

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力学,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(20062413 B25)

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@cjl.edu.cn

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

lia sinensis (L.) O. Ktze. 的叶; HPD-300、HPD-100 大孔树脂购于河北保恩化工有限公司; AB-8、NKA-2 和 NKA 大孔树脂购于南开大学化工厂。其他试剂均为分析纯, 购于杭州华东医药股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 茶黄素的提取: 红碎茶 1 kg 粉碎后过 80 目筛, 收集筛下物。加入 50% 乙醇溶液 5 L 后, 在 60 °C 下浸提 10 h。滤液减压蒸干后, 悬浮于 1 L 水中, 等体积醋酸乙酯萃取后收集有机相, 减压蒸干后得到茶黄素提取物。

2.2 茶黄素的测定: 参照文献报道的方法^[6,7]。精确称取少量样品, 与 30 mL 水混合后沸水浴 5 min, 冷却到室温后定溶至 50 mL。滤过后取 20 mL 滤液加入等体积醋酸乙酯萃取, 静置分层后取 15 mL 醋酸乙酯萃取液, 加入等体积 2.5% NaHCO₃ 溶液再进行萃取, 静置分层后取 4 mL 醋酸乙酯萃取液, 利用甲醇稀释至 25 mL, 以甲醇作对照, 在 380 nm 下测吸光度值, 通过比色法测定提取物中茶黄素的质量分数为 18.4%。

2.3 大孔树脂的筛选: 准确称取树脂 2g 于锥形瓶中, 加入 20 mL 茶黄素提取液(茶黄素质量浓度为 50 mg/mL), 于室温震荡吸附 24 h, 测定溶液中茶黄素的质量浓度; 吸附结束后除去水相, 用滤纸吸干树脂表面液体后将其置于锥形瓶中加入 95% 乙醇溶液 20 mL, 于室温震荡解吸, 24 h 后测定解吸液中茶黄素的质量浓度, 并计算树脂的吸附量和解吸率。

吸附量 = (原料液质量浓度 - 吸附后溶液质量浓度) × 溶液体积 / 树脂质量

解吸率 = 解吸后溶液质量浓度 × 解吸液体积 / 树脂吸附量 × 100%

选择极性、弱极性和非极性大孔树脂, 考察其对茶黄素的吸附作用, 所选树脂的性质见表 1。不同树脂对茶黄素的静态吸附与解吸实验结果见表 2。可知非极性树脂 HPD-300、HPD-100、NKA 具有较高的吸附能力, 其中 HPD-300 的吸附量最大, 达到 120.8 mg/g 树脂; 同上述 3 种非极性树脂相比, AB-8 和 NKA-2 的吸附量较低, 分别为 80.6、74.5 mg/g 树脂。由解吸试验结果可知, 5 种大孔树脂均具有较高的解吸效率。由于 HPD-300 树脂具有较高的吸附量和解吸率, 选择 HPD-300 树脂作为分离介质, 对其吸附解吸性能进行研究。

2.4 静态吸附速率的测定: 分别称取 HPD-300 树脂 2g 于不同锥形瓶中, 各加入 20 mL 茶黄素提取

表 1 不同大孔树脂的性质表征

Table 1 Characterization of different macroporous resins

树脂名称	极性	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	平均孔径/nm
AB-8	弱极性	480~520	13~14
HPD-300	非极性	800~870	5.0~5.5
HPD-100	非极性	650~700	8.5~9.0
NKA-2	极性	160~200	14.5~15.5
NKA	非极性	570~590	20~22

表 2 不同树脂对茶黄素的静态吸附和解吸能力

Table 2 Static adsorption and desorption capacity of different resins on theaflavins

树脂名称	吸附量/(mg·g ⁻¹)	解吸率/%
AB-8	80.6	93.6
HPD-300	120.8	91.7
HPD-100	100.7	92.6
NKA-2	74.5	92.4
NKA	90.5	91.5

液(茶黄素质量浓度为 50 mg/mL)于室温震荡至不同时间后, 测定溶液中茶黄素的浓度, 计算树脂的吸附量。HPD-300 树脂对茶黄素的静态吸附速率测定结果见图 1。实验结果表明, HPD-300 树脂在 60 min 内的吸附速度较快, 60 min 时的吸附量为平衡吸附量的 87%, 达到平衡吸附的时间为 100 min。

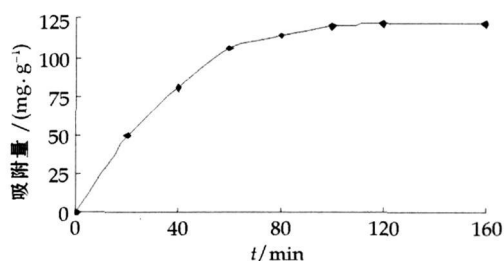


图 1 HPD-300 树脂对茶黄素的静态吸附速率曲线

Fig. 1 Static adsorption velocity curve of HPD-300 resin on theaflavins

2.5 吸附等温线的测定: 分别称取 HPD-300 树脂 2 g 于锥形瓶中, 各加入 20 mL 不同质量浓度的茶黄素提取液, 分别在 25 °C 和 45 °C 下震荡吸附至平衡, 测定溶液中茶黄素的浓度, 计算平衡吸附量。HPD-300 树脂对茶黄素的吸附平衡实验数据见图 2。可以看出随着平衡质量浓度的增大, HPD-300 树脂对茶黄素的吸附量逐渐增大, 且随温度的增加, 其吸附量降低, 说明该吸附过程为放热反应。

采用经典的 Freundlich 吸附经验方程式对上述实验数据进行拟合:

$$Q_e = kC_e^n$$

式中, Q_e 为平衡吸附量(mg/g), C_e 为平衡浓度(mg/mL), k 为平衡吸附常数, n 为特征常数

表 3 列出了拟合方程和相关系数 R^2 , 可以看

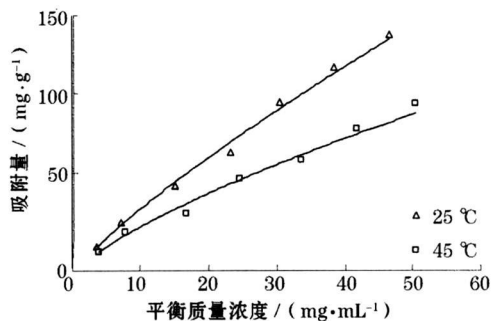


图 2 HPD300 树脂对茶黄素的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm curve of HPD-300 resin on theaflavins

到, 拟合方程与实验实测数据之间的相关系数 R^2 均大于 0.98, 表明 HPD-300 对茶黄素的吸附等温线符合 Freundlich 方程。方程的特征参数 $n < 1$, 表明是优惠吸附^[8]。从 k 值可以看出, 降低温度有利于吸附。

表 3 茶黄素在 HPD-300 树脂上的吸附等温线拟合参数

Table 3 Parameters for adsorption isotherm equation of HPD-300 resin on theaflavins

温度/℃	拟合方程	R^2
25	$Q_e = 6.21C_e^{0.8053}$	0.981
45	$Q_e = 5.46C_e^{0.7272}$	0.987

2.6 HPD-300 树脂的吸附穿透曲线: 将 HPD-300 大孔树脂悬浮于水中后装填于色谱柱中(内径 2.6 cm, 长度 36 cm), 将 50 mg/mL 茶黄素提取液通过色谱柱, 流速为 2 BV/h, 分部收集流出液(30 mL/份), 检测每份流出液中茶黄素质量浓度, 以流出液质量浓度(C)与进样浓度(C_0)的比值为纵坐标, 流出液体积为横坐标绘制穿透曲线。HPD-300 树脂对茶黄素的吸附穿透曲线见图 3。当料液通过吸附柱时, 流出液中吸附质质量浓度达到进样液质量浓度的 10% 时, 可认为吸附柱已穿透, 该点即为穿透点, 对应的流出体积可称为穿透体积^[9]。在本实验条件下茶黄素溶液的穿透体积为 420 mL, 此时树脂的吸附量为 176.3 mg/g。

2.7 动态解吸试验: 进行装柱和进样, 达到穿透点后, 通入 1 BV 水顶出料液, 依次通入不同体积分数乙醇溶液进行阶段解吸, 每种解吸溶液的洗脱体积为 2 BV, 体积流量为 2 BV/h。收集洗脱液减压干燥后测定其中茶黄素的质量分数, 并计算回收率。不同体积分数乙醇溶液的解吸效果见表 4。可知 30% 乙醇溶液解吸能力较弱, 只有少量茶黄素被解吸, 60% 乙醇溶液解吸能力较强, 回收率达到 73.7%, 解吸物中茶黄素质量分数达到 67.2%。根据以上实

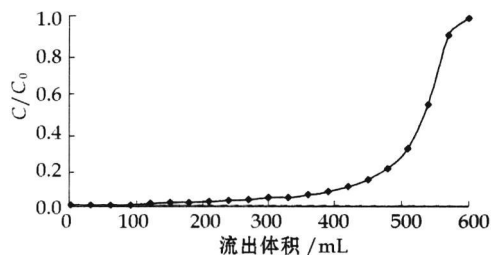


图 3 茶黄素提取液的穿透曲线

Fig. 3 Breakthrough curve of theaflavins extracting solution

验结果, 选择先用 30% 乙醇溶液洗脱除去杂质, 再用 60% 乙醇溶液洗脱解吸茶黄素。60% 乙醇洗脱液浓缩干燥后得到黄色粉末即为茶黄素样品。

表 4 不同洗脱液的解吸效果

Table 4 Desorption capacities of different eluate

乙醇体积分数/%	茶黄素/%	回收率/%
30	7.3	7.6
60	67.2	73.7
90	23.5	8.9

3 讨论

大孔吸附树脂分离技术已作为常用的分离纯化手段, 用于中药有效成分的制备。茶黄素为儿茶素氧化聚合而成的酚性化合物, 显弱酸性, 在碱性条件下会发生电离, 从而降低分子与树脂功能基团间的相互作用, 考虑到极端酸性条件可能对茶黄素稳定性产生影响, 故本实验将茶黄素提取液调节至 pH 3.5, 进行吸附试验。

大孔树脂的吸附能力受多种因素影响, 如极性、比表面积和孔径大小等, 其中吸附剂与吸附质之间的极性匹配是影响吸附的主要因素^[10]。本实验的结果表明, 非极性大孔树脂吸附茶黄素的能力高于极性和弱极性树脂, 可能是由于茶黄素是弱极性物质, 因而与非极性树脂之间的作用力较强。在本实验所选择的 3 种非极性树脂中, HPD-300 对茶黄素的吸附能力最强, 这可能是由于 HPD-300 具有较小的孔径, 可以排阻其他杂质在树脂内部的扩散分配, 减少竞争性吸附; 同时 HPD-300 具有较大的比表面积, 具有更多的吸附位点, 所以 HPD-300 树脂表现出较高的吸附能力。为了提高树脂对茶黄素的分离效率和可操作性, 对其动态吸附解吸进行了初步研究, 结果表明动态洗脱物中茶黄素的含量达到了 67.2%。实验结果为茶黄素的大规模制备提供了科学参考。

参考文献:

- [1] 曹进, 赵燕, 刘箭卫. 红茶及茶色素药理作用研究的动态[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(6): 361-363
- [2] 杨子银, 屠幼英, 赵勤, 等. 高速逆流色谱分离茶黄素单体的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 87-90

- [3] Yang C J, Li D X, Wan X C. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods: An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861(1): 140-144
- [4] 张亚梅, 张小娟, 简晖, 等. 大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1226-1229
- [5] 邢建国, 翟科峰, 何承辉, 等. 大孔吸附树脂纯化天山雪莲中有效成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1062-1066
- [6] Borse B B, Rao L J M, Nagalakshmi S, et al. Fingerprint of black teas from India: identification of the region-specific characteristics [J]. *Food Chem*, 2002, 79(4): 419-424
- [7] Yao L H, Jiang Y M, Caffin N, et al. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets [J]. *Food Chem*, 2006, 96(4): 614-620
- [8] 杨鹏波, 张晓燕, 丛威, 等. 大孔吸附树脂吸附乳酸及乳酸与谷氨酸的分离 [J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 767-772
- [9] 王琨, 金志华, 林建平, 等. 大孔吸附树脂分离提取多杀菌素 [J]. 离子交换与吸附, 2005, 21(5): 444-451
- [10] 李洁莹, 陈金龙, 费正皓, 等. 大孔吸附树脂对邻甲酚的吸附行为研究 [J]. 离子交换与吸附, 2004, 20(5): 430-437

HPLC 法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素

闫小青¹, 董林毅^{2*}

(1 天津市天津医院, 天津 300180; 2 天津大学, 天津 300072)

摘要: 目的 建立用高效液相色谱法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素的方法。方法 采用高效液相色谱法。Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水-三乙胺 (65: 35: 0.5) 为流动相; 检测波长为 280 nm; 体积流量为 0.80 mL/min; 柱温为室温; 进样量为 20 μL。结果 延胡索乙素在 0.250~8.00 μg/mL 线性良好, 平均回收率为 100.24%, RSD 为 2.43%。结论 本方法操作简便, 准确, 灵敏, 为伤痛宁胶囊的质量控制建立了方法。

关键词: 伤痛宁胶囊; 延胡索乙素; 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)07-1109-02

伤痛宁胶囊由延胡索(醋制)、白芷、乳香(制)、没药(制)、山柰、细辛、香附(制)、甘松 8 味中药精制而成, 主要用于各种急慢性软组织损伤所致的疼痛、肿胀、功能障碍; 因闪腰挫伤或陈伤所致的局部疼痛、关节痛、腰腿痛、肩背痛等; 对骨折患者可促进骨痂生长, 缩短骨折愈合时间; 对因气滞血瘀所致的胸痛、心口痛、脉管炎、乳腺炎、痔疮等有疗效。为了完善其质量控制方法, 笔者选取了延胡索乙素作为质量控制对象之一进行研究。有关延胡索乙素的测定方法主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法、薄层扫描法、高效毛细管电泳法^[1-5]。本实验采用高效液相色谱法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素, 方法学考察结果表明, 该方法简便、准确、重现性好。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(美国科美特科学仪器公司, 包括 LDI-6000 色谱输液泵, PVW I-6000 紫外检测器, ANSTAR 色谱工作站); PB153 I-S 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司); Milipore I-Q 超纯水装置(美国密理博公司), MSE 台式高速离心机(三洋电器公司), HU I-10260B 超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司), YKH I-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

延胡索乙素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 07269605); 伤痛宁胶囊(长沙市恒石医药科技有限公司, 批号分别为 091022、090908、090810); 延胡索(醋制)、白芷、乳香(制)、没药(制)、山柰、细辛、香附(制)、甘松药材由天津市天津医院提供; 甲醇为色谱纯(天津市协和吴鹏色谱科技有限公司提供, 批号 090812); 三乙胺为分析纯, 其他试剂均为分析纯, 实验室用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水-三乙胺 (65: 35: 0.5) 为流动相; 检测波长 280 nm; 体积流量 0.80 mL/min; 柱温室温; 进样量 20 μL。理论塔板数不低于 5 000。在上述条件下伤痛宁胶囊中延胡索乙素与其他组分达到基线分离, 与相邻的杂质峰分离度大于 2.5。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取延胡索乙素对照品 2 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 振荡, 摇匀, 即得对照品储备液(质量浓度为 80 μg/mL), 冰箱保存, 临用时用甲醇稀释。

2.3 供试品溶液的制备: 取伤痛宁胶囊 10 粒分别精密称定质量后, 将胶囊中药物取出混匀, 精密称取相当 4 粒胶囊所含药物, 置于 100 mL 量瓶中, 加适

* 收稿日期: 2009-12-23

作者简介: 闫小青, 主管药师, 从事专业: 药物分析。

* 通讯作者 董林毅 Tel: 13682164749 E-mail: dongwl119@163.com