

四倍体板蓝根中五种有机酸成分的毛细管电泳分离分析

范国荣 胡晋红 李博华¹ 张汉明¹ 林梅² 安登魁²

(第二军医大学附属长海医院临床药理室,上海 200433; ¹第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200433;

中国药科大学药物分析学教研室,南京 210009)

摘 要 选择毛细管区带电泳分离模式,以肉桂酸为内标建立了适合板蓝根药材中抗内毒素活性成分五种有机酸优化分离与定量分析的毛细管电泳方法。电泳分离条件:毛细管 40 cm× 50 μm,运行缓冲液 pH 9.5 磷酸二氢钠 硼砂 (50 mmol/L: 12.5 mmol/L,内含 16 mmol/L β-CD),压力进样 20 ps× s,操作电压 18 kV (+)→(-),柱上在线检测 UV 200 nm,毛细管柱温 25℃。

关键词 板蓝根; 有机酸; 抗内毒素活性成分; 毛细管电泳

板蓝根 (*Radix Isatidis*)系十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根,性寒味苦,具有清热解毒、凉血消肿之功效,是一味传统的中药材。为了改良菘蓝药材品种,提高活性成分含量,乔传卓等采用秋水仙碱处理萌发的菘蓝种子或幼苗生长点,获得了菘蓝同源四倍体植株,其中根与叶中的活性成分均有较大幅度的提高^[1]。

从板蓝根中分离得到的化学成分较多,但目前有效成分尚不明确。现代医药学研究认为,中药材的清热解毒功效主要集中于其有效成分的抗内毒素作用和抗病原微生物作用^[2]。刘云海已试验证实板蓝根药材具有明显的抗内毒素作用^[3],Wu XY等还从菘蓝药材中分离得到了抗内毒素活性成分五种有机酸^[4]。对于中药活性成分有机酸的分离测定,常用的分析手段主要有薄层色谱法、气相色谱法和高效液相色谱法^[5]。毛细管电泳作为一种迅速发展起来的新型高效分离分析技术已在一些中药有效成分分离分析方面获得了成功的应用^[6]。本文采用毛细管电泳方法分离测定了四倍体板蓝根中抗内毒素活性成分五种有机酸的含量,并与二倍体板蓝根相比较,以考察四倍体板蓝根药材的优良品质。

1 仪器与试剂

BioFocusTM 3000 毛细管电泳仪 (Bio-Rad,

USA),未涂层石英毛细管 40 cm× 50 μm (河北永年光导纤维厂),pH-25型酸度计 (上海雷磁仪器厂),TGL-16C 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

五种有机酸对照品水杨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、丁香酸和 3-(2-苯甲酸)-4(3H)-喹唑酮由第二军医大学药学院生药学教研室提供,经毛细管电泳分离鉴定均为单一电泳峰。肉桂酸购自中国药品生物制品鉴定所。四倍体板蓝根 (4n)为经数代选育获得的菘蓝四倍体植株的干燥根,由第二军医大学药学院生药学教研室乔传卓教授赠送;板蓝根 (2n)分别采购于上海、南京、杭州和河北安国,经鉴定均为菘蓝的干燥根。实验所用试剂均为国产分析纯,水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 电泳操作条件

按要求配制实验所需各种缓冲溶液,使用前用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,并经 10000 r/min 高速离心脱气 5 min。每天电泳操作前毛细管均依次用甲醇-水 (60:40)、0.1 mol/L NaOH 过滤重蒸水及运行缓冲液冲洗 5 min。样品分析一次循环冲洗一次,连续电泳分离 5 次后需更换电极池中的运行缓冲液。本实验采用压力进样: 20 ps× s,正极进样,负极柱上 200 nm 检测。以 18 kV 作为操作电

压,控制毛细管柱温为 25℃,在 pH 9.5 磷酸二氢钠-硼砂 (50 mmol/L : 12.5 mmol/L, 内含 16 mmol/L β-CD) 缓冲液条件下,五种抗内毒素活性成分有机酸及其定量内标物肉桂酸在 8 min 之内获得了理想的分离。图 1 为五种有机酸对照品及板蓝根药材提取液毛细管电泳分离图谱。

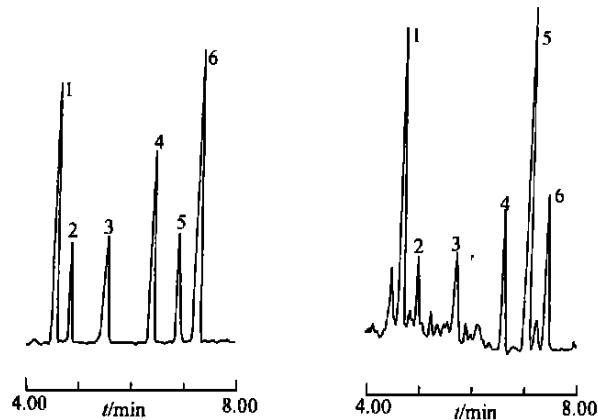


Fig 1. Typical electropherograms of five organic acids in *Radix Isatidis*. A: standard solution of five organic acids; B: extraction sample of *Radix Isatidis*; 1: Internal standard cinnamic acid; 2: quinazolinone acid; 3: salicylic acid; 4: benzoic acid; 5: anthranilic acid; 6: syringic acid

2.2 标准曲线的制备

精密配制含水杨酸 105.5 μg/ml 苯甲酸 92.10 μg/ml 邻氨基苯甲酸 537.0 μg/ml 丁香酸 109.8 μg/ml 和 3-(2-苯甲酸)-4-(3H)-喹唑酮 92.30 μg/ml 的甲醇-水 (30 : 70) 混合标准液。肉桂酸内标液由 pH 9.5 背景电解质 (50 mmol/L 磷酸二氢钠-12.5 mmol/L 硼砂) 配制,浓度为 150.0 μg/ml。分别准确吸取混合标准液 5, 10, 15, 25, 50, 100

μl, 加内标液 100 μl, 用重蒸水稀释定容至 1 ml 量瓶中,混匀。吸取其中 80 μl, 以 10000 r/min 高速离心 5 min 后,置于毛细管电泳仪中进行分析。以有机酸峰面积与内标峰面积比 (Y) 对相应的浓度 (C) 进行线性回归,计算回归方程,即水杨酸 $Y_1 = 0.004315 + 0.01752C, r = 0.9992 (n = 5)$, 定量线性范围 0.5275 ~ 10.55 μg/ml; 苯甲酸 $Y_2 = 0.002136 + 0.02411C, r = 0.9996 (n = 5)$, 定量线性范围 0.4605 ~ 9.210 μg/ml; 邻氨基苯甲酸 $Y_3 = 0.005474 + 0.01822C, r = 0.9991 (n = 5)$, 定量线性范围 2.685 ~ 53.70 μg/ml; 丁香酸 $Y_4 = 0.002108 + 0.01632C, r = 0.9995 (n = 5)$, 定量线性范围 0.5490 ~ 10.98 μg/ml; 3-(2-苯甲酸)-4-(3H)-喹唑酮 $Y_5 = 0.0009214 + 0.01205C, r = 0.9990 (n = 5)$, 定量线性范围 0.4615 ~ 9.230 μg/ml

2.3 样品的分离分析

板蓝根药材烘干,粉碎,过 60 目筛。精密称取各药材粉末 10 g, 加蒸馏水 500 ml, 煎煮 30 min; 重复操作 3 次,合并滤液,水浴浓缩至约 100 ml, 加乙醇至醇浓度为 80%, 冷藏 24 h 后过滤,滤液回收乙醇至无醇味。残留液加蒸馏水定容至 10 ml, 并用 1 mol/L HCl 调 pH 值为 1, 以石油醚分次萃取,去除脂溶性杂质后,选择乙醚按 2 : 1 萃取 3 次,合并乙醚液,以无水硫酸钠脱水,过滤,滤液回收乙醚。残留物以甲醇溶解并定容至 2 ml 量瓶中。精密吸取样品液 200 μl, 加内标液 100 μl, 用重蒸水稀释定容至 1 ml 量瓶中,混匀。吸取其中 80 μl, 以 10000 r/min 高速离心 5 min 后,进行电泳分析,定量结果列于表 1

Tab 1. Contents of five organic acids in *Radix Isatidis* (μg/g) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sample	Quinazolinone acid	Salicylic acid	Benzoic acid	Anthranilic acid	Syringic acid
Shanghai	1.038±0.031	4.966±0.129	5.327±0.134	6.025±0.145	1.32±0.036
Nanjing	1.353±0.038	5.239±0.135	4.786±0.127	4.353±0.113	1.227±0.033
Hangzhou	1.116±0.029	6.10±0.143	5.194±0.130	5.262±0.128	1.516±0.039
Anguo, Hebei	1.615±0.041	7.58±0.153	6.433±0.167	5.892±0.128	2.358±0.059
Shanghai(4n)	2.112±0.052	7.823±0.156	8.045±0.188	18.23±0.296	7.894±0.183

2.4 加样回收率试验

精密称取已知含量的四倍体板蓝根药材粉末 10 g, 准确加入五种有机酸混合标准液 200 μl, 按板蓝根药材“样品的分离分析”项下操作,计算四倍体板蓝根药材的加样回收率,结果见表 2

Tab 2. Recoveries of five organic acids in *Radix Isatidis* (n = 5)

Component	Added (μg)	Found (μg)	Average recovery (%)	RSD (%)
Quinazolinone acid	18.46	18.05	97.78	2.2
Salicylic acid	21.10	21.43	101.6	2.3
Benzoic acid	18.42	18.89	102.6	2.6
Anthranilic acid	107.4	104.6	97.37	1.9
Syringic acid	21.96	21.82	99.34	2.8

2.5 定性定量精密度

精密吸取五种有机酸混合标准液 25 μ l共 5 份, 添加肉桂酸内标液 100 μ l, 按“标准曲线的制备”项下配制毛细管电泳分析标准溶液, 重复进样 5 次, 结果求得水杨酸迁移时间 RSD 1.2%, 相对峰面积 RSD 2.1%; 苯甲酸迁移时间 RSD 1.5%, 相对峰面积 RSD 2.3%; 邻氨基苯甲酸迁移时间 RSD 1.0%, 相对峰面积 RSD 2.0%; 丁香酸迁移时间 RSD 1.8%, 相对峰面积 RSD 2.5%; 3-(2-苯甲酸)-4(3H)-喹唑酮迁移时间 RSD 0.8%, 相对峰面积 RSD 1.8%。

精密称取同一批四倍体板蓝根药材粉末 10 g, 按“样品的分离分析”项下步骤平行制备 5 份待测样品, 毛细管电泳连续进样分离分析其中五种有机酸的含量, 结果四倍体板蓝根药材中水杨酸浓度 RSD 2.2%; 苯甲酸浓度 RSD 2.1%; 邻氨基苯甲酸浓度 RSD 1.8%; 丁香酸浓度 RSD 2.4%; 3-(2-苯甲酸)-4(3H)-喹唑酮浓度 RSD 2.3%。

3 讨论

1) 对于有机酸的毛细管电泳快速分离, 一种有效的方法是采用反向电渗流毛细管电泳操作模式, 但是带正电荷的电渗流改性剂易与带负电荷的酸性溶质发生不良相互作用^[7]。本文选择常规毛细管区带电泳分离模式, 考察了缓冲液 pH 运行电压、有机添加剂等操作参数对板蓝根药材中五种有机酸电泳分离的影响, 其中适量 β -CD 的加入, 不仅改善分离选择性, 而且还明显增进电迁移速率。一个合理的解释是, β -CD 的包合作用在改善各样品组分相对电迁移速率的同时, 本质上减少有机酸分子的负电荷密度, 进而降低了本身反方向的电泳速度。在兼顾分离效率和分析速度的前提下, 优选的电泳分离条件为: 操作电压 18kV (+) \rightarrow (-), 运行缓冲液 pH 9.5 磷酸二氢钠-硼砂 (50 mmol/L : 12.5 mmol/L, 内含 16 mmol/L β -CD)。

2) 板蓝根药材的质量控制, 目前尚无行之有效

的评价标准。中国药典规定以靛玉红作为感冒退热冲剂的鉴定标准, 事实上现有的水煮醇沉制剂工艺对脂溶性成分靛玉红的提取率极低, 产品质量差异较大, 因此选择靛玉红等脂溶性成分作为板蓝根及其制剂的质量控制已不可取^[8,9]。至于其他文献报道板蓝根药材中氨基酸、喹唑酮等有效成分的含量测定结果, 则更不足以表征药材品质的优劣^[9,10]。从板蓝根药材中分离得到的五种有机酸成分, 体外抗内毒素活性能真实反映其内在清热解毒之功效, 较好的水溶性特征符合感冒退热冲剂的生产制备工艺, 适合作为板蓝根药材及其制剂质量控制的指标性成分。本文借鉴板蓝根水煮醇沉制剂工艺进行样品分离分析的预处理, 毛细管电泳有机酸活性成分的测定结果定量比较了不同产地板蓝根药材的质量, 其中四倍体板蓝根的品质明显优于二倍体板蓝根。

参考文献

- 1 乔传卓, 吴美枢, 戴富宝等. 菰蓝多倍体育种的研究. 植物学报, 1989, 31(9): 678
- 2 周金黄, 王建华主编. 中药药理与临床研究进展(第一册). 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 358
- 3 刘云海. 板蓝根抗内毒素作用研究. 中国药科大学学报, 1995, 26(5): 297
- 4 Wu XY, Liu YH, Sheng WY, et al. Chemical constituents of *Isatis indigotica*. *Plant Medica*, 1996, 63: 55
- 5 陈发奎主编. 常用中草药有效成分含量测定. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 62, 69, 124
- 6 魏伟, 王义明, 罗国安. 中药成分的高效毛细管电泳分析. 药学报, 1997, 32(6): 476
- 7 林梅, 冯敏, 张正行等. 酸性药物的反向电渗流高效毛细管电泳分离分析研究. 色谱, 1998, 16(5): 383
- 8 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部). 广州: 广东科技出版社, 1995. 627
- 9 李玲, 乔传卓, 李修禄等. 大青叶和板蓝根药材及其制剂质量控制的研究. 药学学报, 1993, 28(3): 229
- 10 乔章星. 板蓝根水醇提取液中氨基酸成分的测定. 现代应用药学, 1991, 8(3): 14

Separation and Analysis of Five Organic Acids in Autotetraploid *Radix Isatidis* by Capillary Electrophoresis

FAN Guo-Rong, HU Jin-Hong, LI Bo-Hua¹, ZHANG Han-Ming¹, LIN Mei², AN Deng-Kui²

Department of Clinical Pharmacology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; ¹Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; ²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A capillary electrophoresis (CE) method was established for the systematic separation and quantitative analysis of antiendotoxic active components, five organic acids, i. e., salicylic acid, benzoic acid, anthranilic acid, syringic acid and quinazolinone acid, in Banlangen (*Radix Isatidis*), based on the mode of capillary zone electrophoresis. A buffer solution composed of 50 mmol/L sodium dihydrogenphosphate and 12.5 mmol/L borate at pH 9.5 containing 16 mmol/L β -CD was found to be the most suitable electrolyte for this separation. The electromigration was performed on the 40 cm \times 50 μ m uncoated capillary with a 18 kV running voltage. The analytes were monitored by on-line ultraviolet (UV) detection at 200 nm and cinnamic acid was selected as internal standard. The analytical results demonstrated the method was simple, rapid, accurate and well reproducible and could be used as a reliable tool for the quality control of Banlangen (*Radix Isatidis*) and its preparations.

Key words Banlangen (*Radix Isatidis*); Organic acids; Antiendotoxic active components; Capillary electrophoresis

药 学 书 刊 征 订

《世界制药公司最新专利概况 1995~ 1997》主编:周和平。内容:系统翻译 50家制药公司的外国最新专利摘要 7000条 包括新化合物、新中间体、新工艺、新配方、新制剂、新用途及新光学异构体和植物药专利、有关键词索引。可用于预测市场、监视竞争对手、开发新药、改革工艺。每本 290元。尚余少量《世界制药公司最新专利概况 1990~ 1994》(含翻译的外国专利摘要 9500条),每本 230元。

《世界制药公司专利概况 (1998)卷》近期已经出版,每本定价 190元。上述三册书合订优惠价为 710元。

《国外非肠道给药制剂辅料应用大全》根据最新国外权威资料编译。文中收录了近 250种药用辅料在 1800种非肠道给药制剂的应用,每一条目详细介绍了药用辅料名称、浓度、pH值、给药途径、药品通用名、商品名、生产厂商、剂型、储存容器等,辅料涉及的应用剂型包括冻干粉针、冻干生物制品、低温干燥制剂、经皮给药制剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、输液剂、乳胶剂、微粒剂、固体植入剂等。文后排有通用名索引,可供新药研究单位、医院药剂科选择辅料品种,开发新剂型使用。每本定价 100元。(以上定价均含邮资)。

需订购者请与本刊编辑部联系。电话:025-3319685