

· 中药工业 ·

阳离子树脂种类及用量对桑叶中 1-脱氧野尻霉素纯化效果

石万银*, 王玉, 王道清, 徐剑, 陈志元, 江丹

劲牌生物医药有限公司, 湖北 黄石 435000

[摘要] 目的: 确定桑叶中1-脱氧野尻霉素(DNJ)纯化的最佳树脂种类和用量。方法: 采用LSI-010型(H型)、001×7(H型)、001×7(Na型)3种阳离子交换树脂纯化桑叶DNJ, 并考察等量阳离子交换树脂对不同量桑叶DNJ纯化效果。结果: 3种阳离子树脂对桑叶DNJ纯化效果差异较大, 等量阳离子树脂对不同上样量的桑叶DNJ纯化效果不同。结论: 001×7(Na型)阳离子交换树脂对桑叶DNJ纯化效果最好, 阳离子树脂用量与药材量最佳比例为1:1。

[关键词] 桑叶; 1-脱氧野尻霉素; 阳离子交换树脂; 纯化

[中图分类号] R282.71; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0508-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180910001

Purification of 1-deoxynojirimycin in Mori Folium by Different Cation Resin Types

SHI Wan-yin*, WANG Yu, WANG Dao-qing, XU Jian, CHEN Zhi-yuan, JIANG Dan

Jing Brand Bio-Medicine Co., Ltd., Huangshi 435000, China

[Abstract] **Objective:** To select the optimal cation resin type and quantity for purification of 1-deoxymilithromycin (DNJ) in Mori Folium extract. **Methods:** Three cation resins of LSI-010(H), 001×7(H), 001×7(Na) were used to purify DNJ. The type and quantity of the resins were selected. **Result:** The purification capacity of three cation resins on DNJ was quite different. The adsorption effect of different cation resin quantity on DNJ was also different. **Conclusion:** The best resin for purification of DNJ is 001×7(Na). The optimum ratio of the amount of resin to the amount of the medicinal materials is 1:1.

[Keywords] Mori Folium; 1-deoxynojirimycin; cation resin; purification

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶^[1]。初霜后采收, 除去杂质, 晒干。桑叶是蚕的日常食物, 又名家桑、荆桑、桑椹树、黄桑叶等, 桑叶药性平和、营养丰富, 含有人体必需的多种氨基酸和维生素, 被国家卫计委列为“既是食品又是药品”名单^[2]。

1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)是桑叶中一种嘧啶类生物碱, 是一种天然糖的结构类似物^[3], DNJ降血糖主要途径表现在小肠内与 α -葡萄糖苷酶结合, 抑制麦芽糖、蔗糖的分解, 从而使在肠道内糖分吸收量明显下降, 安全性好^[3]。目前, DNJ的主要获得途径有天然来源和化学合成, 但现有的化学合成方法存在过程复杂、条件苛刻、产率低等弊端。因此, 从植物中获得高纯度DNJ成为当

今研究的热点^[4]。

离子交换树脂纯化天然DNJ是目前应用较多的方法, 通过离子交换原理, 选择性置换出提取液中带相应电荷的离子或者分子, 洗去杂质后再将其洗脱下来, 从而实现目标成分和杂质的分离。该方法操作步骤为桑叶提取液上阳离子交换树脂, 纯水洗去杂质, 再用适宜浓度的氨水洗脱, 收集氨水洗脱液浓缩干燥, 得到含DNJ的提取物^[5-6]。

本文采用前期实验确定的桑叶DNJ纯化工艺, 比较了LSI-010(H型)、001×7(H型)、001×7(Na型)3种阳离子树脂对桑叶DNJ的纯化效果, 并确定了001×7(Na型)阳离子交换树脂纯化桑叶DNJ的最佳用量。

* [通信作者] 石万银, 工程师, 研究方向: 中药分离纯化研究; E-mail: 495430732@qq.com

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(G1311A 四元梯度泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、蒸发光散射检测器);纯水机(威立雅水务);电子天平(梅特勒-托利多公司);水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司);真空泵(vacuubrand)。

1.2 试剂

LSI-010(H型)、001×7(H型)、001×7(Na型)阳离子交换树脂;对照品 DNJ(1-脱氧野尻霉素,纯度95%,批号:D101242,Aladdin);乙腈(TEDIA,色谱纯);乙酸铵(SIGMA,色谱纯);超纯水;乙醇、浓盐酸、浓氨水、氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)。

2 DNJ 检测方法学考察

2.1 供试品溶液的制备

精密称取桑叶提取物 20 mg,置 10 mL 容量瓶中,用乙腈-水(50:50,水中含 6.5 mmol 乙酸铵)溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液制备

精密称取 DNJ 对照品 7.00 mg 于 25 mL 容量瓶中,用乙腈-水(50:50,水中含 6.5 mmol 乙酸铵)溶解并定容至刻度,配制成 DNJ 质量浓度为 $266 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:Shodex Asahipak NH2P-50 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);蒸发光散射检测器,漂移管温度为 100 $^{\circ}\text{C}$,氮气流速为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,乙腈- $6.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵 = 82:18 等度洗脱,流动相流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ [7]。上述色谱条件下,DNJ 对照品色谱图见图 1,桑叶提取物色谱图见图 2。

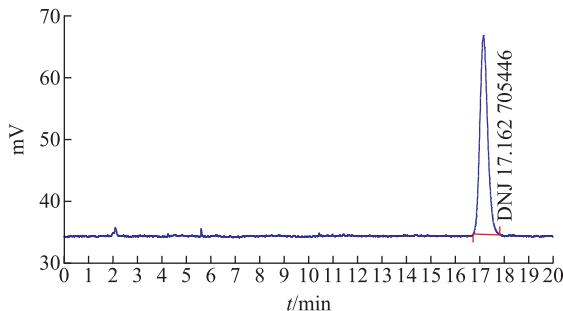


图1 DNJ 对照品 HPLC 图

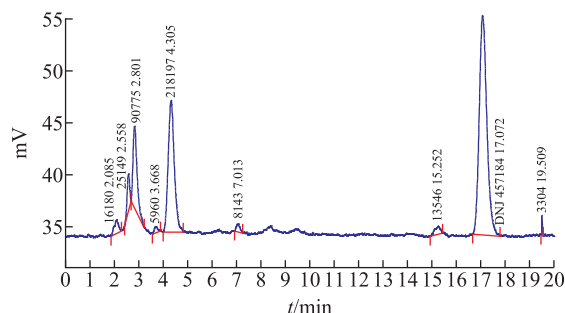


图2 桑叶提取物 HPLC 图

2.4 色谱柱的选择

比较了 Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters T3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Shodex Asahipak NH2P-50 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对 DNJ 对照品和桑叶提取物的分离效果,根据对照品和提取物样品的 HPLC 图分离度和对称因子,最终确定选择 Shodex Asahipak NH2P-50 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为检测 DNJ 的色谱柱。

2.5 检测方法学研究

2.5.1 线性范围考察 分别精密吸取 2.2 项下对照品溶液 1、2、3、4、5 mL 于 5 mL 容量瓶中,用乙腈-水(50:50 含 6.5 mmol 乙酸铵)稀释并定容至刻度,得到 DNJ 质量浓度分别为 53.20、106.40、159.60、212.80、266.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,用 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后作为对照品溶液备用。按照 2.3 的色谱条件进行色谱分析,经色谱分析分别得到各浓度 DNJ 对照品色谱峰的峰面积,分别以 DNJ 对照品溶液峰面积的对数为纵坐标,以 DNJ 对照品溶液浓度的对数为横坐标建立标准曲线。DNJ 的标准曲线方程: $Y = 0.527266X - 0.589344$, $r = 0.9992$ 。

2.5.2 精密度试验 精密称取桑叶提取物 32.76 mg,按照 2.1 方法制备桑叶提取物供试品溶液,在 2.3 色谱条件下连续进样分析 6 次,得到各次分析的 DNJ 色谱峰面积,计算提取物中 DNJ 峰面积的 RSD 值为 1.56%。

2.5.3 稳定性试验 取精密度试验中的桑叶提取物的供试品溶液,分别在 2.3 色谱条件下于 0、1、2、3、4 h 进样分析,得到桑叶提取物中 DNJ 的峰面积,计算 DNJ 峰面积的 RSD 值为 1.32%。

2.5.4 重复性试验 精密称取桑叶提取物 30 mg,按

照 2.1 项下的方法制备 6 份桑叶提取物供试品溶液,在上述色谱条件下进行色谱分析,利用建立的标准曲线计算各供试品溶液中 DNJ 的含量。计算得到桑叶提取物中 DNJ 的平均质量分数为 5.28%, RSD 值为 0.76%。

2.5.5 加样回收试验 精密称取桑叶提取物 15 mg 样品 6 份,分别加入相当于 15 mg 桑叶提取物中 DNJ 含量的 80%、100%、120% 3 个梯度的 DNJ 对照溶液各 2 份,按照 2.1 项下的方法制备桑叶提取物供试品溶液,在上述色谱条件下进行色谱分析,利用标准曲线计算 DNJ 的含量及回收率。计算所得桑叶提取物中 DNJ 的平均回收率为 96.30%, RSD 值为 1.58%。

3 阳离子种类及用量对 DNJ 纯化效果考察

3.1 不同种类阳离子交换树脂对桑叶 DNJ 纯化效果考察

3.1.1 阳离子树脂预处理 量取 LSI-010(H 型)、001×7(H 型)、001×7(Na 型)阳离子交换树脂 3 份,每份 200 mL,纯水浸泡后分别装入 3 根玻璃层析柱,水洗至无色,LSI-010(H 型)、001×7(H 型)分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性,再分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性备用;001×7(Na 型)分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性,再分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性备用。

3.1.2 桑叶 DNJ 纯化 称取桑叶药材 200 g 共 3 份,分别加入 4 L 纯净水,90 ℃ 提取两次,每次 2 h,趁热过滤,合并两次滤液,分别用预处理过的 LSI-010(H 型)、001×7(H 型)、001×7(Na 型)3 种阳离子交换树脂纯化,流速为 400 mL·h⁻¹,提取液上样完毕后每根树脂柱分别用 800 mL 水洗,弃去水洗液,再用 1000 mL 0.5 mol·L⁻¹ 氨水洗,收集氨水洗脱液,浓缩干燥,称质量,检测 DNJ 含量。检测结果见表 1^[8]。

3.2 001×7(Na 型)阳离子交换树脂对不同量的桑叶提取液中 DNJ 纯化效果考察

3.2.1 阳离子树脂预处理 量取 001×7(Na 型)阳离子交换树脂 5 份,每份 200 mL,纯水浸泡后分别装

表 1 不同类型阳离子交换树脂对桑叶 DNJ 纯化结果

树脂类型	提取物得率	提取物 DNJ 含量 %
001×7(H 型)	1.45	7.64
001×7(Na 型)	0.94	15.71
LSI-010(H 型)	1.62	8.93

入 5 根玻璃层析柱,水洗至无色,分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性,再分别用 1000 mL 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液洗脱,流速为 400 mL·h⁻¹,水洗至中性备用,树脂柱编号为 1#、2#、3#、4#、5#。

3.2.2 桑叶 DNJ 纯化 分别称取桑叶药材 200、300、400、600、800 g 共 5 份,分别加入 20 倍体积的纯净水,90 ℃ 提取两次,每次 2 h,趁热过滤,合并两次滤液,分别用预处理过的上述 5 组阳离子交换树脂纯化,流速为 400 mL·h⁻¹,提取液上样完毕后每根树脂柱分别用 800 mL 水洗,弃去水洗液,再用 1000 mL 0.5 mol·L⁻¹ 氨水洗,收集氨水洗脱液,浓缩干燥,称质量,检测 DNJ 含量。检测结果见表 2。

表 2 001×7(Na 型)阳离子树脂对不同量桑叶提取液纯化效果

树脂柱编号	树脂量:药材量	流出液 DNJ 量/mg	提取物得率/%	提取物 DNJ 质量分数/%
1#	1:1	15.50	0.98	6.98
2#	1:1.5	41.43	0.66	5.47
3#	1:2	62.08	0.58	4.36
4#	1:3	151.26	0.45	3.22
5#	1:4	184.15	0.45	3.07

4 结论及讨论

不同类型阳离子树脂对桑叶 DNJ 纯化检测结果显示,桑叶提取液经过 3 种阳离子树脂纯化后得到桑叶提取物中 DNJ 含量从高到低依次为 001×7(Na 型) > LSI-010(H 型) > 001×7(H 型),纯化后桑叶提取物得率从高到低依次为 LSI-010(H 型) > 001×7(H 型) > 001×7(Na 型),不同阳离子树脂纯化 DNJ 提取物得率和 DNJ 含量差异较大,与不同类型树脂交联度不一样,对 DNJ 吸附和交换能力不

一样有关;采用H型阳离子树脂提取物得率高于Na型阳离子树脂,是由于相同质量的H型阳离子树脂比Na型阳离子树脂能交换更多带正电荷的物质。

桑叶提取液不同上样量实验,从流出液中DNJ检出量结果看,1倍上样量流出液DNJ含量最少,1.5倍、2倍、3倍、4倍上样量流出液中DNJ含量依次增大,且后期实验证明,树脂多次使用后,DNJ得率降低而流出液中DNJ检出量增加,可能是由于树脂本身破碎,功能退化或者是再生不彻底,而使纯化效果变差。

采用001×7(Na型)阳离子交换树脂进行桑叶DNJ纯化后,由于树脂上的Na离子也被部分交换下来,导致浓缩液碱性太强,提取物中Na离子含量较高,可根据需求提取物DNJ含量的高低选择不同种类的阳离子交换树脂进行桑叶DNJ的纯化。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:297.
- [2] 任玉珍,王龙虎,蒋焕,等. 不同采收期桑叶药材的质量比较[J]. 中国现代中药,2006,8(5):8-9.
- [3] LI Y G,JI D F,ZHONG S,et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice [J]. J Ethnopharmacol,2011,134(3):961-970.
- [4] 周晓玲,孙凌云,张进,等. 1-脱氧野尻霉素的来源及合成研究进展[J]. 蚕业科学,2011,37(1):105-110.
- [5] 刘韦璠,赵骏,高秀梅,等. 1-脱氧野尻霉素的提取精制工艺[J]. 中华中医药学刊,2009,27(10):2079-2081.
- [6] 刘超,徐立,史正琴,等. 植物源1-脱氧野尻霉素分离纯化技术综述[J]. 蚕业科学,2014,40(3):544-550.
- [7] 周玉飞,褚以文,王欣荣. HPLC-ELSD分析米格列醇和杂质1-脱氧野尻霉素[J]. 中国新药杂志,2012,21(4):375-377.
- [8] 吴方睿. 桑叶中1-脱氧野尻霉素提取分离工艺研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2009.

(收稿日期:2018-09-10 编辑:王笑辉)