

大孔吸附树脂分离富集水皂角多酚

刘硕谦, 刘仲华, 黄建安, 田娜

(湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 运用静态吸附与解吸实验对大孔树脂进行筛选, 然后, 通过单因素实验、正交实验以及方差分析确定了水皂角多酚分离富集的最佳操作条件。结果表明, S-8 大孔树脂表现出最好的吸附性能与良好的解吸效果。确定的最佳吸附条件为 $A_3B_2C_3$, 即上柱速度为 2.5BV/h, 料液浓度为 4mg/ml, 料液 pH 值为 6.5, 最佳洗脱条件为 $A_2B_3C_2D_1$, 即乙醇浓度为 75%, 洗脱流速为 2BV/h, 洗脱液 pH 值为 8, 洗脱体积为 3.5BV。

关键词: 水皂角; 分离富集; 大孔树脂

Isolation and Purification of *Cassia nomame* Polyphenols by Macroporous Resin

LIU Shuo-qian, LIU Zhong-hua, HUANG Jian-an, TIAN Na

(Research Center of Natural Product, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Static adsorption test and static de-adsorption test were carried out to screen the best macroporous resin for the *Cassia nomame* polyphenols. The single factor tests, orthogonal experimental designs and variance analyses were applied to optimize the manipulation parameters of macroporous resin. The results indicated that macroporous resin S-8 possessed the strongest adsorption ability to *Cassia nomame* polyphenols among the various resins studied, in addition to an easy de-adsorption property. The optimum adsorption conditions were $A_3B_2C_3$, i.e. feeding rate 2.5BV/h, concentration of feed 4mg/ml and pH value 6.5. The optimum elution conditions were $A_2B_3C_2D_1$, namely elute volume 3.5BV, elute concentration 75%, elution rate 2BV/h and pH value 8.

Key words: *Cassia nomame*; isolation and purification; macroporous resin

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)03-0055-06

水皂角 (*Cassia minosoides* L. var. *nomame* Makino) 是一年生豆科植物, 有清肝明目、和脾利水之功效, 民间用于治黄疸、利尿、清心、明目等。现代药理以及现代植物化学研究表明, 水皂角植物中的多酚类化合物对肠胃脂肪酶有明显的抑制作用, 能有效阻止消化道内脂肪类物质的分解, 使其最终无法消化而被直接排出体外, 从而起到减肥、降血脂的作用^[1-4]。肥胖已成为危害全球人类的一个严重问题, 它不仅仅是影响人体美观那么简单, 还能引发多种疾病, 严重影响人类身体健康和生活质量, 加速人体细胞衰老, 缩短人类寿命。目前, 用于减肥的药物主要为化学合成药, 但这些减肥药有严重的副作用, 长期服用会造成身体损害, 如厌食、失眠、下泻等。要有效地防止和治疗肥胖症, 只有依赖于那些有减肥效果的天然植物药物。因此, 研究和开发水皂角植物资源具有非常广阔的市场前景, 也有为提高人类生活质量、减少人类痛苦的实际意义。日本对水皂角的开发利用研究最早,

并取得了不少成果, 开发出了多种以水皂角多酚提取物为主要原料的减肥产品, 并呈现出越来越强劲的发展趋势。然而, 国内外对水皂角的研究尚未见对其提取纯化工艺的报道。为了充分利用水皂角植物资源, 本文采用国产大孔树脂对水皂角多酚粗提物进行分离纯化, 以获得高多酚含量的产品, 为天然减肥药物、减肥保健食品以及化妆品提供更优质、更有效的原材料。

1 材料与方法

1.1 材料

水皂角地上部分, 由湖南金农生物资源股份有限公司提供。

1.2 试剂与设备

表儿茶素对照品购于 Sigma 公司, 乙醇为食用规格, 其它试剂均为国产分析纯, 岛津公司 UV-2550 紫外分光光度计,

收稿日期: 2003-07-24

基金项目: 湖南省高新技术产业化重点项目 (HNHF-0105116)

作者简介: 刘硕谦 (1977-), 男, 讲师, 从事天然活性成分研究与开发。

瑞士EL-131Buchi 旋转蒸发器, 德国Christ gamma 1-20冷冻干燥机, 大孔树脂NKA-II, NKA-9, S-8, AB-8, X-5购于南开大学化工厂, 使用前按说明进行预处理。

1.3 水皂角多酚分离纯化工艺路线

水皂角地上部分→提取液→冷却过滤→浓缩挥尽酒精
→水溶液→上柱吸附→洗脱→减压回收酒精→冷冻干燥

1.4 水皂角总多酚浓度的测定

参照Folin-Ciocalteu法^[7]。以表儿茶素为标准品绘制标准曲线。

1.5 静态吸附实验

分别精密量取预处理过的大孔树脂NKA-II, NKA-9, S-8, AB-8, X-5各20ml置于锥形瓶中, 各加入100ml水皂角粗提取物水溶液(浓度为15mg/ml), 封口, 置于摇床中, 25℃, 60r/min, 定时从上清液中取样, 检测总多酚含量的变化, 计算吸附量。

1.6 静态解吸实验

分别将上述充分吸附了水皂角多酚水溶液的四种树脂进行过滤, 去除水液, 再将其置于锥形瓶中, 加入75%的乙醇水溶液200ml, 封口, 置于摇床中, 25℃, 60r/min, 定时从上清液中取样, 检测总多酚含量, 计算解吸率。

1.7 动态吸附实验

精密吸取20ml S-8大孔树脂依法装柱, 以浓度为5mg/ml的水皂角粗提取物溶液上柱, 上柱流速调节为4BV/h, 分部收集流出液, 定时检测流出液的水皂角总多酚浓度。以流出液体积为横坐标, 总多酚含量为纵坐标, 作S-8大孔树脂对水皂角多酚的动态吸附曲线图。吸附达到饱和后, 计算饱和动态吸附量。

1.8 吸附条件单因素实验

各取20ml处理过的湿S-8大孔树脂依法装柱, 规定料液浓度、料液pH值以及上柱速度, 分别考察各吸附条件对S-8树脂吸附水皂角多酚的影响。分部收集流出液, 检测其总多酚浓度, 当流出液中总多酚浓度达到0.05mg/ml时停止吸附。根据流出液的总体积和吸附前后的水皂角总多酚浓度差计算总多酚动态吸附量。

1.9 吸附条件正交设计

根据单因素实验确定的范围, 上柱速率, 料液浓度, 提取液pH值作为考察的3因素, 每因素3水平, 以动态吸附量为考察指标, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 得出最佳动态吸附条件。

1.10 洗脱条件单因素实验

各取20ml已处理的S-8湿树脂依法装柱, 按上述实验确定的吸附条件进行进样吸附, 吸附完全后, 以规定的洗脱剂pH值、乙醇浓度、洗脱速度以及洗脱体积进行洗脱。分部收集流出液, 测定其中水皂角总多酚浓度, 计算解吸率。以洗脱条件为横坐标, 解吸率为纵坐标作图, 考察洗脱条件对洗

脱效果的影响。

1.11 洗脱条件正交设计

实验以影响洗脱效果的乙醇浓度、洗脱速度、料液pH值和洗脱体积作为考察的4因素, 每因素3水平, 以解吸率为考察指标, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。

1.12 吸附量的计算公式

$$\text{吸附量 (mg/ml)} = \frac{(C_0 - C) \times V}{W}$$

其中 C_0 为吸附前料液中水皂角总多酚的浓度, C 为吸附后溶液中水皂角总多酚的浓度, V 为料液总体积, W 为树脂体积。

1.13 解吸率的计算公式

$$\text{解吸率 (\%)} = \frac{V \times C}{W} \times 100\%$$

其中 W 为吸附总量, V 为洗脱总体积, C 为洗脱液中水皂角总多酚浓度。

2 结果与分析

2.1 树脂的筛选

2.1.1 静态吸附性能比较

由图1可知, 树脂的吸附速率随时间的增加而急剧下降, 然后慢慢趋向饱和, 6h后均基本达到吸附平衡。同时还可以看出, 考察的各树脂的静态吸附总量相差较大, 其中S-8的饱和静态吸附量最大, 达到63.23mg/ml, NKA-9次之, 为56.56mg/ml, NKA-II为46.25mg/ml, AB-8的饱和静态吸附量明显比前面三种树脂要低, 为31.79mg/ml, 而X-5最低, 仅为21.47mg/ml, 大约只相当于S-8静态饱和吸附量的1/3。这一现象说明了大孔树脂对水皂角多酚的吸附有强的选择性, 其吸附能力因不同的树脂而有相当大的变化。

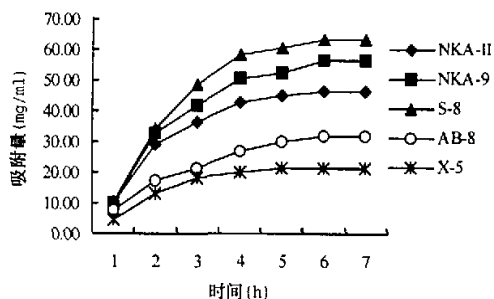


图1 静态吸附曲线

2.1.2 静态解吸性能比较

由图2可见, 乙醇溶液对各种树脂都有很好的解吸能力。考察的四种树脂中S-8大孔树脂解吸能力最强, 解吸速度最快, 2h后其解吸率就达91.3%, 4h达到94.61%, 9h达到97.62

%, 大部分的水皂角多酚类物质被洗脱下来。其次是NKA-II大孔树脂, 3h就有91.06%的解吸率, 9h后所吸附的水皂角多酚类物质基本已被解吸, 解吸率达96.87%。NKA-9的解吸能力也好, 4h就达到92.10%的解吸率, 8h解吸率为96.01%。AB-8大孔树脂的解吸效果最差, 3h解吸率才达82.36%, 8h后仍然只有90.12%。

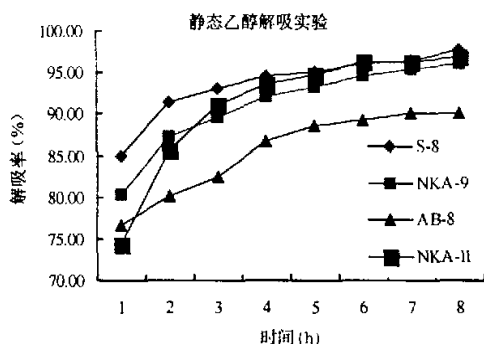


图2 静态解吸曲线

2.1.3 动态吸附特征

从图3可以看出, S-8大孔树脂对水皂角多酚有良好的动态吸附性能, 泄漏时间较长, 6BV才开始出现泄漏, 并较长时间保持低浓度泄漏。直到流出液到9BV时, 流出液中水皂角总多酚浓度才达0.05mg/ml左右。但是, 此时泄漏速度开始快速增加, 当流出液体积达到12BV时, 泄漏液浓度增加为0.23mg/ml。流出液体积到达24BV时, 已达到吸附平衡, 此时大孔树脂的饱和动态吸附量为63.45mg/ml。由此可见, S-8大孔树脂的动态吸附与静态吸附特征基本一致。

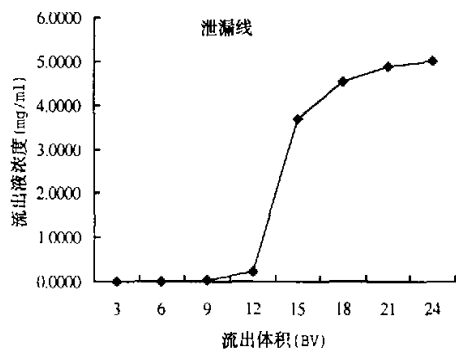


图3 S-8大孔树脂动态吸附曲线

综合以上静态吸附实验、静态解吸实验以及动态吸附实验, 可以知道S-8大孔树脂对水皂角多酚有强的选择性, 吸附量大, 且易被解吸, 回收率高。因此以S-8大孔树脂为吸附填料进行后续实验。

2.2 吸附条件的优化

2.2.1 吸附条件对树脂吸附量的影响

2.2.1.1 上柱速率对吸附量的影响

上柱速率对吸附量的影响结果见图4。从图4的结果可以看出, S-8树脂的吸附量随着流速的增加而降低。当上柱流速为1BV/h时, S-8树脂的动态吸附量为60.26mg/ml湿树脂。当流速提高到4.5BV/h时, 其动态吸附量降至22.50mg/ml湿树脂。这是因为水皂角总多酚为一类大分子酚类化合物, 其扩散速度较慢, 如果上柱流速过大, 则大量多酚类化合物来不及被树脂充分吸附便流出树脂柱。虽然较低的流速对吸附有利, 但流速过低, 操作时间长, 在实际生产中应综合考虑选择上柱速度, 以2BV/h左右的流速进行上柱为宜。

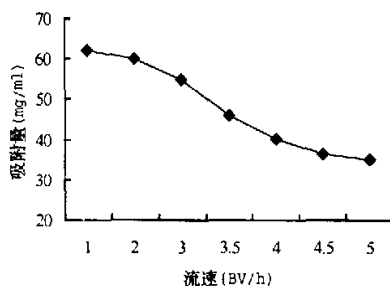


图4 上柱速率对吸附量的影响

2.2.1.2 料液浓度对吸附量的影响

从图5的结果可以知道, 在水皂角总多酚浓度较低时, S-8吸附水皂角总多酚的能力随着料液的浓度的提高而增加。当料液浓度为1mg/ml时, S-8树脂对水皂角总多酚的动态吸附量为18.9mg/ml湿树脂; 当料液浓度为4mg/ml时, 其动态吸附量增加至65.15mg/ml湿树脂。显然, 在低浓度总多酚条件下, 随着总多酚浓度的提高, 可吸附物质的量也随着增加, 因而使S-8树脂对水皂角总多酚的吸附量增加。但是, 随着总多酚浓度的提高, 与总多酚竞争吸附的杂质量也随之增加, 加之流速恒定后, 随着料液浓度增加, 可能使水皂角多酚等物质在树脂内部扩散能力降低。这可能就是当料液总多酚浓度超过4mg/ml后, 树脂吸附量有所下降的原因所在。所以, 料液浓度应控制在4mg/ml左右。

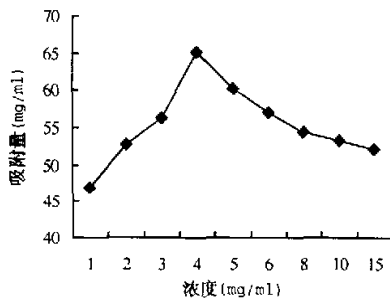


图5 料液浓度对吸附量的影响

2.2.1.3 pH值对吸附量的影响

pH值对S-8树脂吸附量的影响结果见图6。图6的结果指出,在酸性条件下,S-8树脂对水皂角总多酚的吸附量随pH值的增加而增大,pH值为5时,动态吸附量为56.9mg/ml,当pH值为6时其吸附量最大,达到69.81mg/ml。而大于此值后,随着pH值的增加,S-8树脂对水皂角总多酚的吸附能力下降,当pH值为8时,动态吸附量下降为50.37mg/ml。这一现象可从水皂角多酚的存在形式得到解释,因为在强酸性条件下水皂角多酚与酸形成伴盐,以离子的形式存在,当在pH值大于6时又与碱形成盐以离子的形式存在,只有在pH值于6左右时,水皂角多酚以分子的形式存在,而大孔吸附树脂只对分子态物质有吸附,而对离子态的物质无吸附。因此,料液的pH值宜维持在6左右。

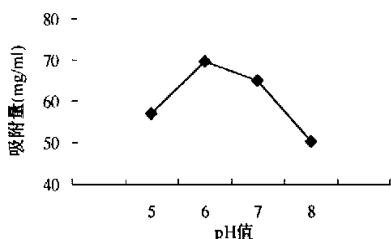


图6 pH值对吸附量的影响

2.2.2 最佳吸附条件的确定

2.2.2.1 正交实验结果

上面讨论了各单因素的影响,但实际操作中各因素相互交叉影响。因此,为了全面考察影响因素,再进行了正交实验。实验方案与结果见表1、2。

表2结果说明,各因素对S-8大孔树脂选择性吸附水皂角多酚的影响程度依次为 $C > B > A$,综合各因素k值和直接比较, $A_2B_2C_3$ 为最佳条件。

2.2.2.2 正交实验的方差分析结果

由表3可知,因素A无显著性差异($p > 0.1$),说明了上柱速度在正交设计的三水平内对大孔树脂吸附水皂角多酚效率无显著性影响,而上柱速度太慢会增加操作时间,延长生产周期,对生产不利。因此选择以2.5BV/h的流速进行上柱。因素B和因素C有显著性差异($p < 0.05$),说明在正交设计的三水平内,料液的水皂角多酚浓度以及料液的pH值稍微有一点变化,就会引起大孔树脂对水皂角多酚分离纯化效果很大的变化。因此,为了能达到最好的纯化效果,只能选择在正交实验中有最大K值的水平。这样,最后确定最佳吸附条件为 $A_3B_2C_3$,即上柱速度为2.5BV/h,料液浓度为4mg/ml,料液pH值为6.5。

2.3 洗脱条件的优化

2.3.1 洗脱条件对洗脱效果的影响

表1 因素水平表

水平	流速 (BV/h)	浓度 (mg/ml)	pH 值
	A	B	C
1	1.5	3.5	5.5
2	2	4	6
3	2.5	4.5	6.5

表2 正交试验表

实验号	A	B	C	动态吸附量 (mg/ml)
1	1	1	1	47.4
2	1	2	3	70.14
3	1	3	2	61.19
4	2	1	2	57.75
5	2	2	1	64.33
6	2	3	3	71.18
7	3	1	3	62.61
8	3	2	2	67.31
9	3	3	1	54.31
k_1	59.58	55.92	55.35	$Q_T=34850.82$
k_2	64.42	67.26	62.08	$P=34375.63$
k_3	61.41	62.23	67.98	
R	4.84	11.34	12.63	
Q_A	34411.51	34569.33	34615.26	
S_A	35.88	193.70	239.63	

表3 正交实验方差分析表

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著水平 (p)
A	35.88	2	17.94	6.00	>0.1
B	193.70	2	96.85	32.40	<0.05
C	239.63	2	119.82	40.09	<0.05
误差	5.99	2	2.99		
总和	475.19	8			

$$F_{0.1}(2,2)=9; F_{0.05}(2,2)=19.$$

2.3.1.1 乙醇浓度对解吸效果的影响

乙醇浓度对解吸效果的影响如图7所示。从图7可以看出,在一定范围内,随着乙醇浓度增加洗脱效果也得以提高。乙醇浓度为50%时,解吸率仅为70.12%;而当乙醇浓度提高到70%时,则解吸率达到94.40%。此后,再增加乙醇浓度,解吸率略有增加,但变化不明显。而乙醇浓度过高,生产成本增加,并且挥发性大,增加了控制操作条件的难度。因此,宜选用70%左右的乙醇对水皂角总多酚进行洗脱。

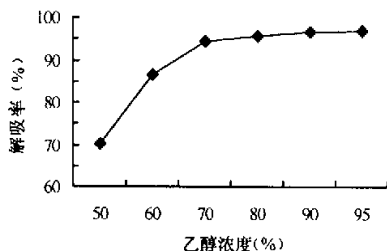


图7 乙醇浓度对解吸效果的影响

2.3.1.2 流速对洗脱效果的影响

流速对洗脱效果的影响结果见图8。图8指出,流速对洗脱效果有明显的影 响,两者成反比例关系,这可能是流速对洗脱剂与吸附在树脂上的水皂角多酚间的交换速率进行影 响所致。流速为0.5BV/h时,解吸率可达97.68%;而流速为5.5BV/h时,则解吸率只有70.03%。这可能是由于流速过快,洗脱剂未能与被吸附的水皂角多酚充分作用而将其从大孔树的 吸附位点上置换出来。可见,在洗脱操作时,洗脱速度宜控制在0.5~2.5BV/h左右。

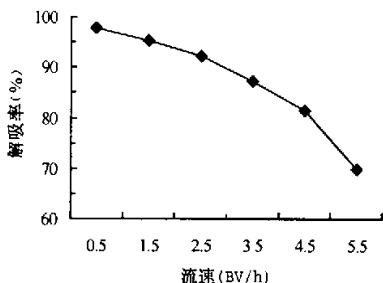


图8 洗脱剂流速对洗脱效果的影响

2.3.1.3 洗脱剂的pH值对洗脱效果的影响

洗脱剂的pH值对洗脱效果的影响如图9所示。图9结果 说明,碱性洗脱剂的解吸能力比中性洗脱剂强。当洗脱液pH 值为7时,解吸率仅为95.17%,而pH值为8时,解吸率则增 加到97.59%,提高了约3个百分点。这可能是因为在碱性条 件下,水皂角多酚类化合物呈离子状态,有利于解吸附。从 图中曲线变化趋势可以看出,洗脱液pH值越大,洗脱效果越

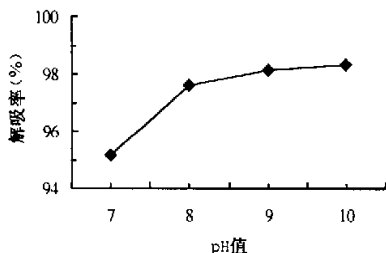


图9 pH值对解吸效果的影响

好。但在强碱条件下,水皂角多酚类化合物易分解。因此,在 实际操作中,宜选择pH为8左右,既能保证有大的解吸率, 又能保证有效成分不受破坏。

2.3.1.4 洗脱剂用量对洗脱效果的影响

洗脱剂的用量对洗脱效果的影响如图10所示。图10 结果显示,乙醇洗脱能力与其用量呈正相关,用量越大,解吸 率越大,相反亦然。当以2BV洗脱剂进行洗脱时,其解吸率 只有86.21%,而洗脱用量增加为4BV时,解吸率很快就增加 为98.11%,与2BV的洗脱用量相比提高了约12个百分点。在 此基础之上,再增加洗脱剂用量,解吸率继续增大,但增幅 不大。因此,从节约成本出发,宜以4BV左右的洗脱剂用量 进行洗脱。

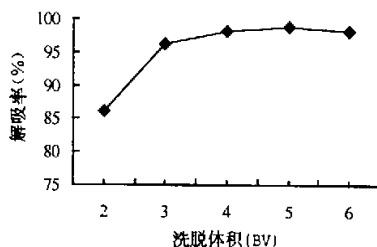


图10 洗脱剂用量对洗脱效果的影响

2.3.2 最佳洗脱条件的确定

2.3.2.1 大孔树脂洗脱正交实验结果

上述实验对各单因素与洗脱效果的关系单独进行了考 察,并确定了最佳洗脱条件。但是,通常情况下各因素之间 影响是相互作用的,单独考察的结果并不一定与实际情况相 符,所以为筛选与实际情况更接近的最佳洗脱条件,在单因 素实验研究结果的基础之上,再进一步进行正交实验。实验 方案与结果见表4、5。

表4 因素水平表

水 平	A 乙醇浓度 (%)	B 洗脱速度 (BV/h)	C 洗脱液 pH 值	D 洗脱体积 (BV)
1	70	1	7.5	3.5
2	75	1.5	8	4
3	80	2	8.5	4.5

表5结果说明,各因素对洗脱效果的影响程度依次为 B > A > C > D,综合各因素k值和直接比较,A₂B₃C₂D₂ 为最佳洗脱条件,即用4BV的75% pH值8的乙醇溶液,以 2BV/h的流速进行洗脱,该条件下的解吸率最大,产品回 收率最高。

2.3.2.2 正交实验的方差分析结果

正交实验的方差分析结果见表6,从中可知,各因素在 考察的三水平内都没有显著性差异(0.05),但洗脱液流速有

表 5 正交试验表

实验号	A	B	C	D	洗脱率(%)
1	1	1	1	1	80.16
2	1	2	2	2	89.01
3	1	3	3	3	89.20
4	2	1	2	3	90.15
5	2	2	3	1	92.39
6	2	3	1	2	98.81
7	3	1	3	2	86.72
8	3	2	1	3	87.33
9	3	3	2	1	99.50
K ₁	86.12	85.68	88.77	90.68	Q _r =73778.53 P=73489.79
K ₂	93.78	89.58	92.89	91.51	
K ₃	91.18	95.84	89.44	88.89	
R	7.66	10.16	4.12	2.62	
Q _A	73580.8	73647.4	73519.1	73500.55	
S _A	91.0392	157.623	29.3258	10.7574	

表 6 正交设计方差分析表

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著水平 (P)
A	91.04	2	45.52	8.46	>0.1
B	157.62	2	78.81	14.65	<0.1
C	29.33	2	14.66	2.73	>0.1
D	10.76	2	5.38	1	
误差	10.76	2	5.38		
总和	288.75	10			

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

一定的显著性差异 ($p<0.1$),说明洗脱效果主要由流速决定,而其它三因素对洗脱效果的影响小,各水平可任意选择。就洗脱体积而言,若洗脱体积过大则会增加过滤、浓缩等后续工作的困难。因此,为节省成本,降代能耗,宜采用第一水平,使用较少量洗脱剂进行洗脱。但乙醇浓度和料液酸碱度采用第一水平时,解吸率下降不大,这对生产成本的降低没有实际意义,故这两因素仍然选择有最大K值的水平。由此可以确定,分离纯化水皂角多酚的最佳工艺为A₂B₃C₂D₁,即乙醇浓度为75%,洗脱流速为2BV/h,洗脱液pH值为8,洗脱体积为3.5BV。

2.4 重复验证实验

为了考察优化条件的再现性,重复3次实验,结果见表7。从表中结果可以看出,实验确定的最佳操作条件具有很好的重复性,动态吸附量达71mg/ml湿树脂以上,洗脱率可达99%以上,分离纯化后的产品水皂角总多酚含量达65%以上,较水皂角植物体内含量提高了30倍以上,得率为2%左右。

表 7 工艺放大实验结果

编号	动态吸附量 (mg/ml)	动态解吸率 (mg/ml)	纯化产品 多酚含量(%)	纯化产品 得率(%)
1	71.32	99.52	65.09	2.05
2	71.46	99.55	65.47	2.01
3	71.55	99.48	65.11	2.01

3 小结与讨论

考察的几种大孔树脂中, S-8大孔树脂表现出最好的吸附性能与良好的解吸效果。最佳吸附条件为A₃B₂C₃,即上柱速度为2.5BV/h,料液浓度为4mg/ml,料液pH值为6.5。最佳洗脱条件为A₂B₃C₂D₁,即乙醇浓度为75%,洗脱流速为2BV/h,洗脱液pH值为8,洗脱体积为3.5BV。

首次将大孔树脂应用于水皂角多酚的分离纯化,在水皂角经乙醇溶液粗提的基础上,采用国产大孔吸附树脂进行分离富集,有效提高了水皂角提取物的多酚含量,纯化后的产品水皂角多酚含量达65%以上,与原料相比提高了30倍以上,大幅度增加产品的药理活性,为高效减肥产品的开发提供了优良的活性原料。可见大孔树脂分离纯化水皂角多酚是有高效、经济、实用的。

参 考 文 献:

[1] Shimura S, Tsuzuki W, Itoh Y, et al. Lipase Inhibitors in *Cassia mimosoides* L. var. *nomame* makino[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1993, 67(11):1583.

[2] Shimura S, Tsuzuki W, Itoh Y, et al. Inhibitory effect of tannin fraction from *Cassia mimosoides* L. var. *nomame* makino on lipase activity [J]. Norin Suisansho Shokuhin Sogo Kenkyujo Japan Nihon Shokuhin Kogyo Gakkai, 1994,141(8):561.

[3] Yamamoto M, Shimura S, Itoh Y, et al. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, *Nomame Herba*, on rats fed a high-fat diet [J]. International Journal of Obesity,2000,24(6):758-764.

[4] Sumino S. Studies on safety of CT-II, an extract from *Nomame herba*. in human - Results of consecutive administration for 7 Days [J]. Japanese Pharmacology And Therapeutics, 1998, 26(5):193-198.

[5] Egawa M. Studies on safety of CT-II, an extract from *Nomame herba*, in rats - Results of 3 months is treatment [J]. Japanese Pharmacology And Therapeutics,1998, 26(5):189-192.

[6] Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, et al. Flavan dimmers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame* [J]. Phytochemistry, 1997, 46(5): 893-900.

[7] Singleton V T and Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. Am J EnolVitic,1965,16:144-158.