

大多在正常范围内,说明中间型地中海贫血患者相对重型地贫患者来说,体内溶血程度较轻,大多还不处于体内高铁状态,此结果与黄钰君等^[23]研究结果一致。益髓生血颗粒改善 HbH 病患者临床疗效的可能机制之一可能与降低体内铁负荷有关,仍需要进一步临床试验进行验证。

参考文献

- 1 吴志奎. 中医药对边远民族地区人口与健康的贡献: 益髓生血治疗地中海贫血取得重大进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 4-8
- 2 Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations [J]. Blood, 1989, 74(6): 2194-2202
- 3 Scott MD, Rouyer - Fessard P, Ba MS, et al. Alpha - and beta - haemoglobin chain induced changes in normal erythrocyte deformability: comparison to beta thalassaemia intermedia and Hb H disease [J]. Br J Haematol, 1992, 80(4): 519-526
- 4 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 48-59
- 5 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中西医结合杂志, 1986, 6(10): 598
- 6 姚乃礼. 中医证候鉴别诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 393-394
- 7 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 2002: 173-184, 263-266
- 8 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 1993: 61-63
- 9 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 1995: 13-19, 137-140
- 10 Cao A, Galanello R, Rosatelli MC, et al. Clinical experience of management of β - thalassemia: the sardinian experience [J]. Seminars in Hematology, 1996, 33(1): 70-73
- 11 Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future [J]. Curr Mol Med, 2008, 8: 592-599
- 12 谢杏梅, 周剑英, 唐海深. 应用脐带血毛细管电泳技术筛查常见非缺失型 HbH 病 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(5): 20-21
- 13 刘宁毅, 陈良军. 非缺失型 α - 珠蛋白生成障碍性贫血基因检测分析 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(16): 2113-2114
- 14 Raffaella M, Paola T, Matteo P, et al. Iron metabolism in thalassemia and sickle cell disease [J]. Medit J Hemat Dis, 2009, 1(1): e200906
- 15 Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, et al. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation [J]. Blood, 2003, 102: 2670-2677
- 16 Handan D, Duran C, Güchan A, et al. The antioxidant effects of caparis ovata and deferasirox in patients with thalassemia major [J]. Blood Disorders Transf, 2013, 4(3): 2155-2159
- 17 Koren A, Fink D, Admoni O, et al. Non - transferrin bound labile plasma iron and iron overload in sickle cell disease: a comparative study between sickle cell disease and β - thalassemic patients [J]. Eur J Haematol, 2010, 84: 72-78
- 18 Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI - labile plasma iron in iron overload [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2005, 18: 277-287
- 19 Galanello R, Origa R. Beta - thalassemia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 11
- 20 吴志奎, 张新华, 方素萍, 等. 基于“肾藏精生髓”理论治疗地中海贫血 [J]. 中医杂志, 2011, 52(1): 20-23
- 21 程艳玲, 张新华, 孙玉雯, 等. 补肾益髓法治疗 β - 地中海贫血的现状 [J]. 中医杂志, 2013, 54(2): 155-159
- 22 Samir MA, Manar FA, Nisreen AN, et al. Ischemia modified albumin: an oxidative stress marker in β - thalassemia major [J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413: 907-910
- 23 黄钰君, 伍绍国, 区小冰, 等. 不同基因型地中海贫血患儿血清铁代谢指标的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(2): 85-88

(收稿日期: 2014-06-05)

(修回日期: 2014-06-11)

湖北海棠总黄酮纯化工艺研究

郭东艳 王幸 唐志书 汪黎植

摘要 目的 优化湖北海棠总黄酮分离纯化工艺。**方法** 以总黄酮含量为评价指标,采用大孔吸附树脂法进行纯化,确定总黄酮纯化工艺条件。**结果** 湖北海棠总黄酮最佳分离纯化工艺为:选用 HPD100 型大孔树脂,树脂与药材的质量比为 1:1.74,上样药液浓度为 0.15g/ml,上样流速为 2BV/h,树脂径高比为 1:10,洗脱时先用 4BV 水洗除杂,再用 4BV 70% 乙醇洗脱,洗脱速度为 1BV/h。**结论** 纯化工艺简便、可行,适合工业化生产。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81202905);陕西省科技厅基金资助项目(2013KTCQ03-12);陕西省教育厅基金资助项目(11JS036)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医药大学药学院(郭东艳、王幸、唐志书);443002 宜昌,天然产物研究与应用湖北省重点实验室(汪黎植)

关键词 湖北海棠 总黄酮 纯化 大孔树脂
 [中图分类号] R284.2 [文献标识码] A

Study on Purification for Total Flavone of Malus Hupehensis. Guo Dongyan, Wang Xing, Tang Zhishu, Wang Junzhi. The Medicine College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China

Abstract Objective To optimize separation and purification for total flavone of *Malus hupehensis*. **Methods** Taking the total flavone content as evaluation index, we determined purification condition of total flavone by selecting macroporous absorption resin. **Results** The optimum separation and purification for total flavone of *Malus hupehensis* were as follows: HPD100 Macroporous resin was fitted. The mass proportion of resin and medicine was 1:1.74, the absorption capacity of HPD100 Macroporous resin was 0.15g/ml and the velocity of absorption was 2BV/h, the diameter - height ratio of resin column was 1:10, the eluting reagent was 4BV water and 4BV 70% ethanol, eluting rate was 1BV/h. **Conclusion** This optimized purification technology was convenient and feasible. It could suit industrialization production.

Key words *Malus hupehensis*; Total flavone; Purification; Macroporous resin

湖北海棠为蔷薇科苹果属(*Malus Mill.*)湖北海棠[*Malushupehensis*(Pamp.)Rehd.] 的干燥叶, 收载于《湖北省中药材质量标准》(2009年版)。其主要含有三萜及黄酮类等成分。文献报道其黄酮类成分具有雌激素双向调节作用、保肝及抗骨质疏松等作用^[1~5]。课题组前期对湖北海棠的提取工艺进行了研究, 确定了黄酮类成分的提取工艺参数^[6,7]。本研究是在前期研究的基础上, 采用大孔树脂法对湖北海棠提取液进行纯化工艺研究, 以期为后期进一步应用开发奠定基础。

材料与方法

1. 仪器与试药:(1) 仪器: UV-1102型紫外可见分光光度仪(上海天美科学仪器有限公司); WJN-50多功能真空浓缩机(韩国); L-520型离心机(湖南赛特湘仪离心机有限公司); RE-52-05旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SB3200DT-超声波清洗机(宁波); GB-204型电子天平(瑞士); HH-2型恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。(2) 试药: 湖北海棠药材[购自湖北神农架, 经陕西中医学院王继涛老师鉴定为苹果属(*Malus Mill.*)湖北海棠[*Malushupehensis*(Pamp.)Rehd.] 的干燥叶。YWD01G3、YWD03F(河北沧州远威化工有限公司)D101、HPD600、HPD300、HPD100、AB-8(西安蓝晓科技有限公司); 根皮苷对照品(自制, 经HPLC检测含量>98%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2. 总黄酮的含量测定^[6,7]: (1) 对照品溶液的制备: 精密称取根皮苷对照品适量, 加入50%甲醇溶解制成每1ml含0.1mg的溶液, 备用。(2) 供试品溶液的制备: 精密移取湖北海棠提取液1ml蒸干, 加50%甲醇溶解并定容至10ml量瓶中, 0.45μm微孔滤膜滤过, 即得。(3) 线性关系考察: 分别精密吸取根皮苷对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml并移至10ml量瓶中, 加入50%甲醇稀释至刻度, 即得。按紫外-可见分光光度法, 以50%甲醇为空白, 在287nm波长处测定

吸收度。以吸收度(Y)为纵坐标, 根皮苷的浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为Y=30.274X+0.0055, R²=0.9993。结果表明, 对照品溶液在0.005~0.03mg/ml浓度范围内与吸收度呈现良好的线性关系。

3. 大孔树脂型号的筛选:(1) 上样药液的制备: 称取250g湖北海棠药材, 加入8倍量70%乙醇进行回流提取150min, 共两次。提取液回收乙醇并浓缩至2500ml。依照总黄酮的含量测定方法, 测定含量。结果总黄酮含量为5.48mg/ml。(2) 大孔吸附树脂的预处理: 称取7种型号的大孔吸附树脂足量, 分别装入树脂床中, 缓缓加入约2倍树脂床体积(2BV)95%乙醇, 浸泡过夜。再用95%乙醇以较缓慢的速度流过树脂床, 直到洗出的乙醇液与等体积的去离子水混合后不呈现白色浑浊为宜, 然后再用去离子水缓缓流过树脂床, 洗至无乙醇, 备用。(3) 静态吸附: 将经过预处理的7种大孔树脂(YWD01G3、YWD03F、AB-8、D101、HPD100、HPD300、HPD600)抽干表面的水分, 各准确称取3.0g, 分别放置在250ml锥形瓶中, 再分别加入上述湖北海棠上样药液160ml, 将各锥形瓶放在恒温水浴振荡器中, 于37℃缓慢振摇使树脂充分吸附, 24h后, 滤过, 收集残留液, 并将树脂用少量流动的去离子水洗去表面的残留药液, 再放入各锥形瓶中, 加入130ml 70%乙醇于37℃振摇洗脱, 24h后, 滤过, 收集洗脱液。精密移取以上各残留液、洗脱液0.5ml于蒸发皿中蒸干, 将残渣加50%甲醇溶解并定容至10ml量瓶中, 依法测定其总黄酮含量。

4. 总黄酮纯化工艺研究^[8]: (1) 泄漏曲线的考察: 精密称取预处理过的HPD100型大孔吸附树脂约8g, 湿法装入2cm×40cm的柱内(1BV=20ml)。取湖北海棠水提液缓慢加入, 控制流量为1BV/h, 分别收集过柱液20份, 每份20ml, 水浴蒸干, 加50%甲醇均定容于10ml量瓶中, 0.45μm滤膜过滤, 测总黄酮含量。(2) 上样药液浓度的考察: 称取4份经预处理过的HPD100型大孔树脂各8g, 湿法装入2cm×40cm的柱内。取湖北海棠水提液, 分别配制成浓度为含生药0.05g/ml、0.10g/ml、0.15g/ml、0.20g/ml的药液, 将药液缓慢上样, 以

2BV/h 的流速进行吸附,再以 2BV/h 的去离子水洗脱后,最后用 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液至 100ml。各精密移取 1ml, 蒸干, 加甲醇定容至 10ml 量瓶中, 测定总黄酮的含量, 计算比吸附量及吸附率。(3) 树脂柱径高比的考察: 称取 4 份经预处理过的 HPD100 型大孔树脂湿法装柱(1cm × 40cm), 使径高比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20, 分别取浓度为含生药 0.15g/ml 的药液适量, 加于 HPD100 树脂柱上, 以 2BV/h 的流速进行吸附后, 先以 2BV/h 水洗脱后, 再用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液至 100ml, 测定总黄酮的含量, 计算比吸附量及吸附率。(4) 上样药液流速的考察: 称取 4 份经预处理过的 HPD100 型大孔树脂湿法装柱(1cm × 10cm, V = 10.45ml), 径高比为 1:10。取浓度为含生药 0.15g/ml 的药液 60ml, 4 份。取 4 份上样药液分别上样, 流速分别为 0.5BV/h、1BV/h、2BV/h、3BV/h, 再用 25ml 的水以 2BV/h 的流速进行洗脱除杂, 最后用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液至 100ml。测定总黄酮含量, 计算比吸附量及吸附率。(5) 水洗除杂工艺的考察: 称取经预处理的 HPD100 大孔树脂湿法装柱(1cm × 10cm, V = 10.45ml), 径高比为 1:10。取浓度为 0.15g/ml 的上样药液 60ml, 以 2BV/h 的流速上样, 再用去离子水洗脱, 以 10ml(1BV) 为一个单位进行接收, 共接收水洗脱液 11 个单位。测定各水洗液中总黄酮的含量并绘制曲线图。(6) 解吸附乙醇浓度的考察: 称取经预处理的 HPD100 大孔树脂湿法装柱(1cm × 10cm, V = 10.45ml), 径高比为 1:10。量取浓度为 0.15g/ml 的药液 60ml 上样, 用 4BV 去离子水洗除杂后, 依次用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95% 乙醇溶液各 3BV 进行梯度洗脱, 分别收集洗脱液。精密移取各洗脱液 1ml 挥发干后, 加 50% 甲醇溶解并转移至 100ml 量瓶中。计算吸附率及洗脱率。(7) 洗脱剂用量的考察: 称取经预处理的 HPD100 大孔树脂湿法装柱(1cm × 10cm, V = 10.45ml), 径高比为 1:10。量取浓度为 0.15g/ml 的药液 60ml 上样, 用 4BV 水洗去除杂质后, 用 70% 乙醇进行洗脱, 每 10ml 收集 1 份, 共收集洗脱液 11 份。测定各洗脱液中总黄酮的含量。(8) 洗脱速度的考察: 称取经预处理的 HPD100 大孔吸附树脂湿法装柱(1cm × 10cm, V = 10.45ml) 4 份, 分别装柱, 径高比为 1:10。量取浓度为 0.15g/ml 的药液 60ml 上样, 用 4BV 水洗去除杂质后, 用 70% 乙醇进行洗脱, 将 4 份样品分别按照 0.5BV/h、1BV/h、2BV/h、3BV/h 的流速洗脱, 分别收集 2BV, 取 1ml 蒸干, 加甲醇定容于 10ml 量瓶。测定各洗脱液中总黄酮的含量, 计算解吸率。

结 果

1. 静态吸附考察结果: 分别测定母液、洗脱液及残留液中总黄酮的含量, 以下式计算不同树脂的吸附率及解吸率, 结果见表 1。吸附率(%) = [母液含量(mg) - 残留液中含量(mg)] / 母液含量(mg) × 100%; 解吸率(%) = 70% 乙醇洗脱下的含量 / [母液含量(mg) - 残留液中含量(mg)] × 100%。结果表明, HPD100 型大孔吸附树脂的吸附率均明显高于其

他型号的树脂, 且解吸率也较高, 综合考虑, 故选择 HPD100 型大孔吸附树脂。

表 1 静态吸附考察结果

树脂类型	药液含量 (mg)	残余量 (mg)	吸附量 (mg)	解吸量 (mg)	吸附率 (%)	解吸率 (%)
YWD01G3	878.15	477.17	400.98	340.873	45.66	85.01
YWD03F	878.15	435.17	442.98	351.98	50.44	79.46
AB-8	878.15	517.22	360.93	277.38	41.10	76.85
D101	878.15	461.54	416.61	362.30	47.44	86.97
HPD100	878.15	136.29	741.86	597.42	84.48	80.53
HPD300	878.15	161.84	716.31	571.76	81.57	79.82
HPD600	878.15	579.73	298.42	226.59	33.98	75.93

2. 树脂纯化条件的考察:(1) 泄漏曲线的考察: 以过柱体积(BV)为横坐标, 总黄酮含量(mg/ml)为纵坐标, 绘制泄漏曲线, 结果见图 1。从 5BV 开始已有部分总黄酮成分泄漏, 因此确定最大上样量为不超过 5BV 的样品液。当收集至 14BV 时, 流出液中总黄酮的浓度基本不再增加, 表明 HPD100 型树脂对湖北海棠总黄酮的吸附量达到平衡。即每 1gHPD100 型大孔吸附树脂可吸附总黄酮 305.9mg, 折合成原药材为 1.74g。(2) 上样药液浓度的考察: 上样药液浓度对吸附量有一定的影响, 上样药液浓度为 0.15g/ml 时, 总黄酮的比吸附量及吸附率均高于其他浓度因此, 确定上样液的药液浓度为 0.15g/ml。(3) 树脂柱径高比的考察: 当径高比为 1:10 时, 总黄酮的比吸附量及吸附率为最大。因此, 确定树脂柱的径高比为 1:10。(4) 上样药液流速的考察: 当上样流速为 2BV/h, 树脂对总黄酮的比吸附量及吸附率均为最大。因此确定上样流速为 2BV/h。(5) 水洗除杂工艺的考察: 以水洗体积为横坐标, 总黄酮含量为纵坐标, 绘制曲线图, 结果见图 2。当水洗脱液达到 4BV 时, 洗脱液中总黄酮含量极少, 可看做已经无总黄酮。故选择 4BV 水进行洗脱。(6) 解吸附乙醇浓度的考察: 70% 乙醇洗脱液中已经几乎测不到总黄酮, 故确定湖北海棠总黄酮洗脱剂的浓度为 70% 乙醇。(7) 洗脱剂用量的考察: 以 70% 乙醇洗脱体积为横坐标, 总黄酮含量为纵坐标, 绘制解吸曲线。结果见图 3。当洗脱剂用量达到 4BV 时, 总黄酮含量已基本洗脱完, 故确定洗脱剂用量为 4BV。(8) 洗脱速度的考察: 以 1BV/h 的速度洗脱, 总黄酮解吸率最高, 故选择以 1BV/h 的流速进行洗脱。(9) 验证试验: 称取 3 份 HPD100 树脂约 100g, 装入柱子中, 径高比为 1:10, 再分别取 3 份浓度为 0.15g/ml 的药液 500ml

以 $2\text{BV}/\text{h}$ 的流速上样,再用 4BV 去离子水洗脱除杂,最后用 $4\text{BV} 70\%$ 乙醇以 $1\text{BV}/\text{h}$ 的流速进行洗脱,收集洗脱液。分别测定各洗脱液中总黄酮的含量及固体物的含量。结果见表2。经纯化后得总黄酮含量为 92.20% ,固体物平均得率为 13.73% 。说明该纯化工艺稳定、可行。

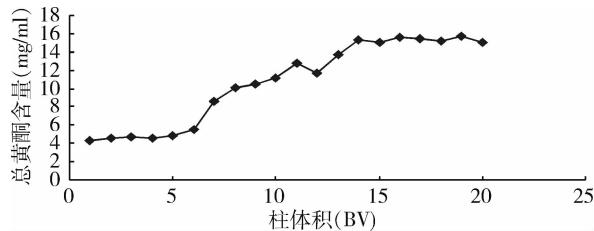


图1 总黄酮含量泄漏曲线

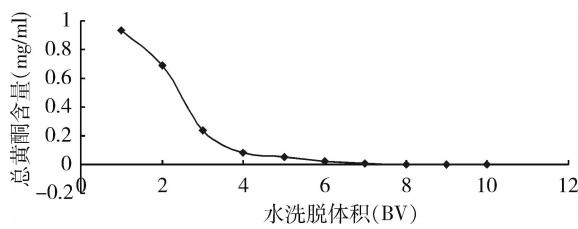


图2 水洗除杂工艺图

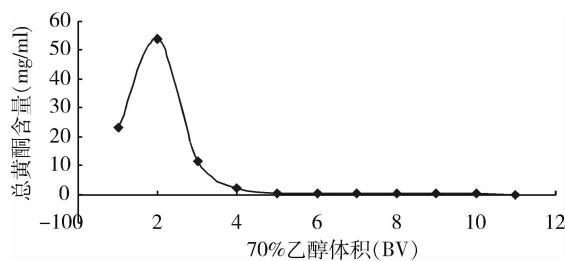


图3 洗脱剂用量的解吸曲线

表2 验证试验结果

试验次数	1	2	3	平均值	RSD(%)
纯化后总黄酮含量(%)	92.13	91.47	92.99	92.20	0.83
固体物得率(%)	13.67	13.93	13.58	13.73	1.32

讨 论

中药提取过程中,在最大限度提取出有效成分的同时,也伴生着大量的杂质,如鞣质、蛋白质、果胶、淀粉、黏液质等大分子物质,且还存在许多微粒子和絮状物等,此类物质不但无药理活性,反而导致制剂有

效载药量小,用量较大,最终还可能影响质量,是造成中药制剂“粗、大、黑”的主要原因。所以,对提取液进行科学合理的精制、纯化,去杂存精是一项非常重要的工作,随着新技术新工艺的迅速发展,精制工艺也在不断去旧推新,一些较实用、可行的技术在中药制剂中逐渐走向成熟化、大众化,如膜分离技术、吸附澄清技术、大孔树脂吸附技术等。其中大孔树脂技术以其具有操作方便,适合大生产,且树脂能回收利用,节约成本等方面的优点,已在中药提取液的分离纯化中得到了越来越广泛的应用。正是基于上述原因本实验重点对大孔树脂纯化工艺条件进行了优化。

湖北海棠中主要含有黄酮类成分,且黄酮类物质为湖北海棠中主要的活性成分,为了富集有效成分,减少服用剂量,便于后期制剂成型^[1~5]。本试验探讨了HPD100型大孔吸附树脂分离纯化湖北海棠中总黄酮的工艺条件。湖北海棠经HPD100型大孔吸附树脂分离纯化后含量高达 92.20% 。确定了纯化条件为选用HPD100型大孔树脂,吸附时树脂与药材的比例为 $1:1.74$,上样药液浓度为 0.15g/ml ,上样流速为 $2\text{BV}/\text{h}$,树脂径高比为 $1:10$,洗脱时先用 4BV 水洗除杂,再用 $4\text{BV} 70\%$ 乙醇以 $1\text{BV}/\text{h}$ 的流速进行洗脱。经纯化后总黄酮含量较高,且操作方便可行,适合工业化大生产。

参考文献

- Wang JZ, Chung MH, Xue BJ, et al. Estrogenic and antiestrogenic activities of phloridzin[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(4):592~597
- 冯天艳,方荣,汪鋆植,等.根皮苷对小鼠CCL4急性肝损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2010,26(5):47~49
- 曹丹,薛冰洁,黄文峰,等.湖北海棠总黄酮对去势大鼠骨质疏松的影响[J].中药药理与临床,2011,27(5):56~59
- 薛冰洁,曹丹,周继刚,等.湖北海棠总黄酮对成骨细胞增殖分化及破骨细胞活性的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2011,19(5):12~14
- 冯天艳,汪鋆植,周继刚,等.湖北海棠叶总黄酮抗CCl4所致大鼠肝纤维化作用研究[J].中药药理与临床,2012,28(2):72~75
- 王幸,师延琼,郭东艳,等.多指标综合评价湖北海棠总黄酮提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):46~49
- 郭东艳,王幸,唐志书,等.星点设计-效应面法优选湖北海棠总黄酮的提取工艺[J].医学研究杂志,2014,43(1):23~27
- 李瑾.白柏木保肝活性部位的制备及其制剂前研究[D].陕西中医学院硕士论文,2012

(收稿日期:2014-05-24)

(修回日期:2014-06-12)