

HOOPER 等<sup>[5]</sup>对 UA 代谢的研究,UA 悬浮液经腹腔注射能很好的吸收,分布至脊髓组织。笔者在此基础上,确定用药时间和剂量,使造模后血药浓度迅速达到最大,充分发挥其药物作用。结果表明:应用 UA 干预后,同损伤组比较运动功能有明显改善,MDA 下降,SOD 上升,组织形态学观察好转。其机制可能是:①清除氮氧自由基,氮氧自由基可以诱导脂质过氧化,损伤细胞膜和线粒体,使线粒体呼吸链酶失活,损伤 DNA,在脊髓损伤后细胞损伤起重要作用。② UA 在可以保护血-脑脊髓屏障的通透性,抑制炎症细胞的浸入,从而减轻炎症反应所致的损伤和级联反应,保护脊髓。③ UA 可以很快地与鸟嘌呤自由基反应: $\text{UH}_2^- + \text{RG} \cdot (\text{H}) \rightarrow \text{UH}^- + \text{RG}$ ,可以修复受氧化损伤的 DNA 碱基。④硝基过氧化物是 NO 与过氧化阴离子结合的产物,能使蛋白的酪氨酸硝基化而损害细胞。UA 能阻断硝基化的反应过程。

综上所述,使用 UA 干预脊髓损伤是有效的,为临床治疗脊髓损伤后继发性损伤提供了参考。其临床应用还有待进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] ANDERSON D K, HALL E D. Pathophysiology of spinal cord trauma[J]. *Ann Emerg Med*, 1993, 22(6): 987-992.
- [2] AMES B N, CATHCART R, SCHWIERS E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer a hypothesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(11): 6858.
- [3] GWEN S S, SALVATORE C, TIZIANA G, et al. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury

[J]. *PNAS*, 2005, 102(9): 3483-3488.

- [4] YU Z F, BRUCE-KELLER A J, GOODMAN Y, et al. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo [J]. *Neurosci Res*, 1998, 53(5): 613-625.
- [5] HOOPER D C, SPITSIN S, KEAN R B, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(1): 675-680.
- [6] HOOPER D C, SCOTT G S, ZBOREK A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *FASEB J*, 2000, 14(5): 691-698.
- [7] ALLEN A R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crash injury of fracture dislocation of spinal column; a preliminary report [J]. *JAMA*, 1911, 57: 878-880.
- [8] GALE K, KERASIDIS H, WRATHALL J R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment [J]. *Exp Neurol*, 1985, 88(1): 123-131.
- [9] LIPTON S A, CHOI Y B, PAN Z H, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neuro-destructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds [J]. *Nature*, 1993, 364: 626-632.
- [10] LIU D X, LING X, WEN J, et al. The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein [J]. *Neurochem Res*, 2000, 75(5): 2145-2154.

## 大孔树脂吸附骨碎补总黄酮性质的研究

陈 顺, 关延彬

(华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030)

**[摘要]** 目的 研究大孔树脂吸附纯化骨碎补总黄酮的性质。方法 对 AB-8 型树脂进行静态吸附、吸附动力学研究,以 Freundlich 和 Langmuir 方程拟合 25 ℃ 的等温吸附线,同时考察不同浓度醇对树脂的解吸效果,并做泄漏曲线,以确定解吸终点。结果 以 AB-8 树脂对骨碎补总黄酮的吸附、解洗效果最好。 Freundlich 和 Langmuir 方程对等温吸附线的拟合效果都很好,从解吸曲线可以看出 50% 为骨碎补总黄酮的最佳解吸醇浓度。结论 AB-8 型大孔树脂对骨碎补总黄酮的吸附性能较好,各种参数能反映树脂对骨碎补总黄酮吸附的内在性质。

**[关键词]** 骨碎补总黄酮;大孔树脂;吸附等温线;吸附动力学;泄漏曲线

**[中图分类号]** R284.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2007)01-0019-03

## Study on Adsorption Process of Total Flavonoids in *Drynaria Fortunei* with Macropore Resin

CHEN Shun, GUAN Yan-bin (School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huzhong University of Science and

Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To study the absorptions process of total flavonoids in *Drynaria fortunei* with macropore resin.

**Methods** AB-8 resin was selected to investigate its static adsorption and adsorption kinetics, and the absorption isotherm curve with Freundlich and Langmuir equations was simulated in 25 °C. Different concentrations of alcohol for the absorptions were also studied, and the throughout curve was made for judging the end of elution. **Results** Both of Freundlich and Langmuir equations fit the absorption isotherm curve very well. The 50% alcohol was the best concentration for elution. **Conclusion** The properties of AB-8 resin is good for absorption and desorption of total flavonoids, and the parameters can reflect the inner properties of absorption.

**KEY WORDS** Total flavonoids; Macropore resin; Adsorption isotherm curve; Throughout curve;

骨碎补是一味常用中药,为水龙骨科多年生附生蕨类植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm 的根茎。传统中医认为骨碎补性味苦温归肾肝经,具有补肾强骨,续伤镇痛功效,用于肾虚腰痛、耳鸣耳聋、牙齿松动、跌扑闪挫、筋骨折伤;有报道称骨碎补总黄酮有刺激骨生长<sup>[1]</sup>、预防骨质疏松<sup>[2]</sup>和抗炎作用<sup>[3]</sup>。大孔树脂对于黄酮类化合物是较理想的吸附剂,但应用于骨碎补总黄酮的研究不多。笔者考查了 AB-8 型树脂对骨碎补总黄酮吸附性质,并进行了工艺研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器 UV754 分光光度计(上海第三分析仪器厂),DF-101S 智能恒温水浴锅(巩义市英裕华中仪器厂)。

1.2 材料 骨碎补(市售,经鉴定为水龙骨科蕨类槲蕨),柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0722-200108),大孔树脂 AB-8 型(南开大学化工厂),无水乙醇(天津市恒兴化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系考察 精密称取柚皮苷 5 mg 置 50 mL 容量瓶,纯化定容摇匀,分别精密吸取 1,2,3,4,5,6 mL 分别置 25 mL 容量瓶,纯化定容摇匀,在 283 nm 波长处测吸光度(A),以 A 值对浓度(C)求回归方程为  $A = 0.005 + 0.0274C$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。结果表明柚皮苷浓度在 4 ~ 24  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。

2.1.2 加样回收率考察 取已测得浓度的样液平行 6 份,分别加入等量柚皮苷标准液,等量稀释,在 283 nm 波长下测吸光度,计算浓度,并计算加样回收率。结果见表 1。

2.2 骨碎补样品液的制备 将骨碎补粉碎过筛孔内径为 0.25 mm(60 目)筛,加 60% 乙醇 25 倍体积回流提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,置于旋转蒸发器蒸发回收乙醇至膏状,再加适量热水溶解,抽滤,即得样品液。

2.3 大孔树脂的预处理 将层析柱及管道清洗干净,以防有害物质对树脂的污染,并排净柱内的水分,于柱内加入少量的 95% 乙醇,然后称取一定量的大孔树脂以 95% 乙醇湿法上柱,使液面高于树脂表面 30 cm,浸泡 24 h 后用 2 BV 乙醇,以 0.5 BV · h<sup>-1</sup> 流速通过树脂层,并浸泡 4 h。再以 95% 乙醇以 2 BV · h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂层,洗至流出液加水(1 : 5)不浑浊,且在波长 200 ~ 400 nm 范围内除乙醇外无其他吸收为止。以双蒸水洗净乙醇。用 2 BV 的 5% 盐酸溶液,以 4 ~ 6 BV · h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂层,并浸泡 4 h 后以纯化水洗至 pH 值 = 7。再用 2 BV 的 2% 氢氧化钠溶液,以 4 ~ 6 BV · h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂层,并浸泡 4 h,以纯化水洗至 pH 值 = 7,备用。

表 1 柚皮苷回收率实验结果

样液总黄酮含量/ $\mu\text{g}$	加入柚皮苷量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	RSD/ %
158.75	143.25	305.75	102.62	
158.75	143.25	300.00	98.60	
158.75	143.25	300.00	98.60	1.6
158.75	143.25	301.00	99.30	
158.75	143.25	302.00	100.00	
158.75	143.25	303.75	101.22	

2.4 静态吸附实验 称取 2.0 g 抽滤至干的湿树脂,加入一定浓度的骨碎补样品溶液 50 mL,置于恒温水浴箱分别在 25,30,35 °C 吸附,定时取样 0.5 mL,适当稀释后,测其浓度。同时补充 0.5 mL 纯化。吸附实验结果表明 12 h 时,AB-8 树脂基本达到吸附平衡,24 h 完全达到吸附平衡,以平衡吸附量为纵坐标,平衡浓度为横坐标,绘制出的等温吸附线如图 1 所示。由图 1 可以看出,树脂的吸附量随温度的升高呈下降趋势。

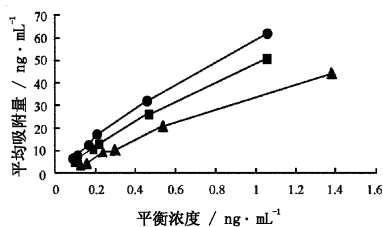


图 1 树脂对骨碎补总黄酮的吸附等温线

●—● 25 °C; ■—■ 30 °C; ▲—▲ 35 °C

[收稿日期] 2006-03-06

[作者简介] 陈 顺(1981 -),男,湖北仙桃人,硕士,从事药物新剂型研究工作。E-mail:c\_shun@eyou.com。

采用 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温式分别对 25, 30, 35 °C 时所得吸附等温吸附线数据进行回归, 得到树脂对总黄酮的吸附方程, 结果如表 2 所示。由相关系数可以看出, 采用 Langmuir 方程和 Freundlich 方程均可比较好的拟和。

表 2 拟和回归方程

T/°C	方程类型	回归方程	相关系数 (r)
25	Langmuir 等温式	$Q = \frac{C}{1.42 \times 10^{-2} - 6 \times 10^{-3} C}$	0.997 9
	Freundlich 等温式	$Q = 4.1291 C^{0.925 5}$	0.996 4
30	Langmuir 等温式	$Q = \frac{C}{1.92 \times 10^{-2} - 3.3 \times 10^{-3} C}$	0.989 5
	Freundlich 等温式	$Q = 3.9185 C^{0.956 9}$	0.995 9
35	Langmuir 等温式	$Q = \frac{C}{3.65 \times 10^{-2} - 9 \times 10^{-3} C}$	0.994 9
	Freundlich 等温式	$Q = 3.5337 C^{1.058 6}$	0.990 8

**2.6 pH 值的影响** 平行称取 2 g 已处理好的 AB-8 树脂 6 份, 分别加入一定浓度的骨碎补样品液 50 mL, 分别调节 pH 为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 置 25 °C 恒温水浴箱吸附 24 h 后, 取上液测浓度, 计算吸附量, 结果 pH 为 3~8 时, 吸附量依次为 13.0, 14.0, 12.5, 11.0, 10.0, 8.5 mg。

**2.7 洗脱溶剂的筛选** 取 20 g 已处理好的 AB-8 型大孔树脂装柱 (20 mm × 150 mm)。精密吸取骨碎补样液 20 mL (3.5 mg · mL<sup>-1</sup>) 上柱, 吸附 3 h 后, 用水洗脱至还原糖反应阴性 (硫酸-苯酚无颜色反应)。依次用 10%, 30%, 50%, 70%, 95% 乙醇以 1 mL · min<sup>-1</sup> 流速进行洗脱, 每 12 mL 收集为一个流份, 用水适量稀释, 测吸光度并计算浓度。以流份编号为横坐标, 浓度为纵坐标, 绘制洗脱曲线。结果表明 50% 醇能洗脱绝大部分总黄酮, 是最佳的洗脱溶剂。

**2.8 吸附透过曲线** 取 10 g 已处理好的 AB-8 型大孔树脂装柱, 加入浓度为 1.5 mg · mL<sup>-1</sup> 的骨碎补样液, 流速为 0.5 mL · min<sup>-1</sup>, 每 25 mL 收集为一流份, 紫外测吸光度, 计算浓度。以流份编号为横坐标, 浓度为纵坐标, 绘制曲线如下, 结果表明洗脱体积为 500 mL, 树脂即已经达到吸附饱和, 其吸附量为 35 mg · g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

大孔树脂的极性、孔径、比表面积是影响吸附性能的重要因素<sup>[4]</sup>。遵从相似相容原则, 极性较大的树脂

适合用于在弱极性溶液中吸附极性大的物质, 极性小的树脂适合用于在强剂型溶液中吸附极性小的物质。骨碎补总黄酮主要物质柚皮苷为二氢黄酮是极性物质, 因此极性和弱极性树脂是较好的选择。从数据可以看出, 极性树脂的效果比较好, S-8 的比吸附量最大。

另外, 吸附质的分子大小和树脂孔径对吸附也有很大影响。骨碎补总黄酮相对分子量为 580.53, 因此, 大的孔径有利于树脂的吸附。同是极性树脂的 S-8、NKA2、NKA9, 其孔径大小 S-8 > NKA2 > NKA9, 故吸附量 S-8 > NKA2 > NKA9。大孔树脂吸附为一物理吸附过程, 树脂的比表面积大, 更有利于树脂的吸附, D4006 的比表面积远大于其他树脂, 因此虽然它的孔径小且为弱极性, 但是吸附量也相当大。故大孔树脂的吸附是一个综合因素影响的过程, 不能仅凭借某一方面来选择, 而应当多方面的实验来选择合适的树脂。

对等温吸附线进行 Freundlich 和 Langmuir 方程拟合, 两个方程均能较好的拟合, 通过两个方程的计算, 结果显示, 低浓度时 Langmuir 计算得到的最大吸附量和实验结果相近, 而高浓度时 Freundlich 计算得到最大吸附量和实验结果相近, 结果说明, 在低浓度时, 吸附是单分子吸附为主的吸附, 而高浓度时是多分子层吸附为主的吸附。上柱药液的温度升高, 树脂的比吸附量下降, 说明树脂的吸附过程为一放热反应, 低温有利于树脂吸附容量的提高, 高温有利于树脂的解吸。

本研究结果显示, pH 值 = 4 时, 树脂的吸附量较好, pH 太大和太小均不利于吸附, 原因可能是骨碎补总黄酮为多羟基酚类, 呈酸性结构, pH 太大易成盐, pH 太小, 易形成烺盐<sup>[5]</sup>, 而树脂吸附时, 吸附质以分子状态吸附效果最好, pH 太大或太小骨碎补总黄酮均不能以分子结构存在, 影响了吸附效果。

#### [参考文献]

- [1] 谢雁鸣, 鞠大宏, 赵晋宁. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 343-346.
- [2] 赵晋宁, 谢雁鸣, 张文军, 等. 骨碎补总黄酮急性毒性实验[J]. 医药导报, 2005, 24(1): 14-16.
- [3] 刘剑刚, 谢雁鸣, 邓文龙, 等. 骨碎补总黄酮抗炎作用的实验研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 232-234.
- [4] 谢秀琼. 现代中药制剂新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 85.
- [5] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 20-30.