

注射用丹参多酚酸中鞣质类物质的排除性检测

薛静¹, 叶正良^{2*}, 李德坤², 周大铮²

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

[摘要] **目的:**利用高效液相色谱法对注射用丹参多酚酸中的鞣质类成分进行排除性检测。**方法:**采用高效液相色谱法检测水解前后丹参多酚酸样品中没食子酸、儿茶素和鞣花酸。没食子酸液相色谱条件: 色谱柱 Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.05% 磷酸水溶液 (5:95) 等度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 271 nm。儿茶素液相色谱条件: 色谱柱 Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 271 nm。鞣花酸液相色谱条件: 色谱柱 Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液 (18:82), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 254 nm。**结果:**水解前后的丹参多酚酸样品的色谱图中, 在没食子酸标准品的色谱峰位置, 没有相应峰出现; 水解后样品中, 儿茶素、鞣花酸标准品位置的附近有可疑峰存在, 水解后的样品中加入相应对照品再次测定, 可确认可疑峰并非儿茶素和鞣花酸的峰。**结论:**丹参原药材在经过制剂工艺中的聚酰胺树脂柱处理后, 其中的鞣质类成分已经被除去, 得到的注射用丹参多酚酸中没有鞣质类成分或含量极低。

[关键词] 丹参多酚酸; 鞣质; 聚酰胺; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2013) 04-0093-03

Exclusive Detection of the Tannin in Salvianolic Acid Extracts for Injection

XUE Jing¹, YE Zheng-liang^{2*}, LI De-kun², ZHOU Da-zheng²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300410, China)

[Abstract] **Objective:** HPLC was employed to detect the tannin in salvianolic acid extracts for injection. **Method:** Gallic acid, catechins and ellagic acid in salvianolic acid extracts for injection were analyzed using HPLC method before and after the hydrolysis. The chromatographic condition for gallic acid was as follows: the chromatographic column was Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, mobile phase was phosphoric acid-water (0.05:100) and methanol, column temperature was kept at 30 °C and the detector was set at 271 nm. The chromatographic condition for catechins was as follows: the chromatographic column was Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at the gradient elution mode with the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, mobile phase was phosphoric acid-water (0.05:100) and methanol, column temperature was kept at 30 °C and the detector was set at 271 nm. The chromatographic condition for ellagic acid was as follows: the chromatographic column was Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, mobile phase was phosphoric acid-water (0.2:100) and acetonitrile, column temperature was kept at 40 °C and the detector was set at 254 nm. **Result:** There was no gallic acid in salvianolic acid extracts before and after the hydrolysis. But catechins and ellagic acid might exist in salvianolic acid extracts after the hydrolysis. With the corresponding standard product in salvianolic acid extracts after the hydrolysis and detected again, it proved that no catechins and ellagic acid existed in salvianolic acid extracts after the hydrolysis. **Conclusion:** No tannin exists in

[收稿日期] 20120315(007)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101202)

[第一作者] 薛静, 在读硕士, 从事药物分析和中药质量控制的研究, Tel: 15522608992, E-mail: xuejingsjt@163.com

[通讯作者] * 叶正良, 研究员, 从事药物分析和中药质量控制的研究, Tel: 022-86342066, E-mail: yezl@tasly.com

salvianolic acid extracts after the treatment of polyamide resin.

[Key words] salvianolic acid extracts; tannin; polyamide resin; high-performance liquid chromatography

鞣质是存在于植物体内的一类结构比较复杂的多酚类化合物,根据化学结构可分为两大类:可水解鞣质和缩合鞣质。可水解鞣质依水解后所得酚酸类的不同,又可分为没食子酸鞣质和逆没食子酸鞣质(鞣花酸鞣质)。由于鞣质都是以没食子酸、鞣花酸和儿茶素为构成单位,通过各种结合方式形成二聚体、三聚体,进而形成低聚体及多聚体^[1]。所以通过测定样品中水解前后没食子酸、儿茶素、鞣花酸的情况,可以间接反映样品中鞣质的情况。

鞣质常常被作为杂质除去,因为在中药制剂中,鞣质不但会对制剂的稳定性和澄明度产生影响,甚至会引起许多严重的生理反应。它能与组织蛋白结合形成硬结,导致注射局部组织肿瘤、坏死^[2];它还会加速红细胞的凝聚,并能与血红蛋白形成药物性沉淀^[3]。近年来中药注射剂的安全性问题已经引起了人们的普遍关注,由于在丹参的原药材中存在鞣质类物质^[3-5],因此,对于注射用丹参多酚酸,鞣质类物质经过制剂工艺后的排除性检测就显得分外重要。

目前去除鞣质的方法主要有明胶沉淀法、碱性醇沉法和聚酰胺吸附法等,注射用丹参多酚酸采用的是聚酰胺吸附法,其对鞣质类物质具有良好的去除作用。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱单元,配 Waters 2489 型紫外检测器(美国 WATERS 公司);AL 204 型 1/万电子分析天平;XS 105 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 METTLER 公司);KQ-100E 型超声波清洗器;DK-S28 型电热恒温水浴锅。

丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司提供),没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,纯度 > 90.1%,批号 110831-200803),儿茶素对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 > 94.4%,批号 110877-201102),鞣花酸对照品(天津一方科技有限公司,纯度 > 98%),丙酮,盐酸,乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯),磷酸(色谱纯),超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 没食子酸液相色谱条件^[6] 色谱柱 Venusil XBP C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸水溶液(5:95)等度洗脱,流速 0.8 mL·

min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 271 nm,进样体积 3 μL。

2.1.2 儿茶素液相色谱条件 色谱柱 Venusil XBP C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱,梯度洗脱程序见表 1;流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 271 nm,进样体积 5 μL。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	甲醇/%	0.05% 磷酸-水/%
0	5	95
15	5	95
25	20	80
50	20	80

2.1.3 鞣花酸液相色谱条件^[7] 色谱柱 Venusil XBP C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(18:82),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,检测波长 254 nm,进样体积 10 μL。

2.2 对照品及样品溶液制备

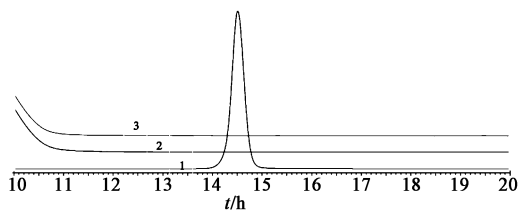
2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、儿茶素、鞣花酸对照品适量,分别加甲醇制成相应的对照品溶液,得没食子酸质量浓度为 0.545 1 g·L⁻¹、儿茶素质量浓度为 0.507 9 g·L⁻¹、鞣花酸质量浓度为 0.506 7 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 未水解样品溶液的制备 精密称定丹参多酚酸 0.1 g,溶于 10mL 60% 的丙酮中,超声 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 水解样品溶液的制备 精密称定丹参多酚酸 0.1 g,溶于 5 mL 60% 的丙酮中,再加入 5 mL 2 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液,于 100 ℃ 水解 4 h。后用 60% 丙酮补加溶剂到 10 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

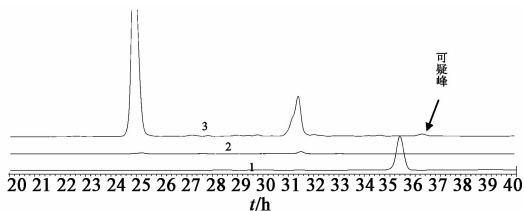
3 结果

水解前后的丹参多酚酸样品的色谱图中,在没食子酸对照品的色谱峰位置没有相应峰出现;而在儿茶素、鞣花酸对照品位置的附近有可疑峰存在,样品中加入相应对照品再次测定,确认了可疑峰并非儿茶素和鞣花酸的峰。丹参原药材在经过工艺中的聚酰胺处理后,其中的鞣质类物质已经被除去,得到的注射用丹参多酚酸中没有鞣质类物质存在。见图 1~5。



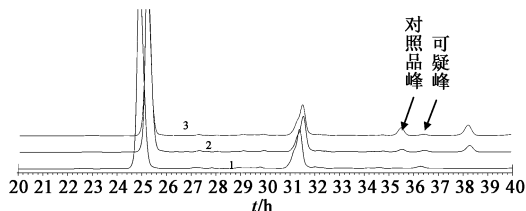
1. 没食子酸对照品;2. 水解前样品;3. 水解后样品

图1 没食子酸对照品及样品水解前后色谱



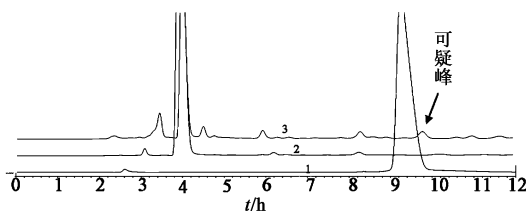
1. 儿茶素对照品;2. 水解前样品;3. 水解后样品

图2 儿茶素对照品及样品水解前后色谱



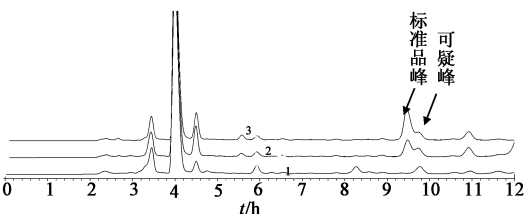
1. 水解后样品图;2. 水解后样品加儿茶素5滴;
3. 水解后样品加儿茶素15滴

图3 水解后样品及加不同量儿茶素对照品后色谱



1. 鞣花酸标准品;2. 水解前样品;3. 水解后样品

图4 鞣花酸对照品及样品水解前后色谱



1. 水解后样品图;2. 水解后样品加鞣花酸5滴;
3. 水解后样品加鞣花酸15滴

图5 水解后样品及加不同量鞣花酸对照品后色谱

4 讨论

聚酰胺分子内含有许多酰胺键,可与酚类化合物形成氢键而吸附这些物质。鞣质为多元酚的衍生物,亦可被吸附,从而达到除去的目的。丹参原药材在经过制剂工艺中的优质聚酰胺树脂柱处理后,得到的注射用丹参多酚酸中没有鞣质类物质存在,说明选用聚酰胺去除鞣质的方法可靠。

在流动相的选择过程中,试图采用合适的梯度条件同时测定没食子酸、儿茶素、鞣花酸的混合对照品以及水解前后的丹参多酚酸样品,但是由于丹参多酚酸样品中成分较为复杂,分离效果不好,所以改为用3个不同的色谱条件对没食子酸、儿茶素、鞣花酸对照品以及水解前后丹参多酚酸样品进行测定,以达到好的分离效果,便于鞣质类物质的排除性检测。

在选择样品制备所用溶剂时,通过对比水作为溶剂、不同比例的甲醇作为溶剂以及不同比例的丙酮作为溶剂色谱峰的情况,选择用60%的丙酮作为溶剂对水解前后的样品进行处理。

选用高效液相色谱法对注射用丹参多酚酸中的鞣质类物质进行排除性检测,操作简单,结果精确稳定,也为其他药材中鞣质的检测及含量测定起到一定借鉴作用。

[参考文献]

- [1] 蔡垠,吴军,贾晓斌. HPLC-PDA 识别中药材中的鞣质成分[J]. 中成药,2007,29(10):1510.
- [2] 江波,侯世祥,孙毅毅. 含丹参中药注射液鞣质检查新方法[J]. 中成药,2000,22(3):192.
- [3] 沈洁,徐金钟,胡济宏,等. 磷钼钨酸-干酪素法测定丹参药材中鞣质的含量[J]. 分析化学研究简报,2008,36(4):553.
- [4] 瞿海斌,程翼宇,黄红霞. 一种快速测定丹参提取液中鞣质含量的方法. 中国:CN101791331A [P], 2010-08-04.
- [5] 瞿海斌,程翼宇,黄红霞. 一种近红外光谱测定丹参提取液中鞣质含量的方法,中国:CN101780141A [P], 2010-07-21.
- [6] 尹胜利,浦益琼,张彤,等. HPLC 法测定茵栀黄注射液中水解产物没食子酸[J]. 中草药,2011,42(2):288.
- [7] 莫建光,陈秋红,徐慧,等. HPLC 法测定广西甜茶中水解型鞣花鞣质的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(13):6926.

[责任编辑 顾雪竹]