

## HPLC同时测定白花蛇舌草中2种蒽醌化合物的含量

刘艳群, 殷文杰, 左琳, 满其倩, 吕青涛\*, 蒋海强, 巩丽丽  
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 建立白花蛇舌草药材中2种蒽醌化合物2-羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌(蒽醌I)和2-羟基-1-甲氧基蒽醌(蒽醌II)含量测定的方法。方法: 采用Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水(60:40)等度洗脱, 流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长272 nm, 柱温25℃。结果: 蒽醌I和蒽醌II分别在4.0~160 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.9996)和4.0~160 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.9995)线性关系良好, 平均加样回收率(*n*=9)分别为99.27%, 99.08%, 供试品溶液在24 h内稳定。结论: 该方法精密度高, 准确度高, 适合于白花蛇舌草药材中2-羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌和2-羟基-1-甲氧基蒽醌含量的测定。

**[关键词]** 白花蛇舌草; 2-羟基-1-甲氧基蒽醌; 2-羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌; 高效液相色谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0042-03

**[doi]** 10.11653/syfy2014040042

## Determination of Two Anthraquinones in *Hedyotis diffusa* by HPLC

LIU Yan-qun, YIN Wen-jie, ZUO Lin, MAN Qi-qian, LV Qing-tao\*, JIANG Hai-qiang, GONG Li-li  
(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for quantitative determination of 2-hydroxy-3-methoxy-7-methylanthraquinone (anthraquinone I) and 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone (anthraquinone II) in *Hedyotis diffusa*. **Method:** A Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with a mobile phase of methanol-water (60:40) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was set at 272 nm and the column temperature was 25℃. **Result:** The calibration curves were linear in the ranges of 4.0-160 mg·L<sup>-1</sup> (*r*=0.9996) for anthraquinone I and 4.0-160 mg·L<sup>-1</sup> (*r*=0.9995) for anthraquinone II. The average recoveries (*n*=9) of anthraquinone I and anthraquinone II were 99.27% and 99.08%, respectively. The sample solution was steady within 24 h. **Conclusion:** The method is precise and accurate for determination of 2-hydroxy-3-methoxy-7-methylanthraquinone and 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone in *H. diffusa*.

**[Key words]** *Hedyotis diffusa*; 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone; 2-hydroxy-3-methoxy-7-methylanthraquinone; HPLC; quantitative determination

白花蛇舌草为茜草科一年生草本植物白花蛇舌草的全草, 又名蛇舌草、节节结蕊草、蛇总管(福建)等。白花蛇舌草性味苦甘、寒, 入心、肝、脾三经, 具有清热、利湿、解毒的功能<sup>[1-2]</sup>。近代研究发现, 白

花蛇舌草具有抗肿瘤、提高机体免疫功能、抗衰老、抗氧化、保肝利胆、抗化学诱变等作用<sup>[3-5]</sup>。据研究, 白花蛇舌草中主要的化合物有蒽醌类、萜类、有机酸类、生物碱类、黄酮类和甾醇类等<sup>[6-8]</sup>。文献报道白花蛇舌草含量的测定多是槲皮素、齐墩果酸、咖啡酸、山柰酸、熊果酸及环烯醚萜类等化合物<sup>[9-12]</sup>, 而蒽醌化合物含量测定的报道较少。本研究建立了HPLC同时测定白花蛇舌草中2-羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌(蒽醌I)和2-羟基-1-甲氧基蒽醌(蒽醌II)含量的方法, 并测定了3批药材中两种蒽醌化合物的含量, 为白花蛇舌草药材质量

**[收稿日期]** 20130922(031)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173614)

**[第一作者]** 刘艳群, 硕士研究生, 从事药物化学研究, Tel: 13026597386, E-mail: liuyanqunsd@163.com

**[通讯作者]** \*吕青涛, 博士, 副教授, 从事天然药物化学成分及化学分析研究, Tel: 13905316839, E-mail: luqingtao9@163.com

控制研究提供了参考依据。

## 1 仪器与试剂

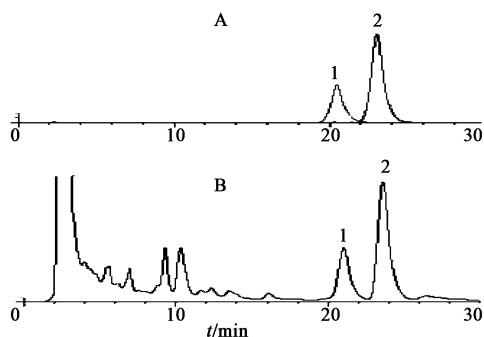
Agilent 1200 型高效液相色谱仪(VWD 检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机,美国安捷伦公司),AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司)。

甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),水(纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司),无水乙醇(分析纯,天津市达森化工产品销售有限公司)。蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品为本实验室提取制备,通过<sup>13</sup>C-NMR,<sup>1</sup>H-NMR,理化性质及参考文献<sup>[13-14]</sup>确定其结构,经 HPLC 检测蒽醌 I 和蒽醌 II 纯度均 >98%。

白花蛇舌草药材购自济南市建联中药店以及漱玉平民大药房(批号分别为 20130201,20120301,121002),经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定为茜草科草本植物白花蛇舌草全草 *Hedyotis diffusa* Willd.。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(60:40)等度洗脱,检测波长 272 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,进样量 20 μL。对照品及供试品色谱见图 1。以蒽醌 I 和蒽醌 II 化合物计算理论塔板数均在 4 600 以上。



1. 2-羟基-3-甲氧基-7-甲基蒽醌

2. 2-羟基-1-甲氧基蒽醌

图 1 蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品(A)及批号为 20130201 的供试品(B)色谱

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品适量,以甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,制得 1.0 g·L<sup>-1</sup>蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品储备液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取白花蛇舌草粉末(20~40 目)约 3 g,精密称定,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 60 mL 无水乙醇,95 °C 水浴回流提取

2.0 h,共提取 3 次,滤过,合并滤液,水浴蒸干,以甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,制得供试品溶液。

**2.4 线性关系的考察** 精密量取 2.2 项下蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品的储备液 0.040,0.20,0.40,0.80,1.2,1.6 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得 4.0,20,40,80,120,160 mg·L<sup>-1</sup>的蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品溶液。分别取不同质量浓度蒽醌 I 和蒽醌 II 的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以峰面积 A 对浓度 C(mg·L<sup>-1</sup>)进行线性回归,其回归方程分别为  $A_{\text{I}} = 54.64C_{\text{I}} + 212.8$  ( $r = 0.9996$ );  $A_{\text{II}} = 126.7C_{\text{II}} + 623.4$  ( $r = 0.9995$ );表明两种蒽醌化合物在 4.0~160 mg·L 浓度与峰面积线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 取 2.3 项下批号为 20130201 的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续测定 6 次,记录蒽醌 I 和蒽醌 II 的峰面积,结果 RSD 分别为 0.34%,0.35%,说明该方法精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取批号为 20130201 白花蛇舌草粉末(20~40 目)约 3 g,精密称定 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果药材中蒽醌 I 和蒽醌 II 的平均含量分别为 0.051%,0.049%,RSD 分别为 1.2%,1.1%,表明该方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样分析,记录蒽醌 I 和蒽醌 II 的峰面积,其 RSD 分别为 1.2%,0.72%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收试验** 取已知含量同一批号(20130201)的白花蛇舌草粉末(20~40 目)3 g,精密称定 9 份,每 3 份加入相同量的蒽醌 I 和蒽醌 II 对照品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算蒽醌 I 和蒽醌 II 的回收率,结果见表 1。

表 1 白花蛇舌草中蒽醌 I 和蒽醌 II 的加样回收试验(n=3)

成分	已知量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD /%
蒽醌 I	511	391	901	99.74	1.42
	514	512	1 024	99.61	1.62
	516	652	1 158	98.47	1.53
蒽醌 II	491	361	846	98.35	1.68
	492	487	982	100.6	1.59
	489	585	1 064	98.29	1.36

**2.9 含量测定** 取 3 批白花蛇舌草粉末(20~40 目)各 3 份,每份 3 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,测定蒽醌 I 和蒽醌 II 的峰面积,按 2.4 项下回归方程计算样品中蒽醌 I 和蒽醌 II 的含量,结果见表 2。

表 2 3 批白花蛇舌草药材中 2 种蒽醌的含量测定( $n=3$ )

批号	蒽醌 I		蒽醌 II	
	含量	RSD	含量	RSD
	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\%$	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\%$
20130201	0.51	1.1	0.49	0.78
121002	0.48	0.95	0.48	1.2
20120301	0.16	0.46	0.22	0.92

### 3 讨论

**3.1 提取方法的考察** 分别考察了水、乙醇、乙酸乙酯的加热回流提取,比较 3 种溶剂提取效果,结果显示采用乙醇进行加热回流提取,测得的蒽醌 I 和蒽醌 II 含量最高,其次对提取次数进行考察,分别考察提取 2 次、3 次和 4 次,结果显示以无水乙醇加热回流提取 3 次即可提取完全。

**3.2 检测波长的考察** 对 2 种蒽醌化合物分别在波长为 200~400 nm 测定紫外吸收光谱,结果显示两种化合物均在 272 nm 左右有最大吸收,因此选择 272 nm 作为检测波长。

**3.3 流动相的选择** 分别以甲醇-水的比例为 80:20,70:30,65:35 和 60:40 作为流动相,对供试品溶液进样分析,结果显示以甲醇-水(60:40)进行等度洗脱时蒽醌 I 和蒽醌 II 的分离度均  $>1.5$ ,分离效果较好。

### [参考文献]

[1] 江西省卫生厅. 江西省中药材标准[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1997:73.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草精选本[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:433.

[3] 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.

[4] 刘瑾. 白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌肿瘤组织 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):227.

[5] 罗先钦,兰波,杨雪,等. 白花蛇舌草抗肿瘤和免疫调节作用研究进展[J]. 重庆中草药研究,2011,63(1):35.

[6] 康兴东,李锐,毛羽,等. 白花蛇舌草的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(8):479.

[7] 曾永长,梁少瑜,邢学峰,等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):26.

[8] 杨帅,杨文文,胡金芳,等. GC-MS 结合保留指数分析白花蛇舌草挥发性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):93.

[9] 孙也之,王琳,刘振,等. 高效液相色谱法测定白花蛇舌草中槲皮素的含量[J]. 广东药学院学报,2007,23(1):5.

[10] 陈薇,罗昱澜,杨寒艳. HPLC 法测定白花蛇舌草中槲皮素和山奈素的含量[J]. 华夏医学,2008,21(5):899.

[11] 杨宜华,陈玉祥. 液质联用法测定白花蛇舌草齐墩果酸与熊果酸含量[J]. 医药导报,2008,27(5):589.

[12] 李乐道,秦书德. HPLC 法测定白花蛇舌草药材中 2 种环烯醚萜类成分含量[J]. 西北药学杂志,2011,26(5):327.

[13] 吴孔松,张坤,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.

[14] Susana C Nunez, Montoya, Alicia M Agnese, et al. Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* [J]. J Nat Prod,2006(69):801.

[责任编辑 顾雪竹]