

总糖量分别为 19.6%, 本研究中纯化的凝集素也是一种糖蛋白, 总糖的量在 10.7%, 与其他凝集素存在一定的相似性。该凝集素的生物学活性(如抗菌及抗肿瘤活性等)仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙 册, 朱 政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986
- [2] 朱 月. 凝集素的作用与应用[J]. 水产科学, 2005, 24 (12): 48-49.
- [3] Rameshwaram N R, Nadimpalli S K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab* [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861: 209-217.
- [4] Absar N, Yeasmin T, Raza M S, *et al.* Single step purification, characterization and N-terminal sequences of a mannose specific lectin from mulberry seeds [J]. *Protein J*, 2005, 24 (6): 369-377.
- [5] Absar N, Hasan S, Arisaka F. Purification, characterization and N-terminal sequences alignment of a mannose specific protein purified from Potca fish, *Tetraodon pataca* [J]. *Pro-*

tein J, 2008, 27: 97-104

- [6] 白焱晶, 王智颖, 杜新刚. 黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 9801-2901.
- [7] 刘玉莲, 杨丛忠. 黄芪药理作用概述[J]. 中国药业, 2004, 13: 79.
- [8] Yan Q J, Jiang Z J, Yang S Q, *et al.* A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 442: 72-81.
- [9] Yan Q J, Qi X W, Jiang Z Q, *et al.* Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 93-99.
- [10] Zacharius R M, Zell T E, Morrison J H, *et al.* Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1969, 30: 148-152.
- [11] Dubois M, Gillis K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 350-356.
- [12] Ng T B, Yu Y L, Chu K T. Isolation a novel legumin-like lectin with potent hemagglutinating activity from seeds of the Chinese chestnut *Castanea mollissima* [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2002, 133: 453-460.

亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究

丛艳波, 张永忠*, 刘 潇

(东北农业大学理学院 应用化学系, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:目的 考察了亚临界水提取槐角总异黄酮的最佳实验条件。方法 通过单因素和正交试验, 以染料木苷为对照、总异黄酮的得率为指标, 优选出槐角异黄酮的提取工艺参数。结果 当提取时间为 45 min、提取温度为 130 ℃、液固比为 12.5 mL/g 时槐角总异黄酮的得率为 23.3%。结论 与传统的提取方法相比, 亚临界水提取技术是新发展起来的一种新型提取技术, 具有提取时间短、效率高、环境友好等优点。

关键词: 槐角; 总异黄酮; 亚临界水提取

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0717-04

Study on total isoflavones from *Fructus Sophorae* by subcritical water extraction

CONG Yan-bo, ZHANG Yong-zhong, LIU Xiao

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extracting condition of total isoflavones from *Fructus Sophorae* by subcritical water extraction. **Methods** Taking isoflavones yield as index and genistin as control, the technology parameter of subcritical water extraction of *Fructus Sophorae* isoflavones was optimized by single factor and orthogonal experiment. **Results** The yield of *Fructus Sophorae* total isoflavones in the extracts was 23.3% at 130 ℃ for 45 min with the liquid-solid ratio of 12.5 mL/g. **Conclusion** Compared with traditional extracting methods, subcritical water extraction is a new developing technology in recent years. Its advantage is fast, good-selective.

Key words: *Fructus Sophorae*; total isoflavones; subcritical water extraction

①收稿日期: 2009-09-14

基金项目: 国家 863 课题(2008AA10Z331)

作者简介: 丛艳波(1985—), 女, 黑龙江绥化兰西人, 在读硕士研究生, 2004—2008 年考入东北农业大学食品分析与检验专业, 2008 年保送到东北农业大学研究生学院攻读应用化学硕士, 主要研究天然活性物质的分离纯化及其应用。

Tel: 13624612968 E-mail: cyb_happy_love@126.com

* 通讯作者 张永忠 E-mail: zyz1953@sohu.com

槐角为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的果实,始载于《神农本草经》,有清热泻火、凉血止血的作用^[1]。黄酮类和异黄酮类化合物是槐角中的主要活性成分,具有降低转氨酶、降血压、抗生育和抗癌等药理作用^[2]。槐角中含有的异黄酮主要是染料木黄酮(genistein)^[3,4]及其衍生物,如染料木苷(genistin)、槐属苷(sophoricoside)、槐属双苷(sophorabioside)、染料木黄酮-7-双葡萄糖苷(genistein-7-diglucoside)和染料木黄酮-7,4-双葡萄糖苷(genistein-7,4-diglucoside)等。槐角异黄酮水解可以生成染料木黄酮,染料木黄酮具有多种生物活性和生理功能,美国国家癌症研究所于 1996 年已将其列入肿瘤化学预防药物临床发展计划之中,主要预防目标是乳腺癌和前列腺癌^[5]。槐角中异黄酮总量约为 29.58 g/kg,而大豆中存在的异黄酮总量约为 0.5~1.7 g/kg^[6]。研究槐角异黄酮的提取纯化,对于进一步制备生物活性较高的染料木黄酮具有十分重要的意义。亚临界水也被称为过热水、高温水、高压热水或热液态水,是指在一定压力下,将水加热到 100℃以上临界温度 374℃以下的高温,水体仍然保持在液体状态(或指压力和温度在其临界值之下的附近区域的液态水)^[7]。通过对亚临界水温度和压力的控制可以改变水的极性、表面张力和黏度^[8]。随着温度的升高,水的极性会降低,对有机物的溶解能力会增加。在合适的压力下提高温度也能够降低表面张力和水的黏度,增强有机物在水中的溶解度。随着温度的增加,亚临界水的氢键被打开或减弱^[9],在这样的条件下,水的介电常数(ϵ)随温度升高很容易降低。常温下纯水的 ϵ 约为 80,而升温升压至 250℃、5 MPa 时,水的 ϵ 降低到 27^[10]。这个值和 25℃、0.1 MPa 下的乙醇相同,因此极性足够低,可以溶解许多中等和低极性化合物。本实验采用单因素和正交试验方法研究亚临界水对槐角中总异黄酮提取效率的影响,以期对槐角异黄酮的生产提供参考。该方法是一种快速高效的新方法,这一方法在中药有效成分的提取分离中将具有很好的应用前景。

1 材料和仪器

槐角购至安国市京兴药业有限责任公司,经本校胡宝忠教授鉴定。染料木苷对照品(Sigma 公司,质量分数为 99.0%)。

Mettler Toledo AG135 型电子天平[梅特勒-托利多仪器有限公司(上海)];FW 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);KCFD05-10 高压磁力搅拌反应釜(烟台高新区科立自控设备研究所,

容积:0.5 L,设计压力<12 MPa,设计温度<350℃);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法和结果

2.1 槐角总异黄酮的测定方法

2.1.1 最大吸收波长的确定:槐角中含有的异黄酮主要是染料木黄酮及其衍生物槐属苷和槐属双苷等,它们的化学结构与染料木苷(染料木黄酮 7 位上的羟基与葡萄糖的苷羟基形成的糖苷)相近,最大吸收波长也与染料木苷相同都是 262 nm。

2.1.2 标准曲线的制备:准确称取染料木苷对照品 1.0 mg,溶解于 95%乙醇中,并定容至 100 mL。分别取 3、6、9、12、15 mL 溶液于 25 mL 量瓶中至刻度,测定吸光度。以染料木苷的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,用 Excel 软件处理,得回归标准曲线方程 $Y = 0.066X - 0.043$ ^[11]。

2.1.3 测定方法和槐角总异黄酮的得率的计算:提取液减压滤过,将滤液定容至 250 mL 量瓶中,然后从中准确吸取 0.100 mL,定容至 50.00 mL 量瓶中。以水为对照,进行槐角总异黄酮的测定。利用上述标准曲线回归方程计算得到槐角提取液中总异黄酮的浓度,计算槐角总异黄酮的得率[得率=提取液中总异黄酮质量/槐角质量×100%]。

2.2 槐角总异黄酮的提取:将槐角洗净、烘干,粉碎,过 100 目筛。准确取槐角粉 7.000 0 g 于高压反应釜中,加入不同体积的蒸馏水,磁力搅拌速度为 120 r/min,然后在不同温度及时间条件下进行提取。

2.3 单因素试验结果与分析

2.3.1 提取时间对槐角总异黄酮提取效果的影响:在固液比 10 mL/g,提取温度为 120℃条件下,选取提取时间 30、45、60、75、90 min 进行提取试验,结果见图 1。可以看出,当提取时间为 30~45 min,异黄酮得率明显升高,当时间再延长时,异黄酮增加缓慢。在 60 min 以后异黄酮得率明显下降,因此选择 60 min 为最佳提取时间。

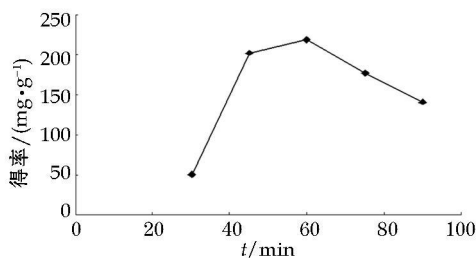


图 1 提取时间对异黄酮提取效果的影响

Fig 1 Influence of time on isoflavone extract

2.3.2 提取温度对槐角总异黄酮提取效果的影响: 在提取时间为 60 min, 固液比为 10 mL/g 的条件下, 选择提取温度为 100、110、120、130、140 ℃进行提取实验, 结果见图 2。可以看出当提取温度为 130 ℃时, 异黄酮的得率最大, 因此选择 130 ℃为单因素提取的最佳条件。

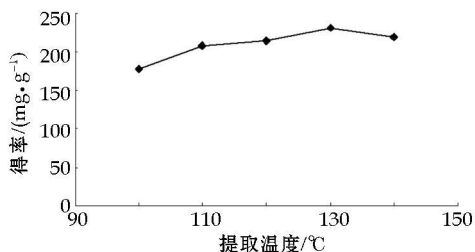


图 2 提取温度对异黄酮提取效果的影响

Fig 2 Influence of temperature on isoflavone extract

2.3.3 液固比对槐角总异黄酮提取效果的影响: 在提取时间、提取温度分别为 60 min、130 ℃的条件下, 选择水与槐角粉的液固比为 7.5、10、12.5、15、17.5 mL/g, 结果见图 3。当液固比为 10 mL/g 时, 槐角异黄酮的得率最大。但是当液固比小于 10 mL/g 时, 会发生糊底的现象, 使得槐角异黄酮损失。而在液固比为 10~15 mL/g, 槐角异黄酮的得率变化很小, 由于液固比较大时, 后续脱溶处理比较困难。因此选择液固比为 12.5 mL/g。

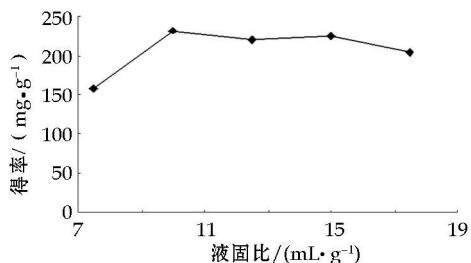


图 3 液固比对异黄酮提取效果的影响

Fig 3 Influence of liquid to solid ratio on isoflavone extract

2.4 亚临界水提取槐角总异黄酮的正交试验: 以单因素试验为基础, 对提取时间、提取温度、液固比等影响槐角总异黄酮得率的因素进行 L₉(3⁴) 正交试验设计, 并对试验结果进行统计分析, 确定最佳的工艺参数。因素与水平见表 1, 试验设计与结果见表 2。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取时间/min	B 提取温度/℃	C 液固比/(mL·g ⁻¹)
1	60	130	10.0
2	45	140	12.5
3	75	120	15.0

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	得率/%
1	1	1	1	23.141
2	1	2	2	20.490
3	1	3	3	18.650
4	2	1	2	23.277
5	2	2	3	20.733
6	2	3	1	20.463
7	3	1	3	20.544
8	3	2	1	19.651
9	3	3	2	19.516
K ₁	62.281	66.962	63.255	
K ₂	64.473	60.874	63.283	
K ₃	59.711	58.629	59.927	
k ₁	20.760	22.321	21.085	
k ₂	21.491	20.291	21.094	
k ₃	19.904	19.543	19.976	
R	1.587	2.778	1.118	

从极差分析结果得出影响槐角总异黄酮提取效率的因素主次顺序为 B>A>C, 即提取温度、提取时间和液固比。液固比影响不显著。最佳组合为 A₂B₁C₂, 即提取温度为 130 ℃、液固比为 12.5 mL/g、提取时间 45 min 时提取效果最好。最佳组合在实验组, 且与试验结果相符。

3 讨论

槐角异黄酮的提取纯化方法近年来已有报道。但采用亚临界水提取的方法尚未见文献报道。常规的提取方法存在有机溶剂残留等不安全因素, 对人体健康有潜在威胁。水是一种绿色环保、资源丰富的溶剂, 通过高温高压制得的亚临界水由于其极性足够低, 可以溶解许多中等和低极性化合物, 是一种无毒环保的绿色提取剂, 具有提取时间短、提取率高、环境友好等优点。将亚临界水提取技术开发成一种工程化中药提取技术, 将更接近于中国传统水煎煮中药的模式, 避免有机溶剂的应用和污染。将亚临界水提取用于槐角异黄酮的提取上, 是槐角异黄酮提取手段的一种新的探索, 不仅可以避免有机溶剂对异黄酮的污染, 而且成本低, 这对槐角异黄酮的生产利用具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] Mazur W M, Duke J A, Wahala K, *et al.* Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans [J]. *J. Nutri Biochem*, 1998, 9(4): 193-200(8).
- [3] 张永忠, 孙艳梅. 大豆异黄酮研究中的名词术语[J]. *中国粮油学报*, 2004, 19(4): 50-52
- [4] 王剑波, 郭萍, 赵小兵, 等. RP-HPLC 法测定槐角提取物中染料木素的含量[J]. *中草药*, 2004, 35(4): 402-403
- [5] Kelloff G J, Crowell J A, Boone C W, *et al.* Strategy and planning for chemopreventive drug development: clinical development plans II [J]. *Cell Biochem*, 2004, 56(s20), 55-62

- [6] Kwon, S H, Hwang B S, kim K H, *et al*. Method for preparing sophorae fructus extract containing isoflavone [P]. US, 7595080, 2009-09-29.
- [7] Smith R M. Extraction with superheated water [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 975: 31-46
- [8] Hartonen K, Inkala K, Kangas K, *et al*. Extraction of polychlorinated biphenyls with water under subcritical conditions [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 785: 219-222.
- [9] Yamaguchi T. Structure of subcritical and supercritical hydrogen-bonded liquids and solutions [J]. *J Mol Liquids*, 1998, 78(122): 43-50
- [10] De Castro M D L, Jimene C M M. Potential of water for continuous automated sample leaching [J]. *Trends Anal Chem*, 1998, 17(7): 441-447.
- [11] 魏福华, 张永忠, 井乐刚, 等. 紫外分光光度法测定大豆中大豆异黄酮[J]. 理化检验: 化学分册, 2006, 42(6): 461-463

硝酸毛果芸香碱眼用原位凝胶的制备和评价

朱 静^{1,2}, 姜 锋², 阎 卉², 王成港², 王春龙^{2*}

(1 天津医科大学, 天津 300070; 2 天津药物研究院, 天津 300193)

摘 要:目的 以硝酸毛果芸香碱为模型药, 研究温度敏感型原位凝胶对药物眼部滞留和体外释放的影响。方法以泊洛沙姆 407、188 为凝胶剂, 以卡波姆 974P 为增黏剂, 制备眼用温敏型原位凝胶。考察原位凝胶的流变学性质; 采用改良 Franz 扩散池法研究凝胶的体外释药行为。结果 流变学测定结果显示原位凝胶在室温状态下为物理缠结的聚合物溶液, 在眼表温度下转变为次级键网状结构。泊洛沙姆 188、卡波姆 974P 的加入均可延缓药物的释放, 二者对凝胶的黏性模量 G' 的影响不同。原位凝胶在 4 h 内缓慢释放药物, 释放曲线符合 Higuchi 方程($r=0.9923$)。结论 通过调节泊洛沙姆 407 和 188 的比例, 可得到具有适宜溶液-凝胶转变温度和良好释药特性的原位凝胶。流变学结果提示原位凝胶的眼部滞留能力强于普通滴眼液, 是一种具有研究前景的给药系统。

关键词: 硝酸毛果芸香碱; 眼用原位凝胶; 温敏型; 流变学; 溶液-凝胶转变温度; 体外释放

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0720-05

Preparation and evaluation of pilocarpine nitrate *in situ* gel for ophthalmic use

ZHU Jing, JIANG Feng, YAN Hui, WANG Cheng-gang, WANG Chun-long

(Tianjin Medical University, Tianjin, 300070; Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193)

Abstract: **Objective** To develop and characterize a series of Poloxamer and Carbopol-based *in situ* gel for ophthalmic use as to enhance the ability of drug to retain in eyes and delay drug release. **Methods** The gel was prepared using Poloxamer 407/188 and Carbopol 974P as gelling agent and viscosity enhancer, respectively. Rheological characteristics were evaluated and behaviour of drug release *in vitro* was investigated by modified Franz diffusion cells. **Results** The rheological study indicated that the gel was physically entangled polymer solutions at 20 °C and then converted into a network structure with secondary bonds at 35 °C. The gel released the drug molecules slowly in 4 h. The best fit model was Higuchi matrix model ($r=0.9923$). Formulations consisting of Poloxamer 188 and Carbopol 974P were proved to be able to decrease the drug release speed efficiently. The impact on elastic modulus G' of the gel caused by those two were different. **Conclusion** An *in situ* gel with suitable sol-gel transition temperature and satisfactory release pattern could be achieved by adjusting the ratio of Poloxamer 407 to Poloxamer 188. The developed formulations have the ability to prolong the ocular residence time, which suggests it may be a new drug delivery system with bright future.

Key words: pilocarpine nitrate; ophthalmic *in situ* gel; thermosensitive; rheology, sol-gel transition temperature; *in vitro* release

①收稿日期: 2009-11-03

作者简介: 朱 静, 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事眼部缓释给药系统的研究。

Tel: (022) 23006879 E-mail: catherine_zhu@hotmail.com

* 通讯作者 王春龙 Tel: (022) 23006880 E-mail: dds-wcl@vip.sina.com