

HPLC 测定板蓝根及其制剂中水杨酸、苯甲酸的含量

年四辉^{1*}, 李萍¹, 刘丽敏², 李丽华¹

(1. 皖南医学院药理学系, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽中医药高等专科学校药理学系, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定板蓝根药材及其制剂中水杨酸、苯甲酸含量方法。方法: 以苯甲酸、水杨酸为对照品, 采用 Lichrospher C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), 流动相甲醇-0.1% 的磷酸溶液 (42:58), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 测定板蓝根药材及其制剂中水杨酸、苯甲酸含量。结果: 水杨酸在 4.36 ~ 21.8 mg·L⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r=0.9999$), 苯甲酸在 4.04 ~ 20.2 mg·L⁻¹ 内与峰面积线性关系良好 ($r=0.9997$); 水杨酸平均加样回收率为 98.45%, RSD 1.26% ($n=9$), 苯甲酸平均加样回收率为 97.90%, RSD 1.36% ($n=9$)。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可用于板蓝根药材及其制剂中苯甲酸、水杨酸的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱法; 板蓝根, 水杨酸; 苯甲酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0092-04

Determination of Salicylic Acid and Benzoic Acid in Radix Isatidis and its Preparations by HPLC

NIAN Si-hui^{1*}, LI Ping¹, LIU Li-min², LI Li-hua¹

(1. Wannan Medicine College, Wuhu 241002, China;

2. Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of salicylic acid and benzoic acid in Radix Isatidis and its preparations by HPLC. **Method:** The content of salicylic acid and benzoic acid in Radix Isatidis and its preparations was determined by HPLC based on a Lichrospher C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution solvent system composed of methanol-0.1% H₃PO₄ water (42:58) solution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 230 nm. **Result:** Salicylic acid had good linearity in the range of 4.36-21.8 mg·L⁻¹, and the average recovery rate was 98.45% with RSD of 1.26% ($n=9$), while benzoic acid had good linearity in the range of 4.04-20.2 mg·L⁻¹, and the average recovery rate was 97.90% with RSD of 1.36% ($n=9$). **Conclusion:** The method is simple, stable and reliable, which can be used to determine salicylic acid and benzoic acid in Radix Isatidis and its preparations.

[Key words] HPLC; Radix Isatidis; salicylic acid; benzoic acid

板蓝根系十字花科植物菘蓝的干燥根, 性寒味苦, 具有清热解毒、凉血利咽的功效, 常用于瘟疫时毒、发热咽痛、温毒发斑、丹毒、痈肿等^[1]。

现代研究表明, 板蓝根中总有机酸部位具有较强的抑菌解热及抗病毒效果^[2-5], 其中水杨酸、苯甲酸具有较强的抗内毒素作用^[6]; 以水杨酸、苯甲酸为代表的有机酸成分也是板蓝根及其制剂中的物质基础^[7]。对该类成分的测定可采用薄层色谱法定性鉴别^[8]、采用酸碱滴定法测定总有机酸^[9]、采用毛细管电泳法测定水杨酸、苯甲酸等^[10], 而高效液相色谱法具有分析简便、快捷、普适性强的特点, 是有机酸类成分分析的常用手段。有文献采用 HPLC 对药材中水杨酸的测定报道^[11], 但未见对药材中苯甲

[收稿日期] 20111128(018)

[基金项目] 皖南医学院中青年科研基金 (WK200812); 安徽省教育厅项目 (KJ2009B104Z); 芜湖市科技局重点项目 (2009 卫 1-5)

[通讯作者] * 年四辉, 硕士, 讲师, 从事天然药物活性成分及中药制剂新工艺研究, Tel: 0553-3932497, E-mail: niansihui@sina.com

酸及其制剂中水杨酸含量测定的报道,本文采用反相高效液相色谱法测定板蓝根药材及其制剂中苯甲酸与水杨酸的含量,以期对板蓝根药材及其制剂质量控制提供参考。

1 材料

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津),KQ5200B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AUW220D 型电子分析天平(日本岛津),EYELA 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司),水杨酸(中国药品生物制品检定所,批号 100106-200303),苯甲酸(中国药品生物制品检定所,批号 110782-200301)。板蓝根饮片分别购自芜湖市老百姓大药房、市中大药房、济善大药房及亳州中药材市场(经皖南医学院药学系药剂与生药学教研室包淑云副教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的根);板蓝根颗粒为市售,分别产自广州白云山和记黄埔中药有限公司、山东三九药业有限公司、芜湖张恒春药业有限公司、河南宛西制药股份有限公司、北京亚东生物制药有限公司;磷酸为分析纯,甲醇为色谱纯,提取用水为蒸馏水,乙醇为食用乙醇,色谱用水为乐百氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(42:58),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

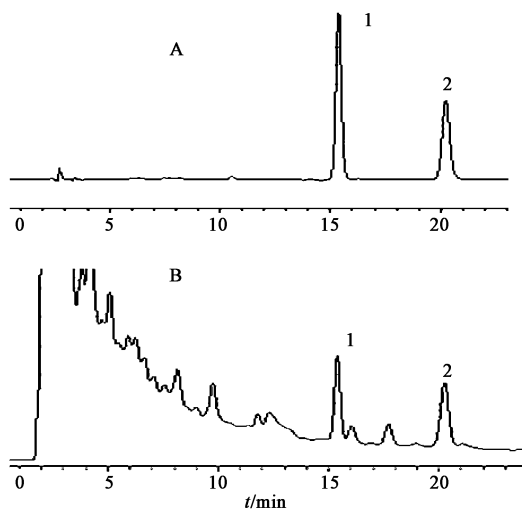
2.2.1 对照品溶液 分别精密称取苯甲酸对照品 10.1 mg、水杨酸对照品 10.9 mg 于 50 mL 量瓶中,甲醇充分溶解后定容,配制成为质量浓度分别为 0.202 g·L⁻¹ 苯甲酸、0.218 g·L⁻¹ 水杨酸的溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 分别精密称取板蓝根药材粗粉约 4 g,以 70% 乙醇 50 mL 超声提取 2 次,每次 30 min,合并 2 次提取液,减压浓缩至稀膏状,70% 乙醇分次洗涤并定容到 50 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得供试品溶液,备用。

板蓝根制剂溶液的制备: 分别取板蓝根颗粒 1 袋,以 70% 乙醇 100 mL 超声提取 2 次,每次 30 min,合并 2 次提取液,减压浓缩至稀膏状,70% 乙醇分次洗涤并定容到 100 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得供试品溶液,备用。

2.3 标准曲线的绘制 分别精密量取 2.2.1 项下对照品溶液 5 mL 于 50 mL 量瓶中,甲醇定容,配制

成含苯甲酸、水杨酸质量浓度分别为 0.020 2 g·L⁻¹ 苯甲酸、0.021 8 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。精密量取该混合对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,分配制成苯甲酸质量浓度为 1.01, 2.02, 4.04, 8.08, 12.12, 16.16, 20.2 mg·L⁻¹;水杨酸质量浓度为 1.09, 2.18, 4.36, 8.72, 13.08, 17.44, 21.8 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,各重复进样 20 μL(*n* = 3),记录峰面积。以峰面积平均值 *Y* 为纵坐标、样品浓度 *X* 为横坐标绘制标准曲线,得苯甲酸标准曲线为 $Y = 47\ 940X + 22\ 228$ ($r = 0.999\ 7$),水杨酸标准曲线为 $Y = 27\ 292X + 13\ 284$ ($r = 0.999\ 9$)。苯甲酸、水杨酸质量浓度分别在 4.04 ~ 20.2, 4.36 ~ 21.8 mg·L⁻¹ 线性关系良好。



A. 对照品; B. 样品; 1. 苯甲酸; 2. 水杨酸

图1 对照品与板蓝根药材 HPLC

2.4 精密度试验 取同一苯甲酸、水杨酸对照品混合溶液按上述液相色谱条件重复进样 6 次,苯甲酸、水杨酸的 RSD 分别为 1.42%, 1.65%。

2.5 重复性试验 按 2.2.2 项下方法制备板蓝根药材样品溶液 6 份,按上述色谱条件进行分析,测得苯甲酸、水杨酸的 RSD 分别为 1.92%, 1.78%。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别在 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样测定,测得苯甲酸、水杨酸峰面积的 RSD 分别为 2.12%, 1.42%, 表明供试品溶液在 8 h 内含量稳定。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的板蓝根药材粗粉 9 份,每份约 1.0 g,分别精密加入苯甲酸、水杨酸对照品溶液,按 2.2.2 项下供试品溶液制备及 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率。结果表明,苯甲酸平均回收率 97.90%, RSD 1.36%, 水杨酸平均回收率 98.45%, RSD 1.26%, 见表 1。

表 1 苯甲酸、水杨酸加样回收率试验 ($n=9$)

成分	称样质量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
苯甲酸	1.001 2	0.009 9	0.008 1	0.017 8	97.63	97.90	1.36
	1.075 1	0.010 6	0.008 1	0.018 6	98.47		
	1.028 2	0.010 2	0.008 1	0.018 3	100.51		
	0.988 2	0.009 8	0.010 1	0.019 6	97.20		
	0.991 3	0.009 8	0.010 1	0.019 8	98.87		
	1.003 8	0.009 9	0.010 1	0.019 6	95.67		
	0.992 1	0.009 8	0.012 1	0.021 7	98.01		
	1.001 0	0.009 9	0.012 1	0.021 7	97.44		
	0.988 5	0.009 8	0.012 1	0.021 6	97.31		
水杨酸	1.001 2	0.047 7	0.039 2	0.086 3	98.48	98.45	1.26
	1.075 1	0.051 2	0.039 2	0.089 5	97.67		
	1.028 2	0.048 9	0.039 2	0.088 4	100.55		
	0.988 2	0.047 0	0.048 0	0.094 1	98.13		
	0.991 3	0.047 2	0.048 0	0.093 9	97.40		
	1.003 8	0.047 8	0.048 0	0.094 0	96.37		
	0.992 1	0.047 2	0.056 7	0.103 2	98.76		
	1.001 0	0.047 6	0.056 7	0.104 1	99.60		
	0.988 5	0.047 1	0.056 7	0.103 2	99.06		

2.8 样品含量测定 对 2.2.2 项下供试品按上述色谱条件进行分析,每个样品重复测 3 次,以平均值计算含量,见表 2。

表 2 板蓝根药材及颗粒中苯甲酸、水杨酸含量测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

样品	购买地(厂家)	批号	苯甲酸	水杨酸
药材	老百姓大药房	-	0.007 2	0.037 3
药材	市中大药房	-	0.009 9	0.047 6
药材	济善大药房	-	0.008 5	0.050 6
药材	亳州药材市场	-	0.014 1	0.131 4
药材	亳州药材市场	-	0.006 6	0.039 9
颗粒	广州白云山	L9A020	-	0.004 2
颗粒	山东三九	0911050	-	0.001 4
颗粒	芜湖张恒春	0906201	0.010 0	0.018 9
颗粒	宛西制药	091117	-	0.018 0
颗粒	北京亚东生物制药	0910015	-	0.026 1

注:苯甲酸、水杨酸的含量为折合生药含量;“-”峰面积过小,无法计算。

3 讨论与结论

从结果也可以看出,不同药材及制剂中苯甲酸与水杨酸的含量差别较大;板蓝根颗粒通过提取处理后苯甲酸的几乎完全损失,折合生药量后水杨酸的含量也大大降低,传统的提取工艺对有机酸类成分转移率低,有必要对板蓝根传统工艺进行改革与创新。

在测定样品时,尤其是制剂样品时,因样品中苯甲酸、水杨酸含量较低,第一次测量低于线性范围的无法积分的,采取样品浓缩 1 倍后再次进行测定。

苯甲酸、水杨酸都是有机酸类化合物,其 pKa 值分别为 4.20,2.98,溶液的 pH 会影响其以分子状态或离子状态存在,理论上当流动相的 pH 大于苯甲酸的 pKa 时,2 种化合物会以离子形式存在,或者当流动相的 pH 小于水杨酸的 pKa 时,2 种化合物会以分子状态存在,在色谱图上会形成单一峰。作者分别考察了流动相 pH 2,3,5,6,7 时的 2 个化合物的色谱行为,当 pH 大于 5 时,可以得到单峰,但峰形不好,且流动相需要缓冲盐调节 pH 值,配制、洗柱较为麻烦,故最终选择 0.1% 的磷酸 (pH 约为 2)。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010:191.
- [2] 刘云海,秦国伟,方建国,等. 板蓝根抗内毒素活性化学成分筛选[J]. 医药导报,2002,21(2):742.
- [3] 程妍,李祥,许金国,等. 板蓝根有效部位的抑菌解热药效研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(6):589.
- [4] 程妍,李祥,陈建伟,等. 板蓝根有效部位的抗病毒药效研究[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(2):155.

南海红树林内生真菌 SK7RN3G1 代谢产物研究

杨建香^{1,2*}, 邱声祥¹, 佘志刚², 林永成²

(1. 中国科学院华南植物园 植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650;
2. 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

[摘要] 目的:研究南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 的代谢产物。方法:采用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶色谱法等进行分离纯化,并通过理化常数测定和光谱分析鉴定其化学结构。结果:从南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 的菌体中分离得到 6 个代谢产物。经波谱解析,分别为:3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (**1**), lichenxanthone (**2**), griseoxanthone C (**3**), 1,3,6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one (**4**), harman(1-甲基-β-咔啉) (**5**), N9-甲基-1-甲基-β-咔啉(**6**)。初步药理活性显示化合物 **1** 和 **2** 对人体肝癌细胞 HepG2 抑制的 IC₅₀ 分别为 20,25 mg · L⁻¹。根据文献报道,化合物 **5** 具有抗 HIV 活性,其 EC₅₀ 为 10.7 μmol · L⁻¹, 化合物 **6** 具有抗 HIV 和抗癌重要生理活性。结论:所有化合物均首次从南海红树林内生真菌 SK7RN3G₁ 中分离得到。

[关键词] 红树林; 内生真菌; 代谢产物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0095-04

Metabolites of Mangrove Endophytic Fungus SK7RN3G1 from South China Sea

YANG Jian-xiang^{1,2*}, QIU Sheng-xiang¹, SHE Zhi-gang², LIN Yong-cheng²

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

[Abstract] **Objective:** To study on secondary metabolites of mangrove endophytic fungus No·SK7RN3G₁ from the south china sea. **Method:** The compounds were isolated by column chromatography and identified on the basia of physic-chemical constants and spectral analysis. **Result:** Six metabolites were obtained and elucidated as 3, 8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (**1**), lichenxanthone (**2**), Griseoxanthone C (**3**), 1,

[收稿日期] 20120519(008)

[基金项目] 国家 863 计划项目(2007AA09Z448);国家自然科学基金项目(20772162)

[通讯作者] * 杨建香, 博士,副教授,从事天然产物化学研究,Tel:020-37082553,E-mail:791011@126.com

[5] 陈凯, 窦月, 陈智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 275.
[6] 张汉明, 张戈, 乔传卓. 板蓝根和大青叶不同部位的靛蓝、靛玉红含量测定及其部分成分的抗内毒素作用比较[J]. 药学实践杂志. 2000, 18(5): 347.
[7] 马莉, 金城, 李祖伦, 等. 生物检定与板蓝根质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 134.
[8] 马琳, 孟祥超, 李兰芳. 板蓝根药材及板蓝根颗粒中有机酸成分薄层色谱鉴别分析[J]. 国际医药卫生导

报, 2008, 14(10): 74.
[9] 马莉, 唐建元, 李祖伦, 等. 板蓝根提取物中总有机酸和水杨酸含量测定方法研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 804.
[10] 王小雪, 郑文捷, 谢国祥, 等. 高效毛细管电泳同时测定板蓝根中水杨酸、丁香酸、苯甲酸和邻氨基苯甲酸[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 189.
[11] 施峰, 安益强, 贾晓斌, 等. 不同产地板蓝根药材中水杨酸量的比较[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 271.

[责任编辑 顾雪竹]