把定性评价转化为定量评价，即用模糊数学对受到多种因素制约的事物或对象做出一个总体的评价[8]。具体表现为通过精确的数字手段处理模糊的评价对象，对蕴藏信息作出比较科学、合理、贴近实际的量化评价。

从本实验来看，基于模糊数学理论的模糊综合评价法理论清晰，结果直观，且在评价过程中考察了各指标对总体效果的综合贡献，因此认为该法基本上能客观、公正、科学地评价促透剂的促透效果，期望能为促透剂的研究和筛选提供一定的理论依据。

参考文献：

[1] 赵 鑫，刘建平，朱家壁. 茶碱微乳经皮吸收及药代动力学研究[J]. 中国药科大学学报，2006，37(1)：28-32.
[2] 梁 庆，沈飞沉，王 晖，等. 经皮给药系统的研究及临床应用概况[J]. 广东药学院学报，2008，24(3)：324-327.
[3] 王 琰，徐惠南. 中药挥发性成分的透皮渗透作用[J]. 上海医药，2004，25(3)：106-107.
[4] Jaymin C，Shah，Idris K. Analysis of percutanneous data：II Evaluation of the lag time method[J]. *Int J Pharm*，1994，109：283-290.
[5] Gao S，Singh J. Mechanism of transdermal transport of 5-fluorouracil by terpenes：carvone，1，8-cineole and thymol[J]. *Int J Pharm*，1997，154(3)：67-68.
[6] Williams A C，Barry B W. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement[J]. *Pharm Res*，1991，8(1)：17-18.
[7] 穆 征，王方勇，李 静，等. 基于模糊综合评价模型的河流水质综合评价[J]. 水力发电，2009，35(4)：11-13.
[8] 刘玉梅，李大治. 南通市区环境质量模糊综合评价[J]. 南通职业大学学报，2009，23(1)：87-89.
[9] 王 晖，许卫铭，冯小龙. 薄荷醇对两种不同性质化合物体外经兔皮吸收的影响[J]. 中国药房，2002，13(3)：141-142.
[10] Gao S，Singh J. *In vitro* percutaneous absorption enhancement of alipophilic drug tamoxifen by terpenes[J]. *J Controlled Release*，1998，51：193-194.

超高效液相色谱法测定脑外伤患者口服大黄后尿液中蒽醌类成分

王 杨[1]，黄 熙[1*]，梁清华[1]，秦 锋[1]，刘昭前[2]，周宏灏[2]

（1. 中南大学湘雅医院中西医结合研究所 国家中医药管理局脑病重点专科，湖南 长沙 410008；
2. 中南大学临床药理研究所，湖南 长沙 410008）

摘 要：目的 建立超高效液相色谱（UPLC）法同时测定脑外伤患者口服大黄后尿液中蒽醌类成分。方法 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为甲醇-0.5%醋酸（12∶82）；柱温 25 ℃；检测波长 254 nm；体积流量 0.5 mL/min；进样量 5 μL。结果 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的尿中质量浓度分别在 0.198～6.333、0.42～13.429、0.285～9.107、0.386～12.321、0.134～4.286 μg/mL 线性良好，方法回收率在 97.68%～108.85%，日内、日间 RSD 均小于 7%。结论 本法精密度好，回收率高，操作简便、无毒、重现性好，可用于大黄蒽醌类成分在脑外伤病人体内的代谢组学研究。

关键词：大黄；蒽醌；尿液；超高效液相色谱

中图分类号：R286.02 文献标识码：A 文章编号：0253-2670(2010)07-1103-04

大黄始载于《神农本草经》，已成为使用最频繁的中药之一。现代研究证明大黄具有泻下清热、抗菌、抗肿瘤、护肝、松弛肠道、改善血液循环等药理作用[1～3]。蒽醌类成分作为大黄药理相关有效活性成分，被认为大黄质量控制的基础[3～5]。国内外已有学者对健康人血浆，对健康大鼠血浆及尿液蒽醌类成分进行测定[6～8]。对人服用大黄汤剂后尿液中蒽醌类成分进行测定尚未见报道。顾建文等[9,10]报道大黄通过多靶点药理作用具有抗颅脑损伤的效应，但颅脑损伤患者服用大黄后吸收的蒽醌类成分未见报道。本实验室建立了超高效液相色谱法对脑外伤患者服用大黄汤剂尿液蒽醌类成分的测定，为将吸收的抗颅脑损伤蒽醌类成分作为大黄质量控制标准，为大黄在脑病中代谢学研究，为脑外伤患者的大黄治疗提供了依据。

1 材料

超高效液相色谱仪：液相色谱仪为 Waters Acquity UPLC system，包括二元泵处理器、样品处理器、柱温

* 收稿日期：2009-12-23
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30572339）
作者简介：王 杨（1984—），男，住院医师，硕士，主要从事心脑血管病的中西医结合防治基础与临床工作。
Tel/Fax：(0731)84327222 E-mail：xiaoyangge02@126.com
* 通讯作者 黄 熙 E-mail：tcmhuangx59@163.com

箱、PDA 检测器以及 Empower 色谱工作站。

大黄购于中南大学湘雅医院中药房，由西北大学生物解剖学教研室胡正海教授鉴定为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎，样品凭证存于中南大学湘雅医院中药药理实验室。

芦荟大黄素（批号 09102301）、大黄酸（批号 09102302）、大黄素（批号 09102303）、大黄酚（批号 09102304）、大黄素甲醚（批号 09102305）对照品均购于中国药品生物制品检定所，质量分数均大于 98%；醋酸、甲醇和乙醚均为 AR 级，水为自制三蒸水。

2 方法与结果

2.1 脑外伤患者入选标准：选择 2009 年 6 月—2009 年 8 月来源于中南大学湘雅医院神经外科病房重型脑外伤患者 5 名，纳入标准：㈠ 外伤后昏迷时间> 6 h 或格拉斯哥评分（GCS 评分）< 8 分；㈡脑损伤患者均经 CT 扫描或 MRI 检查证实；㈢患者病情稳定，意识清楚；¼ 无因先天或年幼疾病导致学习困难造成言语功能缺陷；½ 未给予系统的认知知觉训练。排除标准：㈠ 既往有颅脑外伤史及脑血管意外史或其他颅内占位病史、脑炎史等；㈡外伤前有精神病史或吸毒、长期嗜酒史；㈢外伤时年龄< 16 岁或> 65 岁；¼ 外伤后昏迷时间< 6 h 或格拉斯哥评分（GCS 评分）> 8 分；½ 意识不清；¾ 精神躁动或因其他原因而无法配合评定；㈧脑外伤后所致的构音障碍；㈨独特临床综合征的纯词聋及纯词哑。本实验已经中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准，实验前均签署知情同意书。

2.2 色谱条件：Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm × 2.1 mm，1.7 μm）；流动相甲醇-0.5% 醋酸（12∶82）；柱温 25 ℃；检测波长 254 nm；体积流量 0.5 mL/min；进样量 5 μL。

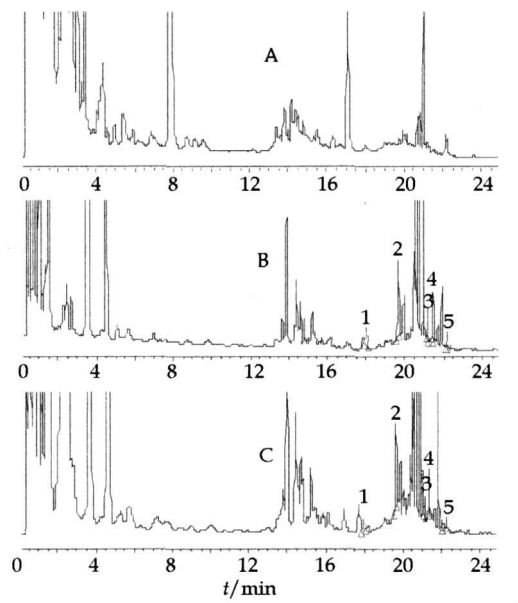
2.3 对照品溶液的配制：精密称定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量，以甲醇溶解定容到 25 mL 量瓶中，摇匀，即得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品溶液质量浓度分别为 0.266、0.075、0.255、0.207、0.090 mg/mL。

2.4 大黄煎液的制备：取大黄 30 g，常水洗净 2 遍后，水浸 30 min，煎煮至沸，持续 20 min。UPLC 测定 3 次，测得大黄汤剂中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的质量浓度分别为（56.98±2.26）、（101.12±3.54）、（48.93±1.51）、（15.50±0.84）、（27.03±1.61）μg/mL。

2.5 给药及尿液采集：患者于实验前 3d 不得饮用啤酒、茶、咖啡及其他饮料；实验前 8h 不准进水和食物。实验当天测定其空腹体质量及心率、脉搏、血压；每位志愿者在服用汤剂前均采集服药前尿液，作为空白对照。采集尿液后按 0.5 g/kg 口服一次大黄汤剂。服药后收集患者 36 h 尿液。取患者待测尿液 5 mL 置于灭菌试管中，4 ℃下冷冻离心 15 min，取尿液上清液迅速入冻干机制成冻干粉，-20 ℃冰箱保存。

2.6 患者尿液预处理方法：将制成冻干粉的尿液分别加入 6 mL 乙醚及 50 μL 1 mmol/L HCl，摇匀 1 min，15 000 × g 离心 15 min。取上清液在常温下挥发干，加入 100 μL 甲醇，15 000 × g 离心 15 min。取上清液用 0.22 μm 混合纤维素脂微孔滤膜滤过，即得，取 5 μL 滤液进样。

2.7 干扰性试验：在选定的色谱条件下，空白尿液、空白尿液加对照品、脑外伤患者口服大黄汤剂后尿液的色谱图见图 1。结果显示空白尿液加对照品及脑外伤患者口服大黄汤剂后尿液芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分离良好。



1-芦荟大黄素 2-大黄酸 3-大黄素 4-大黄酚 5-大黄素甲醚

1-aloe-emodin 2-rhein 3-emodin 4-chrysophanol 5-physcion

图 1 空白尿液（A）、空白尿液加入蒽醌类对照品（B）和含药尿液（C）的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC Chromatograms of blank urine (A), blank urine with anthraquinones refernces substance (B), and urine with sample (C)

2.8 标准曲线的绘制：取 6 份 3 mL 人空白尿，加入不同体积的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品溶液，使芦荟大黄素在尿中的质量浓度分别为 0.198、0.396、0.792、1.584、

3.167、6.333 μg/mL; 大黄酸的质量浓度分别为 0.42、0.84、1.679、3.358、6.68、13.429 μg/mL; 大黄素的质量浓度分别为 0.285、0.570、1.139、2.277、4.554、9.107 μg/mL; 大黄酚的质量浓度分别为 0.386、0.771、1.541、3.081、6.100、12.321 μg/mL; 大黄素甲醚的质量浓度分别为 0.134、0.268、0.536、1.072、2.143、4.286 μg/mL。按脑外伤患者尿液样品的处理方法进行处理, 测定。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 拟合线性方程, 结果见表 1。当信噪比(signal-to-noise, S/N) 为 3 时确定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的最低检测限。

2.9 精密度和回收率的测定: 于空白尿液样品中分别加入低、中、高 3 种质量浓度的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚混合对照品溶液, 按脑外伤患者尿液样品的处理方法进行处理, 记录峰面积。重复上述实验过程, 5 次/d, 使用相同的样品与方法连续测定 5 d。以加入尿中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的量为标准值, 实际测得的峰面积比值代入回归方程计算值, 计算值与标准值相比求得回收率和日内精密度, 并计算出相对标准差(relative standard deviation, RSD)。结果见表 2。

回收率= (计算值/标准值) × 100%

精密度= (计算值的平均值/加入标准浓度) × 100%

RSD= (标准差/平均值) × 100%

表 1 线性范围和回归方程

Table 1 Linear ranges and regression equations

成分	回归方程	相关系数	线性范围/(μg·mL⁻¹)
芦荟大黄素	Y= 22.961 X+ 888.87	0.998 6	0.198~6.333
大黄酸	Y= 19.932 X− 1.476 7	0.999 9	0.42~13.429
大黄素	Y= 20.370 X+ 2.625 1	0.998 4	0.285~9.107
大黄酚	Y= 21.760 X− 3.855 3	0.999 6	0.386~12.321
大黄素甲醚	Y= 15.388 X− 1.743 8	0.996 4	0.134~4.286

表 2 精密度和回收率检测

Table 2 Precision and recovery test

成分	空白尿液中加入药物量/(μg·mL⁻¹)	日内		日间		回收率/%
		测得量/(μg·mL⁻¹)	RSD/%	测得量/(μg·mL⁻¹)	RSD/%	
芦荟大黄素	0.198	0.201	4.3	0.221	2.3	101.68
	0.792	0.791	5.1	0.801	3.2	99.95
	3.167	3.169	3.6	3.168	2.8	100.21
大黄酸	0.420	0.461	3.2	0.426	4.4	108.85
	1.679	1.677	2.8	1.681	5.2	99.92
	6.680	6.710	4.6	6.920	5.2	102.21
大黄素	0.285	0.290	2.3	0.299	3.1	101.75
	1.139	1.135	3.8	1.089	5.3	99.76
	4.554	4.559	4.9	4.601	4.5	100.19
大黄酚	0.386	0.388	6.2	0.368	2.4	100.53
	1.541	1.544	3.7	1.533	3.5	100.26
	6.100	5.925	4.4	5.899	4.2	97.68
大黄素甲醚	0.134	0.133	5.4	0.128	4.8	100.12
	0.536	0.559	4.9	0.533	3.9	104.32
	2.143	2.196	2.8	2.161	2.7	102.54

2.10 样品测定: 收集 5 名重型脑外伤病人的 36h 新鲜尿液样品, 预处理后进样测定大黄蒽醌类成分质量浓度, 结果见表 3。

表 3 口服大黄脑外伤患者尿液中蒽醌类成分测定结果

Table 3 Determination of anthraquinones in urine from patients with cerebral traumatic injury after oral rhubarb decoction

样品编号	芦荟大黄素/(μg·mL⁻¹)	大黄酸/(μg·mL⁻¹)	大黄素/(μg·mL⁻¹)	大黄酚/(μg·mL⁻¹)	大黄素甲醚/(μg·mL⁻¹)
1	0.83	6.65	0.52	1.71	0.37
2	0.49	8.78	0.32	3.22	0.26
3	0.74	7.41	0.41	1.41	0.39
4	0.62	9.15	0.74	0.90	0.36
5	0.87	7.73	0.83	1.37	0.71

3 讨论

大黄用于脑外伤治疗机制逐渐清晰, 但对大黄进入脑外伤患者体内后的代谢研究并不清楚。蒽醌类成分作为大黄的主要有效成分, 本实验以“生物方剂分析中医药学”思想作为理论指导基础, 应用 UPLC 法分析了脑外伤患者口服大黄汤剂后尿中的蒽醌类成分的检测, 为蒽醌类成分在脑外伤病人体内的代谢组学研究奠定了基础[11]。

本实验建立了脑外伤患者尿液中蒽醌类成分的 UPLC 方法, 本法精密度好, 回收率高, 操作简便、无毒、重现性好。考虑到脑外伤患者同时需接受其他标准化的治疗, 且在生物样品的测定中干扰成分较多, 但由图 1 可知, 运用 UPLC 法对脑外伤患者尿

液中蒽醌类成分检测与尿中其他成分分离良好。本实验方法适用于脑外伤患者口服大黄汤剂后蒽醌类成分尿中浓度的测定，为进一步研究大黄在颅脑损伤患者尿中蒽醌类药动学，进一步阐明其在脑外伤患者体内的代谢情况，为将吸收的抗颅脑损伤蒽醌作为大黄质量控制标准奠定了基础。

参考文献：

[1] Wang F X, Zhang Z Y, Cui X J, *et al*. Identification of rhubarbs by using NIR spectrometry and temperature-constrained cascade correlation networks [J]. *Talanta*, 2006, 70: 1170-1176.

[2] Liu L H, Fan L Y, Chen H L, *et al*. Separation and determination of four active anthraquinones in Chinese herbal preparations by flow injection-capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26: 2999-3006.

[3] Gao X Y, Jiang Y, Lu J Q, *et al*. One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2118-2123.

[4] He D X, Chen B, Tian Q Q, *et al*. Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49: 1123-1127.

[5] 马 客，狄留庆，许惠琴. 大黄中游离蒽醌的提取工艺优化研究[J]. 中草药，2008，39(6)：858-860.

[6] 朱 伟，张 莉，王学美. HPLC 法测定人血浆中的大黄酸 [J]. 中草药，2006，37(1)：65-68.

[7] Lee J H, Kim J M, Kim C. Pharmacokinetic analysis of rhein in *Rheum undulatum* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84: 5-9.

[8] Ding M Y, Ma S W, Liu D L. Simultaneous determination of hydroxyanthraquinones in rhubarb and experimental animal bodies by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Sci*, 2003, 19: 1163-1165.

[9] Gu J W, Hiroshi H, Mitsue T, *et al*. Effects of emodin on synaptic transmission in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro* [J]. *Neuropharmacology*, 2005, 49: 103-111.

[10] Gu J W, Zhang X, Fei Z, *et al*. Rhubarb extracts in treating complications of severe cerebral injury [J]. *Chin Med J*, 2000, 113 (6): 529-531.

[11] 黄 熙. 生物方剂分析中医药学研究的设想、背景与意义 [J]. 中国中西医结合杂志，2002，22(4)：251-252.

大孔吸附树脂纯化红茶中茶黄素的研究

贾振宝，陈文伟，关荣发，黄光荣，蒋家新*

（中国计量学院生命科学学院，浙江 杭州 310018）

摘 要：目的 研究大孔吸附树脂纯化红茶中茶黄素的工艺。方法 通过静态吸附实验比较不同树脂对茶黄素的吸附和解吸能力，考察 HPD-300 树脂对茶黄素的吸附性质，比较不同溶液的动态解吸效果。结果 HPD-300 树脂具有较高的吸附和解吸能力，在 25 ℃和 45 ℃下 HPD-300 树脂对茶黄素的吸附等温线符合 Freundlich 方程。经过动态吸附解吸后茶黄素由 18.4% 提高到 67.2%，回收率达到 73.7%。结论 HPD-300 树脂对茶黄素具有良好的分离能力，为茶黄素的大规模制备提供了科学参考。

关键词：茶黄素；大孔吸附树脂；纯化

中图分类号：R284.2；R286.02 文献标识码：B 文章编号：0253-2670(2010)07-1106-04

茶黄素是红茶发酵过程中形成的一类具有苯骈草酚酮结构特征，易溶于醋酸乙酯的橙黄色物质。茶黄素在抗氧化、抗癌、改善和治疗心脑血管疾病等方面具有的重要生理功能，在某些方面甚至强于儿茶素，其在医药领域有着广泛的应用前景[1]。目前茶黄素的分离方法主要有 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法和高速逆流色谱法，但上述两种方法处理量小、成本高，不适合工业化生产应用[2,3]。大孔吸附树脂是一种具有大孔结构的高分子材料，具有吸附容量大、吸附速度快、选择性好、再生处理简单、使用成本低等优点，特别适合大批量样品的分离制备[4,5]。因此本实验对茶黄素的大孔吸附树脂纯化工艺进行研究。

1 仪器与材料

UV-2501PC 紫外-可见分光光度计（日本岛津公司）；ZHWY-110X50 水浴摇床（上海智城分析仪器制造有限公司）；RE-52A 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）。

红碎茶购于杭州福海堂茶业有限公司，经浙江省农业科学院陈文烜副研究员鉴定为红茶 *Camel-*

* 收稿日期：2009-10-15

基金项目：杭州市科技发展计划项目（20062413B25）

作者简介：贾振宝（1976-），男，山东莱阳人，讲师，博士，主要从事天然产物化学研究工作。Tel：(0571) 87676258 E-mail：zhenbaojia@cjlu.edu.cn

* 通讯作者 蒋家新 Tel：(0571) 86836007 E-mail：jjx@cjlu.edu.cn