

## 蒽醌类化合物的定性定量方法研究进展

朱 蕾 王竹天 杨大进

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**就蒽醌类化合物的定性、定量方法研究进展进行了综述。其中定性方法包括薄层色谱法,质谱法(MS)、氢谱法(HNMR)、碳谱法(CNMR)、核磁法(DEPT)的联用,红外光谱法、可见光谱法、紫外光谱法等。定量方法包括比色法、高效液相色谱法(HPLC)、薄层扫描法、毛细管电泳法(CE)等。

**关键词:**蒽醌类;定性;定量;化学,分析

## Quantitative and Qualitative Methods for Determination of Anthraquinones

ZHU Lei, WANG Zhu-tian, YANG Da-jin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** This paper is a summary of the recent developments of analytical techniques for the determination of anthraquinones. The qualitative techniques include TLC, combined use of MS, HNMR, CNMR and DEPT, infrared chromatography, visible light chromatography and ultraviolet chromatography. The quantitative methods include colorimetry, HPLC, TLC and CE.

**Key word:** Anthracenediones; Qualitative Method; Quantitative Method; Chemistry, Analytical

决明子、大黄、何首乌等常用中药主要活性成分为蒽醌类化合物。各种蒽醌及其苷都具有多方面的生物活性,主要表现为降血脂、降胆固醇、利尿、抗氧化、抗过氧化等重要作用。但是蒽醌类化合物也有多种毒性作用,主要引起胃肠的各种不适,严重的可能会导致胃肠出血、呼吸困难、心悸和流体损耗。因此各种类型中成药、保健品中蒽醌类物质的质量控制十分重要。目前此类化合物的定性定量分析方法研究很多,本文就其进展进行概述。

## 1 蒽醌类化合物的定性分析

红外光谱法 张文惠等<sup>[1]</sup>对烟气中大黄酚进行

了红外分光光度法鉴别,将样品的红外光谱和标准品进行对照,考察2个红外光谱图的峰位和峰形是否基本一致,以此鉴别蒽醌类化合物。此方法最突出的特点是特征性强,用量少。利用傅立叶变换红外光谱,可以根据指纹图谱峰位置的差异、峰强度-吸光度比值、指纹图谱峰形的不同,鉴别不同的蒽醌类物质<sup>[2]</sup>。

## 2 蒽醌类化合物的定量分析

2.1 分光光度法 陈军等<sup>[3]</sup>、马长清等<sup>[4]</sup>对分光光度法进行了改进,改进后的方法操作简便,结果可靠,稳定性好,不易受日光照射影响,弥补了碱液法

- [23] Damien E, Price J S. The estrogen receptor's involvement in osteoblasts adaptive response to mechanical strain[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13:1275.
- [24] 李大为,秦林林. 异黄酮类药 Genistein 对原代培养大鼠成骨细胞增殖、分化、钙含量及矿化功能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 4: 307-310.
- [25] 田玉慧,李万里. 大豆异黄酮对成骨细胞生长因子表达的影响[J]. 中国公共卫生, 2003, 12: 1438-1439.
- [26] Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells[J]. J Toxicology, 2004, 196:137-145.

- [27] 涂平生,徐杰. 雌激素类治疗骨质疏松研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2003, 4: 24-25.
- [28] Cao Y H, Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: apoptosis is induced through Ca<sup>2+</sup> signaling[J]. J Biol Pharm Bull, 1999, 22: 805-809.
- [29] Cao Y H, Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation[J]. J Mol Med, 2000, 5: 261-267.

[收稿日期:2005-11-09]

中图分类号:R15;Q579.13;O614.231 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2006)02-0152-04

作者简介:朱蕾 女 硕士生

通讯作者:王竹天 男 研究员

蒽醌类化合物的定性定量方法研究进展——朱蕾 王竹天 杨大进

— 155 —

显色后不稳定、易衰减的缺点。

林新华等<sup>[5]</sup>运用双波长标准分光光度法同时测定芦荟中蒽醌类化合物芦荟大黄素甙和芦荟大黄素的含量,达到改善选择性又不降低灵敏度的目的,样品加标回收率均在 100% ± 5% 范围内。吕鹏等<sup>[6]</sup>运用系数倍率分光光度法测定消肿散瘀软膏中蒽醌类成分的含量和大黄中总蒽醌定量,由于基质凡士林和羊毛脂的影响,容易造成误差,故采用系数倍率法测定,该法可消除基质干扰。

## 2.2 高效液相色谱法(HPLC)

2.2.1 HPLC 法对中药材中蒽醌类物质的测定 大岛俊幸等<sup>[7]</sup>运用高效液相色谱法测定何首乌和夜交藤中的蒽醌类成分含量,样品通过萃取和回流水解成为游离型和结合型蒽醌定量用试样溶液,直接测定结合型和游离型蒽醌,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性范围为 0.8 ~ 40.0 μg/ml。

兰红梅等<sup>[8]</sup>用 symmetry C<sup>18</sup> 色谱柱,甲醇 + 0.1% 磷酸溶液(90 + 10)为流动相,在检测波长 440 nm 的条件下同时测定了决明子中 6 种蒽醌类化合物的含量(芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、决明素)。结果,6 种物质线性范围 0.063 ~ 0.544 0 μg。混合对照品溶液在 6.5 h 内基本稳定。

2.2.2 HPLC 法对中成药中蒽醌类物质的测定 洪筱坤等<sup>[9]</sup>对含大黄中成药的 4 种不同的剂型进行定性定量分析。色谱柱为 μ-Bondapak C<sup>18</sup> 柱,流动相为甲醇 + 1% 高氯酸(85 + 15),检测波长 254 nm,此方法 20 min 左右即能完成一次分析,方法简便易行,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性范围从 0.010 ~ 0.308 μg。

姜少灏等<sup>[10]</sup>利用非水反相液相色谱法测定脂肝宁胶囊中大黄素、大黄素甲醚的含量。色谱条件为 Kromasil C<sup>18</sup> 柱,流动相为甲醇 + 冰醋酸(99.9 + 0.1),流速 1.0 ml/min,检测波长 254 nm。大黄素在 0.420 ~ 33.6 μg/ml 范围内线性关系良好,该法简便快速,定量准确,能够用于含蒽醌类化合物药物的质量控制。

## 2.3 毛细管电泳法(CE)

2.3.1 毛细管区带电泳法(CZE) Junko Koyama 等<sup>[11]</sup>利用环式糊精(CD)改造的毛细管区带电泳法对天然药物中大黄素、大黄酸及其糖苷进行同时测定,电解液由 0.03 mol/L 四硼酸钠中加入适当体积的 10% 氢氧化钠、0.005 mol/L β-CD 和 10% 乙腈组成。大黄素、大黄素-8-β-D-糖苷、大黄酚、大黄酚-8-β-D-糖苷的线性范围分别为 5 ~ 50、25 ~ 150、5 ~ 75、50 ~ 500 μg/ml,大黄素和大黄酚的加标回收率分别为 96.1% ~ 105.3%、99.2% ~

103.3%。

2.3.2 胶束电动毛细管色谱法(MEKC) MEKC 是将离子型表面活性剂加到缓冲液中,如果浓度达到或超过临界胶束浓度,表面活性剂的单体就结合形成胶束,而溶质则在流动的水相和起固定相作用的胶束相之间分配,并由于其在胶束中不同的保留能力而产生差速迁移。

大黄中的 5 种蒽醌类衍生物能在 10 min 内,在含有 25 mmol/L 脱氧胆酸钠的 50 mmol/L 硼酸-氢氧化钠(pH=11)缓冲溶液中成功分离,但其中大黄酚和大黄素甲醚重现性不佳。此方法回收率高于 90%,芦荟大黄素、大黄素、大黄酸的检测限分别为 0.66、0.94、0.96 μg/ml,线性范围分别为 2.64 ~ 21.12、5.64 ~ 56.4、4.80 ~ 33.60 μg/ml,加标回收率分别为 90.61% (RSD = 1.45%)、93.39% (RSD = 1.21%)、92.31% (RSD = 1.10%),日内和日间重现性 RSD 在 0.96% ~ 1.85% 之间。此方法分析时间短,所需样品量少,抗污染及抗干扰能力较高,故分析中草药较合适<sup>[12]</sup>。

鉴于此,Shang XY 等<sup>[13]</sup>运用含胆酸钠和牛磺胆酸钠的混合胶束系统,用环式糊精改造的胶束电动毛细管色谱对大黄中的 6 种成分进行了分离和测定,结果 6 种成分能在 20 min 内得到较好的分离,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、丹叶大黄素、大黄素甲醚的检测限 0.72 ~ 1.13 μg/ml,加标回收率 92.3% ~ 101.2%,日内和日间 RSD 分别为 1.08% ~ 1.62%、1.23% ~ 2.10%、0.98% ~ 1.29%、1.75% ~ 2.25%、1.53% ~ 2.24%、1.6% ~ 2.18%。

纪松岗等<sup>[14]</sup>结合超邻界流体萃取和胶束电动毛细管色谱法,测定了大黄中的芦荟大黄素、大黄素和大黄酸的含量。被测组分在 10 min 内全部分离,芦荟大黄素、大黄素、大黄酸的线性范围分别为 2.64 ~ 21.12、5.64 ~ 56.41、4.80 ~ 33.60 μg/ml,其日内和日间精密度的 RSD 均小于 2%,加标回收率分别为 97.36%、100.97%、97.65%。结果证明方法可靠,回收率高,为中药大黄的质量控制提供了新的更为理想的方法。

2.3.3 毛细管电色谱法(CEC) 毛细管电色谱法是一种相对较新的微柱分离技术,是高效液相和毛细管电泳两种分离技术的结合,该技术应用电力驱动流动相带动试样液流过固定相。Li Y 等<sup>[15]</sup>用此方法对几个种类的大黄类物质进行了分离,对各种影响因素进行了探索。结果表明,最佳检测条件为:波长 254 nm,施加压力 30 kV,柱温 40 °C,背景电解液(BGE)包含 5 mmol/l 的乙酸和 80% 的乙腈。在此条件下 4 种蒽醌类物质能在 12 min 内得到分离,且

保留时间重复性好(芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的  $RSD$  分别为 1.27%、1.28%、1.10%、1.16%),但峰面积的重复性不理想,日内  $RSD < 11%$ ,日间  $RSD < 11%$ 。

压力流驱动毛细管电色谱是以液相色谱泵为流动相的主要驱动力,它克服了仅靠电渗流驱动的一些控制因素,可方便地对流动相的组成、性质和流速进行调节,尤其是能够实现流动相梯度洗脱。颜流水等<sup>[16]</sup>利用梯度加压毛细管电色谱同时分离了大黄提取液中的蒽醌类成分,对梯度洗脱条件进行了优化,在此条件下,大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚 5 种蒽醌类化合物能够在 22 min 内完全分离,柱效是等度洗脱的 6.63 倍,并且稳定性试验表明,此系统具有良好的稳定性,6 次重复进样,每个蒽醌化合物的保留时间的  $RSD$  均小于 1.5%。

CEC 法的优点在于柱的寿命较长,需梯度洗脱,试样注射简单,且 CEC 柱不易被中药中的复杂成分污染,但峰面积的重复性较差,所以应勤更新背景电解液,加快梯度洗脱的速度,从而改善峰面积重复性差的缺陷。

### 3 蒽醌类化合物的定性定量分析

3.1 质谱联用法 质谱法(MS)、氢谱法(HNMR)、碳谱法(CNMR)和核磁法(DEPT)联用可对蒽醌类物质进行定性分析。结合化合物的颜色、熔点、FAB-MS(快原子轰击质谱)或 EI-MS(电子轰击质谱)的  $m/z$ (质荷比)、HNMR 的 ppm、CNMR 数据,与文献报道的已知物质进行比较,可判断化合物的类型<sup>[17]</sup>。李军林等<sup>[18]</sup>对河套大黄的蒽醌类成分进行研究,经化学方法和波谱学鉴定,确定了它们的结构。实验证明这几种方法联合应用,能够准确确定物质结构。此方法是近几年发展起来的技术,能分析待测组分的精细结构,对植物药的成分分析具有重要意义。

另外,质谱联用法也可进行蒽醌类物质的定量测定。唐成国<sup>[19]</sup>将气相色谱法和质谱法连用,选择离子监测法(SIM)定量测定了生产双氧水的蒽醌工作液中 2-乙基蒽醌(2-EAQ)和 2-乙基四氢蒽醌(2-ETHAQ)的浓度。仪器条件:色谱柱 SE-54(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m),载气为 He,0.8 ml/min,柱温 240,进样口温度 300,分流流量 100 ml/min,进样量 1  $\mu$ l。电离方式为 EI 源,电离能量为 70 eV,离子源温度为 200,GC/MS 接口温度为 250,扫描范围 40 ~ 300 amu, SIM( $m/z$ )为 230、236、240。结果 2-EAQ 和 2-ETHAQ 的多次测定

$RSD$  都在 2% 以下,2-EAQ 的回收率在 99.5% ~ 102.4% 之间,证明气相色谱-质谱联用分析二乙基蒽醌、2-乙基四氢蒽醌是一种选择性和准确性较高的方法。

高效液相色谱法灵敏度高、准确度高、精密度高和操作简单,但在进行复杂混合物分析中常遇到分析时间长,分析效率低,即使采用梯度洗脱也难以使某些成分完全分离等问题,此外色谱容易被污染,且某些不可逆,使色谱柱寿命下降。毛细管电泳法与 HPLC 法相比具有高效、快速、抗污染能力强,能同时进样多个试样,对高效液相色谱法难以分离的扩散系数小的高分子化合物也能分离,且有流动相为缓冲液,耗费低等一系列优点,但由于其分离系统中的试样量很少,可能会造成分析误差较大。此外由于是通过电荷吸附作用,当试样基质不同时可能造成相同组分不同保留的符合性差的现象。所以对如何解决毛细管电泳法的重复性问题研究很多,如分析前采用碱溶液清洗新毛细管柱以及每次进样前的预清洗。另外 Lee 和 Yeung 提出用新的迁移指数和校正迁移指数对不同柱子不同电压下所获得数据进行换算,并说明了此迁移指数的重复性优于迁移时间的重复性<sup>[20]</sup>。在缓冲液中加入乙二醇等添加剂,动态涂覆毛细管内壁表面或采用化学方法对毛细管内壁进行改性也有利于改善迁移时间的重复性<sup>[21]</sup>。质谱法所用仪器昂贵,耗费较大,尚未普及。综合考虑,HPLC 法和毛细管电泳法是蒽醌类定性定量测定的首选,因此有必要建立准确测定蒽醌类物质的 HPLC 法和毛细管电泳法,并不断改进这两种方法。另外,在试样前处理方面可通过应用一些新技术如固相微萃取技术、超临界流体萃取技术等,以缩短处理时间,提高实验效率。

### 参考文献

- [1] 张文惠,汪国华. 大黄烟剂的制备及其烟气中大黄酚的红外光谱鉴别[J]. 江西中医学院学报,1997,9(3):41.
- [2] 朱惠菊,张卓勇. 大黄的傅里叶变换红外光谱法快速鉴别[J]. 分析测试报,2004,23(6):95-97.
- [3] 陈军,方芸,刁雨辉. 比色法测定逐淤扶正胶囊中蒽醌类成分的含量[J]. 药学实践杂志,2002,20(5):297-300.
- [4] 马长清,程岚,彭彦. 清肠饮中大黄蒽醌含量的比色分析方法研究[J]. 医药导报,2002,21(3):173-175.
- [5] 林新华,陈伟,黄丽英,等. 芦荟中蒽醌类化合物的测定及药理作用[J]. 中华临床医药,2002,3(24):10-12.
- [6] 吕鹏,房德敏,唐淑萍. 系数倍率法测定消肿散淤软膏中蒽醌类成分的含量[J]. 中草药,2001,32(7):608-609.
- [7] 大岛俊幸,平山总良,齐藤文孝,等. 高效液相色谱法测定何首乌和夜交藤中蒽醌类成分的含量[J]. 药物分析杂志,1996,16(4):219-221.

- [8] 兰红梅,于超,王宇,等. 高效液相色谱法同时测定决明子中六个蒽醌类化合物的含量[J]. 重庆中草药研究,2001,6(43):45-48.
- [9] 洪筱坤,王智华,李琴韵,等. 含大黄的中成药中蒽醌类化合物的多组分定性定量研究[J]. 中成药,1996,18(4):38-39.
- [10] 姜少灏,蒋晔,郝晓花. 非水反相液相色谱法测定脂肪肝宁胶囊中大黄素、大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志,2003,23(6):437-439.
- [11] Junko Koyama, Izumi Morita, Kazuko Kawanishi, et al. Capillary electrophoresis for simultaneous determination of emodin, chrysophanol and their 8-*D*-glucosides[J]. Chem Pharm Bull,2003,51(4):418-420.
- [12] Ji S G, Chai Y F, Wu Y T, et al. Separation and determination of anthraquinone derivatives in rhubarb and its preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Biomed Chromatogr,1998,12:335-337.
- [13] Shang X Y, Zhou B Y. Determination of six components in rhubarb by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography using a mixed micellar system of sodium cholate and sodium taurocholate[J]. Analytica Chimica Acta,2002,456:183-188.
- [14] 纪松岗,柴逸峰,吴玉田,等. 超临界流体萃取-胶束电  
动毛细管色谱法分离测定大黄中蒽醌类组分的含量[J]. 分析化学研究简报,1998,26(11):1388-1390.
- [15] Li Y,Liu H W, Ji X H, et al. Optimized separation of pharmacologically active anthraquinones in rhubarb by capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis,2000,21:3109-3115.
- [16] 颜流水,王宗花,罗国安,等. 梯度加压毛细管电色谱同时分离大黄提取液中5种蒽醌类化合物[J]. 高等学校化学学报,2004,25(5):827-830.
- [17] Zhao M, Duan J A, Huang W Z. Steroids and anthraquinones from astragalus hoantchy[J]. Journal of China Pharmaceutical University,2003,34(3):216-219.
- [18] 李军林,王爱芹. 河套大黄的蒽醌类成分研究[J]. 中草药,2000,31(5):321-324.
- [19] 唐成国. 气相色谱-质谱联用分析蒽醌工作液的组成[J]. 化学研究与利用,2000,12(3):278-281.
- [20] Lee T T, Yeung E S. Quantitative determination of native proteins in individual human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. Anal Chem,1992,64(23):3045-3051.
- [21] Gordon M J, Lee K J, Arias A A, et al. Protocol for resolving protein mixtures in capillary zone electrophoresis[J]. Anal Chem,1991,63:69-72.

[收稿日期:2005-09-10]

中图分类号:R15;O625.24;O625.46;O655;O654 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2006)02-0155-04

[上接插页]

它形式为食品卫生工作者的知识更新尽绵薄之力。

这次刊授学习绝大多数学员善始善终,认真地完成了学习任务。对于“《中国食品卫生杂志》的采用稿件原则是什么”,许多同志都有清晰的见解,如浙江省丽水市卫生监督所的一些同志站在专业的角度提出自己的见解;并提出发现新人、增加刊期、讲座、报告、争鸣、考虑交叉学科等问题的建议。许多同志发表了自己的看法,如福州市卫生防疫站的邱福东、河南省濮阳市卫生监督局的王想霞等同志除了回答问题外,还提出采用稿件和发表文章的内容要多面向基层。编辑部将在下一步的工作中认真考虑大家的意见。

本次刊授学习除评出优秀个人学员外,浙江省丽水市卫生监督所、福建省三明市卫生监督所、云南省昆明市官渡区卫生监督中队、河南省濮阳市卫生监督局、福州铁路卫生防疫站、四川省攀枝花市仁和区卫生监督所被评为优秀集体学员,编辑部向他们表示感谢和祝贺。

## 实行可追溯性是确保食品安全的重要措施

人们趋于把越来越多的复杂技术应用到生产的终端产品。在终端产品中,初始原材料经常几乎无法辨认。此外,生产过程中经常涉及不同地域的其他专业公司的共同参与。在大多数情况下,消费者只能接触产品,而无法对生产加工进行控制,所以提出了对动物福利、环境保护与产品安全方面提供保证的需求。进而消费者对大量标准化生产出的产品的潜在缺陷引发的抱怨增多了。

当前,在食品加工业实行可追溯性是确保食品安全的重要措施。首先,可追溯性要求现代的动物饲养管理,对食源性疾病有效控制。近年来,公众要求对动物及其产品的标识,尤其关注肉制品。

可追溯性:通过登记的识别码,对商品或行为的历史和使用或位置予以追踪的能力。(CAC和ISO的定义)。