

· 化学与分析 ·

HPLC-DAD 同时测定白花蛇舌草中 2 个活性蒽醌类成分

曹广尚¹, 杨培民^{1*}, 张加余^{2*}, 李芳^{1,3}, 倪健², 高鹏³

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-DAD 测定白花蛇舌草药材中 2 个蒽醌类成分 2-甲基-3-甲氧基蒽醌(蒽醌 I)、2, 3-二甲氧基-6-甲氧基蒽醌(蒽醌 II)含量的方法。方法: 采用 ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸溶液(48:52), 检测波长 265 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果: 蒽醌 I 在 0.998 ~ 9.98 μg ($r = 0.999\ 6$)、蒽醌 II 在 0.675 ~ 6.75 μg ($r = 0.999\ 9$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.87% (RSD 1.13%) 和 99.51% (RSD 0.69%)。不同批次的白花蛇舌草药材中蒽醌 I 和蒽醌 II 成分含量差异较大, 蒽醌 I 和蒽醌 II 的比例也无明显规律。结论: 该方法简单、准确, 适用于白花蛇舌草药材中 2-甲基-3-甲氧基蒽醌和 2, 3-二甲氧基-6-甲氧基蒽醌的质量控制。

[关键词] 白花蛇舌草; 2-甲基-3-甲氧基蒽醌; 2, 3-二甲氧基-6-甲氧基蒽醌; 高效液相色谱-二级管阵列

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0054-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1405.005.html>

[网络出版时间] 2014-08-29 14:05

Determination of Two Anthraquinones in Hedyotidis Herba by HPLC-DAD

CAO Guang-shang¹, YANG Pei-min^{1*}, ZHANG Jia-yu^{2*}, LI Fang^{1,3}, NI Jian², GAO Peng³

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250011, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish an HPLC-DAD method for the determination of 2-methy-3-methoxyanthraquinone, 2, 3-dimethoxy-6-methoxyanthraquinone in Hedyotidis Herba. **Method:** The assay was performed on a ZORBAX Extend-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile - 0.5% phosphate (48:52). The detection wavelength was 265 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was set at 25 °C. **Result:** The calibration curves were linear in the ranges of 0.998-9.98 μg ($r = 0.999\ 6$) for anthraquinone I and 0.675-6.75 μg ($r = 0.999\ 9$) for anthraquinone II. The average recoveries of anthraquinone I and anthraquinone II were 99.87% (RSD 1.13%) and 99.51% (RSD 0.69%), respectively. **Conclusion:** The method is simple and accurate for the quality control of 2-methy-3-

[收稿日期] 20140507(028)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274052, 81303206); 山东省自然科学基金项目(ZR2011HL043); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013YY052)

[第一作者] 曹广尚, 主管药师, 从事中药制剂工作, Tel: 0531-68617919, E-mail: cgs198041@163.com

[通讯作者] * 杨培民, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂相关研究, Tel: 0531-68617607, E-mail: jnymp7777@163.com;

* 张加余, 博士后, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13716990438

methoxyanthraquinone and 2, 3-dimethoxy-6-methoxyanthraquinone in Hedyotidis Herba.

[**Key words**] Hedyotidis Herba; 2-methy-3-methoxyanthraquinone; 2, 3-dimethoxy-6-methoxyanthraquinone; HPLC-DAD

白花蛇舌草始载于《广西中药志》,又称蛇舌草、蛇舌癩、蛇总管等,为茜草科植物白花蛇舌草的干燥全草^[1],具清热、利湿、解毒之功效,主要用于抗肿瘤、提高免疫力、抗炎、抗氧化、抗化学诱变^[2-3],中医临床使用广泛,疗效确切。现代研究表明,白花蛇舌草中主要物质基础为蒽醌、黄酮、环烯醚萜和多糖等成分^[4-6]。其中蒽醌类成分以其良好的药理活性、稳定的化学性质和可控的含量区间受到研究者青睐,而对于其中指标成分的质控方法鲜见报道^[7]。本文在前期研究的基础上,针对药效确切的白花蛇舌草蒽醌有效部位,参考有关文献^[8-10]从中分离出2-甲基-3-甲氧基蒽醌(蒽醌I)和2,3-二甲氧基-6-甲基蒽醌(蒽醌II)2个成分,经初步药效学实验证实,具有良好的抗肿瘤活性,本研究以其为指标采用HPLC-DAD同时测定了不同批次白花蛇舌草药材中的含量,为建立其质控方法提供科学参考。

1 材料

1260系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AE200s型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),KQ-5200DA型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

蒽醌I、蒽醌II均为本课题组自制,经北京中医药大学科研测试中心采用HPLC归一法验证质量分数>97.0%。乙腈为色谱纯(美国Fisher公司),磷酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯。

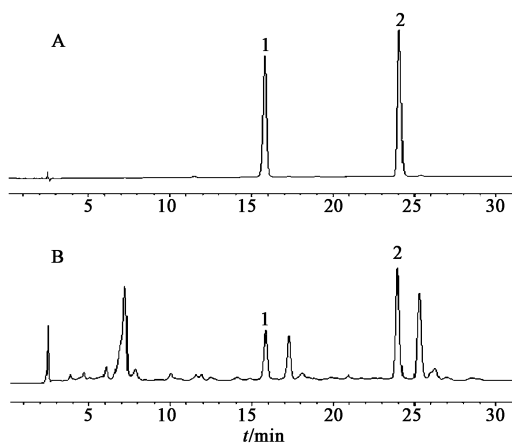
白花蛇舌草由山东中医药大学附属医院药学部提供(产地为安徽亳州),经北京中医药大学倪健教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Wild.) Roxb. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.5%磷酸(48:52),进样量10 μL,检测波长265 nm,柱温25℃,流速1.0 mL·min⁻¹,各成分分离度良好。见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称蒽醌I和蒽醌II对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.998,0.675 g·L⁻¹的混合对照品贮备溶液。



1. 蒽醌 I; 2. 蒽醌 II

图1 混合对照品(A)和白花蛇舌草样品(B)HPLC

2.2.2 供试品溶液 取白花蛇舌材粉末(过40目筛),约1.0 g,精密称定,置烧瓶中,准确加入甲醇50 mL,水浴回流1 h,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察 精密量取上述混合对照品贮备溶液1,3,5,7,9,10 mL分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,分别吸取上述各溶液10 μL注入液相色谱仪,记录峰面积,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,蒽醌I,II的回归方程分别为 $Y = 1\,963.54X - 62.28$ ($r = 0.999\,6$), $Y = 1\,843.23X - 91.98$ ($r = 0.999\,9$),线性范围分别为0.998~9.98 μg,0.675~6.75 μg。

2.4 精密度试验 精密量取混合对照品溶液,按上述色谱条件连续进样6次,结果蒽醌I和蒽醌II峰面积RSD分别为0.67%,0.59%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密量取同一份供试品溶液10 μL,分别于0,2,4,8,12,24 h注入液相色谱仪,记录峰面积积分值,结果蒽醌I和蒽醌II含量的RSD分别为1.18%,1.01%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称定同一批次样品约1.0 g,共6份,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下注入液相色谱仪,记录峰面积,结果蒽醌I和蒽醌II含量的RSD分别为1.23%,1.12%。表明该方法具有良好的重复性。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一

白花蛇舌草样品各 6 份,每份约 0.5 g,分别精密加入一定量的葱醌 I 和葱醌 II 混合对照品溶液适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下分析测定。结果见表 1。

表 1 白花蛇舌草中两种成分加样回收率试验

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
葱醌 I	0.426	0.43	0.855	99.70	99.87	1.13
	0.428	0.43	0.857	99.95		
	0.413	0.43	0.851	101.81		
	0.422	0.43	0.850	99.67		
	0.423	0.43	0.852	99.79		
	0.427	0.43	0.850	98.30		
葱醌 II	0.340	0.355	0.694	99.52	99.51	0.69
	0.346	0.355	0.700	99.72		
	0.342	0.355	0.695	99.38		
	0.343	0.355	0.693	98.42		
	0.349	0.355	0.706	100.56		
	0.345	0.355	0.698	99.46		

2.8 样品含量测定 取产地为安徽亳州的 10 个不同批次白花蛇舌草药材,按上述供试品溶液的制备方法制备,在上述色谱条件下进样分析,测定,每批样品测定 3 份,结果见表 2。

表 2 白花蛇舌草样品含量测定(n=3) mg·g⁻¹

批次	葱醌 I	葱醌 II
20130928	0.48	0.39
20131016	0.26	0.37
20131207	0.59	0.64
20140219	0.47	0.28
20140302	0.69	0.33
20140317	0.48	0.54
20140325	0.37	0.25
20140401	0.85	0.68
20140412	0.32	0.49
20140420	0.51	0.50

3 讨论

历版《中国药典》和各地方中药材标准均未对白花蛇舌草药材进行定性、定量控制。随着该药材临床应用与日俱增,野生品产量已不能满足医疗需要,市场上白花蛇舌草和同科属栽培品鱼目混珠,严

重影响了其临床疗效。建立并提升本药材的质控方法具有十分重要的学术价值和临床意义。

本研究采用 DAD 检测器进行全波长扫描(190~450 nm),结果 265 nm 时 2 个葱醌成分均有最大吸收,且杂质成分干扰少,故选择 265 nm 作为检测波长。流动相优选时分别考察了乙腈-水、乙腈-磷酸水系统等,结果以乙腈-0.5% 磷酸为流动相时,样品峰分离度好,故最终确定此流动相。供试品制备时比较甲醇、乙醇等溶剂的提取效果,考察了回流、超声等提取方法。结果表明,以甲醇回流提取 1 h 提取率最佳。

样品测定结果表明,不同批次的白花蛇舌草药材中葱醌 I 和葱醌 II 成分含量差异较大,葱醌 I 和葱醌 II 的比例也无明显规律,尚需对多产地、多批次白花蛇舌草样药材进行测定,探讨地域、气候等对成分含量的影响规律,可为白花蛇舌草药材标准的建立提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 23.

[2] 樊宏伟,洪敏,余黎,等. 白花蛇舌草抑制 HL60 和 B16BL6 细胞肿瘤活性的作用研究[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(20):1754.

[3] 陈秀珍,朱大诚,王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J]. 中药材,2009,32(1):157.

[4] 黄建荣,刘咏海,喻志标,等. 白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J]. 中成药,2005,27(11):1329.

[5] 施峰,贾晓斌,贾东升,等. 白花蛇舌草预防肺癌物质基础研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(3):403.

[6] 吴孔松,张冲,谭桂山,等. 白花蛇舌草化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(11):817.

[7] 刘艳群,殷文杰,左琳,等. HPLC 同时测定白花蛇舌草中 2 种葱醌化合物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):42.

[8] Kim D H, Lee H J, Oh Y J, et al. Iridoid glycosides isolated from *Oldenlandia diffusa* inhibit LDL-oxidation [J]. Arch Pharm Res, 2005,28(10):1156.

[9] Tai D F, Lin Y M, Chen F C. Components of *Hedyotis diffusa* Wild[J]. Hua Hsueh, 1979(3):60.

[10] Ho T I, Chen G P, Lin Y C, et al. An anthraquinone from *Hedyotis diffusa* [J]. Phytochem, 1986, 25(8):1988.

[责任编辑 顾雪竹]