

量,对被提取的新棒状花椒酰胺的影响不大,故选择体积流量大一点的因素 C₃ 来提取两面针中新棒状花椒酰胺。因此,用渗漉法提取两面针中新棒状花椒酰胺的最佳工艺条件是 A₃B₃C₃,即用 95%乙醇溶液,在渗漉柱中以 3.9 mL/min 的体积流量流出,提取 72 h,即可达到两面针中新棒状花椒酰胺提取的最佳工艺效果。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	新棒状花椒酰胺提取率/%
1	1	1	1	1	0.03
2	1	2	2	2	0.22
3	1	3	3	3	0.46
4	2	3	2	1	0.72
5	2	1	3	2	0.34
6	2	2	1	3	0.67
7	3	2	3	1	0.71
8	3	3	1	2	0.74
9	3	1	2	3	0.35
K ₁	0.71	0.72	1.44	1.46	
K ₂	1.73	1.60	1.29	1.30	
K ₃	1.80	1.92	1.51	1.48	
R	1.09	1.20	0.22	0.18	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.25	2	0.13	65.00	P<0.05
B	0.25	2	0.13	65.00	P<0.05
C	0.005 9	2	0.003 0	1.50	
D(误差)	0.004 0	2	0.002 0		

F_{0.05}(2,2)=19.0 F_{0.01}(2,2)=99.0

2.3 验证试验:取两面针 100.0 g,用渗漉法在 A₃B₃C₃ 条件下提取两面针中的新棒状花椒酰胺,按同样的方法来检测分析提取液中新棒状花椒酰胺,结果提取液中新棒状花椒酰胺的提取率为 0.74%,

这与试验 8 号的 A₃B₃C₁ 结果一致。这可能是只要选择合适的提取溶剂,有足够的浸泡时间让溶剂将两面针中的新棒状花椒酰胺提取完全即可,渗漉速度的快慢对两面针中的新棒状花椒酰胺提取影响不大,所以用渗漉法在 A₃B₃C₃ 的条件下与试验 8 号的 A₃B₃C₁ 结果都是 0.74%。

3 讨论

试验研究发现,不同的提取条件,两面针中新棒状花椒酰胺差别很大。当乙醇体积分数为 95%、浸泡时间为 72 h、渗漉体积流量为 3.9 mL/min 时,两面针提取液中新棒状花椒酰胺的提取率最高,为 0.74%;当乙醇体积分数为 50%、浸泡时间为 24 h、渗漉速度为 1.3 mL/min 时,两面针提取液中新棒状花椒酰胺的提取率最低,为 0.031%。

与回流提取法相比,渗漉法提取不需要加热回流,但是乙醇的体积分数要求高一些,时间要长一些,提取率为 0.74%;而回流法提取时,要加热回流,乙醇的体积分数要求稍低一些,时间要短一些,提取率为 0.76%^[2],稍高一些。通过比较研究发现,这两种提取方法都是切实可行,可以根据具体情况选择合适的提取方法。

References:

- [1] Liu S H, Qin Q Y, Fang K, et al. The preparation of neoherculin and it is used in the productions of oral cavity [P]. CN: 2005102000806. 2005-02-05.
- [2] Liu S H, Qin Q Y, Fang K, et al. Extraction of neoherculin from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC [J]. *Nat Prod Res Devel* (天然产物研究与开发), 2005, 17 (4): 482-484.
- [3] Liu S H, Qin Q Y, Tang X L, et al. Determination of the neoherculin of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC growing in the ten areas of Guangxi [J]. *Nat Prod Res Devel* (天然产物研究与开发), 2005, 17(3): 337-339.

高速逆流色谱法分离制备淡豆豉中大豆素和染料木素

曲丽萍, 寇鹤鸣*, 范国荣, 位 华, 孙 亮

(第二军医大学药学院 药物分析教研室, 上海 200433)

淡豆豉是经大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 发酵而来的传统中药,其中所含的大豆异黄酮是该药主要活性成分之一。近年来的研究表明,大豆异黄酮是一类重要的生理活性物质,具有预防心血管

疾病、防癌抗癌、治疗骨质疏松、降低妇女更年期综合症^[1~3]等功效。经发酵处理后大豆异黄酮中游离型苷元的质量分数明显提高,如大豆素和染料木素,而游离型大豆异黄酮比结合型大豆异黄酮具有更强

收稿日期:2005-05-17

基金项目:上海市科委基金资助项目(02DZ19111)

*通讯作者 寇鹤鸣 Tel: (021) 25074436 E-mail: mixiao0519@msn.com

的生物活性^[4]。因此,如何简便、快速从淡豆豉中分离制备大豆异黄酮苷元对进一步进行药效与作用机制研究、开发现代中药和充分利用我国的药材资源等具有重大意义。高速逆流色谱(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)法是一种不需固态载体的液液分配色谱技术,该技术与传统方法比较具有分离效率高、操作简便、可避免因不可逆吸附而引起的样品损失等无可比拟的优点,因此已被广泛应用于天然产物有效成分的分离制备当中^[5]。本实验采用高速逆流色谱技术从淡豆豉中分离制备大豆素和染料木素,优选了最佳的溶剂系统,该法分离时间短、产物纯度高。

1 实验部分

1.1 仪器:TBE-300A 高速逆流色谱仪(深圳同田生化技术有限公司),聚四氟乙烯管缠绕在 3 个水平轴上形成螺旋管(管直径 2.6 mm,分离体积 300 mL),20 mL 进样圈,该 HSCCC 还配备了柱塞式泵(S 系列,北京圣益通技术开发有限公司),UV-Ⅱ型检测器(中国科学院上海生物化学研究所),N2010 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。Waters 高效液相色谱仪,包括 515 泵,2487 检测器,20 μL 定量圈,N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。

1.2 材料与试剂:淡豆豉购于上海童涵春中药饮片厂。大豆素和染料木素对照品购于上海同田生化技术有限公司,质量分数均大于 99%。实验中所用的氯仿、甲醇、石油醚为分析纯,乙腈为色谱纯,购于上海市化学试剂公司。水为自制重蒸馏水,并经微孔滤膜滤过。

1.3 淡豆豉中大豆异黄酮粗品的分离:将药材适当粉碎,称取粗粉 2 kg,先用石油醚于索氏提取器中回流提取 8 h 除去脂肪油后,加 8 倍量 75%乙醇,回流提取 2 次,每次 2.0 h。滤过,合并滤液,减压回收乙醇,得浸膏。取浸膏加适量水混悬后,过 1300 大孔吸附树脂,依次用水、40%乙醇和 75%乙醇洗脱,将 75%乙醇洗脱流份减压浓缩后真空干燥得黄色粉末,置冰箱保存,备用。

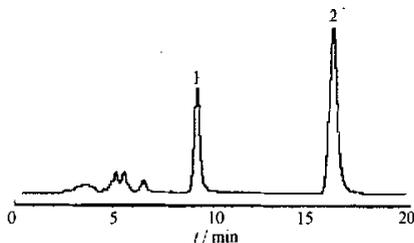
1.4 溶剂体系选择:在分液漏斗中配制氯仿-甲醇-水(4:3:2)溶剂体系,充分振荡后静止,使用前分取上下相,超声脱气后泵入逆流色谱仪。先将色谱柱中充满上相作为固定相,调整主机转速为 800 r/min,再以 2.0 mL/min 体积流量泵入下相作为流动相,待流动相从柱出口流出,表明两相在分离管中建立了动态平衡,由进样阀进样,流出液采用紫外检测

器在 254 nm 处进行检测,同时记录色谱图,根据色谱图接收目标成分,并检测色谱峰纯度。

1.5 液相色谱条件:色谱柱:Lichrospher C₁₈柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm)(江苏,汉邦科技有限公司),流动相为乙腈-水-冰醋酸(45:55:2),体积流量为 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,柱温为室温,进样量 20 μL。

2 结果与讨论

淡豆豉经石油醚除油后,过 1300 大孔树脂易于得到较为干净的总异黄酮粗提物。实验中用不同体积分数乙醇梯度洗脱,各流份经高效液相色谱法检测,与对照品比较表明:大豆异黄酮苷元主要存在于 75%乙醇洗脱物中(图 1),其结合型糖苷主要存在于 40%乙醇洗脱物中。本研究中接收 75%乙醇洗脱物减压浓缩后真空干燥(60 ℃),得浅黄色粉末 2.14 g,得率为 1.07%。



1-大豆素 2-染料木素
1-daidzein 2-genistein

图 1 淡豆豉粗提物时高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of crude extract from Semen Sojæ Preparatum

高速逆流色谱法中,分离成败的关键在于能否选择合适的两相溶剂系统。合适的两相溶剂体系应满足下列要求:分层时间短于 30 s;固定相的保留率要高;目标化合物的两相中的分配系数应合适(0.5<k<2)等。本研究中,根据所分离化合物的特性,考察了氯仿-甲醇-水(4:3:2,8:10:5,4:4:3)、正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1,1:0.7:0.7:1,1:1:1:1)、醋酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3,4:1:4)8种溶剂体系(表 1)。试验结果表明氯仿-甲醇-水(8:10:5,4:4:3)和醋酸乙酯-正丁醇-水(4:1:4)固定相保留率很低,正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1,1:0.7:0.7:1,1:1:1:1)分配系数较小,色谱峰重叠,所得流份纯度差,醋酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3)分配系数太大,分离时间过长,溶剂浪费严重,因此最终选定氯仿-甲醇-水(4:3:2)为高速逆流色谱分离制备的两相溶剂系统。结果固定相保留率为 65%,在 3

h 内分离得到 2 个流份(流份 I 和 II), 高速逆流色谱图见图 2。

表 1 不同溶剂体系中大豆素和染料木素分配系数和分离度值

Table 1 Partition coefficient and separation factor of daidzein and genistein in various solvent systems

溶剂体系	大豆素 k_1	分离度 α	染料木素 k_2
氯仿-甲醇-水(4:3:2)	1.45	2.74	0.53
氯仿-甲醇-水(8:10:5)	0.38	3.45	0.11
氯仿-甲醇-水(4:4:3)	0.41	3.15	0.13
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)	0.26	2.35	0.61
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:0.7:0.7:1)	0.32	2.16	0.69
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1.1:1.1:1)	0.19	3.00	0.57
醋酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3)	1.98	1.79	3.54
醋酸乙酯-正丁醇-水(4:1:4)	2.11	2.06	4.35

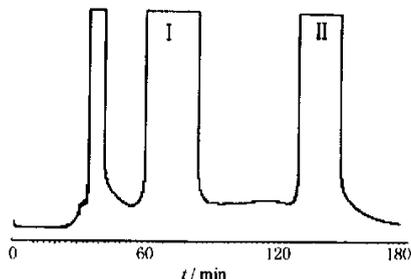


图 2 淡豆豉粗提物高速逆流色谱图(I 和 II 为接收流份)
Fig. 2 HSCCC Chromatogram of crude extract from *Semen Sojae Preparatum* (I and II were obtained fractions)

采用 HPLC 法对逆流色谱分离流份进行分析, 结果表明两个流份均为单一色谱峰, 与对照品比较表明, 流份 I 为染料木素, 流份 II 为大豆素, 产物的质量分数分别为 99.1% 和 98.4%。200 mg 大豆异黄酮

粗品可得 26 mg 大豆素和 35 mg 染料木素(图 3)。

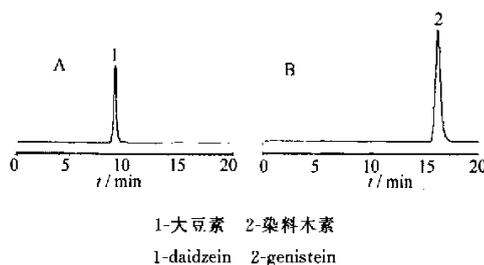


图 3 流份 II (A) 和流份 I (B) 的高速逆流色谱制备流份高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatogram of fraction II (A) and fraction I (B) obtained by HSCCC

本实验结果表明采用高速逆流色谱法可以从淡豆豉中分离得到质量分数的大豆素和染料木素单体化合物, 分离时间较短, 操作简便、样品无损失。由此可以进一步制备获得这两个物质的化学对照品, 为淡豆豉深入研究和质量控制提供了必要的物质基础。

References:

[1] Holder C L, Churchwell M I, Doerge D R. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/EM-MS [J]. *Agric Food Chem*, 1999, 47: 3764-3770.
 [2] Lee C H, Yang L. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides [J]. *Food Chem*, 2005, 90: 735-741.
 [3] Guo J M, Xiao B X, Liu D H. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 1641-1646.
 [4] Mao J Q, Mi H M, Lou Z Y, et al. Detection of isoflavones contents in *Semen Sojae Preparatum* by HPLC [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2000, 21 (10): 955-957.
 [5] Dai D S, Wang Y M, Luo G A. Recent development in high-speed countercurrent chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29 (5): 586-591.

当归多糖铁的溶出度和生物利用度的研究

王凯平, 张 玉, 戴立泉, 曾令杰

(华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030)

以前的研究表明若以当归多糖与三价铁配合生成当归多糖铁 (*Angelica sinensis* polysaccharide-iron complex, APC), 有可能开发出一种新型的、具有双重补血功能的补血剂^[1-3]; 一方面, 不仅具有较

理想的稳定性、水溶性和吸收率等, 而且没有游离铁离子所造成的对胃肠道的刺激作用, 可起到良好的高价铁治疗缺铁性贫血的作用; 另一方面, 在多糖铁中的铁释放之后, 配体多糖由于具有多方面的生物

收稿日期: 2005-05-06

基金项目: 湖北省科技厅攻关项目(1283721050)

作者简介: 王凯平(1969—), 女, 湖北武汉人, 副教授, 在读博士研究生, 主要从事药物开发研究工作。E-mail: wkpzcq@163.com