

1-脱氧野尻霉素的含量测定研究进展

周惠燕, 许丽丽(浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

摘要: 目的 综述近年来 1-脱氧野尻霉素的含量测定研究进展。方法 检索、阅读文献, 分析与归纳文献内容。结果 1-脱氧野尻霉素的含量测定方法包括柱前衍生化 HPLC、HPLC-ELSD、离子色谱法、气相色谱法。结论 以上含量测定方法各有特点, 均可用于 1-脱氧野尻霉素的含量测定。

关键词: 1-脱氧野尻霉素; 含量测定; 高效液相色谱法; 离子色谱; 气相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)11-0901-04

Research Progress on Determination of 1-deoxyrijimycin

ZHOU Huiyan, XU Lili (Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To summarize the research progress on content determination methods of 1-deoxyrijimycin (DNJ). **METHODS** Concerning documents were retrieved and concluded. **RESULTS** The determination methods of DNJ concludes HPLC with pre-column derivatization, HPLC-ELSD, IC, GC. **CONCLUSION** These methods are of character, and can be used for the quality control of DNJ.

KEY WORDS: 1-deoxyrijimycin; content determination; HPLC; IC; GC

1-脱氧野尻霉素(1-deoxyrijimycin, DNJ)是一种含氮生物碱, 在桑属植物中含量较高。目前, DNJ 的研究和应用主要集中在医药和工业生产领域。DNJ 是所有哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 能够用于糖尿病及其并发症的有效治疗; 它具有显著的抗病毒逆转录酶活性的作用; 对肿瘤转移具有抑制作用; 还可以作为工业化生产药用高纯度麦芽糖的有效载体^[1-3]。DNJ 的结构属于含氮杂环糖类, 此类物质在紫外-可见光区域无吸收, 因此用高效液相色谱法常用的紫外检测器不能检测出此类物质, 且在一般的 C_{18} 反相色谱柱上基本不保留。目前, DNJ 的检测方法主要有液相色谱法、离子色谱法和气相色谱法等, 但未见有关 DNJ 含量测定方法综述报道。为此对 DNJ 的含量测定方法作一综述, 为今后对 DNJ 含量测定研究提供参考。

1 柱前衍生化 HPLC 测定

1.1 FMOC-Cl 柱前衍生化 HPLC 测定

FMOC-Cl 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。而 DNJ 分子中具有仲胺结构, 因此可以采用 FMOC-Cl 作为衍生化试剂进行衍生化。由于 FMOC-Cl 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能进入色谱柱。一般在衍生化反应后加入一定量的甘氨酸以除去多余的荧光试剂。

欧阳臻等^[4-9]采用 FMOC-Cl 柱前衍生化 HPLC 荧光检测法测定不同产地桑叶中 DNJ 的含量。采用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸提取桑叶干燥粉末中的 DNJ, 在 pH 8.5 的硼酸盐缓冲液条件下, 用 FMOC-Cl 与 DNJ 反应生成荧光产物 DNJ-FMOC, 然后用高效液相色谱-荧光检测器测定 DNJ 的含

基金项目: 2005 年浙江省青年教师资助计划项目(245)

作者简介: 周惠燕, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0574)88222793

E-mail: hzhxiaohui@hotmail.com

量。色谱柱: HiQSL C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及 ODS 预柱(10 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%醋酸(55:45); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 荧光检测器激发波长 254 nm, 发射波长 322 nm; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下样品中的 DNJ 衍生物与相邻组分均得到良好的基线分离, 试剂的水解副产物 FMOC-OH, 和 Gly-FMOC 均不干扰组分的测定。结果表明 DNJ 在 0.567~34 μg·mL⁻¹ 内与峰面积成良好的线性关系。加样回收率为 97.2%, RSD 为 2.0%。该试验还考察了衍生化反应的条件, 选择衍生化反应的时间为 20 min, 衍生化反应的温度为 20 °C。该检测法用于测定桑叶中 DNJ 含量具有准确、选择性强、灵敏度高、重现性好等特点, 可用于桑叶中 DNJ 的定量分析。

陈正收等^[10-12]采用 FMOC-Cl 柱前衍生化 HPLC 紫外检测法测定桑白皮药材中 DNJ 的含量。采用 0.05 mol·L⁻¹ 盐酸超声提取桑白皮中的 DNJ, 加入 0.4 mol·L⁻¹ 的硼酸-氯化钾缓冲液(pH 8.5), 再加入 10 mmol·L⁻¹ 的 FMOC-Cl 乙腈溶液, 室温下超声处理衍生化, 然后用高效液相色谱-DAD 检测器。色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250mm, 5 μm); 乙腈-0.1% 醋酸溶液(25:75)为流动相; 检测波长为 265 nm。结果表明 DNJ 在 0.0163~0.3250 μg 内成良好的线性关系。加样回收率为 99.16%, RSD 为 0.84%。

利用荧光试剂 FMOC-Cl 与桑叶中 DNJ 柱前衍生化, 然后高效液相进行色谱分离测定, 方法灵敏准确, 较简便快速, 并具有衍生反应可于室温下进行, 反应速度快, 操作步骤简单, 衍生物稳定等特点。缺点是该方法中衍生化试剂的水解副产物较多, 一定程度上可能会干扰目标峰的判断。以上 2 种检测方法基本一致, 区别点是检测器不同, 荧光检测器的灵敏度大于紫外检测器。

1.2 AQC 柱前衍生化 HPLC 测定

谢慧明等采用 6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)柱前衍生化高效液相色谱-荧光检测法测定了桑叶中的 DNJ 含量。采用 0.05 mol·L⁻¹ HCl 提取桑叶中的 DNJ, 以过量的 AQC 试剂在 pH 8.5 硼酸盐缓冲液下对 DNJ 进行衍生化, 生成 DNJ 的 AQC 衍生物具有荧光, 以 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.0)-乙腈(85:15)为流动相, 利用 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 在激发波长为 250 nm、发射波长为 395 nm 条件下进

行荧光检测, DNJ 的 AQC 衍生物与衍生化试剂的水解产物分离良好, 方法的线性范围为 0.5~25 mg·L⁻¹, 回收率为 96.1%~98.6%。样品中的 DNJ 经 AQC 衍生后用荧光检测和紫外检测皆可, 该试验还比较了采用紫外检测器(最大吸收波长为 245 nm)和荧光检测器的灵敏度差异, 紫外检测的最低检出限约为 0.15 mg·L⁻¹(S/N=3), 荧光检测的检出限为 0.02 mg·L⁻¹(S/N=3)^[13]。该试验中 DNJ 与过量的 AQC 反应, 多余的衍生试剂能在 1 min 内被水解, 生成仅有微弱的荧光发射性的水解产物 6-氨基喹啉(AMQ)。通过调整流动相的组成比例, 可消除 AMQ 对检测结果的影响。该方法与上述 FMOC-Cl 衍生化相比, 衍生化试剂的干扰较少, 水解副产物少, 且荧光微弱, 灵敏度更高, 且衍生化后产物更稳定。

2 HPLC-ELSD

根据 DNJ 的结构特征, 因此可选用 NH₂ 色谱柱分离、蒸发光散射检测器(ELSD)检测。ELSD 的通用检测方法消除了常见于传统 HPLC 检测方法中的难点, 不同于紫外检测器对于无紫外吸收的化合物灵敏度低, 而且只能使用不吸收紫外的流动相, ELSD 的响应不依赖与样品的光学特性, 任何挥发性低于流动相的样品均能被检测, 不受其官能团的影响; 能与任何的挥发性流动相相容, 可根据样品的溶解度或分离特性选择流动相; 对几乎所有的样品给出一致的响应因子, 可以通过和内标比较定量未知化合物。所以 DNJ 的含量测定可以选择 ELSD 检测器。

杨梅等^[14-15]采用 HPLC-ELSD 测定不同产地桑叶中 DNJ 的含量。样品处理方法为: 取干燥粉碎桑叶水提醇沉法提取, 经 001×7 强酸性阳离子交换树脂处理, 临用前溶液经微孔滤膜过滤。检测方法如下: 色谱柱为 TSKgel Amide-80 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(70:30), 水中含有 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C; ELSD 漂移管的温度为 105 °C, 载气流速为 3.0 L·min⁻¹。结果, 通过优化色谱条件, 主峰与杂质得到了很好的分离, 且有合理的保留时间(8.728 min), 线性范围为 2.11~10.55 μg(*r*=0.999 1)。平均回收率为 95.98%(*n*=5), RSD=1.98%。

陈正收等^[10]也采用 HPLC-ELSD 测定桑白皮药材中 DNJ 的含量。样品处理方法为: 取桑白皮粉末, 用 40%乙醇超声提取, 提取液通过 001×7 型阳离

子树脂柱纯化。检测方法为：色谱柱为 Hypersil NH₂ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水(78 : 22)；流速为 0.8 mL·min⁻¹；ELSD 检测器漂移管温度为 50 °C；载气流速：2.0×10⁵ Pa。且他们同时建立了 FMOC-Cl 柱前衍生化 HPLC 紫外检测法测定桑白皮药材中 DNJ 的含量的方法，并比较了 2 种测定方法，2 种方法经过方法学考察，结果表明都能准确可靠地测定药材含量，且方法之间不存在显著性差异，都可作为桑白皮药材的质量控制方法。

HPLC-ELSD 具有快捷、灵敏、准确、重现性好等优点，取得了令人满意的结果。但因 ELSD 的选择性差，样品需进行复杂的前处理才能进行测定，以上作者都对待测定样品用阳离子树脂进行了分离纯化。

3 离子色谱法(IC)

陈智毅等^[16-17]采用离子色谱法测定蚕沙及蚕沙冲剂中 DNJ 的含量。以蒸馏水超声波法提取蚕沙及蚕沙冲剂样品中的 DNJ 制得供试液，然后进行离子色谱检测。色谱条件为 Dionex DX500-IC/HPLC，色谱柱为 CarboPac Pal(4~250 mm)，ED40 检测器，流动相为 20 mmol·L⁻¹ NaOH，流速为 0.5 mL·min⁻¹。结果 DNJ 的保留时间约 3.22 min 处，从蚕沙提取物分离出 6 个主要成分；从蚕沙冲剂提取物分离出 11 个主要组分，用峰面积归一化法测定蚕沙中 DNJ 的相对含量为 0.107 1%，和桑叶中 DNJ 含量(0.1%)十分相近，蚕沙冲剂的相对含量为 0.109 9%，和加工前的蚕沙差异不大。由此认为蚕沙和蚕沙冲剂应具有与桑叶相同的降糖效果。该方法的缺点是电化学检测器由于选择性低，因此灵敏度较低，另外蚕沙提取液在该分析方法中分离度偏低，DNJ 的保留时间太短。

4 气相色谱法

李宏等^[18]为了快速测定桑叶中的 DNJ 的含量，利用化学合成法将 DNJ 转化成沸点较低的酯类物质，并首次建立了用气相法快速检测 DNJ 的新方法。样品处理方法为：取桑叶粉 0.5 g 于 10 mL 的烧杯，先后加入 1 mL 吡啶待 DNJ 溶解后，加入 NaOH 10 mg，振荡 10 min 后，加入乙酸苄 2.5 mL，于 65 °C 反应 6~7 h，冷却至常温后，加入 2.5 mL 的甲醇，12 000 r·min⁻¹、离心 5 min，取上清液后，再次加入 2.5 mL 的甲醇，离心 2 min 合并 2 次的溶液，用甲醇定容至 10 mL 量瓶中作为测试样品备用。

色谱条件为：气相色谱仪岛津 Gc-14c，检测器 FID，色谱柱为 DB-5(30 mm×0.53 mm×1.0 μm)，进样口温度 260 °C、检测器温度 260 °C；柱温，起始温度 120 °C、保持 2 min，以 16 °C·min⁻¹ 升至 250 °C，保持 10 min；载气中，氮气流速 5.0 mL·min⁻¹、空气 500.0 mL·min⁻¹、氢气 60.0 mL·min⁻¹。检测到桑叶中 DNJ 含量达到 0.129 4%，与欧阳臻等利用柱前衍生化高效液相色谱荧光检测法检测出不同季节桑叶中 DNJ 的含量在 0.076%~0.24%之间类似。该方法，操作简便，能够快速、准确的检测出桑叶中的 DNJ 含量；通过改变实验条件，该方法还可以用于蚕沙、蚕粉以及蚕蛹等物质中 DNJ 含量的检测。但是该方法对样品无水的要求较高。

5 结语

本文综述和比较了近年来桑叶中主要有效成分 DNJ 含量测定的常用方法。包括柱前衍生化 HPLC、HPLC-ELSD、离子色谱法、气相色谱法，这些方法各有特点。柱前衍生化 HPLC 的特点是需要进行柱前衍生化反应，但是该方法准确、选择性强、灵敏度高；HPLC-ELSD 的特点是灵敏、准确，但是样品需进行复杂的前处理；离子色谱法的特点是快捷、但灵敏度相对较低，干扰较大；气相色谱法准确，但在测定之前用化学合成法将 DNJ 转化成沸点较低的酯类物质的反应时间较长，且对样品无水的要求高。笔者认为根据研究中不同的需要以及所具备的仪器条件选择以上的测定方法。由于 DNJ 特殊的活性，在医学研究和工业应用领域越来越多的受到重视，目前 DNJ 的来源主要是从桑叶中提纯制备，而发展快速、简便、灵敏、准确的含量测定方法则是制备 DNJ 的基础。

REFERENCES

- [1] HANG S K, YOUNG H K, YOUNG S H, et al. α-Glucosidase inhibitors from comadina communis [J]. Hanta Medicm, 1999, 65(2): 437-439.
- [2] HIROSHI N, IKUKO K, FU CH, et al. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars from xanthocercis azmbesiaca, morus bombycis, aglaonematreubii, and castanospermum australe in streptozotocin in diabetic mice [J]. J Nat Prod, 1998, 61(2): 397-400.
- [3] BUDHAN S P, NAGARAJA M, INDER K. Role of sulfhydryl groups in the function of glucosidase from mammary gland [J]. J BioI Chem, 1993, 263(9): 6445-6452.
- [4] OUYANG Z, LI Y H, XU W D, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in leaves of *Morus alba* by high performance liquid chromatography with luorescence detection [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2005, 30(9): 682-685.

(下转第 928 页)

[5] MENG X, OUYANG Z, CHANG Y, et al. Contrast of 1-deoxynojirimycin content in mulberry leaves from different habitats [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2008, 31(1): 8-10.

[6] OUYANG Z, CHEN J, LI Y H. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2005,33(6): 817-820.

[7] OUYANG Z, CHEN J. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. Leaves in Different Seasons [J]. J Food Sci (食品科学), 2004, 25(10): 211-214.

[8] ZHANG Z F, JIN J, SHI L G. Determination of 1-deoxynojirimycin in ramulus mori by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(7): 535-537.

[9] 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): 93-96.

[10] CHEN Z S, XU J, ZHOU Y J. Comparison of two determination methods of 1-deoxynojirimycin in Cortex Mori [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2007, 29(11): 1654-1657.

[11] SHEN Y H, ZHU J, DAI F Y, et al. Investigation of 1-DNJ Contents in the Larvae of *Bombyx mori* and *Bombyx Mandarina* [J]. Science of Sericulture (蚕业科学), 2007, 33(4):

[12] SHI X Q, CUI W Z, QIU L Q, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin content by ultraviolet reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Science of Sericulture (蚕业科学), 2006, 32(1): 146-149.

[13] XIE H M, WU F R, YANG Y, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves using reversed-phase high performance liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2008, 26(5): 634-636.

[14] YANG M, LIU Y M, GAO R C. Determination of DNJ in *Morus alba* L. leaves by HPLC [J]. Med J Chin PAPF(武警医学), 2007, 18(2): 121-124.

[15] JIANG Y T, CHEN J Y, LIU K. HPLC-ELSD determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(1): 27-29.

[16] CHEN Z Y, XIAO G S. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Bombyx mori* L. and granule [J]. China Sericulture (中国蚕业), 2003, 24(1): 30-31.

[17] CHEN Z Y, XIAO G S, CHEN W D. Determination of 1-deoxynojirimycin in yellow blood silk worm by ion chromatography [J]. J Food Sci (食品科学), 2004, 25(5): 150-151.

[18] LI H, QIAN Y H, WANG J F, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in leaves of *Morus alba* L. by GC [J]. North Sericulture(北方蚕业), 2006, 37(3): 31-32.

收稿日期: 2009-03-26