

桑叶 DNJ 和 Fagomine 的检测及提取纯化工艺研究

徐月灿*, 周 衡, 李 丹, 张莲莲, 张 倩, 张峻康

湖南希尔天然药业有限公司, 永州 425000

摘要:建立了高效液相色谱-衍生化法同时对桑叶中 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)和 Fagomine 进行含量检测,并采用树脂法对桑叶中 DNJ 和 Fagomine 在同一条件下的提取纯化工艺进行研究。考察不同提取溶剂、不同型号树脂、树脂动态吸附特性、洗脱剂浓度等参数,并采用高效液相色谱-衍生化法对桑叶中 DNJ 和 Fagomine 进行检测,获得桑叶 DNJ 和 Fagomine 提取纯化工艺的优化条件:桑叶粗粉中加入 6 倍量 0.1% 盐酸水溶液加热回流提取三次,提取液浓缩后上 LSD001 树脂柱,再以 0.5 mol/L 的氨水洗脱并收集洗脱液。在此工艺条件下,所得样品中 DNJ 含量达 5.65%, Fagomine 含量达 1.35%。

关键词:高效液相色谱-衍生化;桑叶;DNJ;Fagomine;提取;纯化

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019) Suppl-0097-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.017

Study on detection, extraction and purification of DNJ and fagomine in mulberry leaves

XU Yue-can*, ZHOU Heng, LI Dan, ZHANG Lian-lian, ZHANG Qian, ZHANG Jun-kang

Hill Pharmaceutical Co., Ltd., Yongzhou 425000, China

Abstract: A high performance liquid chromatography-derivatization method was established to simultaneously detect the contents of 1-deoxynojirimycin (DNJ) and Fagomine in mulberry leaves, and the extraction and purification processes of DNJ and Fagomine in mulberry leaves under the same conditions were studied by resin method. Different extraction solvents, different types of resin, resin dynamic adsorption characteristics, parameters such as concentration of eluant, and the high performance liquid chromatography (HPLC) of DNJ in mulberry leaves and Fagomine derivatization method for testing, mulberry DNJ and Fagomine optimization conditions of extraction and purification process, mulberry leaf meal to add 6 times the amount of 0.1% hydrochloric acid aqueous solution, heating reflux extraction, three times after the extract concentration on LSD001 resin column, then in 0.5 mol/L of ammonia elution and collect the eluent. The content of DNJ and Fagomine reached 5.65% and 1.35% respectively.

Key words: high performance liquid chromatography-derivatization method; mulberry leaves; DNJ; Fagomine; extraction; purification

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,始载于《神农本草经》,性寒、味甘苦,具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效,是常用中药之一^[1]。历代中医药典籍均见记载桑叶能够治疗消渴症,《本草纲目》记载“桑叶乃手、足阳明之药,汁煎代茗,能止消渴”。现代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^[2,3],而 DNJ 作为桑叶中多羟基生物碱的代表性物质^[4],系降血

糖的主要活性成分。Li 等^[5]对正常及 STZ 诱导的糖尿病小鼠进行葡萄糖耐量试验,并喂以 DNJ 进行干预,结果显示 DNJ(50 mg/kg)对正常小鼠和糖尿病小鼠预处理可以明显降低餐后血糖峰值,改善糖耐量。Fagomine 为桑叶中另外的一种生物碱,能够促进胰岛素分泌,抑制葡萄糖苷酶活性,降低餐后血糖^[6]。Eunice 等^[7]的研究表明, Fagomine 能够降低高脂高糖膳食模型大鼠体内的甘油三酯水平及血糖水平。

因此,建立一种在可靠的同一条件下,桑叶中 DNJ 和 Fagomine 含量的测定方法及提取纯化方法,

对桑叶降糖药物的研究开发意义重大。本文立足于桑叶中 DNJ 和 Fagomine 在同一条件下进行含量检测和提取纯化的研究,以期更为简便、更高效地利用桑叶原料开发降糖药物,提供新的思路和指导。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

桑叶原药材购自广西贵港;DNJ 和 Fagomine 均购自 Chromatogram 公司;各种树脂均购自西安蓝晓科技有限公司;

1.2 实验仪器

玻璃树脂柱尺寸:20 mm × 420 mm (自制);安捷伦高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);N-1001 旋转蒸发仪(上海爱昂仪器仪器有限公司);真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);四孔水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂);AG135 分析电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 衍生化法检测 DNJ 和 Fagomine 含量

2.1.1 桑叶 DNJ 和 Fagomine 提取、纯化

取 200 g 桑叶粗粉,加入 1 200 mL 提取溶剂,加热回流提取三次,每次 2 h,合并三次提取药液,经浓缩至原料的重量,离心、过滤后,滤液直接上已处理好的树脂柱(柱体积 100 mL),上样完毕后,先用水洗脱树脂至流出液干净,再用 3 倍量树脂体积的 0.5 mol/L 的氨水洗脱,经回收氨水后减压浓缩至稠膏,真空干燥即得产品。

2.1.2 色谱条件

色谱柱为 ODS C₁₈ 柱;流动相为乙腈-0.1% 醋酸溶液(30:70),流速 1.0 mL/min,检测波长 265 nm,进样量为 10 μL。

2.1.3 溶液配制

0.4 mol/L 的硼酸-氯化钾缓冲液(pH = 8.5)的配置:取硼酸 12.37 g,加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 500 mL 使溶解,再加 1.0 mol/L 氢氧化钾适量,调节 pH 至 8.5,即得。

5 mmol/L Fmoc-Cl(芴甲氧羰酰氯)溶液的配制:准确称取芴甲氧羰酰氯(9-fluorenylmethyl chloroformate, Fmoc-Cl) 12.94 mg,转移到 10 mL 容量瓶中,加适量乙腈使其溶解并稀释至刻度线,即得。

0.5 mol/L 的甘氨酸溶液的配制:准确称取甘氨酸 375.25 mg,转移至 10 mL 容量瓶中,加适量纯净水使其溶解并稀释至刻度线即得。

对照品溶液的配制:精密称取 DNJ 和 Fagomine

标准品各适量,分别加 20% 甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,摇匀。参考文献^[8],并加以改进,进行衍生化:精密分别量取上述溶液各 1 mL,置入 25 mL 量瓶中,加入 0.4 mol/L 的硼酸-氯化钾缓冲液(pH = 8.5) 1 mL,再加入 5 mmol/L 的 Fmoc-Cl(芴甲氧羰酰氯)无水乙腈(乙腈用无水硫酸钠脱水)溶液 2 mL,室温下超声处理 20 分钟,立即加 0.5 mol/L 的甘氨酸 2 mL,再加 0.1% 的醋酸溶液至刻度,摇匀,过 0.45 μm 有机滤膜过滤,即得 DNJ 标准溶液和 Fagomine 标准溶液。

供试品溶液的配制:精密称取样品 0.3 g,精密称定,加适量热水超声溶解后,通过已处理好的聚酰胺树脂柱(30 ~ 60 目,内径 1.5 cm,长 20 cm),用 pH = 3 的盐酸溶液 200 mL 洗脱,收集洗脱液,减压回收至约 10 mL 时,通过已处理好的阴离子交换树脂柱(内径 1.5 cm,长 20 cm),用水 150 mL 洗脱,收集洗脱液,减压回收至约 30 mL 时,转移至 50 mL 量瓶中,并加水稀释至刻度。参考文献^[8],并加以改进,进行衍生化:精密量取上述溶液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加入 0.4 mol/L 的硼酸-氯化钾缓冲液(pH = 8.5) 1 mL,再加入 5 mmol/L 的 Fmoc-Cl 无水乙腈溶液 2 mL,室温下超声处理 20 分钟,立即加 0.5 mol/L 的甘氨酸 2 mL,再加 0.1% 的醋酸溶液至刻度,摇匀过 0.45 μm 有机滤膜过滤,即得待测样品。

2.1.4 桑叶中 DNJ 和 Fagomine 的含量测定

分别精密吸取 2.1.3 中配制的 DNJ、Fagomine 对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,按 2.1.2 色谱条件进样分析。

2.1.5 系统适用性、线性关系考察、稳定性、精密程度、重复性及加样回收率实验

系统适用性实验:分别精密吸取 2.1.3 中配制的 DNJ、Fagomine 对照品溶液、供试品溶液,按 2.1.2 色谱条件分别进样分析,理论板数按 DNJ、Fagomine 计,均不低于 3 000。

线性关系考察:精密吸取上述两种对照品溶液 2、4、6、8 和 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.1.2 色谱条件测定。

稳定性实验:精密吸取按 2.1.1 制备的同一桑叶供试品溶液,按 2.1.2 色谱条件,分别于衍生化后 0、4、8 和 12 h 时间间隔进行测定,分别测定峰面积,计算 RSD。

精密程度实验:精密吸取同一样品溶液,按 2.1.2 色谱条件,同法连续测定 6 次,测定峰面积,计算

RSD。

重复性实验:取同一批次的桑叶原药材粗粉,分为5份,按2.1.1项下方法制备供试品溶液共5份,并在2.1.2色谱条件下进行测定,计算RSD。

加样回收率实验:分别称取已知DNJ和Fagomine含量的供试样品共6份,按供试品溶液制备,并分别加入DNJ和Fagomine对照品溶液各4ml,衍生化后,按2.1.2色谱条件分析,测定峰面积,计算RSD。

2.2 桑叶 DNJ 和 Fagomine 提取、纯化工艺研究

2.2.1 提取溶剂的选择

称取200g桑叶粗粉4份,分别加入1200mL蒸馏水、80%乙醇、50%乙醇、0.1%盐酸水加热回流提取三次,每次2h,滤过,合并三次滤液,浓缩。

2.2.2 不同树脂纯化 DNJ 和 Fagomine 的试验

取经0.1%盐酸水提取剂提取所得药液4份,每份200mL,分别上LSA-7、LSA-21、LSD001、D-101四种型号的树脂进行纯化(柱体积100mL),上柱流速为2BV/h,分别收集洗脱液,测定DNJ、Fagomine的含量。

2.2.3 LSD001 树脂对 DNJ 和 Fagomine 的动态吸附试验

准确量取LSD001树脂100mL,湿法装柱(ϕ 2cm \times 50cm),先用3倍量2%的氢氧化钠水溶液洗脱树脂柱,水洗至中性时,再加入3倍量2%的盐酸水溶液洗脱树脂柱,并加水淋洗至树脂成中性即可。将含DNJ和Fagomine质量浓度分别为0.85mg/mL

和0.21mg/mL的样液,以5mL/min上样,每50mL接一管,进行HPLC法检测。

2.2.4 LSD001 树脂洗脱剂浓度的选择

为研究氨水浓度对DNJ和Fagomine的洗脱性能,取DNJ和Fagomine质量浓度分别为0.85mg/mL和0.21mg/mL的提取液200mL进行LSD001树脂分离,树脂柱规格同2.2.3项下的。分别用0.1、0.2、0.5、0.7、1.0mol/L的氨水各3BV洗脱,洗脱流速为10mL/min,每100mL接一管,进行HPLC法检测。

3 结果与讨论

3.1 衍生化法检测 DNJ 和 Fagomine 含量

3.1.1 系统适用性实验

HPLC结果显示,DNJ对照品(图1)保留时间为9.68min,Fagomine对照品(图2)的保留时间为14.09min,同时按上述方法对桑叶提取物样品(图3)进行检测,结果显示目标峰与杂质峰间的具有较好分离度,表明该方法专属性良好可用于DNJ、Fagomine的检测。

3.1.2 线性关系考察

以对照品峰面积Y为纵坐标,以对照品进样量X为横坐标,绘制标准曲线,得DNJ回归标准曲线方程 $y = 1.273x + 5.720$, $r = 0.9999$,线性范围为0.02~0.20 μ g。Fagomine回归标准曲线方程 $y = 36892x + 3204.4$, $r = 0.9999$,线性范围为0.03~0.15 μ g。

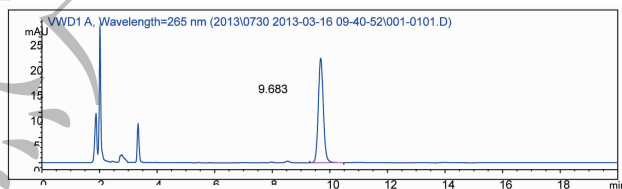


图1 DNJ对照品的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of DNJ standard

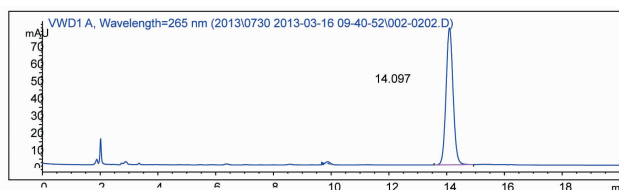


图2 Fagomine对照品的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of Fagomine standard

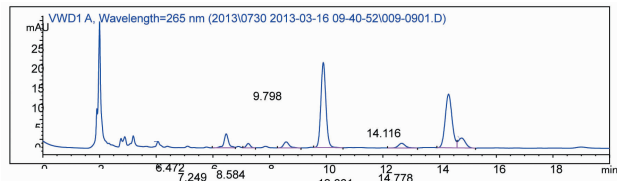


图3 桑叶提取物样品的 HPLC 色谱图

Fig. HPLC chromatograms of Mulberry leaf extract sample

3.1.3 稳定性实验

在稳定性实验中, DNJ 经柱前衍生化后的 RSD 为 1.11%, Fagomine 经柱前衍生化后的 RSD 为 1.12%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.1.4 精密度实验

精密度实验中, 测得 DNJ 峰面积的 RSD 为 0.94% ($n=6$), Fagomine 峰面积的 RSD 为 0.95% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

3.1.5 重复性实验

分别制备 5 份供试品溶液, 测定结果显示, 样品中 DNJ 含量平均值为 8.21%, RSD 为 0.96%。

Fagomine 含量平均值为 1.75%, RSD 为 0.98%, 结果表明方法重复性较好。

3.1.6 加样回收率实验

经测定, DNJ 结果平均回收率为 101.53%, RSD 为 1.14% ($n=6$), Fagomine 结果平均回收率为 101.62%, RSD 为 1.08% ($n=6$)。

3.2 桑叶 DNJ 和 Fagomine 提取、纯化工艺研究

3.2.1 提取溶剂的选择

不同提取溶剂对 DNJ 和 Fagomine 实验, 结果表明, 0.1% 盐酸水溶液和 80% 乙醇提取最好, 考虑提取成本, 选用 0.1% 盐酸水溶液作为提取溶剂, 见表 1。

表 1 不同提取溶剂

Table 1 Different extraction solvent

溶剂 Solvent	提取时间 Extraction time (h)	提取温度 Extraction temperature	浓缩药液中 DNJ 含量 DNJ content in the liquid concentrate after	浓缩药液中 Fagomine 含量 Fagomine content in the liquid concentrate after
水 Water	提取三次, 每次 2 小时 Extract three times for 2 hours each time.	100 °C	0.65 mg/mL	0.11 mg/mL
80% 乙醇 80% Ethanol	提取三次, 每次 2 小时 Extract three times for 2 hours each time.	80 °C	1.05 mg/mL	0.3 mg/mL
50% 乙醇 50% Ethanol	提取三次, 每次 2 小时 Extract three times for 2 hours each time.	90 °C	0.85 mg/mL	0.21 mg/mL
0.1% 盐酸水 0.1% Hydrochloric acid water solution	提取三次, 每次 2 小时 Extract three times for 2 hours each time.	100 °C	1.35 mg/mL	0.44 mg/mL

3.2.2 不同树脂纯化 DNJ 和 Fagomine 的试验

不同树脂对桑叶提取药液中 DNJ 和 Fagomine 的除杂纯化比较, 结果表明, LSD001 树脂对 DNJ 和

Fagomine 纯化最好, 纯化的 DNJ 和 Fagomine 含量远远超过其它树脂的纯化结果, 见表 2。

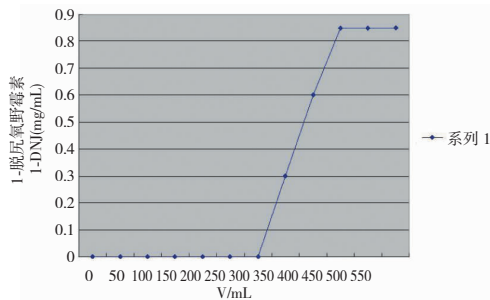
表 2 不同树脂对 DNJ 和 Fagomine 纯化结果

Table 2 The purification results of different resins on DNJ and Fagomine

树脂型号 Resin model	药液量 Solution quantity	树脂体积 Resin volume	上柱流速 Column speed on	DNJ 含量 DNJ content	Fagomine 含量 Fagomine content
LSA-7	200 mL	100 mL	2 BV/h	3.15%	0.63%
LSA-21	200 mL	100 mL	2 BV/h	2.34%	0.14%
LSD001	200 mL	100 mL	2 BV/h	5.65%	1.35%
D-101	200 mL	100 mL	2 BV/h	1.35%	0.22%

3.2.3 LSD001 树脂对 DNJ 和 Fagomine 的动态吸附试验

如图 4, 当上样量达到 450 mL 时, 流出液中 DNJ 和 Fagomine 的质量浓度与样液中的一致, 表明



此 LSD001 树脂的吸附已经达到饱和。计算得出此 LSD001 树脂对 DNJ 和 Fagomine 的动态吸附量分别为 382.5 mg 和 94.5 mg。

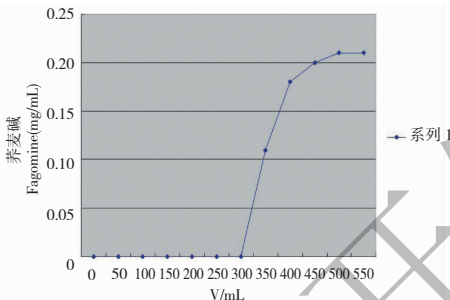


图 4 LSD001 树脂对 DNJ 和 Fagomine 的动态吸附曲线

Fig. 4 The dynamic adsorption curve of LSD001 resin for DNJ and Fagomine

3.2.4 LSD001 树脂洗脱剂浓度的选择

如图 5, 0 ~ 300 mL 为 0.1 mol/L 的氨水洗脱液, 400 ~ 600 mL 为 0.2 mol/L 的氨水洗脱液, 700 ~ 900 mL 为 0.5 mol/L 的氨水洗脱液, 1 000 ~ 1 200

mL 为 0.7 mol/L 的氨水洗脱液, 可见 DNJ 和 Fagomine 用 0.2 mol/L 的氨水洗脱就开始有流出, 到 0.5 mol/L 的浓度时洗脱量量达到最大值。

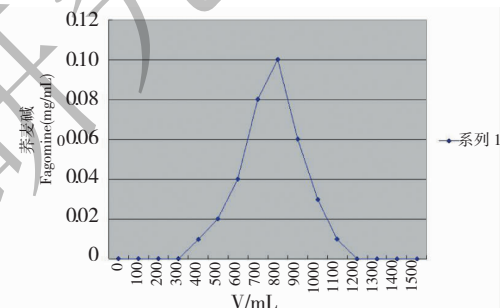
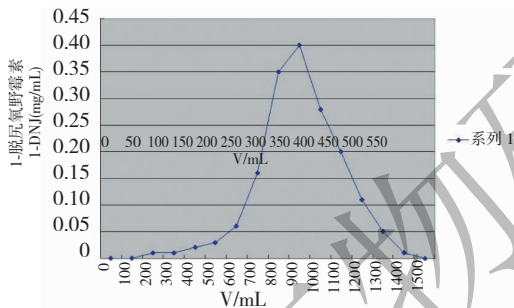


图 5 不同氨水浓度对 DNJ 和 Fagomine 的洗脱

Fig. 5 Different ammonia concentration on DNJ and Fagomine elution

3.2.5 优化工艺

综合上述实验, 桑叶中提取纯化 DNJ 和 Fagomine 的优化工艺条件为: 桑叶粗粉中加入 6 倍量 0.1% 盐酸水溶液, 加热回流提取三次, 提取液过滤、合并、浓缩后上 LSD001 树脂柱, 然后再用 0.5 mol/L 的氨水洗脱并收集洗脱液, 浓缩, 真空干燥即可。利用优化的工艺条件所得样品按照 2.1 所述检测方法进行分析, 结果显示 DNJ 含量达 5.65%, Fagomine 含量达 1.35%。

4 结论

桑叶具有显著的降血糖功效, 生物碱则是其发挥降血糖活性的标志性成分^[9], 我们采用高效液相色谱-衍生化法同时检测桑叶中 DNJ 和 Fagomine 两个生物碱成分, 并采用树脂法对桑叶中 DNJ 和 Fagomine 进行纯化, 为桑叶生物碱活性成分的大生产提供有力依

据, 为桑叶降糖药物的研究开发提供支持。

桑叶中提取纯化 DNJ 和 Fagomine 的优化工艺条件: 桑叶粗粉中加入 6 倍量 0.1% 盐酸水溶液加热回流提取三次, 提取液经过滤、合并、浓缩后上 LSD001 树脂柱, 然后再用 0.5 mol/L 的氨水洗脱并收集洗脱液, 浓缩, 真空干燥即可, 该优化工艺所得样品中 DNJ 含量达 5.65%, Fagomine 含量达 1.35%。该优化工艺步骤简单, 操作方便可行, 具备较好的技术经济性, 适用于车间的放大生产。

参考文献

- Ouyang Z, Chen J. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of mulberry leaves [J]. J Jiangsu Univ: Nat Sci Ed (江苏大学学报: 自科版), 24(6): 39-44.