

丹参多酚酸中己内酰胺和低聚物的残留测定

刘君动¹, 叶正良^{2*}, 李德坤², 兰淑玲², 岳洪水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: 建立丹参多酚酸中己内酰胺和低聚体残留的检测方法。方法: 确定酸水解聚酰胺树脂最佳的水解条件, 利用该条件水解丹参多酚酸, 用 SPE 固相萃取小柱富集净化。通过高效液相色谱仪梯度洗脱, 色谱柱为 AtlantisRRT3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水, 柱温为 30 °C, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长为 209 nm 的条件下检测己内酰胺和低聚物被水解后的氨基己酸。结果: 本法在 7.012 6~0.004 5 g·L⁻¹ 线性关系良好, r=0.999 5, 氨基己酸的回收率为 96.25%, 其 RSD 为 1.17%, 聚酰胺树脂的回收率为 101.27%, 其 RSD 为 4.33%。结论: 该方法简便、准确性好, 可以作为丹参多酚酸中己内酰胺和低聚体残留的测定。

[关键词] 丹参多酚酸; 己内酰胺; 低聚物; 氨基己酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0062-04

Determination of Caprolactam Monomer and Oligomer Residues in Salviolic Acid Extracts

LIU Jun-dong¹, YE Zheng-liang^{2*}, LI De-kun², LAN Shu-ling², YUE Hong-shui², ZHOU Da-zheng²

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

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300402, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for detecting the residues of caprolactam and oligomer in the salviolic acid extracts. **Method:** Acid hydrolysis of polyamide resin was optimized. Salviolic acid extract was hydrolyzed under this optimized condition, which was further enriched and purified using SPE solid extraction column. HPLC was employed to detect caprolactam and aminocaproic acid, the hydrolyzed oligomer. Chromatographic column was AtlantisRRT3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Mobile phase was methanol-water with step gradient elution; Column temperature was at 30 °C. Flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. Detection wavelength was at 209 nm. **Result:** Linear relationship was good in the range of 7.012 6-0.004 5 g·L⁻¹ with a regression coefficient of 0.999 5. Recovery of aminocaproic acid was 96.25%, RSD 1.17%. Recovery of polyamide resin was 101.27%, RSD 4.33%. **Conclusion:** The method is simple and accurate for determination of caprolactam and oligomer in the salviolic acid extract.

[Key words] salviolic acid extracts; caprolactam; oligomer; aminocaproic acid

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge

的干燥根及根茎, 性苦、微寒, 归心、肝经, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效, 是常用的活血化瘀中药^[1]。注射用丹参多酚酸的主要组分是丹参多酚酸, 工艺过程中使用了聚酰胺树脂进行分离纯化。聚酰胺树脂是由 ε-己内酰胺聚合而成的一类高分子化合物, 由于 ε-己内酰胺的开环聚合是一个复杂的可逆过程, 反应平衡后的产物含有一定量的己内酰胺和环状低聚物, 大约有 2% 己内酰胺和己内酰胺环状低聚物存在于聚酰胺树脂中成品中^[2]。为了保证安全, 使用前进行精制。但生产过程中如

[收稿日期] 20111024(010)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09101202)

[第一作者] 刘君动, 在读硕士, 从事药物分析和中药质量控制的研究工作, Tel: 13821068217, E-mail: 66liujundong@163.com

[通讯作者] *叶正良, 研究员, Tel: 022-86342066, E-mail: yezl@tasly.com

果聚酰胺树脂脱落二聚体、三聚体等低聚物,则最后会残留在提取物中。由于己内酰胺是一种致痉挛性和细胞原生质毒物对人体眼睛和中枢神经有刺激作用,特别是对脑干,可引起实质性的脏器损伤,己内酰胺环状低聚体也能引起严重的不良反应,所以需对它们进行残留控制^[3-4]。

聚酰胺树脂通过酸水解生成己内酰胺,进一步被水解生成氨基己酸^[5-6],反应式见图1。

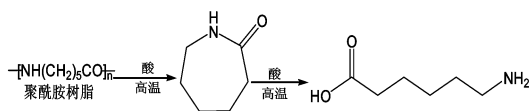


图1 聚酰胺水解反应式

利用该水解条件对丹参多酚酸进行水解,同时进行方法学验证。

1 材料

Waters 2695 高效液相制备色谱仪,配 Waters 2998 双波长检测器(美国 Waters 公司);AL 204 型 1/万电子分析天平,XS 105 型 1/10 万型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),HI 9025 便携式 pH 计,EMS-10 型磁力搅拌器(天津欧诺仪器仪表有限公司),DGG-101-1BS 型电热鼓风干燥箱(天津市天宇实验仪器有限公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DIKMA ProElut™ SPE 小柱(北京迪马科技有限公司)。

丹参多酚酸(10 批,批号 20051102,20051201,20051202,20051204,20090601,20090602,20090603,20100201,20100301,20100801,天津天士力之骄药业有限公司提供),聚酰胺树脂(台州市路桥四甲生化塑料厂,30~60 目,批号 20050510),氨基己酸(国药集团化学试剂公司,批号 F20110112),甲醇(色谱纯),其他试剂(分析纯)。

2 聚酰胺树脂的水解

2.1 液相条件

2.1.1 氨基己酸液相色谱条件 色谱柱 Atlantis® T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水梯度洗脱(梯度洗脱程序见表 1),柱温 30 °C,检测波长 209 nm,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

表1 氨基己酸流动相梯度条件

t/min	甲醇/%	水/%
0	5	95
10	10	90
20	10	90

2.1.2 己内酰胺液相色谱条件 色谱柱 waters symmetry® C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱(梯度洗脱程序见表 2),检测波长为 209 nm,柱温 35 °C,流速为 1 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL。

表2 己内酰胺流动相梯度条件

t/min	乙腈/%	水/%
0	5	95
10	12	88
20	12	88

2.2 聚酰胺树脂水解液的制备

2.2.1 聚酰胺树脂盐酸水解液的制备 称取聚酰胺树脂 10.0 g,加入 200 mL 浓盐酸,回流水解,分别回流 4,6,8,10,12 h。最后将水解液加水定容至 250 mL,摇匀,备用。精密量取 50 mL 水解液,调节 pH 6~7,加水定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,即可。

2.2.2 聚酰胺树脂 40% 硫酸水解液的制备 称取聚酰胺树脂 10.0 g,加入 200 mL 40% 硫酸,按照 2.2.1 制备水解 4,6,8,10 h 的水解液。

2.2.3 聚酰胺树脂甲酸水解液的制备 称取聚酰胺树脂 10.0 g,加入 200 mL 甲酸,按照 2.2.1 制备水解 4,6,8,10 h 的水解液。

2.3 氨基己酸对照品溶液的制备 取氨基己酸 89.87 mg,加水溶解,定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.4 聚酰胺树脂的水解试验 将聚酰胺树脂盐酸水解液、40% 硫酸水解液、甲酸水解液和氨基己酸溶液,按照 2.1.1 和 2.1.2 色谱条件进样测定,结果见表 3~5。

2.5 结果讨论 聚酰胺树脂在酸性条件下能被水解,首先水解成己内酰胺,进一步被水解成氨基己酸。通过考察浓盐酸、40% 硫酸、甲酸和不同水解时间对聚酰胺树脂水解程度的影响,发现甲酸能溶解聚酰胺树脂,但是不能完全水解聚酰胺树脂;40% 硫酸水解聚酰胺树脂 10 h 后,水解率达到 98%,但是稳定性不好;浓盐酸水解 12 h 后,聚酰胺树脂的水解率达到 98%,而且稳定性好。水解过程中通过 GC-MS 检测,发现己内酰胺和二聚体存在,进一步证实聚酰胺树脂被逐步水解。

3 丹参多酚酸水解实验

3.1 样品的制备 取丹参多酚酸提取物约 2.0 g,加入 40 mL 浓盐酸,加热回流水解 12 h。将水解液过滤,加水定容至 50 mL,摇匀。精密量取上述水解

表 3 盐酸水解聚酰胺树脂水解率

水解时间 /h	样品量 /g	己内酰胺 /mg·L ⁻¹	氨基己酸 /g·L ⁻¹	水解率 /%
4	10.827 3	2.263 5	51.615 3	51.98
6	10.024 5	2.164 3	78.174 6	85.03
8	10.125 6	1.039 8	80.332 2	86.51
10	10.012 3	0.945 1	88.394 2	96.27
12	10.023 4	0.000 0	91.100 0	98.53

表 4 40%硫酸水解聚酰胺树脂水解率

水解时间 /h	样品量 /g	己内酰胺 /g·L ⁻¹	氨基己酸 /g·L ⁻¹	水解率 /%
4	10.034 4	15.373 4	68.391 7	74.33
6	10.003 2	8.176 9	89.102 4	97.13
8	9.921 6	5.271 4	89.445 6	98.31
10	10.090 1	0.000 0	91.220 0	98.58

表 5 甲酸水解聚酰胺树脂水解率

水解时间 /h	样品量 /g	己内酰胺 /mg·L ⁻¹	氨基己酸 /g·L ⁻¹	水解率/%
4	10.028 1	24.677 4	0	0.027
6	10.045 6	27.126 1	0	0.029
8	10.032 1	34.424 5	0	0.037
10	10.034 8	63.726 3	0	0.069

液 10 mL,加入氢氧化钠溶液调节 pH 6~7,加水定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,备用。精密量取上述溶液 10 mL,上已处理好的 SPE 商品柱,流速约 1.0 mL·min⁻¹,用水 15 mL 洗脱,收集洗脱液于 25 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

3.2 检测限 取氨基己酸 11.25 mg,定容至 50 mL 量瓶中,摇匀即可。然后逐步稀释,并进行高效液相色谱检测,直到信噪比(S:N)为 1:3 时,测得浓度为 4.522 3 mg·L⁻¹,即最低检测量为 4.522 3 ng,最低检测浓度为 4.522 3 mg·L⁻¹。

3.3 线性关系的考察 取氨基己酸 350.63 mg,加水充分溶解后,定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,即可。然后逐步稀释得到 5 个浓度梯度,分别 7.012 6, 1.797 4, 0.225 0, 0.084 3, 0.004 5 g·L⁻¹,按 2.1.1 项色谱条件测定,记录色谱图及峰面积。以峰面积对照品浓度进行回归处理,计算氨基己酸的线性回归方程及线性范围。结果 $Y = 7\ 296\ 335X + 22\ 693$, $r = 0.999\ 5$,在 7.012 6~0.004 5 g·L⁻¹,线性关系良好。

3.4 精密度试验 精密吸取氨基己酸溶液 10 μL,按 2.1.1 项色谱条件连续进样 6 次,测得氨基己酸峰面积 RSD 1.14%,表明仪器精密度良好。

3.5 回收率试验

3.5.1 氨基己酸回收率试验 取多酚酸提取物约 1.0 g,添加氨基己酸约 1.0 g,加入 40 mL 盐酸,加热回流水解 12 h。将水解液过滤,加水定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,备用。精密量取上述水解液 10 mL,加入氢氧化钠溶液调节 pH 6~7,最后定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,备用。精密量取上述溶液 10 mL,上已处理好的 SPE 商品柱,流速约 1.0 mL·min⁻¹,用水 15 mL 洗脱,收集洗脱液于 25 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,平行 6 份,按 2.1.1 项色谱条件,测得氨基己酸回收率 96.62%,RSD 为 1.17%,表明该方法回收率良好,结果见表 6。

表 6 氨基己酸加样回收率试验(n=6)

No.	样品量 /g	加入量 /g	测的量 /g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.025 4	1.011 7	0.993 7	98.22	96.62	1.17
2	1.045 2	1.010 9	0.983 9	97.33		
3	1.015 9	1.024 2	0.994 3	97.04		
4	1.034 5	1.007 8	0.967 9	96.04		
5	1.026 7	1.024 5	0.973 7	95.04		
6	1.003 8	1.062 7	1.020 6	96.04		

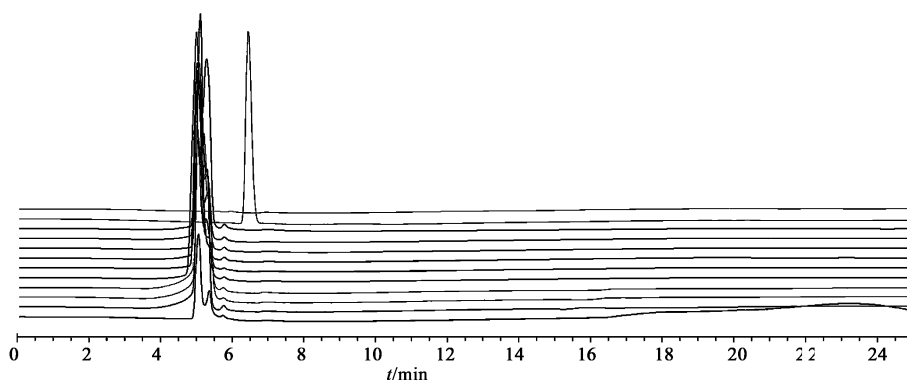
3.5.2 聚酰胺树脂回收率试验 取丹参多酚酸提取物约 1.0 g,添加聚酰胺树脂约 1.0 g,加入 40 mL 盐酸,加热回流水解 12 h,将水解液过滤,加水定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,备用。精密量取上述水解液 10 mL,加入氢氧化钠溶液调节 pH 6~7,最后定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,备用。精密量取上述溶液 10 mL,上已处理好的 SPE 商品柱,流速约 1.0 mL·min⁻¹,用水 15 mL 洗脱,收集洗脱液于 25 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,平行 6 份,按 2.1.1 项色谱条件,测得聚酰胺树脂的回收率 101.27%,RSD 4.33%,表明该方法回收率良好,结果见表 7。

表 7 聚酰胺树脂加样回收率(n=6)

No.	样品量 /g	加入量 /g	测的量 /g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.0320	0.933 8	0.998 0	106.88	101.27	4.33
2	1.002 3	0.957 1	0.974 1	101.78		
3	1.006 2	0.924 0	0.892 0	97.08		
4	1.004 8	0.934 5	0.936 6	100.22		
5	1.012 6	0.964 3	0.949 1	98.42		
6	1.034 7	0.942 7	0.973 3	103.25		

3.6 样品的测定 取 10 批丹参多酚酸提取物 2.0 g 按照 3.1 供试品的制备方法制备,分别将上述样品、氨

基己酸标准溶液和利用空白溶剂作为阴性对照,按照 2.1.1 色谱条件进样测定,HPLC 叠加图见图 2。



(图中从下到上依次为 1. 20051102 批;2. 20051201 批;3. 20051202 批;4. 20051204 批;5. 20090601 批;
6. 20090602 批;7. 20090603 批;8. 20100201 批;9. 20100301 批;10. 20100801 批;11. 氨基己酸;12. 阴性对照)

图 2 丹参多酚酸、氨基己酸和阴性对照 HPLC 叠加图

4 结果与讨论

10 批丹参多酚酸提取物中都没有检测到氨基己酸,说明丹参多酚酸提取物中不存在聚酰胺树脂中残留的己内酰胺和低聚物,或是含量很低在检测限以下,所以本实验方法可以应用于注射用丹参多酚酸中己内酰胺和低聚物的残留检测。

本实验将水解聚酰胺树脂的方法应用于丹参多酚酸水解,然后使用 SPE 固体萃取小柱富集纯化建立测定检测己内酰胺和低聚物残留的方法。由于丹参多酚酸中成分复杂,在使用浓盐酸水解过程中可能会产生很多未知产物。同时氨基己酸极性很强,出峰时间早,容易被丹参多酚酸水解液中的物质所掩盖。所以本次实验使用 SPE 固体萃取小柱,对样品进行除杂净化和对氨基己酸进行富集。回收率实验采用在样品中添加氨基己酸和添加聚酰胺树脂两种方法,并进行了方法学验证,证明方法学良好。

氨基己酸含量测定的方法研究相对较少,本次实验对洗脱溶剂、色谱柱和液相条件分别进行了摸索。经过多次实验发现使用甲醇梯度洗脱与乙腈相

比,氨基己酸的分离度更好;通过在样品中添加氨基己酸的方法,对液相条件和色谱柱进行的摸索,发现普使用 AtlantisRRT3 色谱柱能使氨基己酸得到很好的分离,能够满足定量测定的要求。

[参考文献]

- [1] 柴瑞震. 丹参的药理研究近况[J]. 中国中药科技, 2003,10(6):390.
- [2] 毛新华,李卓志. 提高蒸馏残渣中己内酰胺的回收率[J]. 合成纤维工业,1995,18(5):51.
- [3] 徐贻萍,马伯,王湘苏,等. 低浓度己内酰胺对作业工人的健康影响的调查[J]. 中国工业医学杂志,1997,5:290.
- [4] 林加锋. 己内酰胺中毒 10 例分析[J]. 急救医学杂志, 1999,8(4):268.
- [5] 彭治汉,施祖培. 塑料工业手册聚酰胺[M]. 北京:化学工业出版社,2001:85.
- [6] 崔焕茹. 利用己内酰胺制取氨基己酸[J]. 河北化工, 2003,4:24.

[责任编辑 蔡仲德]