

两种胡桃醌脂质体包封率测定方法研究

罗国伟¹,白春清²,熊 华^{1,*},赵 强¹,雷 莉¹,徐丽青¹,张建飞¹,胡振瀛¹,范 婷¹

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047;

2.江西科技师范大学生命科学学院,江西南昌 330013)

摘要:目的:建立两种胡桃醌脂质体包封率的测定方法,并对测定结果进行比较。方法:分别采用透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法对脂质体中的游离药物进行分离,然后使用紫外分光光度计对脂质体包封的药物进行测定进而计算包封率。结果:透析法透析14h达到稳定;葡聚糖凝胶色谱柱法在30min内即将游离药物与脂质体进行有效的分离。胡桃醌测定波长为425nm,在0.005~0.04mg/mL的浓度范围内,线性关系良好,经回收率实验、精密度及重现性实验证实两种方法可行。结论:对比两种方法可知透析法耗时较长测定的包封率值偏低,葡聚糖凝胶色谱柱法测定所需时间更短,更便捷,测出的包封率更接近真实值。

关键词:脂质体,胡桃醌,透析法,葡聚糖凝胶色谱柱法,包封率

Comparison research on two methods for determining entrapment efficiency of Juglone liposome

LUO Guo-wei¹, BAI Chun-qing², XIONG Hua^{1,*}, ZHAO Qiang¹, LEI Li¹, XU Li-qing¹, ZHANG Jian-fei¹, HU Zhen-ying¹, FAN Ting¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: Objective: Two methods for determining entrapment efficiency of juglone liposome were established by comparing the determination results of two method. Methods: Dialysis and dextran gel methods were applied to separate free drugs from liposomes followed by measuring encapsulated Juglone on a UV spectrophotometer. Results: 14h was needed for dialysis method to reach dialysis equilibrium. Free drugs could be effectively separated in 30min by dextran gel method. The content of Juglone showed good linear relationship in the concentration range of 0.005~0.04mg/mL at the wavelength of 425nm. Through the recovery experiment, precision and reproducibility experiment confirmed that the two methods were feasible. Conclusion: A comparison of the two methods suggested that the dialysis method was time-consuming and the resulting value was low, the dextran gel method required less time, was more convenient and the entrapment efficiency measured was closer to the true value.

Key words: liposomes; juglone; dialysis; glucan gel chromatography column method; entrapment efficiency

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)04-0146-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.04.023

胡桃醌(Juglone)属于萘醌类成分,存在于胡桃科核桃属植物胡桃楸(*Jugland mandshurica Maxim*)和核桃(*Juglans regia L*)的根皮、树皮、青果皮(青龙衣)、叶中,在新鲜核桃枝皮中可达0.02~0.4mg/g,目前主要从核桃青皮中提取^[1-3]。胡桃醌具有抗菌作用^[4-6]、抗炎药理作用^[7]及抗肿瘤作用^[8-9],尤其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等有明显的抑制作用,因此其功效越来越受到人们的重视。胡桃醌易溶于氯仿、苯等有机溶剂^[10],微溶于热水,不溶于冷水。胡桃醌水溶性差,限制了其在食品和医药行业中的应用和发展。

脂质体是一种新型的纳米胶囊制备技术,多用于药物和食品功能性成分的载体。脂质体是由脂质双分子层(由磷脂和胆固醇组成)构成的封闭囊泡,可将脂溶性成分载入,改善油溶性物质的亲水性^[11-12]。脂质体还具有细胞亲和性、靶向性、缓释性、降低药物毒性、提高药物稳定性、透皮吸收效率高、可以携带药物进入细胞避免耐受性、改变给药途径等^[13-14]优良特性。通过脂质体包埋胡桃醌可以提高其水溶性和生物活性,而包封率与生物利用率具有重要的关联性。目前国内胡桃醌脂质体的文献报道较少,评价

收稿日期: 2014-06-09

作者简介: 罗国伟(1989-),男,硕士研究生,研究方向: 纳米脂质体产品与特性研究。

* 通讯作者: 熊华(1957-),男,硕士,教授,研究方向: 蛋白质、微胶囊与功能性食品。

基金项目: 国家自然科学基金委员会资助项目(31160317)。

胡桃醌脂质体包封率又无从考查,这对高质量的胡桃醌脂质体制备来说无疑是个缺陷。在前期实验中发现胡桃醌能溶于甲醇、乙醇等溶剂;但不溶于水^[10],磷脂既能溶于水也能溶于其他有机溶剂^[15],且它们的紫外可见光最大吸收波长不存在相互干扰。因此考虑采用紫外分光光度法这一简便的方法测定胡桃醌的浓度。而在众多分离法中透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法是两种最为常用的游离药物与脂质体分离方法。但这两种分离方法结合紫外分光光度法测定胡桃醌脂质体的包封率未有文献报道。

本实验拟采用透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法将脂质体与未包封的游离药物进行分离,利用紫外分光光度法进行测定,进而确定包封率的测定方法,并通过回收率实验进行验证,确定更为简便准确的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胡桃醌 美国Sigma公司;蛋黄卵磷脂 沈阳仙峰科技发展有限公司;胆固醇 上海蓝季科技发展有限公司;葡聚糖凝胶Sephadex G-50 北京索莱宝科技有限公司;pH7.4磷酸盐缓冲溶液(PBS) 按《中华人民共和国药典》2005年版配制;透析袋(MW8000~14000)、无水乙醇 国药集团化学试剂有限公司。

THZ-82型恒温振荡器 常州国华电器有限公司;超声波发生器 上海科导超声仪器有限公司;RE-52AA型旋转蒸发仪 上海亚荣生化科技仪器厂;SHB-3型循环水多用真空泵 郑州杜甫仪器厂;紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;BS224S型分析天平 赛多利斯科学仪器有限公司;N2000型色谱工作站及其组件 杭州亿捷有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胡桃醌脂质体的制备 按照质量比磷脂:胆固醇:胡桃醌=25:5:3称取样品,向其中加入适量的乙醇溶解,旋转蒸发除去乙醇形成薄膜,将pH7.4的磷酸缓冲液注入其中,于45℃振荡水化20min后,超声处理30min得胡桃醌脂质体。

1.2.2 测定波长的确立 以乙醇做空白用紫外可见分光光度计分别扫描磷脂乙醇溶液、胆固醇乙醇溶液、胡桃醌乙醇溶液的紫外可见光吸收。以此确定胡桃醌最佳测定波长。

溶液的配制:分别配制0.1mg/mL胡桃醌乙醇溶液、1mg/mL磷脂乙醇溶液和1mg/mL胆固醇乙醇溶液以及蒸馏水和pH7.4的PBS缓冲液。

测定波长的确定:用乙醇作为空白对比,在紫外可见分光光度计上于200~600nm范围内扫描,确定胡桃醌最佳测定波长。

1.2.3 标准曲线绘制和包封率计算方法 分别配制浓度为0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04mg/mL的胡桃醌乙醇溶液,以乙醇作为空白,参照在1.2.2所确定的测定波长处测定吸光度A,以A对浓度C(mg/mL)进行线性回归分析,绘制标准曲线。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{C_E}{C_T} \times 100$$

式中: C_E —被脂质体包封的胡桃醌量; C_T —未经处理直接测得脂质体中胡桃醌总量;透析法中 C_E 指透析后脂质体包封的胡桃醌质量,葡聚糖凝胶色谱柱法中 C_E 指经分离后脂质体包封的胡桃醌质量。

1.2.4 处理条件

1.2.4.1 破壁条件确定 结合文献资料^[16]及预实验选择乙醇-超声法对脂质体进行破壁。取1mL脂质体溶液采用不同乙醇用量及超声时间进行处理,并用蒸馏水定容至5mL,测定吸光值,确定破壁条件。

1.2.4.2 透析条件确定 分别量取5mL新制备的脂质体溶液装入36个透析袋中,12组每组3个平行,放入烧杯中以500mL PBS缓冲液回流分别于1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22h取出透析后的脂质体,加入10mL乙醇超声10min对脂质体进行破壁,用蒸馏水定容至20mL,紫外分光光度计测定吸光度计算其包封率,以此确定最佳透析时间。

1.2.4.3 葡聚糖凝胶条件的确定 根据文献[17-20]使用葡聚糖Sephadex-G50对包封脂质体和游离药物进行分离。取1mL胡桃醌脂质体溶液上葡聚糖凝胶色谱柱,用pH7.4的PBS缓冲液洗脱,流速控制在1mL/min左右,直至第一个峰完全出峰改用含有20%乙醇的pH7.4的PBS缓冲溶液洗脱,所有流出液连接紫外检测器和N2000色谱工作站最后使用自动收集器接收流出液,包封脂质体流出液加入2mL乙醇超声10min,用PBS缓冲溶液定容至10mL,按标准曲线计算胡桃醌含量推算出包封率。

1.2.5 回收率实验

1.2.5.1 透析法 精确量取适量的胡桃醌乙醇溶液,加入空白脂质体溶液中,在1.2.4确定的最佳条件进行透析及破壁后,按标准曲线计算胡桃醌含量。

1.2.5.2 葡聚糖凝胶色谱柱法 精确量取适量的胡桃醌乙醇溶液,按1.2.4确定的条件进行过柱,收集出峰流出液,按标准曲线计算胡桃醌含量。

1.2.6 精密度及重现性实验 按照1.2.1的方法制备脂质体溶液,按1.2.4确定的条件于同日不同时间及不同日,精确吸取5、1mL脂质体溶液分别采用透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法进行处理,连续实验5次并且按标准曲线计算胡桃醌含量,测定方法的精密度和重现性。

1.3 数据统计处理

实验数据采用SPSS for Windows 12.0软件进行统计分析,数值以3次实验的均值表示,选取 $\alpha=0.05$ 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

从图1中可以得知,以乙醇作为空白对照,胡桃醌溶液有两个吸收峰分别在426nm和245nm处,两吸收峰互不干扰。磷脂溶液有两个吸收峰分别在269nm和232nm处,其中232nm处为最大吸收峰。胆固醇溶液在213nm处有最大吸收。蒸馏水在200~250nm是负值。综上所述,为了避免磷脂、胆固醇以及蒸馏水的紫外吸收干扰,胡桃醌的测定波长选择在426nm。

2.2 胡桃醌标准曲线

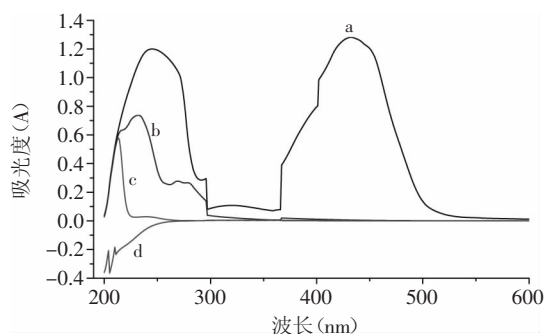


图1 紫外可见吸收光谱图

Fig.1 The absorption spectrum

注: a: 0.1mg/mL胡桃醌乙醇溶液, b: 1mg/mL磷脂乙醇溶液, c: 1mg/mL胆固醇乙醇溶液, d: 蒸馏水。

将一系列浓度的胡桃醌乙醇溶液在425nm处测定吸光度A后,以A对浓度C(mg/mL)进行线性回归分析(如图2所示),得标准曲线方程: $A=21.736C+0.0121$, 相关系数 $R^2=0.9992$, 在0.005~0.04mg/mL的浓度范围内,线性关系良好。

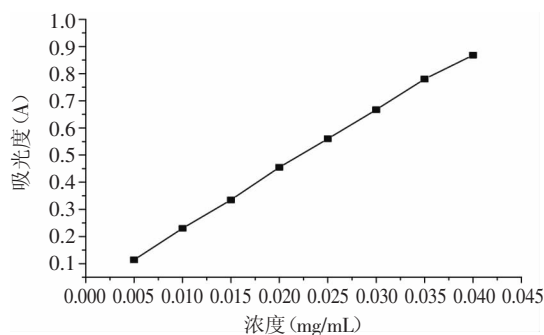


图2 胡桃醌乙醇溶液标准曲线

Fig.2 The standard curve of juglone in ethanol

2.3 破壁条件确定

包封率的测定须用破乳剂破坏脂质体包裹双层膜,破乳效果完全才能使芯材完全从包裹的脂质体中转移到测定溶媒中,破乳剂种类选择在包封率测定中至关重要。胡桃醌不溶于水但能溶于甲醇和乙醇等其他溶剂,磷脂和胆固醇也溶于甲醇和乙醇等其他溶剂。考虑到脂质体溶液是水溶液,使用其他溶剂破乳会造成溶液分层增加分离难度,甲醇、乙醇都能与水互溶并且能破坏脂质体包裹双层膜,而乙醇

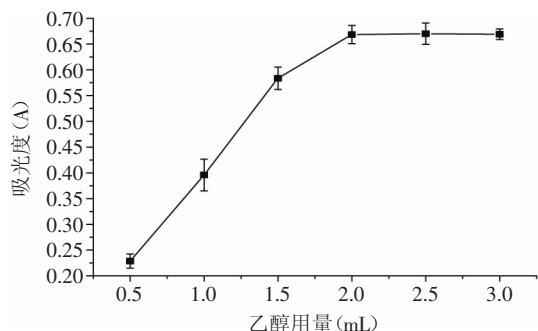


图3 乙醇用量对吸光度的影响

Fig.3 The effect of ethanol volume on absorbance

相对安全(甲醇具有一定的毒性),因此选择乙醇作为破溶剂,考察乙醇用量对破乳后脂质体吸光度的影响,确定较合适的乙醇用量。根据图3可知,随着乙醇用量的增加,吸光度逐渐增大,脂质体破壁越来越严重;当乙醇用量为2mL时,吸光度基本稳定,继续增大乙醇用量,对吸光度几乎没影响,说明乙醇用量为2mL时能充分打开脂质体。根据图4固定乙醇用量为2mL,考察破壁时间对吸光度的影响,发现当超声时间为10min时,吸光度基本稳定,且继续延长破壁时间,吸光度几乎没变化,证明此时样品破壁完全。上述结果确定脂质体的最佳破壁条件为乙醇用量2mL,超声时间10min。

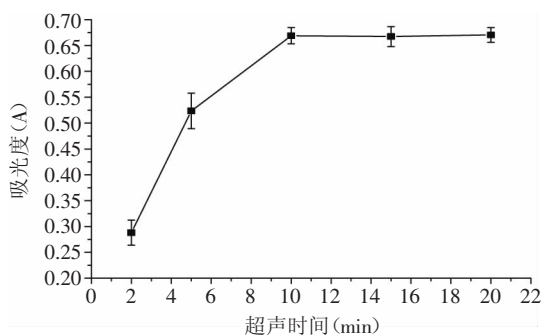


图4 超声时间对吸光度的影响

Fig.4 The effect of ultrasonic time on absorbance

2.4 透析法

为了准确测定脂质体的包封率,将游离药物与脂质体进行分离是最为关键的一步。结合文献资料^[24]及预实验,透析法是一种较为常用的分离方法,且适用于脂溶性药物与脂质体的分离。从图5中可以看出在透析前2h,透析袋内大量游离的胡桃醌导致透析袋内外较大的压力差,胡桃醌快速透析至外界溶液,测定的包封率快速降低;随着透析时间的延长,透析袋内游离的胡桃醌含量降低,透析速率降低,测定值降低较为缓慢,直至较为稳定。图5中可以看出透析14h就几乎将游离的胡桃醌除去了,此时测得的包封率为61.92%。

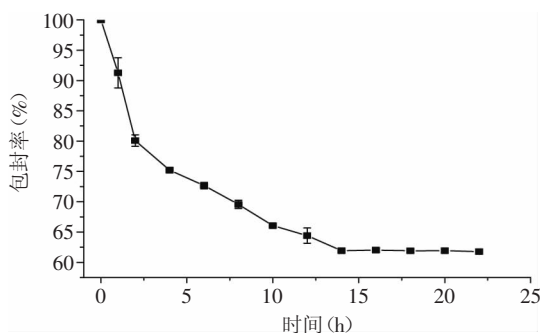


图5 透析时间对包封率的影响

Fig.5 Effect of dialysis time on the entrapment efficiency

2.5 葡聚糖凝胶色谱柱法

根据葡聚糖凝胶色谱柱原理,最先流出的是分子质量最大的,所以图6中a为包封脂质体,b为游离

药物。从图6中可以看出分离效果非常好,并且分离所需时间很短。收集的包封脂质体经乙醇一超声破壁后于425nm处测量吸光度,未过柱样品破壁后采用相同方法测定吸光度,经计算该方法所测包封率为73.57%。根据文献[11-14]所报道,需要根据时间收集流出液测定吸光值,以流出液份数为横坐标以吸光值为纵坐标做图,观察曲线出峰情况以此判断分离效果。考虑到胡桃醌具有颜色并且会使包封脂质体产生颜色变化,流出液中的物质变化会引起紫外检测器电流变化,由N2000色谱工作站收集的信号自动绘制时间—电压变化曲线图,并且实验过程中可以清晰的看见两个条带,包封的脂质体条带(颜色更浅)移动速度快于游离药物条带(颜色更深),与图6显示相吻合,从侧面佐证了此方法可行。本实验方法优越性在于可以在色谱工作站中直接观察到包封脂质体和游离药物出峰情况并且直接收集包封脂质体流出液,无需测定每份流出液吸光值绘制出峰曲线,只需直接收集包封脂质体流出液并测定吸光值,分离效果更佳,操作更简单。

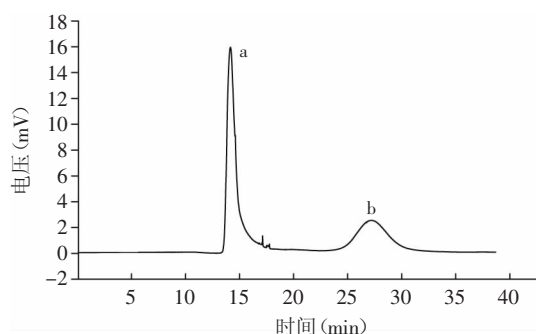


图6 样品梯度洗脱曲线

Fig.6 Gradient elution curves of sample
注:a:包封脂质体;b:游离药物。

对比透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法这两种方法,可以发现透析法的测定结果低于葡聚糖凝胶柱色谱法的测定结果,这可能是透析法耗时过长导致被包封的胡桃醌泄露,引起直接测定包封率偏小,而葡聚糖凝胶色谱柱法测定过程耗时短(30min内即可将游离胡桃醌与脂质体进行分离),药物泄露少,所以葡聚糖凝胶色谱柱法测定的包封率更为真实。

2.6 回收率实验

本实验测定的回收率实验结果如表1所示,两种方法平均回收率均高于99%,RSD<2%,表明这两种方法可行。

表1 回收率实验结果

Table 1 Results of recovery

类别	加入量 (mg/mL)	测定值 (mg/mL)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
透析法	0.006	0.005976	99.6	99.52	1.89
	0.015	0.015204	101.36		
	0.03	0.029281	97.6		
葡聚糖凝胶 色谱柱法	0.01	0.009847	98.47	99.38	1.85
	0.02	0.019638	98.19		
	0.03	0.030451	101.5		

2.7 精密度实验

精密度及重现性实验结果如表2所示,透析法和葡聚糖凝胶色谱柱法的测定结果显示RSD<5%,说明这两种方法的精密度及重现性较好。

3 结论

根据胡桃醌、磷脂和胆固醇吸收峰不同,确定胡桃醌的测定波长为425nm,在此波长下完全可以排除磷脂和胆固醇的干扰。胡桃醌标准曲线 $A=21.736C+0.0121$,相关系数 $R^2=0.9992$,在0.005~0.04mg/mL的浓度范围内,线性关系良好。

对比两种测定方法可知透析法耗时较长测定的包封率值偏低,葡聚糖凝胶色谱柱法测定所需时间更短,更便捷,测出的包封率更接近真实值。

参考文献

- [1] 李秀凤,张艳舫,刘淑萍. 碱提酸沉淀法提取核桃青皮中胡桃醌的研究[J]. 食品科技,2014,39(3):173-175.
- [2] 王文泽,刘洪章,刘淑英,等. 核桃青果皮中胡桃醌的提取工艺研究[J]. 北方园艺,2013(15):153-157.
- [3] 魏赫楠,谭红,包娜,等. 核桃青皮中胡桃醌的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):215-217.
- [4] Fischer T C, Gosch C, Mirbeth B, et al. Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(49):12074-12081.
- [5] 吴朝霞,高跃,黄姝,等. 胡桃醌对大肠杆菌细胞膜的作用研究[J]. 食品科学,2012,33(17):193-197.
- [6] 吴朝霞,陈光启,王媛. 胡桃醌对几种常见食品腐败微生物的抑制作用[J]. 中国酿造,2009,28(8):76-78.
- [7] Kim S H, Lee K S, Son J K, et al. Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica*[J]. Journal of Natural Products, 1998, 61(5):643-645.
- [8] Xu H, Yu X, Qu S, et al. Juglone, isolated from *Juglans*

表2 精密度及重现性实验结果

Table 2 Result of precision and reproducibility

类别		测定值(ug/mL)					平均值(ug/mL)	RSD(%)
		1	2	3	4	5		
透析法	日内	22.62	24.012	22.56	22.236	21.933	22.672	3.519
	日间	21.48	20.963	22.606	20.627	19.811	21.097	4.923
葡聚糖凝胶 色谱柱法	日内	10.931	11.559	10.935	10.727	10.97	11.025	2.846
	日间	11.226	11.318	12.603	11.762	11.878	11.226	4.66

mandshurica Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23(12): 3631-3634.

[9] Kwiecinski M R, Pedrosa R C, Felipe K B, et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 421(2): 268-273.

[10] 陆婉, 曲中原, 邹翔, 等. 胡桃醌的研究进展[J]. 2008年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集, 2008.

[11] Bai C, Peng H, Xiong H, et al. Carboxymethylchitosan-coated proliposomes containing coix seed oil: Characterisation, stability and *in vitro* release evaluation[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1695-1702.

[12] Zhao L P, Xiong H, Peng H, et al. PEG-coated lyophilized proliposomes: preparation, characterizations and *in vitro* release evaluation of vitamin E[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(4): 647-654.

[13] 杨鹏波, 张华. 脂质体的研究新进展[J]. 浙江中医药大学

学报, 2013(7): 936-939.

[14] 白春清. 羧甲基壳聚糖包载薏苡仁油前体脂质体的制备, 表征, 稳定性及体外释放研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.

[15] 张秀青, 于才渊. 高纯卵磷脂的分离提纯方法[J]. 粮油加工与食品机械, 2006(4): 45-48.

[16] 吴道澄, 席晓莉, 胡佳蕙. 分光光度法测定阿霉素脂质体中的磷脂含量[J]. 解放军药学报, 2004, 15(3): 48-49.

[17] 桂双英, 温志强, 彭代银, 等. 汉防己甲素脂质体包封率的测定[J]. 安徽中医学院学报, 2009, 28(5): 70-72.

[18] 陈蓓, 袁明奎, 王建华, 等. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定阿苯达唑纳米脂质体包封率的方法研究[J]. 中国药房, 2012, 23(45): 4281-4284.

[19] 高晓黎, 季兴梅. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(7): 515-517.

[20] 赵怡, 孟路华, 潘黎军, 等. 抗肝纤维化姜黄素脂质体的制备及初步稳定性考察[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(4): 582-585.

[21] 雷筱芬, 刘玉珍. 薏苡仁油脂质体包封率测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 61-63.

(上接第142页)

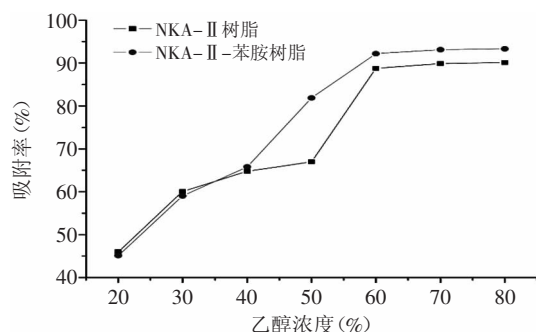


图6 乙醇浓度对解吸率的影响 ($n=3$)

Fig.6 Effect of ethanol concentration on the desorption rate ($n=3$)

芦醇。对NKA-II树脂进行结构优化, 将其氯甲基化, 再接枝苯胺, 引入了可与白藜芦醇分子中的羟基形成氢键的仲胺键。对白藜芦醇的吸附和解吸性有了明显的增强, 当样品溶液pH=4, 白藜芦醇质量浓度为 $0.10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 吸附时间为300min, 乙醇60%解吸时, 其对白藜芦醇的吸附率由87.62%提高到95.85%, 解吸率由88.75%提高到92.19%。可见NKA-II-苯胺树脂更适宜用于白藜芦醇的分离纯化。

(上接第145页)

[2] 李拖平, 李苏红, 宋玉蓉, 等. 山楂果胶寡糖及其复合物对枯草杆菌的抗菌作用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 154-156.

[3] 马亚琴, 孙志高, 吴厚玖, 等. 响应面法优化提取甜橙皮渣中果胶的工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 10-13.

[4] 冯静, 梁瑞红, 刘成梅. 菠萝皮果胶的提取及结构组成研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 241-243.

[5] 杜丽娟, 李拖平, 王娜, 等. 山楂果胶分解物抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 18-20.

[6] 董银萍, 李拖平. 山楂果胶的抗氧化活性[J]. 食品科学,

2014, 35(3): 29-32.

[7] 韦诗琪. 菠萝蜜丝中果胶的分离、分析及其抗氧化性研究[D]. 广东: 华南理工大学, 2011.

[8] 张俊生, 陈莉华, 张文龙. 湘西节节草总黄酮的超声波提取及抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 71-75.

[9] 张俊生, 陈莉华, 朱士龙, 等. 节节草多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 86-89.

[10] 王琴, 区子升. 芥末油抗氧化性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 100-103.

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 194-195.

[2] 杨建文, 杨彬彬, 张艾, 等. 中药虎杖的研究与应用开发[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 156-159.

[3] 孟雪莲, 杨静玉, 吴春福. 白藜芦醇的药理学作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, (Z1): 51-54.

[4] 何伟, 李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134-136.

[5] 汪洪武, 刘艳清. 大孔吸附树脂的应用研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(4): 353-356.

[6] 刘丹, 汤海峰, 张三奇, 等. 大孔吸附树脂吸附纯化虎杖有效部位的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1019-1024.

[7] 刘莉, 季金苟, 唐南南, 等. 虎杖中大黄素的分离纯化工艺研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2034-2037.

[8] 刘睿, 王芃, 施荣富, 等. 氢键吸附树脂的合成及高纯度沙棘叶黄酮的制备[J]. 高分子学报, 2010(10): 1211-1217.

[9] 申东升. 芳香烃氯甲基化反应的综述[J]. 化学研究与应用, 1999, 11(3): 229-234.