

银离子配位色谱法分离香茅次油中 β -榄香烯的研究

黄汉昌^{1,2} 朱宏吉³ 姜招峰^{*,1,2}

(¹北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100083)

(²北京联合大学应用文理学院, 北京 100083)

(³天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 目的: 对比硅胶与硝酸银硅胶层析介质对 β -榄香烯的吸附及分离效果, 从香茅次油中分离得到 β -榄香烯。方法: 测定 β -榄香烯银离子配位化合物的稳定常数, 考察不同极性溶剂中 β -榄香烯在硅胶及硝酸银硅胶表面的静态吸附情况, 香茅次油在两种层析介质中的薄层分离情况, 并采用柱层析方法分离 β -榄香烯。结果: β -榄香烯与硝酸银能够形成 π 配位化合物, 稳定常数为 $5.12 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 当硅胶作为层析介质时, β -榄香烯静态吸附量较小, 符合单分子层吸附模型, 溶剂极性增大对 β -榄香烯柱层析的分离, 含量为 97% 的 β -榄香烯回收率为 11%; 当硅胶经硝酸银改性后, 增强了 β -榄香烯静态吸附能力, 吸附行为与 BET 多分子吸附模型相近, 中等极性的溶剂有利于 β -榄香烯柱层析的分离, 含量为 98% 的 β -榄香烯回收率为 60%。结论: 硅胶经硝酸银改性后对不饱和化合物具有选择性吸附能力, 倍半萜 π 配位化合物的稳定性与其化合物结构及溶剂环境等相关; 常规硅胶层析法很难将 β -榄香烯从倍半萜化合物中分离出来, 而硝酸银硅胶柱层析法却能很好地实现, 且分离效率高。

关键词: β -榄香烯; 银离子配位色谱; 分离

中图分类号: O647.33; O614.122

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2009)03-0433-06

Isolation of β -Elemene from Citronella Oil by Silver Ion Coordination Chromatography

HUANG Han-Chang^{1,2} ZHU Hong-Ji³ JIANG Zhao-Feng^{*,1,2}

(¹Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100083)

(²School of Applied Sciences and Humanities, Beijing Union University, Beijing 100083)

(³School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: *Aim:* To separate β -elemene from other sesquiterpenes, and compare the effect of silica gel chromatography with/without silver nitrate modification. *Methods:* Detecting the complex constant of β -elemene- Ag^+ coordination compound, and investigating the static adsorption of β -elemene on silica gel before and after treated with silver nitrate in different polar solution and the thin layer chromatography of citronella oil when silica gel and silver nitrate modified silica gel are used for chromatography medium, and separating β -elemene from other sesquiterpenes by silica gel and silica gel column chromatography modified with silver nitrate. *Results:* β -Elemene- Ag^+ π coordination compound will be formed with stability constant 5.12×10^{-5} when silver nitrate is added to β -elemene solution. When silica gel is treated as medium, the adsorption of β -elemene conforms to the Langmuir monomolecular adsorption theory and the adsorbility is weak. The polar solvent is available to separate β -elemene from other sesquiterpenes, but the separating result is not good. The 97% content of β -elemene accounts for 11 percent of recovery. While silica gel modified with silver nitrate is treated as medium, the adsorption of β -elemene conforms to BET adsorption theory and the adsorbility is strong. The middling polar solvent is acceptable, and the 98% content of β -elemene accounts for 60 percent of recovery. *Conclusions:* The selective adsorption of β -elemene

收稿日期: 2008-09-09。收修改稿日期: 2008-12-24。

北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室开放课题资助课题(No.LD-KZ-0603)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: zhaofeng@buu.edu.cn

第一作者: 黄汉昌, 男, 33 岁, 硕士, 助理研究员; 研究方向: 主要从事生物活性物质的分离过程研究。

will be increased when silica gel is modified by silver nitrate, and the stability of different structure sesquiterpenes- Ag^+ coordination compounds is related to their molecular structure and solvents. Conventional silica gel chromatography can not be available to separate sesquiterpenes. However, β -elemene can be isolated high efficiently from sesquiterpenes mixtures by silica gel chromatography modified with silver nitrate.

Key words: β -elemene; silver ion coordination chromatography; isolation

榄香烯(Elemene)是一种具有抗癌活性的倍半萜化合物,系我国首先从姜科植物温莪术的根茎中提取的倍半萜天然抗癌药物^[1]。实验药理学和临床试验均发现,榄香烯对肿瘤具有显著的疗效,其抗癌谱较广且毒副作用小,是一种具有广泛应用前景的抗癌新药^[2]。榄香烯有 4 种同分异构体(图 1,分子量 204): α -榄香烯、 β -榄香烯、 γ -榄香烯和 δ -榄香烯;其中 β -榄香烯起主要的抗癌作用,具有最高的抗肿瘤活性^[3]。制备单体药物是降低中草药毒副作用及提高药物疗效的有效途径,也是申请国家一类新药的要求。 β -榄香烯主要从富含倍半萜类化合物的植物挥发油中通过采用减压精馏、硅胶层析等分离方法纯化获得^[4]。周雪松等^[5]采用真空间歇精馏方法,从含 6% β -榄香烯的莪术精油中提取、精制 β -榄香烯,得到较为适宜的二次精馏工艺条件,馏分中 β -榄香烯的质量分数达到 88.0%,收率大于 66.0%。但由于混合物中物性的相近性及倍半萜的热敏性等特点,常规的分离方法难于得到 98%以上的高纯度 β -榄香烯。因此开展 β -榄香烯的分离过程的研究对 β -榄香烯作为抗肿瘤药物的应用有着重要的意义。

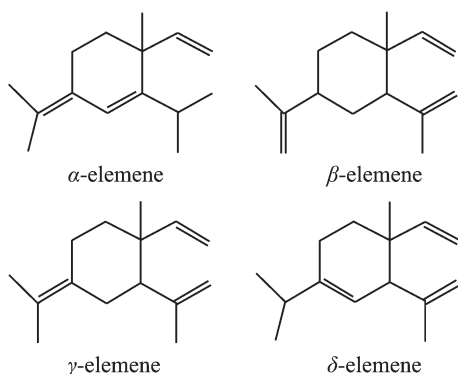


图 1 榄香烯的 4 种异构体

Fig.1 Four isomeric compounds of elemene

Winstein 等^[6]报道含 π 电子的不饱和化合物与银离子能够形成 π 配位化合物,而且这个过程是可逆的。 π 配位化合物的稳定性受 π 电子化合物不饱和程度、分子结构及溶剂环境的影响^[7]。从而可以利

用不饱和物与银离子形成配位化合物的特性,将不饱和化合物从混合物中分离出来。杨克迪等^[8]用银离子配位萃取法分离银杏叶中多萜长链化合物聚戊烯醇,其结果表明,这种方法具有很好的选择性、较高的分离效率,及萃取剂再生方法简便等优点。榄香烯类倍半萜是含有 3 个不饱和双键的非极性物质,从经验规律上推测可与银离子形成榄香烯银离子配位化合物;不同类型的榄香烯双键结构有差异,推断其银离子配位化合物的稳定性也有差异。本研究根据榄香烯的结构特点,测定 β -榄香烯银离子配位化合物的稳定性,对比 β -榄香烯在硅胶及硝酸银硅胶介质上的吸附及解析行为,并选择合适的层析条件,从富含倍半萜成分的香茅次油中选择性地分离提纯 β -榄香烯,为高纯度的抗肿瘤药物 β -榄香烯的提取分离提供参考。

1 实验材料与仪器

99.0% β -榄香烯(大连远大制药公司),香茅次油(市售,约含 80% β -榄香烯,杂质主要为倍半萜化合物);硝酸银,石油醚,乙酸乙酯,甲醇,香草醛,浓硫酸(均为 A.R.级,北京化学试剂公司),正十六烷(GC 纯,北京化学试剂公司);层析用硅胶(200~300 目, A.R.级,青岛海洋化工集团公司),硅胶层析 G 板(青岛海洋化工集团公司)。

层析设备(自组装,层析柱 4.7 cm $\times$ 30.0 cm),气相色谱 GC-14C(日本岛津公司),N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所),AE100 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),原子吸收分光光度计 AAnalyst 700(美国 PE 公司)。

2 实验方法

2.1 β -榄香烯银离子配合物的稳定常数测定

采用两相法测定 β -榄香烯银离子配合物的配合常数。精确称取 1.0 g AgNO_3 ,用蒸馏水溶解定容到 50 mL,置于 250 mL 的分液漏斗中。精确移取 1.0 mL β -榄香烯加入到分液漏斗中,适当振动,使

与之与 AgNO_3 溶液充分混合。室温静置 40 min, 分离出下层水相。气相色谱外标法测定 β -榄香烯银离子配合物中 β -榄香烯的含量, 计算 β -榄香烯银离子配合物的配合常数。

2.2 β -榄香烯在硅胶/硝酸银硅胶表面的静态吸附

硝酸银硅胶的制备: 采用 Ghosh 方法^[9]制备硝酸银硅胶。称取硝酸银 30.0 g 于 400 mL 70% 的甲醇水溶液中溶解, 加入层析用硅胶 300.0 g, 搅拌混合。避光浸泡 24 h 后, 减压旋转蒸发至流动粉末状, 于 120 °C 下烘干 16 h, 置于棕色干燥器中备用。

参照夏向东^[10]测定生育三烯酚在硅胶表面吸附的方法, 精确称取 100.0 mg 经 105 °C 活化 6 h 的硅胶/硝酸银硅胶于 50 mL 中, 加入不同浓度的 β -榄香烯溶液。将三角瓶置于摇床中, 25 °C 下间断振荡以利于 β -榄香烯的平衡吸附。取出部分上清液层, 气相色谱法检测溶液中 β -榄香烯含量^[11,12], 即为平衡吸附时溶液中 β -榄香烯含量。硅胶/硝酸银硅胶吸附 β -榄香烯的吸附量 q :

$$q = \frac{(C_0 - C_r)V}{W} \quad (1)$$

q : 吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); C_0 : β -榄香烯溶液的初始浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_r : β -榄香烯溶液的平衡浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V : 溶液体积 (mL); W : 硅胶或硝酸银硅胶的质量 (g)。以吸附量对溶液平衡浓度作图, 得到 β -榄香烯在硅胶/硝酸银硅胶的静态平衡吸附曲线。

2.3 香茅次油的硅胶/硝酸银硅胶薄层层析

点样: 精确称取 10.0 mg 香茅次油溶解于 10 mL 的石油醚中, 配制 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的香茅次油样品, 用毛细管分别点样于硅胶 G 板及硝酸银甲醇饱和溶液浸泡处理后硅胶 G 板 (硝酸银硅胶 G 板) 一端 5 mm 处。

展开: 将点样后的硅胶/硝酸银硅胶 G 板置于含展开剂的层析缸中, 点样端置于展开剂中展开, 溶剂快到达层析板的另一边沿时停止展开。

显色: 从层析缸中取出硅胶/硝酸银硅胶 G 板, 挥干展开剂后, 喷香草醛浓硫酸溶液显色剂, 105 °C 烘干显色。

2.4 β -榄香烯的柱层析制备

2.4.1 硅胶层析

装柱: 称取硅胶 150.0 g, 用流动相浸泡 1 h, 缓慢搅拌并防止气泡产生, 将其倾入层析柱中, 以 3 倍柱体积的流动相洗涤硅胶柱。

上柱: 取香茅次油样品 1.0 g 加少量流动相溶

解后, 加入层析柱的上端。层析柱上部连接洗脱液贮瓶, 下部安装流分收集器。当样品向下移动到层析介质界面时, 加入少量流动相, 当样品进入介质后加流动相洗脱。

洗脱: 加流动相于层析柱中, 控制流速 $4.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分瓶收集流出溶液, 气相色谱法检测流出液成分, 将成分近似者合并, 当流出液不显峰时即停止收集。

回收率实验: 含目标组分流出液减压蒸发溶剂后, 称量 β -榄香烯的质量, 计算回收率。

2.4.2 硝酸银硅胶层析

装柱: 称取硝酸银的硅胶 150.0 g, 用石油醚浸泡 30 min 左右。缓慢搅拌并防止产生气泡, 将其倾入层析柱中, 柱外包黑纸遮光装好。放置 2~3 h, 达平衡后使用。

上柱: 同 2.4.1 方法。

洗脱: 同 2.4.1 方法。

回收率实验: 目标组分减压蒸发溶剂后, 加入 50 mL 石油醚, 置于分液漏斗中, 加入 10% 氯化钠溶液 50 mL, 振摇 10 min, 静置分层, 放出下层水层, 以除去痕量的银离子。再加 10% 氯化钠溶液 (50 mL $\times$ 2) 洗涤, 取出石油醚层, 减压蒸发除去石油醚, 称取 β -榄香烯的重量, 计算回收率。

2.4.3 痕量银离子的检测

将 2.4.2 氯化钠处理后的 β -榄香烯样品进样于原子吸收分光光度计中, 测定银元素的含量。实验条件为: 银元素灯, 检测波长 328.1 nm, 灯电流 7.5 mA, 光谱通带 0.4 nm, 氩气流量 $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥温度 80~120 °C, 斜坡升温 30 s, 灰化温度 700 °C, 灰化时间 30 s, 原子化温度 1800 °C, 原子化时间 7 s, 清洗时间 7 s, 进样量为 10 μL , 测量方式为峰面积。

3 结果与讨论

3.1 β -榄香烯银离子配合物的稳定常数

β -榄香烯与银离子形成配合物是其配位层析的基础, 其配合物稳定性过强或过弱都不利于层析分离。 β -榄香烯与银离子形成配合物的配位反应式:



形成配位化合物前, β -榄香烯与硝酸银水溶液形成两相体系, 水溶液中没有 β -榄香烯的存在。当两者形成配位化合物后, β -榄香烯以银离子配合物的形式转移到水相 (图 2)。通过检测水相中 β -榄香烯的含量, 可以得到配位化合物的生成量。油相 β -

榄香烯的浓度可看作为摩尔密度:

$$c_{C_{15}H_{24}} = \frac{n}{V} = \frac{\rho}{M} = \frac{880 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{204 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} = 4.31 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \quad (2)$$

气相色谱检测表明,当反应达到平衡时,水相中 β -榄香烯银离子的配合物浓度: $c_{C_{15}H_{24} \cdot Ag^+} = 8.17 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离银离子浓度为: $c_{Ag^+} = 3.70 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. β -榄香烯银离子配合物的稳定常数:

$$K = \frac{c_{C_{15}H_{24} \cdot Ag^+}}{c_{Ag^+} \cdot c_{C_{15}H_{24}}} = 5.12 \times 10^{-5} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1},$$

$$pK = -\lg 5.12 \times 10^{-5} = 4.29 \quad (3)$$

表明水相中 β -榄香烯银离子配合物的浓度很低,该配合物的配位强度较弱,稳定性较差,在一定的条件下平衡反应向配合物的解离方向进行。

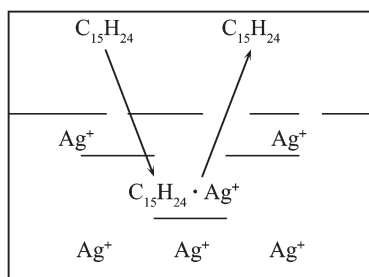


图 2 β -榄香烯银离子配合物形成过程

Fig.2 Forming process of β -elemene silver ion complex

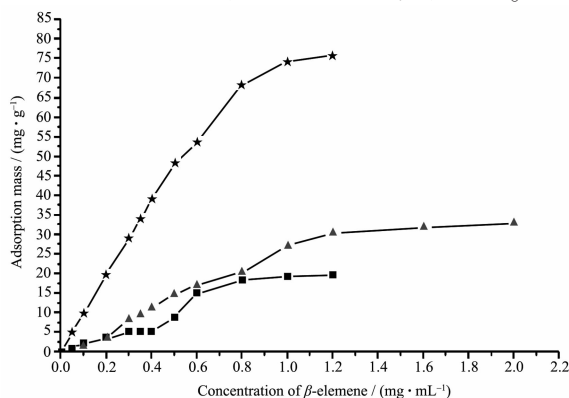
3.2 硅胶/硝酸银硅胶表面的静态吸附比较

吸附溶剂的选择是吸附分离中的关键,当吸附介质一定时,吸附溶剂对被吸附物质的吸附率有很大的影响。溶剂对吸附介质的膨胀性要小,溶剂对被吸附物质的溶解能力要大及被吸附物质在介质中的吸附率要适中。本实验选择了石油醚、乙酸乙酯及其不同比例的溶剂作 β -榄香烯静态吸附实验,依次静态吸附 0.5、1、5、12、16、20 及 24 h,检测溶液中 β -榄香烯的含量。结果表明,静态吸附 12 h 后, β -榄香烯在吸附介质上已达到平衡吸附。为确保平衡吸附,本实验中 β -榄香烯静态吸附 24 h 后再进行吸附量测定实验。

β -榄香烯在硅胶/硝酸银硅胶表面的静态平衡吸附曲线见图 3。 β -榄香烯在硅胶上的吸附曲线不符合 Langmuir 单分子层吸附理论,呈现出比较复杂的吸附特性,与 BET 多分子吸附模型相近,这可能与 β -榄香烯具有 3 个不饱和双键有关。当浓度较低时, β -榄香烯在硅胶上的吸附也可以看作单分子层吸附,与紫杉醇和三尖杉磷碱在硅胶上的吸附等温线类似^[13]。 β -榄香烯在硝酸银硅胶上的配位吸附曲

线近似典型的 Langmuir 型吸附,表明 β -榄香烯在硝酸银硅胶上吸附属于单分子层配位吸附,符合化学吸附的特征。硅胶改性前后 β -榄香烯静态平衡吸附曲线的变化,表明 β -榄香烯与硝酸银发生了作用。

溶剂极性大小对 β -榄香烯在硝酸银硅胶表面的静态吸附量有很大的影响。根据 Langmuir 吸附等温线方程: $q = q_m C / (k_d + C)$, $q^{-1} = k_d q_m^{-1} C^{-1} + q_m^{-1}$, 将 q^{-1} 对 C^{-1} 线性回归,得到静态饱和吸附量 q_m 。石油醚溶剂中, β -榄香烯的饱和吸附量 q_m 到达 $80.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而随溶剂强度的增加,饱和吸附量下降;在石油醚:乙酸乙酯=5:1 的溶剂中饱和吸附量 q_m 只有 $35.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Snyder 等^[14]的研究也表明,溶质吸附过程受溶剂中强溶剂浓度的影响(所谓强溶剂即为溶剂中极性大的溶剂),因此可以通过改变溶剂中强溶剂的浓度来改变洗脱效果。由此可见,溶剂极性增大,有利于 β -榄香烯从硝酸银配位层析介质上洗脱下来。



■ Chromatography medium: silica gel, adsorption solvent: petroleum ether

▲ Chromatography medium: silver nitrate modified silica gel, adsorption solvent: petroleum ether: acetic ester=5:1

★ Chromatography medium: silver nitrate modified silica gel, adsorption solvent: petroleum ether

图 3 β -榄香烯在硅胶/硝酸银硅胶的静态平衡吸附

Fig.3 Adsorption curves of β -elemene on silica gel and silver nitrate modified silica gel

3.3 薄层层析分析的比较

采用石油醚、乙酸乙酯及甲醇不同组合比例的溶剂作展开剂,以硅胶/硝酸银硅胶作为层析介质,展开香茅次油样品,展开效果见图 4。由图可见,采用硅胶作为层析介质,当非极性溶剂(石油醚)展开时,其比移值($R_f = a/b$)几近为 1,非极性溶剂对样品没有分离能力;随着展开剂极性的增加, R_f 值变小,硅胶对样品的分离能力增大;极性过大时(甲醇)样品弥散比较严重。总体而言,硅胶作为层析介质时,

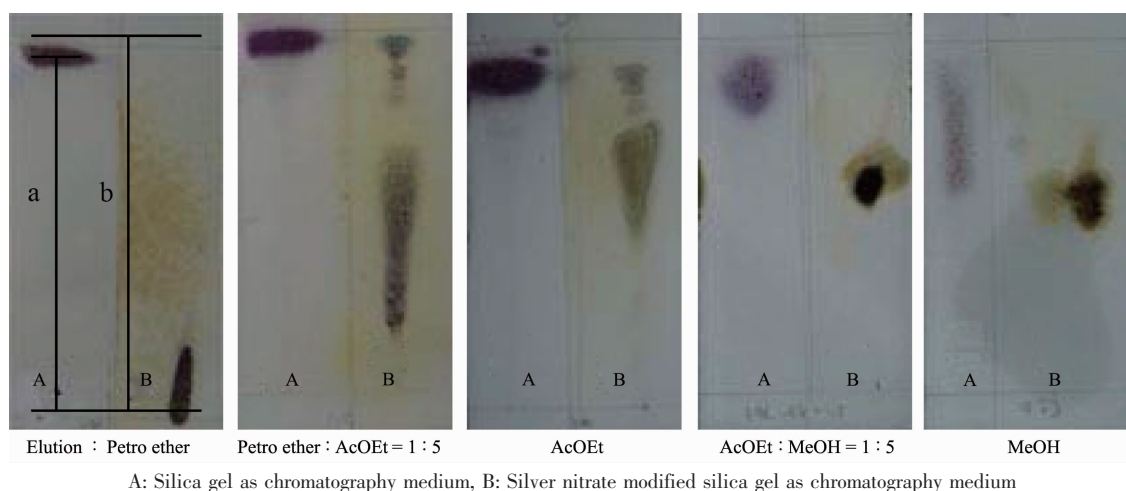


图4 香茅次油的薄层层析

Fig.4 Thin layer chromatography of citronella oil

样品薄层层析的区分能力较差。采用硝酸银改性后的硅胶作为层析介质,当非极性溶剂(石油醚)展开时,样品的 R_f 值很小,非极性溶剂对样品没有分离能力,随着展开剂极性的增强, R_f 值增大;当中等极性溶剂(石油醚及乙酸乙酯混合物)展开时,溶剂对样品有较好的区分能力;当强极性溶剂(甲醇)展开时,对样品分离能力下降。值得注意的是,随着溶剂极性的增强,层析介质中的硝酸银有部分的洗脱,并随溶剂极性呈正相关性,会对层析介质的稳定带来不利影响。另外,极性条件下硅胶易于膨胀,造成柱层析时压力降过大,因此柱层析时宜选用弱极性的溶剂。

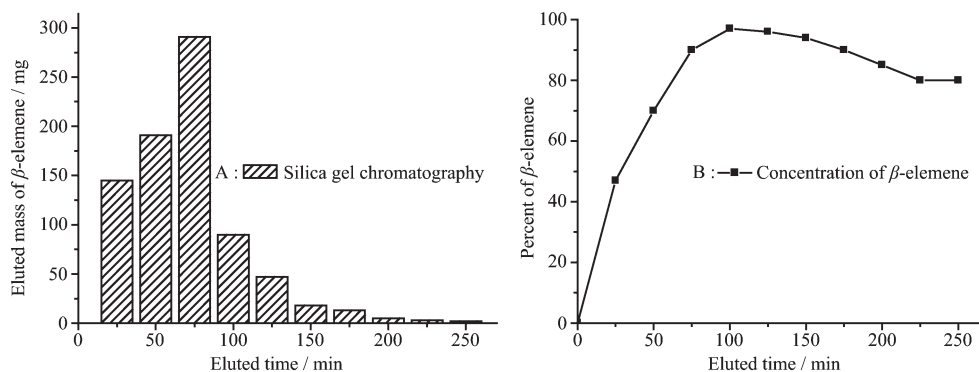
通过以上2种层析介质的层析结果,可见香茅次油中不饱和萜类化合物与硝酸银发生了作用,并改变了其在硅胶介质上的吸附解析特性。倍半萜化合物中双键的多寡及位置的差别可能造成其硝酸银 π 配合物稳定性的差异,在作薄层层析时不同结构的倍半萜化合物有不同的 R_f 值,使得其混合物得

以分离。

3.4 β -榄香烯的硅胶及硝酸银硅胶柱层析的比较

采用 $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:5$ 流动相体系。称取 1.0 g 香茅次油上样于硅胶层析柱中,以 $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:5$ 洗脱,洗脱组分采用气相色谱法检测组分 β -榄香烯的含量。 β -榄香烯与硅胶的吸附作用力较弱,在硅胶柱中停留时间较短, β -榄香烯与杂质成分选择性分离效果较差。 β -榄香烯随时间流出量及纯度见图5,馏分中主体 β -榄香烯含量只达到 95%,部分 β -榄香烯含量达到 97%。以 β -榄香烯含量达到 97% 以上为考察目标,其回收率为 11%。

称取 1.0 g 香茅次油上样于硝酸银硅胶层析柱中。为了有利于香茅次油中不同组分充分分段洗脱,采用极性由弱到强的洗脱剂,以石油醚 300 mL、石油醚、乙酸乙酯 (10:1, 300 mL; 5:1, 300 mL; 1:1, 300 mL) 体系依次梯度洗脱。 β -榄香烯的出峰时间在主要杂质峰之后。收集不同时间段的流动相流分,气相色谱法检测流分中 β -榄香烯的含量, β -榄香烯

图5 β -榄香烯的硅胶柱层析Fig.5 Silica gel chromatography of β -elemene

随时间流出量及纯度见图6。其质量流出曲线有较好的正态分布特征。

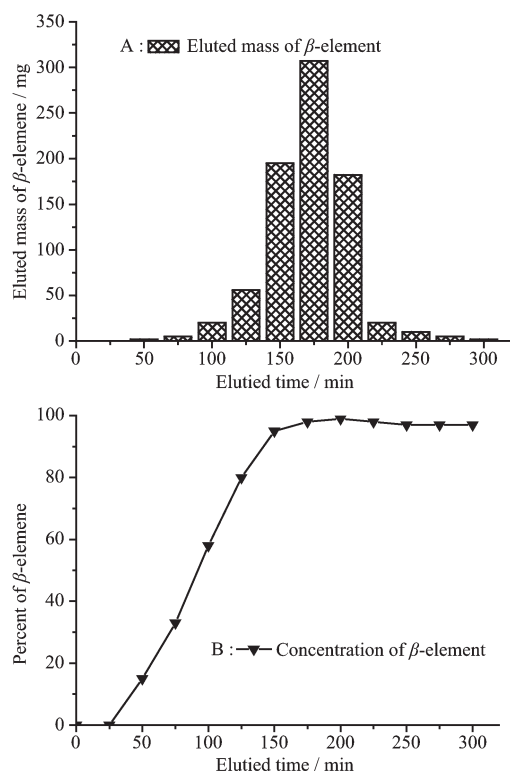


图6 β -榄香烯的硝酸银硅胶柱层析

Fig.6 Silver nitrate modified silica gel chromatography of β -elemene

π 配合物的稳定性规律为^[7]: (1) 当配位化合物无空间阻碍时, 双键越多, 配位越牢固; (2) 环外双键比环内双键配位得牢固; (3) 当双键位置不同时, 末端最牢固, 顺式次之, 反式配体化合物最不牢固。不同结构倍半萜化合物的 π 配合物的稳定性与其双键的多寡及其位置、溶剂环境等相关。 π 配位化合物稳定性的差异导致了 β -榄香烯与其他杂质组分洗脱保留时间的差异。 β -榄香烯与其他倍半萜化合物在硝酸银硅胶柱层析中有很好的分离度, 流分中 β -榄香烯主体含量达到 98% 以上, 以 β -榄香烯含量达到 98% 以上为考察目标, β -榄香烯的回收率为 60%。 β -榄香烯流经氯化钠溶液处理后, 原子吸收分光光度计测定表明, β -榄香烯中不含微量银元素。以上结果表明, 硅胶经硝酸银改性后, 香茅次油中 β -榄香烯的选择性分离能力得到了显著的改善。

3 结 论

倍半萜类化合物能与硝酸银形成 π 配位化合物, 其稳定性主要与不饱和物的双键多少及位置有

关, 溶剂的极性对配位化合物的稳定性也有影响, β -榄香烯与硝酸银形成配合物的稳定常数为 5.12×10^{-5} 。硅胶及硝酸银硅胶层析对比实验表明, 常规硅胶层析法难于很好地将 β -榄香烯从倍半萜化合物中分离出来, 而硝酸银硅胶柱层析法却能有效地实现这一过程, 且分离出的 β -榄香烯含量达到 98.0% 以上, 回收率达到 60%。硝酸银配位色谱法分离倍半萜类化合物的分离效率高, 为从天然植物挥发精油中提取分离高纯度的 β -榄香烯提供方法学上的参考。

参考文献:

- [1] FU Nai-Wu(傅乃武), QUAN Lan-Ping(全兰萍). *Bulletin of Chinese Mateica Medica(Zhongyao Tongbao)*, **1984**, *9*(2):83~87
- [2] YANG Hua(杨 骅), WANG Xian-Ping(王仙平), YU Lin-Lin(郁琳琳), et al. *Chinese J. Oncology (Zhonghua Zhongliu Zazhi)*, **1996**, *18*(3):169~172
- [3] Zheng S, Yang H J, Zhang S, et al. *J. Cell. Biochem.*, **1997**, *67*(S27):106~112
- [4] CHEN Yu-Ying(陈玉仁), WU Xiu-Ying(吴秀英). *CN* 1554331, **2004**-12-15.
- [5] ZHOU Xue-Song(周雪松), ZHANG Lü-Hong(张吕鸿), ZHANG Dan(张 丹). *Chemical Indu. Eng. (Huaxue Gongye Yu Gongcheng)*, **2006**, *23*(11):499~501
- [6] de Vries B. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1963**, *40*:184~186
- [7] OUYANG Chang-Geng(欧阳长庚), LU Wen-Biao(卢文彪). *J. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (Guangzhou Zhongyiyao Daxue Xuebao)*, **2004**, *23*(4):319~413
- [8] YANG Ke-Di(杨克迪), CHEN Jun(陈 钧), YANG Xiao-Ming(杨小明), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**, *22*(2):443~447
- [9] Ghosh A, Hoque M, Dutta. *J. Chromatography*, **1972**, *69*:207~208
- [10] XIA Xiang-Dong(夏向东). *Thesis for the Doctorate of China Agriculture University(中国农业大学博士论文)*. **2002**.
- [11] HUANG Han-Chang(黄汉昌), HUA Hong-Ji(朱宏吉), ZHANG Ming-Xian(张明贤), et al. *Chinese Traditional and Herbal Drugs(Zhongcaoyao)*, **2006**, *37*(12):1799~1802
- [12] WEI Fu-Xiang(魏福祥), DENG Xiao-Li(邓小丽), CHEN Xiao(陈 晓). *J. Hebei University of Science and Technology(Hebei Keji Daxue Xuebao)*, **2005**, *26*(3):219~221
- [13] YANG Jun(杨 军), HAO Ya-Lin(郝雅琳), YUAN Ying-Jin(元英进). *Chinese Traditional and Herbal Drugs(Zhongcaoyao)*, **1999**, *30*(10):735~739
- [14] Snyder L R, Dolan J W, Grant J R. *J. Chromatography*, **1979**, *165*:3~30