

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

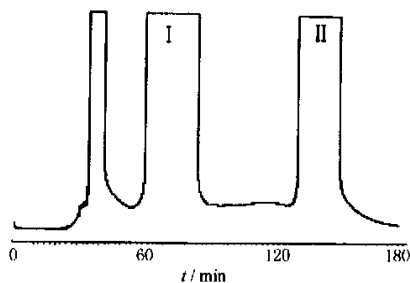


图 2 淡豆豉粗提物高速逆流色谱图(I 和 II 为接收流份)
Fig. 2 HSCCC Chromatogram of crude extract from *Semen Sojae Preparatum* (I and II were obtained fractions)

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)。

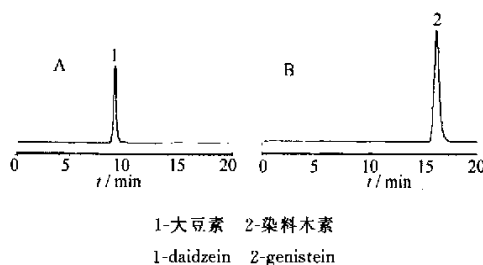


图 3 流份 II (A) 和流份 I (B) 的高速逆流色谱制备流份高效液相色谱图

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

活性,如免疫调节、抗病毒、降血糖等,亦可被机体吸收、利用,从而又可发挥当归多糖的补血活性^[4~6]。有鉴于此,在对当归多糖铁复合物的合成及理化性质做了初步的探索之后,本实验进一步对当归多糖铁复合物的体外溶出度和生物利用度进行研究,以期为其作为一种具有开发价值的补铁剂提供佐证。

1 仪器与材料

ZK-82B 型电热真空干燥箱(上海申光仪器仪表有限公司),PHS-2C 酸度计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂),十万分之一光学读数分析天平(湘仪天平仪器厂),721 型分光光度计(上海第三仪器分析仪器厂),SpectrAA-40 原子分光光谱仪(美国瓦里安公司)。当归多糖铁由本实验室制备并经纯化,其他所用试剂均为分析纯,实验用水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 当归多糖铁的还原性试验:采用邻菲罗啉比色法。该方法以抗坏血酸为还原剂,在酸性条件下,将多糖铁中的 Fe(Ⅲ)还原为 Fe(Ⅱ),Fe(Ⅱ)与邻菲罗啉结合并迅速作用产生一种红色的螯合物,螯合物溶剂颜色的深浅反映出 Fe(Ⅱ)的高低。

取 Fe(Ⅲ)浓度为 0.001 mol/L 的当归多糖铁溶液 50 mL,置三颈烧瓶中,加抗坏血酸溶液[称取 L(+)-抗坏血酸 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,混匀,即得]10 mL,再加 0.12% 邻菲罗啉试剂 5 mL,控制温度为 37 ℃并不断搅拌,取不同时间点的反应溶液于 490 nm 波长处测定吸光度(A);以当归多糖铁溶液中不加入抗坏血酸溶液,加入相应量的邻菲罗啉试剂,均匀混合,所得溶液作为空白。结果见表 1。实验结果表明,6 h 左右当归多糖铁基本被抗坏血酸还原完全。

表 1 当归多糖铁的还原性试验

Table 1 Deoxidization test of APC

时间 t/h	A	时间 t/h	A
0	0	4	0.54
1	0.22	5	0.60
2	0.36	6	0.64
3	0.47	7	0.65

2.2 当归多糖铁的体外溶出性试验:由于 Fe(Ⅲ)可被抗坏血酸还原为 Fe(Ⅱ),因此可以通过测定 Fe(Ⅱ)而间接地测定 Fe(Ⅲ)的溶出量,从而掌握当归多糖铁中的 Fe(Ⅲ)的溶出情况。

2.2.1 对照品溶液的配制:精密称取硫酸亚铁溶液 1.124 g,置 200 mL 棕色量瓶中,加水溶解后,加盐酸(1→2)1.7 mL,再加水稀释至刻度,摇匀,作为贮

备液。临用前,精密量取该贮备液 10 mL,置 200 mL 棕色量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 相当于 0.04 mg 的 Fe²⁺)。

2.2.2 标准曲线的制备:分别精密量取对照品溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 mL,置分液漏斗中,各加水至 38 mL,再各加入邻苯二甲酸氢钾(pH 4)缓冲液 5 mL、邻菲罗啉溶液 5 mL、苦味酸钠溶液 2 mL,放置 5 min 后,以 10 mL 二氯乙烷进行萃取,萃取 3 min 后,静置分层,分取二氯乙烷层,滤过,弃去初滤液,取续滤液,以上述不含对照品溶液、按同法操作所得的二氯乙烷溶液作为空白,于 512 nm 波长处测定 A。以 A 对被测溶液的质量浓度 C 求回归方程,得 $A = 0.0271 + 0.0423C$, $r = 0.9951$ 。结果表明,在 0~20 μg/mL,线性关系良好。

2.2.3 体外溶出试验:精密称取当归多糖铁(含铁 22.59%) 0.020 0 g,置 100 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,转移至 200 mL 三颈烧瓶中,加抗坏血酸 20 mL,控制温度为 37 ℃并不断搅拌,取不同时间点的反应溶液 5 mL,按“标准曲线的制备”项下的方法操作,测定 A。根据回归方程,由 A 求出样品被测溶液质量浓度 C,据此再计算溶出铁的质量分数。结果见表 2。实验结果表明,当归多糖铁中的 Fe(Ⅲ)在还原性物质的作用下,6 h 左右基本全部溶出。

溶出铁的质量分数 = 被测溶液质量浓度 × V₁ × 100 / (m × V₂ × 10⁶) × 100%。

式中,m 为当归多糖铁取样量(g),V₁ 为二氯乙烷体积,V₂ 为量取的反应液体积。

表 2 当归多糖铁的体外溶出试验

Table 2 Dissolution test of APC in vitro

反应时间/h	A	被测溶液质量浓度/(μg · mL ⁻¹)	溶出铁的质量分数/%
0.5	0.195	3.97	3.97
1	0.390	8.57	8.57
2	0.550	12.35	12.35
4	0.670	15.19	15.19
6	0.760	17.32	17.32
8	0.780	17.79	17.79

2.3 当归多糖铁在动物体内的生物利用度

2.3.1 血药浓度-时间数据:将 12 只体重 200 g 左右的健康 Wister 大鼠随机分为两组,每组 6 只,雌雄各半,以硫酸亚铁为对照组,当归多糖铁为实验组,考察当归多糖铁在 Wister 大鼠体内的生物利用度^[9]。先从连续 12 h 禁食但不断水的大鼠眼底取血,以原子吸收分光光度法测定全血中铁的质量浓度,作为 t=0 时刻的质量浓度,然后按每千克体重 5

mg 铁的给药量灌胃给药,分别在给药后 $t=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ h, 从眼底取血,测定全血中铁的质量浓度。结果见表 3。

表 3 大鼠单剂量口服给 APC 和 $FeSO_4$ 后不同时间血中铁的质量浓度 ($n=6$)

Table 3 Iron concentrations in blood of rats at different times after single oral administration of APC and $FeSO_4$ ($n=6$)

时间/h	铁质量浓度/ $(\mu g \cdot mL^{-1})$	
	实验组	对照组
0	200.0±16.7	198.0±18.7
1	280.0±18.1	250.0±17.7
2	330.0±20.3	290.0±19.0
3	370.0±17.2	315.0±16.8
4	388.0±16.4	300.0±15.4
5	327.0±22.5	260.0±21.7
6	280.0±17.8	235.0±17.2
7	260.0±20.1	223.0±19.1
8	235.0±19.6	215.0±21.4
9	220.0±18.0	210.0±20.6
10	210.0±16.9	205.0±18.5

2.3.2 药动学参数:应用 3p87 药代动力学程序对硫酸亚铁和当归多糖铁的血药浓度-时间数据进行处理,经 F 检验拟合优度,以血药浓度拟合值与实测值相关性最好、AIC 最小原则作为判别标准,确定最佳房室模型并计算药动学参数。结果表明,两种铁剂的体内过程均符合单隔室模型一级动力学过程;按此模型处理数据并计算药动学参数,结果见表 4。

表 4 大鼠单剂量口服 APC 和 $FeSO_4$ 的药动学参数 ($n=6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters in rats after single oral administration of APC and $FeSO_4$ ($n=6$)

铁剂	$A/(\mu g \cdot mL^{-1})$	K_e/h^{-1}	K_e'/h^{-1}	$t_{1/2}/h$	$t_{1/2}'/h$	t_{max}/h	$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$AUC/(\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h)$
APC	376.384	1.290	0.0678	0.537	10.220	2.410	303.296	5266.160
$FeSO_4$	573.803	0.837	0.107	0.838	6.467	2.815	370.008	4667.855

3 讨论

食物铁供给不足造成的缺铁性贫血和缺铁症是世界性的营养铁缺乏病之一。临床上一般以硫酸亚铁、葡聚糖酸亚铁等作为补铁剂治疗缺铁性贫血,但是这些药物往往有刺激胃肠道的副作用^[10,11],还存在生物利用度低、化学性质不稳定等问题;并且,游离的亚铁离子 $Fe(II)$ 在体内易产生内源性自由基,可使细胞膜脂质过氧化,从而造成细胞膜损伤^[12,13]。研究表明^[14],食物中的铁为三价铁 $Fe(III)$,在体内, $Fe(III)$ 被食物中所含的还原性物质如抗坏血酸、含巯基的化合物还原为 $Fe(II)$, 然后被机体吸收、利用。

评价补铁剂生物利用度高低的的主要指标之一是

补铁剂在机体的主要吸收部位十二指肠(生理 pH 值 6~7)中是否可溶。当归多糖铁溶液在 pH 值 3~12 无沉淀出现且溶液保持透明澄清。这表明当归多糖铁在生理 pH 条件下可溶且能够稳定存在,因而有利于机体的吸收。

当归多糖铁 6 h 左右基本被抗坏血酸还原完全,而当归多糖铁中的 $Fe(III)$ 在还原性物质的作用下,6 h 左右基本全部溶出。这提示当归多糖铁的溶出时间与其被还原时间之间有一定的对应关系。当归多糖铁的溶出时间较长,亦有利于机体的充分吸收。

从大鼠单剂量口服给药当归多糖铁和硫酸亚铁后不同时间血中铁浓度数据可以看出,大鼠对硫酸亚铁和当归多糖铁的吸收速率相似,但实验组(当归多糖铁)不仅具有更高的铁浓度,而且维持高浓度的时间更长,生物利用度明显高于对照组(硫酸亚铁)。比较当归多糖铁和硫酸亚铁两种铁剂的主要药代动力学参数,当归多糖铁的吸收速率常数 K_e 大于硫酸亚铁而消除速率常数 K_e' 小于硫酸亚铁,达峰时间 t_{max} 小于硫酸亚铁,药时曲线下面积 AUC 大于硫酸亚铁。以上种种数据表明,与硫酸亚铁相比,当归多糖铁吸收快、消除慢,因此在机体内停留的时间长,能够更为充分地被机体利用。

References:

- [1] Wang K P, Zhang Y, Dai L Q. Synthesis of *Angelica sinensis* polysaccharide-iron complex [J]. *J Chin Clin Med* (中华临床医药杂志), 2002, 3 (4): 23-24.
- [2] Di Luzio N R. Immunopharmacology of Glucan; A broad spectrum enhancer of host defense mechanisms [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1983, 4: 344-347.
- [3] Masashi T, Noriko S. Plant mucilages XX I, isolation and characterization of a mucous polysaccharide, "ilium-J-glucomannan" from the bulbs of *Lilium japonicum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27: 468-474.
- [4] Ma L F, Mao X M, Li X W, et al. Experimental studies on the effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on the production of hematopoietic cell [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1988, 9 (3): 148-149.
- [5] Wang Y P, Zhu B D. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on granulopoiesis and monocytopenesis in mice [J]. *Chin J Anatomy* (解剖学杂志), 1993, 16 (2): 125-129.
- [6] Wang Y P, Zhu B D. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on the proliferation of erythrocyte in mice [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1993, 14 (12): 650-651.
- [7] Wang Y P, Huang X Q, Zhu B D, et al. Experimental studies on the HGF-inducing effect of L-cells treated with *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Acta Anatomic Sin* (解剖学报), 1996, 27 (1): 69-74.
- [8] Wang Y P, Zhu B D. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cell [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1996, 76 (5): 363-366.
- [9] Sun J F. *Methodology of Laboratory Animal* (实验动物学)

- [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [10] Wang G Y, Lin S Y, Ye C Y, et al. The effect and safety of polysaccharide-iron complex on hemodialysis patients for chronic renal failure with erythropoietin therapy [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2000, 39 (6): 380-383.
- [11] Chu Y L, Zheng Y Z, Xu Z M, et al. Comparison of the effects of three type oral iron preparations with oral ferrous sulphate for treatment of iron-deficiency anemia [J]. *J Clin Hematol* (临床血液杂志), 1997, 10 (1): 6-9.
- [12] Oates P S, Morgan E H. Defective iron uptake by duodenum of Belgrade rats fed diets of different iron contents [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: G826-G832.
- [13] Floyd R A, Lewis C A. Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes [J]. *Biochemistry*, 1983, 22: 3645-3649.
- [14] Dutra-de-oliveira J E, Marina L S, Jacob F. Iron from complex salts and its bioavailability to rats [J]. *Int J Vit Nutr Res*, 1995, 65: 272-276.

超临界 CO₂ 提取蜂胶中总黄酮的工艺研究

谷玉洪¹, 罗 濛², 徐 飞³, 赵余庆^{4*}

(1. 沈阳东宇药物技术研究院, 辽宁 沈阳 110015; 2. 沈阳市药学会, 辽宁 沈阳 110013; 3. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 1300624; 4. 辽宁省中药现代化工程技术中心, 辽宁 沈阳 110032)

蜂胶是蜜蜂采集不同植物树脂、花粉等部位, 混合其上颚分泌物及蜂蜡加工而成的胶状物。目前已从蜂胶中分离鉴定的成分有黄酮类、萜烯类、醌类、有机酸、氨基酸、酶类、维生素及大量的微量元素等, 具有生理学和药理学活性的成分达 300 多种^[1]。其中黄酮类化合物具有较强的抗氧化、清除自由基作用, 能够软化血管、减少血栓形成及改善人体的微循环。被誉为珍贵的天然“血管清道夫”。对于蜂胶中黄酮类成分的提取工艺研究报道较多, 乙醇冷浸提取法较简单, 并且温度不高, 某些易挥发和失活的有效黄酮类不易失去, 但是提取率受时间限制, 一般在两周内随时间的延长而升高, 而且乙醇体积分数以 70% 为最好^[2]。回流浸提法所需时间较短, 且提取率随温度的升高而升高, 但温度升高时很容易使某些黄酮类失去活性^[3]。70% 丙酮提取总黄酮, 效果很好, 但由于价格较贵, 且会造成溶剂残留, 所以不适合于生产上应用^[4]。超临界萃取法作为“绿色”提取技术, 可以克服上述不足。本实验采用超临界 CO₂ 萃取技术研究了蜂胶中黄酮类成分的提取工艺。

1 仪器与材料

DY168—50—05 超临界萃取装置(沈阳东宇药物技术研究院超临界设备制造分公司)、7230G 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司制造)、二氧化碳(食用, 液态纯度为 99%, 钢瓶装)、芦丁对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号: 00809705, 蜂胶由吉林省药品检验所鉴定和提供, 所用溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蜂胶中总黄酮的超临界萃取^[5,6]: 蜂胶样品低温粉碎, 称取 100 g 投入萃取釜中, 经热交换器分别加热萃取釜、解析釜 I、II, 使达到设定温度。通过制冷设备冷却贮罐, 开启 CO₂ 钢瓶, 打开加压泵升高萃取釜、解析釜 I 和 II 的压力, 使分别达到设定压力时, 关闭 CO₂ 钢瓶阀门。打开循环, 加入一定量的夹带剂(95%乙醇)至夹带剂储罐中, 打开夹带剂高压泵阀门, 按试验设定条件使夹带剂泵入萃取釜。并控制压力, 调节 CO₂ 流量, 保持恒压、恒温, 萃取 3 h。收集从解析釜 I、II 出口放出的萃取物, 合并, 回收乙醇及水分, 称定提取物, 计算萃取率(萃取率 = 提取物质量/样品质量 × 100%)。

2.2 总黄酮的测定^[7]

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 200 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 70 mL, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密吸取 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得(含芦丁 0.2 mg/mL)。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密量取对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠 1.0 mL, 使混匀, 静置 6 min, 再加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 静置 6 min, 再加入氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 照分光光度法在 500 nm 波长处测定吸光度。以吸光度值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 12.42 C -$