

15℃/min的速率从 60℃程序升温至 160℃,再以 6℃/min的速度从 160℃程序升温至 220℃,并保持 2 min;载气为氦气。

质谱分析条件:电子轰击法(EI),电子能量 70 eV,灯丝发射电流为 0.25 mA,电子倍增器电压 1250 V,接口温度为 250℃,扫描速度 33~500 amu/s 用微量进样器取 1 μL 甲酯化样品进样,根据标准图谱进行组份的质谱定性。

数据采用计算机自动处理系统,用 NBS 谱库检索。将所得质谱图与 GC-MS 系统质谱图数据检索分析,面积归一化法计算各组份的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 AgNO₃ 水溶液浓度对络合的影响:用络合反应前后油相中脂肪酸酯的质量变化来表示 AgNO₃ 浓度变化对喜树种子脂肪酸酯中各种成分从油相转移至水相的能力大小的影响,见图 1-A。

由实验结果可知,AgNO₃ 水溶液浓度低时,仅有很少的 α-亚麻酸进入水相,AgNO₃ 水溶液浓度达到 5 mol/L 时,80% α-亚麻酸都富集到了水相中。

但考虑到当 AgNO₃ 水溶液浓度达到 5 mol/L 时,富集到水相中的脂肪酸酯中 α-亚麻酸的纯度降低,而当 AgNO₃ 水溶液浓度达到 4 mol/L 时,富集产物中 α-亚麻酸的相对含量已经高于 90%,因此,当 AgNO₃ 水溶液浓度为 4 mol/L 时,络合效果最佳。

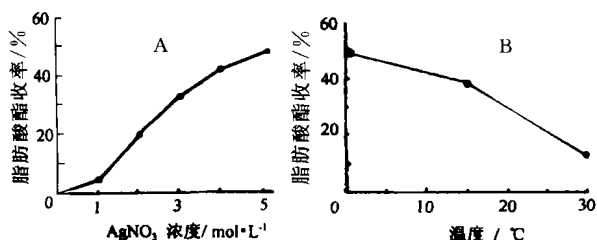


图 1 AgNO₃ 浓度 (A) 和反应温度 (B) 对脂肪酸酯收率的影响

经检索及与质谱标准对照确认,油相与水相中各组份以及保留时间和相对含量见表 1。浓缩后的产物中 α-亚麻酸相对含量达到 91.24%。

2.2 反应温度对络合作用的影响:图 1-B 表示富集产物得率随着温度变化的关系。当温度为 0℃时,产物的得率最高;随着温度的上升,得率缓慢下降;当温度高于 15℃后得率迅速下降。因此,此络合反应温度应控制在 15℃以下。

表 1 油相与水相中脂肪酸的组成及相对含量

序号	保留时间 (min)	化合物名称	相对含量 (%)	
			水相	油相
1	12.074	2,8-二甲基十三烷酸 C ₁₅ : ₀	1.980	17.771
2	12.385	14-甲基十五烷酸 C ₁₆ : ₀		0.491
3	12.727	壬二酸		0.118
4	12.846	9-氧基壬酸		0.177
5	13.007	十七烷酸 C ₁₇ : ₀		0.344
6	14.109	16-甲基十七烷酸 C ₁₈ : ₀		9.712
7	14.480	油酸 C ₁₈ : ₁ (ω-6)	0.988	14.808
8	15.203	亚油酸 C ₁₈ : ₂ (ω-6)	5.787	35.878
9	15.956	亚麻酸 C ₁₈ : ₃ (ω-3)	91.245	20.319
10	16.458	11-二十碳烯酸 C ₂₀ : ₁		0.383
合计			100	100

参考文献:

- [1] F. 巴索格. 无机反应机理——溶液重金属络合物的研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 马礼金. GC-MS 分析红芝脂肪酸成分 [J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 102-103.
- [3] 王威, 王永奇. 气相色谱-质谱联用技术在中草药脂肪油化学成分研究中的应用 [J]. 中草药, 1998, 29(6): 420-421.
- [4] 刘玉军. α-亚麻酸的生物效应和作用机理 [J]. 生理科学概论, 1987, 18(3): 230-235.
- [5] 朱丹, 王世成, 郭煜, 等. 苏子油中 α-亚麻酸的纯化研究 [J]. 中草药, 1997, 28(6): 342-343.
- [6] 程志青, 吴惠勤, 张桂英. GC/MS 法快速测定食用植物油中脂肪酸含量 [J]. 分析测试通报, 1989, 8(6): 11-14.
- [7] Adolf R O. The isolation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and methyl esters of fish oils by silver resin chromatography [J]. J American Oil Chemistry Society, 1985, 62(9): 1592-1597.
- [8] Teruhiko S. Effect of dietary alpha-linoleate balance on mean survival time, incidence of stroke and blood pressure of spontaneously hypertensive rats [J]. Life Sciences, 1988, 43: 2067-2075.

微波技术在大黄游离蒽醌浸提中的应用

郝守祝, 张虹, 刘丽, 李智恩, 徐祖洪*

(中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要: 目的 研究微波技术对大黄游离蒽醌浸出量的影响, 并与传统提取方法做比较。方法 采用正交试验法考

* 收稿日期: 2001-04-03

基金项目: 国家“九·五”攻关资助项目(编号: 96-C02-04-04)

作者简介: 郝守祝(1970-), 男, 山东省莱西市人, 硕士, 现在中国科学院海洋研究所从事天然产物化学及海洋药物的研究。

Tel 0532-2879062-2520(O)

察微波输出功率、药材粒径、浸出时间 3 个因素对提取效率的影响,优选大黄游离蒽醌的最佳浸出方案。以优选出的微波浸出方案为实验组,以常规煎煮法及乙醇回流法为对照组,进行平行实验。结果 药材粒径对大黄游离蒽醌浸出的影响高度显著 ($P < 0.01$),功率对大黄游离蒽醌浸出的影响显著 ($P < 0.05$),时间对大黄游离蒽醌的浸出有一定的影响 ($0.05 < P < 0.1$)。微波浸提法对大黄游离蒽醌的提取效率明显优于常规煎煮法,同乙醇回流提取法相当。结论 微波浸提法是一种提取效率高、操作简便、省时的提取中草药活性成分的新方法,值得推广应用。

关键词:微波技术;大黄;游离蒽醌;正交试验法

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)01-0023-04

Application of microwave technique to extraction of free anthraquinones in *Rheum emodi*

HAO Shou-zhu, ZHANG Hong, LIU Li, LI Zhi-en, XU Zu-hong

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao Shandong 266071, China)

Abstract Object To apply microwave technique to the extraction of free anthraquinones from *Rheum emodi* Wall. and the methods of microwave extraction and traditional extraction were compared. **Methods**

The orthogonal test design was used to arrange sequent experiments to test the effect of the three main factors including microwave power, particle size of herb and extraction time on the extraction efficiency of free anthraquinones and to establish optimal extraction process. A parallel test was carried out using the three different methods including the optimal extraction process, the traditional decocting method and the alcohol refluxing method. **Results** Particle size of herb and microwave power are the significant factors with $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. Time is an affective factor on the extraction of anthraquinones ($0.05 < P < 0.1$). Microwave extraction method is superior to the traditional decocting method and equivalent to the alcohol refluxing method. **Conclusion** Microwave extraction method is efficient, simple and rapid for extraction of active compounds of TCM.

Key words microwave technique; *Rheum emodi* Wall.; free anthraquinones; orthogonal test method

大黄为常用中药,具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经的功效^[1]。实验及临床研究表明,对慢性肾功能衰竭有确切的疗效。目前已证实,对延缓慢性肾功能衰竭发展起作用的主要活性成分为游离蒽醌,如大黄素^[2~4]。对于大黄蒽醌类成分的提取工艺研究已有很多论述,如罗得顺等^[5]分别比较了水提取法、夹层蒸汽煎煮法及乙醇提取法对大黄蒽醌含量的影响;郭澄^[6]等运用正交试验法对大黄回流工艺作了优选等。近年来微波技术开始应用于中药有效成分的提取,如 Ganzler^[7]从棉籽中提取棉实糖,从豆类中提取豆碱。国内也有人将微波技术应用于麻黄、丁香、槐花、雪莲等有效成分的提取^[8~11]。但至今尚未见将微波技术用于提取大黄蒽醌类成分的报道。为探索中药有效成分提取新工艺,本文采用正交试验法考察了微波输出功率、药材粒径、浸取时间 3 个因素对提取效率的影响,优选出大黄游离蒽醌的最佳浸出方案,并与传统提取方法做了比较。

1 仪器和材料

1.1 仪器: 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), MG-5529ST 型 LG 温控灵微波炉 [LG 电子 (天津) 电器有限公司]

1.2 材料: 1,8-二羟基蒽醌对照品 (中国药品生物制品检定所), 所用试剂均为分析纯。大黄药材购自

山东省药材公司, 经沈阳药科大学药用植物教研室孙启时教授鉴定为藏边大黄 *Rheum emodi* Wall. 的干燥根茎。

2 实验方法

2.1 大黄的预处理: 大黄粉碎, 筛分出 20、60、100 目的大黄粉备用。

2.2 供试液的制备

2.2.1 微波方法: 精密称定大黄粉 10 g, 加水 80 mL, 按照正交试验设计, 用微波方法对大黄进行浸出。一定时间后立即过滤, 残渣以适量水冲洗, 过滤, 合并滤液并定容至 100 mL。

2.2.2 常规煎煮法^[12]: 精密称定大黄粉 (60 目) 25 g, 加水约 240 mL, 煎煮至沸并保持微沸 1 h, 过滤, 残渣以适量水冲洗后过滤, 合并滤液并定容至 250 mL。

2.2.3 乙醇回流法^[6]: 精密称定大黄粉 (60 目) 10 g, 以 80 mL 95% 乙醇加热回流 1 h, 倾出回流液, 重复上一步操作, 合并回流液并定容至 200 mL。

2.3 含量测定

2.3.1 标准曲线的制备^[13]: 精密称取 105℃ 干燥至恒重的 1,8-二羟基蒽醌对照品 5.4 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

精密量取上述对照品溶液 0.5、1.0、2.0、2.5、

3.0, 3.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 水浴挥去乙醇。加少量 0.8% 的乙酸镁-乙醇液溶解并稀释至刻度, 摇匀。以 0.8% 的乙酸镁-乙醇液为空白, 在 508 nm 处测定吸光度, 得回归方程: $C = 25.1834 - 0.141$, $r = 0.9999$ 。对照品溶液浓度在 2.7~18.9 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系。

2.3.2 供试液中 大黄游离蒽醌的测定: 精密量取供试品溶液 10 mL, 置圆底烧瓶中, 定量加入氯仿 25 mL (乙醇回流液须先水浴蒸去乙醇, 然后定量加入 25 mL 氯仿), 沸水浴回流 1 h, 静置, 放冷。精密量取氯仿层中氯仿 2 mL, 挥干氯仿, 加少量 0.8% 的乙酸镁-乙醇液溶解并稀释至刻度。以 0.8% 的乙酸镁-乙醇液为空白, 在 508 nm 处测定吸光度。

3 结果

3.1 正交试验: 考察 3 个因素 3 个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验分析, 见表 1~3。

表 1 试验因素水平表

水平	A 粒 径 (目)	B 功 率 (W)	C 时 间 (min)
1	20	160	10
2	60	320	15
3	100	480	20

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表及其结果

No.	A	B	C	D	游离蒽醌含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	0.895
2	1	2	2	2	1.179
3	1	3	3	3	1.336
4	2	1	2	3	1.618
5	2	2	3	1	1.871
6	2	3	1	2	1.745
7	3	1	3	2	1.368
8	3	2	1	3	1.462
9	3	3	2	1	1.556
K_1	3.410	3.881	4.102	4.322	
K_2	5.234	4.512	4.353	4.292	
K_3	4.386	4.637	4.575	4.416	
R	1.824	0.756	0.473	0.124	

表 3 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
A	0.555	2	0.2775	198.9	<0.01
B	0.109	2	0.0545	39.1	<0.05
C	0.0373	2	0.01865	13.4	>0.05
误差 (D)	0.00279	2	0.001395		

$$F_{0.01}(2, 2) = 99, F_{0.05}(2, 2) = 19, F_{0.1}(2, 2) = 9$$

实验结果经方差分析显示, 药材粒径对大黄游离蒽醌浸出的影响高度显著 ($P < 0.01$), 功率对大黄游离蒽醌浸出的影响显著 ($P < 0.05$), 时间对大黄游离蒽醌的浸出有一定的影响 ($0.05 < P < 0.1$), 选出最佳浸出方案为 $A_2 B_3 C_3$, 即采用微波技术, 输

出功率 480 W, 对 60 目大黄粉浸出 20 min。

3.2 平行对照实验: 以正交试验优选出的浸出方案为实验组 (即 $A_2 B_3 C_3$), 以常规煎煮法及乙醇回流法为对照组, 进行平行实验, 结果见表 4。

表 4 平行对照实验结果

方法	常规煎煮法	乙醇回流法	微波方法
游离蒽醌含量 (mg/g)	0.865	1.92	1.90

由平行对照实验结果可以看出, 优选出的微波浸提方案对大黄游离蒽醌的提取效率明显优于常规煎煮法, 同 95% 乙醇回流提取法相当。

4 讨论

4.1 对于大黄蒽醌成分的提取, 目前普遍认为, 醇提法要好于水提法, 尤以 95% 乙醇加热回流提取效果最好^[6, 14]。本文以正交试验筛选出的较佳浸出方案为实验组, 同常规煎煮法及 95% 乙醇回流提取法做了比较。结果表明, 微波浸出法对大黄游离蒽醌的提取效率要明显优于常规煎煮法, 同 95% 乙醇回流提取法相当。说明微波浸提方法对中草药活性成分的提取效率较高。

4.2 微波是一种超高频电磁波, 具有很强的穿透作用, 可以在药材颗粒内外同时均匀、迅速地加热。一方面, 它可使具有永久偶极的分子产生高达 4×10^9 次/秒的共振频率, 使分子平均动能迅速增加。另一方面, 离子化的物质在超高频电磁场中超高速运动, 因摩擦而产生热效率^[15]。所有这些, 皆极大地促进了中药材有效成分的浸出, 而且在浸出过程中, 药材细粉不凝聚, 不焦化。本研究正是基于对微波的上述认识, 将微波技术应用于大黄蒽醌类成分的提取, 并同目前认为提取效果最好的 95% 乙醇回流提取法作比较, 结果表明, 二者对大黄游离蒽醌的提取效率相当。但是乙醇回流法操作时间是 120 min, 而微波浸提法只需 20 min, 且乙醇回流法操作步骤较微波浸提法繁琐。这表明, 微波浸提法是一种提取效率高、操作简便、省时的提取中草药活性成分的新方法, 值得推广应用。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典 [S]. 2000 年版. 一部.
- [2] 郑 丰, 黎磊石, 刘志红, 等. 大黄素对肾小管细胞增殖的影响及其分子机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(5): 375-378.
- [3] 扬俊伟, 黎磊石, 胡伟新, 等. 大黄素抑制肾代偿性肥大的作用 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(3): 224-227.
- [4] 刘志红, 胡伟新, 黎磊石, 等. 大黄素对肾系膜细胞增殖细胞核抗原的影响 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1993, 2(1): 45-48.
- [5] 罗顺得, 蔡鸿生, 苏 玮. 几种提取方法对大黄蒽醌含量的影响 [J]. 中药通报, 1987, 12(5): 286-288.
- [6] 郭 澄, 张 纯. 正交实验法优选大黄醇回流提取工艺 [J]. 药学实践杂志, 1996, 14(1): 31-32.

- [7] Ganzler K, Salgo A. Microwave extraction— a new method superseding traditional Soxhlet extraction [J]. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 1987, 184(4): 274-276.
- [8] 范志刚,张玉萍,孙 燕,等.微波技术对麻黄中麻黄碱浸出量影响[J].中成药,2000,22(7): 520-521.
- [9] 李学坚,黄海滨.微波浸提技术提取丁香油的研究[J].广西中医药,2000,23(3): 49-50.
- [10] 范志刚,李玉莲,杨莉斌,等.微波技术对槐花中芸香甙浸出量影响的研究[J].解放军药学报,2000,16(1): 36-38.
- [11] 范志刚,麦军利,杨莉斌,等.微波技术对雪莲中黄酮浸出量影响的研究[J].中国民族医药杂志,2000,6(1): 43-44.
- [12] 张永红.影响大黄提取液中蒽醌含量的条件探讨[J].兰州医学院学报,1996,22(2): 27-29.
- [13] 万 丽,刘友平,李明权.肾康注射液蒽醌类成分含量测定[J].时珍国医国药,1999,10(4): 244-245.
- [14] 魏风铃,刘敏超,钟加胜.大黄蒽醌类成分提取工艺优选[J].中国中药杂志,1998,23(10): 609-611.
- [15] 曾昭钧,李香文.微波有机化学进展[J].沈阳药科大学学报,1999,16(4): 304-309.

酸枣仁与缅枣仁的蛋白质分析

李续娥¹,李维凤²,裴渭静^{2*}

(1. 华南师范大学生物技术研究所,广东 广州 510631; 2. 西安交通大学,陕西 西安 710061)

摘要:目的 初步探讨酸枣仁与缅枣仁的蛋白质差异.方法 用凯氏定氮法测定蛋白质的含量;用酸水解法测定蛋白质的氨基酸组成;用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和毛细管区带电泳(CZE)分析蛋白质的组分.结果 酸枣仁与缅枣仁的蛋白质含量分别为36.13%和41.58%;除缅枣仁蛋白质的缬氨酸和蛋氨酸明显高于酸枣仁外,蛋白质的其他氨基酸的组成差别不明显;SDS-PAGE图谱明显不同的是,酸枣仁有相对分子质量为39 800的蛋白质,缅枣仁为50 100的蛋白质;CZE图谱的区别是,酸枣仁为3.1 min的峰,缅枣仁含有一个迁移时间为4.8 min的峰.结论 缅枣仁的蛋白质含量较酸枣仁略高,且缬氨酸和蛋氨酸的含量明显高于酸枣仁.两种枣仁的SDS-PAGE和CZE图谱均有明显的差异存在.

关键词:酸枣仁;缅枣仁;蛋白质;毛细管区带电泳

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)01-0026-03

Analysis of proteins in seed of spine date and seed of Indian jujube

LI Xu-e¹, LI Wei-feng², PEI Wei-jing²

(1. Institute of Biological Technology, South China Normal University, Guangzhou Guangdong 510631, China;

2. Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710061, China)

Abstract Object To preliminarily study the difference of proteins in the seed of spine date and the seed of Indian jujube. **Methods** Protein contents were measured with Kieldahl method. Amino acids constituting the protein were determined by means of acidolysis. The proteins were analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and capillary zone electrophoresis (CZE). **Results** Contents of proteins in the seed of spine date and the seed of Indian jujube were 36.13% and 41.58%, respectively. The content of valine and methionine in the seed of Indian jujube were significantly more than that in the seed of spine date remarkably, and the contents of other amino acids from the seed of spine date and seed of Indian jujube were similar. Their SDS-PAGE spectra showed that the seed of spine date contained a protein with molecular weight 39 800 and the seed of Indian jujube contained a protein with molecular weight 50 100. In CZE spectra for the seed of spine date, there was a peak at the mobile time of 3.1 min and in CZE spectra from the seed of Indian jujube, there was a peak at the mobile time of 4.8 min. **Conclusion** Protein content in the seed of Indian jujube is more than that in the seed of spine date; The content of valine and methionine in the seed of Indian jujube is more than that in the seed of spine date remarkably. The spectra of SDS-PAGE and CZE for the seed of spine date are different from that for the seed of Indian jujube clearly.

Key words the seed of spine date; the seed of Indian jujube; protein; capillary zone electrophoresis (CZE)

收稿日期: 2001-01-02

作者简介:李续娥(1964-),女,陕西人,副教授,博士,先后就读于西安医科大学、西安交通大学,曾工作于天津药物研究院、陕西兴平药检所、西安交通大学化工学院,现在华南师范大学生物技术研究所做博士后研究,研究方向为中药有效成分的研究.
Tel 020-85126353