱氧野尻霉素

关丽萍, 郑光浩, 金晴昊, 权迎春

(延边大学药学院, 吉林 延吉 133000)

桑叶异名铁扇子, 为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶^[1], 始载于《神农本草经》, 味苦、甘, 性寒, 归肺、肝经, 具有祛风清热、凉血、明目等功效, 用于风热感冒、肺热燥咳、头晕头疼、目赤昏花等症; 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糖尿病, 且取得满意疗效。现代医学研究证明桑叶有效成分之一多羟基生物碱具有降低血糖等作用^[2,3]。1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)是桑叶中的一种生物碱, 其作为 α -葡萄糖苷酶的抑制剂, 具有降血糖、抗病毒、抗肿瘤转移等作用^[4~6]。目前, 1-DNJ 主要是采用硅烷衍生化后用 GC-MS 法鉴定其结构^[7], 因其分子结构中缺少发色团, 所以很难采用 HPLC 法直接测定。本实验采用荧光试剂 9-苄基氯甲酸甲酯与 1-DNJ 柱前衍生, 然后用 HPLC 法进行含量测定, 取得了满意的效果。本方法准确、灵敏度高, 可用于桑叶中 1-脱氧野尻霉素的定量分析。

1 仪器与试剂

日本岛津 SCL-10Avp 型高效液相色谱仪; SPD-10Avp 型紫外-可见检测器; XW-80A 旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); AS3120A 型超声波清洗脱气器(奥特宝恩斯仪器有限公司)。

乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 醋酸为分析纯, 1-脱氧野尻霉素对照品(Sigma 产品)。桑叶采自湖北、广西、河南, 由延边大学药学院中草药教研室刘永镇教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: YMC-pack ODS-A (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%醋酸(50:50); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取 1-脱氧野尻霉素对照品 10 mg, 用甲醇溶解, 定容于 100 mL 量瓶中, 制得质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备液。

2.3 供试品溶液的制备: 准确称取干燥粉碎的桑叶适量, 加 8 倍量水浸泡 1 h 后, 在 100 $^{\circ}$ C 加热 3 h, 提取两次, 滤过、浓缩、干燥。精密称取粉末 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中加水溶解定容, 备用。

衍生化过程: 精密吸取上述提取液 40 μ L 于试管中, 加 40 μ L 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH=8.5), 80 μ L 的 9-苄基氯甲酸甲酯的乙腈溶液混匀, 在 20 $^{\circ}$ C 水浴中反应 20 min, 再加入 40 μ L 0.1 mol/L 氨基乙酸, 让剩余的衍生化试剂反应, 最后加入 200 μ L 0.1% 醋酸水溶液, 混匀, 超声提取, 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系的考察: 分别精密吸取对照品储备液 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μ L, 按色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $C = 5.04545 \times 10^{-6} A - 0.00514$, $r = 0.9996$ 。结果表明, 对照品在 0.87~2.53 μ g 呈良好的线性关系。HPLC 色谱图见图 1。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一份供试液, 连续进样 5 次, 每次 20 μ L, 计算峰面积的 RSD=1.12%。

2.6 重现性试验: 精密称取湖北(秋季)桑叶样品 5 份, 按 2.3 项制备供试品溶液, 进样 20 μ L, 测定峰面积计算得 RSD=1.52% ($n=5$), 结果显示, 该方法具有较好的重现性。

2.7 稳定性试验: 分别在 2、4、8、12、24 h 进样, 每次 20 μ L, 计算峰面积的 RSD=0.55% ($n=5$)。结果表明, 该溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验: 精密称取已知含量的广西(秋季)

收稿日期: 2005-01-29

作者简介: 关丽萍(1970—), 女, 吉林省蛟河人, 讲师, 硕士, 主要研究方向为天然化合物的提取、合成及药理活性的研究。

Tel: (0433) 2660631 E-mail: glp730@yahoo.com.cn

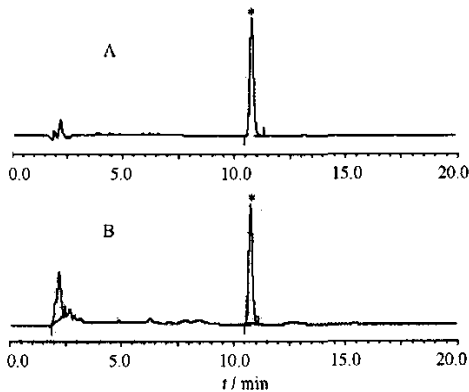


图1 1-脱氧野尻霉素对照品(A)和样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 1-deoxynojirimycin reference substances (A) and sample (B)

桑叶粉末5份,每份约0.2 g,分别精密加入1-脱氧野尻霉素标准溶液(40 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL ,按照2.3项下方法制备供试品溶液,精密吸取20 μL 进样、测定,计算回收率,结果平均回收率为97.6%,RSD=1.21% ($n=5$)。

2.9 样品测定:收集不同产地、不同采集期的桑叶,测定1-脱氧野尻霉素的量。结果见表1。

表1 不同产地、不同采集期桑叶中1-脱氧野尻霉素测定 ($n=5$)

Table 1 Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from different habitats and different collective time ($n=5$)

产地	采集期	1-脱氧野尻霉素 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	产地	采集期	1-脱氧野尻霉素 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
湖北	夏季	9.794	湖北	秋季	10.576
广西	夏季	10.392	广西	秋季	10.864
河南	夏季	8.652	河南	秋季	9.548

3 讨论

3.1 衍生化反应:9-苄基氯甲酸甲酯是一种较新的氨基酸衍生化试剂,主要适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。1-脱氧野

尻霉素分子中含有仲胺结构,因此可与9-苄基氯甲酸甲酯发生衍生化反应。又因9-苄基氯甲酸甲酯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可进入色谱柱。本实验在衍生化后加入氨基乙酸以除去多余的荧光试剂。另外,衍生化反应受pH值的影响较大,实验表明保持pH 8.5时,衍生物稳定性好。

3.2 检测波长的确定:将配好的对照品1-脱氧野尻霉素与样品溶液在200~400 nm波长分别进行扫描,结果均在254 nm处有最大吸收,故确定254 nm为测定波长。

3.3 采集期、产地对桑叶中1-脱氧野尻霉素量的影响:从表1中可以看出,同一产地不同采集期测定的1-脱氧野尻霉素量不同,实验证明在秋季采集的桑叶中1-脱氧野尻霉素的量较高;不同产地,在广西采集的桑叶中1-脱氧野尻霉素量最高,这和不同地区的温度和气候有关,此实验结果可为采集和临床安全用药提供参考。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [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] Asano N, Oseki K, Tomioka E, et al. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 259 (2): 243-247.
- [4] Asano N, Makoto N, Kizu H, et al. Homonojirimycin isomers and glycosides from *Aglaonema treubii* [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60: 98-101.
- [5] Pukazhenthi B S, Muniappa N, Vijay I K. Role of sulfhydryl groups in the function of glucosidase from mammary gland [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (9): 6445-6452.
- [6] Sunkara P S, Bowlin T L, Liu P S, et al. Antiretroviral activity of castanospermine and deoxynojirimycin, specific inhibitors of glycoprotein processing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 148 (1): 206-210.
- [7] Keiner C R, Drager B. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants [J]. *Plant Sci*, 2000, 150: 171-179.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青