

# 桑叶中 1-脱氧野尻霉素分离纯化的工艺研究

罗蕾蕾, 吴俊

(湖北武汉军事经济学院军需系给养勤务教研室, 湖北武汉 430035)

**摘要:** 本文以 1-脱氧野尻霉素(DNJ)的含量和提取率为考察指标, 对使用 AB-8 大孔树脂和 732H 型阳离子树脂分离纯化桑叶中 DNJ 的工艺进行了研究。使用 AB-8 大孔树脂对提取液进行脱色除杂处理, 上样液 pH 值为 4.0, 上样量不超过 2 BV, 流速为 1 BV/h, 可将提取液中 DNJ 含量从 0.23% 提高到 4.9%, 回收率为 98%。采用 732H 型阳离子树脂层析法进一步纯化, 分段洗脱流程为: 1 BV 去离子水-1.5 BV 0.3 M 氨水-2 BV 0.5 M 氨水, 洗脱流速为 2 BV/h, 当流出液 pH 为 9~10 时, DNJ 被洗出。产品中 DNJ 含量为 16.7%, 此工艺纯化效果好, 方法简单, 能够为工业化生产高浓度 DNJ 提取物提供基础工艺数据。

**关键词:** 桑叶; 1-脱氧野尻霉素; 大孔树脂; 阳离子树脂; 纯化

文章编号: 1673-9078(2012)12-167-169

## Isolation and purification of 1-deoxyojirimycin from *Morus alba* L. leaves

LUO Lei-lei, WU Jun

(Quartermaster Department of Military Economics Academy, Wuhan430035, China)

**Abstract:** This paper studied the technology for isolation and purification of 1-Deoxyojirimycin (DNJ) from *Morus alba* L. leaves by using AB-8 macroporous resin and 732 H type cation exchange resin sequentially, with the content and recovery rate of DNJ as indexes. The result showed that AB-8 resin was suitable for the preliminary isolation and purification of DNJ. At pH 4.0, the maximum loaded amount of *Morus alba* L. leaves extract was 2BV and the recovery rate of DNJ was 98% by collecting the solution flowing out at 1BV/h as flowing rate. The content of DNJ was enhanced to 4.9%. 732H type cation exchange resin chromatography was used to purify continuously. Elution order is: 1 BV H<sub>2</sub>O-1.5 BV 0.3 M NH<sub>3</sub>-2BV 0.5 M NH<sub>3</sub>. The final output was obtained by collecting the fraction with pH 9.0~10.0. The final total DNJ content was 16.7%. The technology is suitable for large scale manufactory of extract rich of DNJ.

**Key words:** *Morus alba* L. leaves; 1-Deoxyojirimycin; macroporous resin; cation exchange resin; purification

桑叶为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥叶。

桑叶入药首见于《神农本草经》, 列为中品。桑叶味苦、甘, 性寒, 归肺、肝经, 具有疏散风热、清肺润燥、平肝明目、凉血止血之功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 桑叶中多羟基生物碱具有明显的降血糖作用<sup>[2]</sup>。

而 1-脱氧野尻霉素 (DNJ) 作为多羟基生物碱的一种特征性成分 ( $\alpha$ -糖苷酶抑制剂), 是桑叶能够治疗糖尿病的主要功效成分。我国桑叶资源丰富, 近年的研究也表明桑叶中 DNJ 在降血糖、抗肿瘤等方面有较好的开发价值。因 DNJ 的检测较为困难<sup>[3]</sup>且在桑叶中含量低, 约 1% 左右<sup>[4]</sup>, 关于桑叶中生物碱类活性物质提取分离的研究尚未见到正式文献。故进行桑叶中 DNJ 的高效分离技术研究具有很高的科研和经济价值。本文旨在根据桑叶中 DNJ 的结构特性, 采用大孔树脂和离子柱色谱联用技术分离纯化桑叶中 DNJ, 探讨高 DNJ 含量桑叶提取物的生产方法。此方法操作简

单, 分离纯化效果好, 能够为工业化生产高浓度 DNJ 提取物提供基础工艺数据, 为进一步制备高纯度 DNJ 及深入研究 DNJ 的生物活性提供途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

AB-8、D-101 和 NAK-9 大孔树脂均购自南开大学化工厂; 732H 型阳离子树脂购自蚌埠天星树脂公司; 干桑叶 (购自安徽省药材公司, 产地安徽亳州); DNJ 标准品 (Sigma 公司, 纯度 $\geq$ 99%), 衍生试剂 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯 (AQC, Waters 公司), 乙腈 (色谱纯), 磷酸二氢钾 (分析纯)、氢氧化钠 (分析纯), 色谱检测用水为超纯水、提取及分离纯化用水为去离子水。

Waters 高效液相色谱仪 (Waters515 泵, Waters474 荧光检测器, Empower 色谱工作站); FS-1 型涡旋混合器, 上海沪西分析仪器厂; AG-135 电子分析天平, 梅特勒-托利多公司; Delta320 pH 计, 梅特勒-托利多公司; DGZ20/4-I 型真空干燥箱, 南京实

收稿日期: 2012-09-12

作者简介: 罗蕾蕾 (1981-), 女, 讲师, 研究方向: 食品资源综合利用

通讯作者: 吴俊 (1971-), 女, 教授, 研究方向: 功能性食品

验仪器厂; B260 数显恒温水浴锅, 上海亚荣生化仪器厂; SQ2119 多功能食品粉碎机, 帅佳电子公司; 玻璃色谱柱 ( $\phi 1.2\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ ), 实验室自制。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 桑叶样品的预处理

准确称取 100 mg 桑叶粉末(过 60 目筛)于 10 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.05 mol/L HCl 水溶液, 超声 1 min。离心 10 min(10000 转)。取上清液。残渣按上述方法继续提取一次。合并上清液, 备用。

### 1.2.2 标准曲线的绘制

精密称取 5 mg DNJ 对照品, 置于 5 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的储备液。可置于 4 °C 冰箱中保存。用纯水稀释至 0.5、1、3、5、12.5、25 mg/L。可得系列浓度的对照品溶液。按上述方法衍生化后进样分析, 记录色谱峰面积, 以峰面积 A 对质量浓度 C(mg/L)进行线性回归, 得线性回归方程。

### 1.2.3 样品分析

分别取对照品溶液和供试品溶液, 采用柱前衍生化高效液相色谱-荧光检测法<sup>[1]</sup>进行测定。以保留时间定性, 以试样峰面积与标准比较定量。

### 1.2.4 工艺流程

桑液粗粉 → 过筛 → 盐酸提取 → 过滤 → DNJ → 大孔树脂除杂 → 醇沉 → 浓缩 → 层析 → 分离纯化后 DNJ

### 1.2.5 操作要点

称取 500 g 桑液粗粉(过 40 目筛), 加入 10 倍量 0.05 mol/L HCL 水溶液, 提取温度 80 °C 提取时间 2 小时, 提取两次, 滤过, 合并得 DNJ 浓度为 38.8 mg/L 提取液, 提取率为 76.5%, 提取液经烘干后得浸膏中 DNJ 含量为 0.23%。使用大孔树脂对桑叶提取液进行除杂处理。经除杂处理后提取液经醇沉浓缩后, 使用阳离子树脂层析法对其进一步纯化。大孔树脂吸附和阳离子树脂层析操作条件的优化是制备中的关键工艺。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

按 1.2.2 方法衍生化后进样分析, 得线性回归方程  $A=23496C+27296$ , 相关系数  $r^2=0.9996$ , 表明在 0.5~25 mg/L 之间, 线性关系良好。

### 2.2 桑叶中 DNJ 的检测

由图 1 可见, DNJ 目标峰保留时间为 5.81 min, 衍生反应副产物 AMQ 的保留时间为 8.61 min。各物质分离状况良好。

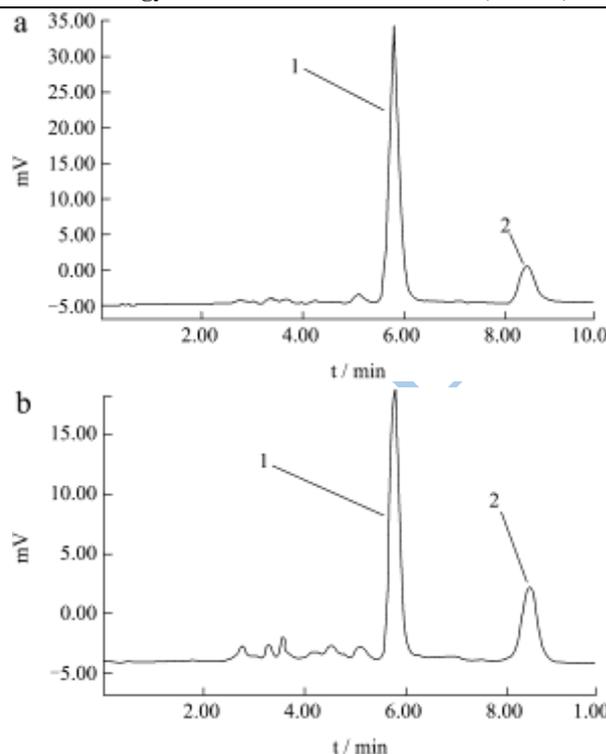


图 1 样品高效液相色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of DNJ samples

注: a: 标准溶液色谱图 (Chromatogram of standard solution); b: 桑叶样品色谱图 (Chromatograms of *Morus alba* L. leaves sample); 1: DNJ 衍生产物 (Derivatized DNJ); 2: 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯水解产物 (AMQ)。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 大孔吸附树脂的选择

使用静态吸附实验方法考察 D-101、AB-8 和 NKA-9 对桑叶提取液的除杂效果。由表 1 可知, 经 AB-8 吸附后, 静态吸附液中 DNJ 含量提高到 0.51%。且回收率也可恒定保持在 98% 以上。NKA-9 大孔吸附树脂对提取液中 DNJ 的纯化效果最差。DNJ 回收率仅 75.6%, DNJ 损失情况严重。故选用 AB-8 大孔树脂预处理桑叶提取液。

表 1 3 种大孔树脂对 DNJ 的吸附分离性能比较

Table 1 Comparison of absorption and separation capabilities of 3 types of macroporous resin on DNJ

树脂种类	极性	比表面积 (m <sup>2</sup> /g)	纯化前 DNJ 含量/%	纯化后 DNJ 含量/%	DNJ 回收率/%
D-101	非极性	500~550	0.23	0.37	96.8
AB-8	弱极性	480~520	0.23	0.51	98.6
NKA-9	极性	250~290	0.23	0.21	75.6

### 2.3.2 pH 值对 AB-8 大孔树脂吸附情况的影响

静态实验方法考察不同 pH 值对 AB-8 大孔树脂除杂的影响如图 2 所示, AB-8 对桑叶提取液的除杂效果随 pH 变化的曲线呈单驼峰状。当提取液 pH 为 4

时, 清液中 DNJ 含量最高, 为 0.51%。DNJ 分子在酸性条件下带正电, 大孔树脂对离子态 DNJ 无保留, 故 pH 对 DNJ 回收率的变化无影响。

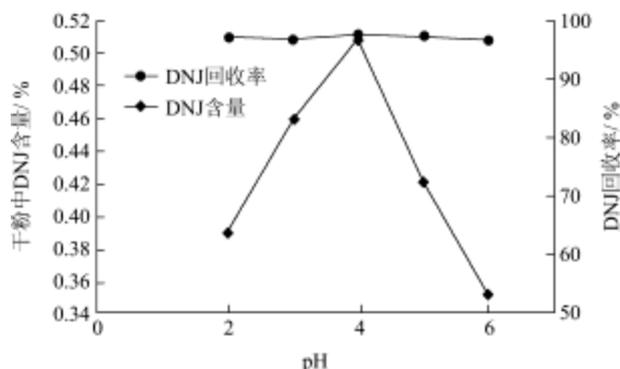


图2 上样液 pH 对 DNJ 纯化效果的影响

Fig.2 Influence of sample pH on the purification of DNJ

### 2.3.3 AB-8 大孔吸附树脂的动态实验

取一定体积桑叶提取液(调于最适 pH 值)于预先处理好的 400 mL AB-8 大孔树脂上柱, 流速为 1.0 BV/h。分部收集流出液, 测定流出液中 DNJ 浓度, 以洗脱体积为横坐标, 流出液中 DNJ 含量和回收率为纵坐标绘制动态吸附曲线。从图 3 可知, 随着上样体积的增大, DNJ 含量降低缓慢。当上样体积超过 2 BV 时, DNJ 含量陡然降至 0.34%。此时已达到泄露点。上样量对 DNJ 回收率无影响, 收集泄露点前流出液, 经醇沉浓缩后, 得透明微黄液体, 其中 DNJ 为 210 mg/L。真空干燥后得干粉中 DNJ 含量为 4.9%。DNJ 的回收率达 98%。

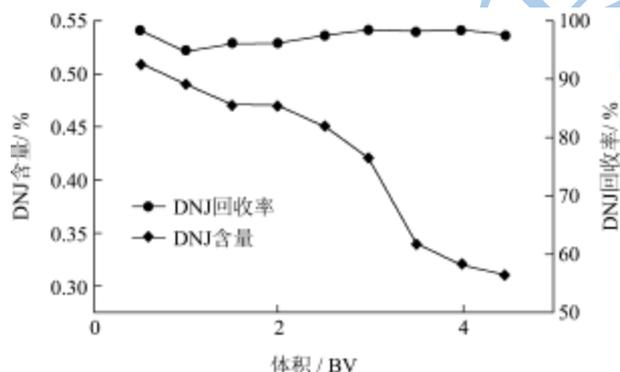


图3 AB-8 大孔树脂动态流出曲线

Fig.3 Elution curve of AB-8 macroporous resin

### 2.4 不同洗脱剂的选择

结果见图 4, 去离子水做为洗脱剂无法洗脱下 DNJ 产品; 0.1 M 氨水和 0.3 M 氨水洗脱速度过慢, 峰型较宽, DNJ 洗脱不完全, 产品损失较多; 0.5 M 氨水洗脱速度快, 峰型较好。但产品中杂质含量过多, 分离纯化效果不佳。故拟采取分段洗脱的方式纯化桑叶中 DNJ。

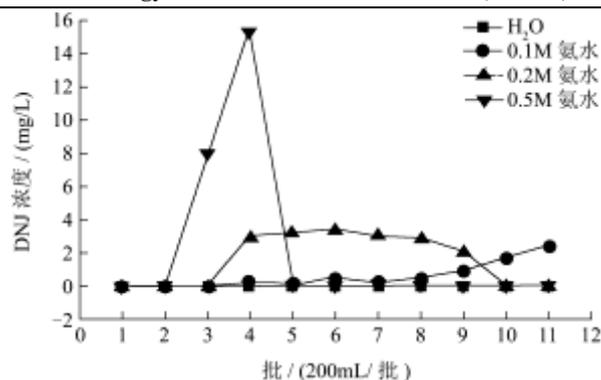


图4 不同洗脱剂对 732H 型阳离子树脂层析的影响

Fig.4 Effect of 4 kinds of eluent on chromatography by using 732H type cation exchange Resin

### 2.5 分段洗脱实验

结合 2.3.1 实验结果, 经优化, 得洗脱流程为: 1 BV 去离子水→1.5 BV 0.3 M 氨水→2 BV 0.5 M 氨水。流出曲线由图 5 可见。收集 6、7、8、9 四批样品, 烘干得浅灰色粉末。经检测, DNJ 含量达 16.7%。

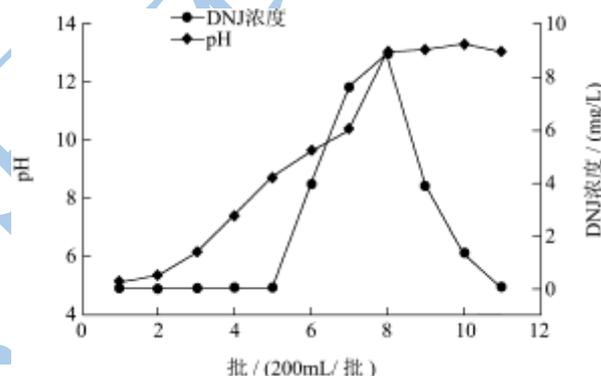


图5 732H 型阳离子树脂层析流出曲线

Fig.5 Elution curve of DNJ by 732H type cation exchange resin chromatography

## 3 结论

3.1 选用 AB-8 大孔树脂为预处理工艺所用吸附树脂, 最佳上样条件为: 上样液 pH 为 4, 上柱流速为 1 BV/h。桑叶提取液上样量不多于 2 BV, 醇沉浓缩后得干粉中 DNJ 含量为 4.9%, DNJ 回收率达 98%。

3.2 阳离子树脂层析操作选用 732H 型阳离子树脂纯化 DNJ, 分段洗脱方式对柱上样品进行洗脱。洗脱流程为: 1 BV 去离子水→1.5 BV 0.3 M 氨水→2 BV 0.5 M 氨水。洗脱流速为 2 BV/h。732H 型阳离子树脂层析流出液中, DNJ 洗脱峰形良好。多次实验证实 DNJ 的洗脱与流出液的 pH 有一定的相关性。当流出液 pH 值为 9-10 时, DNJ 被洗下。HPLC 分析表明, 最终产品中 DNJ 含量为 16.7%。

### 参考文献

- [1] 应芝,励建荣,韩晓祥.桑叶多糖的研究进展[J].现代食品科技,2007,23(11):89-93
- [2] 刘树兴,王维,魏丽娜.桑叶多糖提取工艺的研究[J].现代食品科技,2006,22(2):154-155
- [3] 刘学铭,肖更生,陈卫东.桑椹的研究与开发进展[J].中草药,2001,32(6):569-571
- [4] 耿鹏,朱元元,杨洋,等.桑树资源中 1-脱氧野尻霉素的测定及其生物活性分析[J].中草药,2005,36(8):1151-1154
- [5] 谢慧明,吴方睿,杨毅,等.柱前衍生化高效液相色谱-荧光检测法测定桑叶中的 1-脱氧野尻霉素[J].色谱, 2008, 26(5): 634-636
- [6] Jin-Won Kim, Soo-Un Kim, Heui Sam Lee. 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. Chromatography A, 2003,1002(1-2): 93-97