

利用改良干酪素法对丹参注射液实现鞣质含量控制

张万峰, 章向群, 陈方军, 沈金芳(正大青春宝药业有限公司, 杭州 310023)

摘要: 目的 利用改良干酪素法对丹参注射液实现鞣质含量控制, 以保证注射液的质量。方法 通过对中国药典中鞣质含量测定方法(干酪素法)进行改良, 设定了适宜的样品稀释比例, 建立了丹参注射液的鞣质含量测定方法。结果 测定方法的改良取得了良好的效果, 所测市售样品鞣质含量在 $0.83\sim 2.06\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。结论 鞣质限度检查两法的限度要求不一致, 鞣质含量测定在生产控制及质量考察中具有实际意义。

关键词: 干酪素法; 改良; 鞣质; 丹参注射液; Folin 试液

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0644-03

Use of Modified Casein Method for Radix Salvia Miltiorrhiza Injection to Achieve Tannin Content Control

ZHANG Wanfeng, ZHANG Xiangqun, CHEN Fangjun, SHEN Jinfang(*Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE Use of Modified Casein Method for Radix Salvia miltiorrhiza injection to achieve tannin content control, to ensure the quality of injection. **METHODS** Determination method of tannin in Chinese Pharmacopoeia (casein method) was improved by setting the suitable sample dilution ratio, establishing determination method of tannin in Danshen injection. **RESULTS** Modified determination method has achieved good results, tannin content is $0.83\sim 2.06\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in commercial samples. **CONCLUSION** The requirements of Tannin limit is inconsistent in two limit tests in Chinese pharmacopoeia, tannin content determination in production control and quality inspection is of practical significance.

KEY WORDS: casein method; improvement; tannin; danshen injection; Folin solution

鞣质又称单宁^[1], 是一类复杂的多元酚化合物, 分子较大, 广泛存在于各种中药材中, 具有一定的药理活性, 主要用于止血、收敛和烧伤等。但同时因其具有多个羟基, 呈弱酸性, 具有很强的还原性, 化学性质活泼, 可以与蛋白质、生物碱、维生素 B₁、B₆ 等多类物质发生化学反应形成复合物而沉淀。因此在多数中草药注射液生产中, 须将其作为杂质除去, 以保证注射液的质量。

因在丹参药材中也存在有 $1.3\%\sim 3.35\%$ 的鞣质^[2-3], 如果在生产中去鞣质不彻底, 丹参注射液中有可能存在鞣质而影响质量, 有必要建立一个有效的鞣质含量控制方法。中国药典 2010 年版中关于鞣质的测定方法包括有鞣质限度检查(鸡蛋清法和明胶法)及鞣质含量测定法(干酪素法)^[4]。但在实际工作中, 发现上述方法均存在一定的问题或缺陷。笔者参照 2005 版药典中鞣质含量测定方法(干酪素法), 对其的实验条件和试剂进行了优化和改良, 设定了适宜的样品稀释比例, 建立了丹参注射液的鞣质含量测定方法(以下简称改良干酪素法)。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TU-1900 双光束紫外可见光分光光度计(北京普析)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用), 无水碳酸钠(分析纯, 上海展云化工有限公司, 批号: 0907019), 氢氧化钠(药用, 湖南尔康制药有限公司, 批号: 20090712), 干酪素(分析纯, 浙江杭州双林化工试剂厂, 批号: 20100903), 丹参注射液(A 公司), 丹参注射液(B 公司), 丹参注射液(C 公司), Folin 试液(1.0 Normal, 进口分装, 批号: F030161)。

2 方法及结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称取没食子酸对照品 50.13 mg , 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 精密量取 5 mL , 置 50 mL 棕色量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含没食子酸 0.05013 mg)。

作者简介: 张万峰, 男, 工程师 Tel: (0571)85121024-2275 E-mail: zwf@qcb.com.cn

2.2 标准曲线的制定

精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 25 mL 棕色量瓶中, 各加入 Folin 试液 2 mL, 再分别加入水 10.5, 10, 9, 8, 7, 6 mL, 用碳酸钠-氢氧化钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 以相应的试剂为空白, 按紫外-可见分光光度法(药典一部附录 VA), 在 760 nm 的波长处测定吸光度, 以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 见图 1。

公式 $Abs = K_1 \times (C) + K_0$, $K_0 = 0.00065$, $K_1 = 0.00365$, $r = 0.9997$

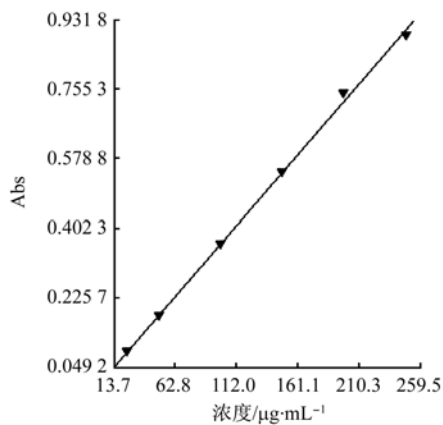


图 1 标准曲线

Fig 1 Standard curve

2.3 仪器适应性试验

精密吸取没食子酸对照液 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加入 Folin 试液 2 mL”起, 加水 9 mL, 依法测定吸光度, 连续测定 5 次, 测定结果见表 1。

表 1 仪器适应性试验

Tab 1 Apparatus suitability test

测定次数	吸光度值	平均值	RSD/%
1	0.475	0.4744	0.607
2	0.478		
3	0.471		
4	0.472		
5	0.476		

结果表明, 仪器适应性良好。

2.4 显色时间试验

精密量取丹参注射液 5 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 稀释至刻度, 精密量取 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加入 Folin

试液 2 mL”起, 加水 9 mL, 分别在 20, 30, 40, 50, 60 min 设放置点, 依法测定吸光度 A 值。结果见表 2。

表 2 稳定性试验(总酚)

Tab 2 Stability test (total phenol)

显色时间/min	吸光度值 n=6	RSD/%
20	0.8549	1.4410
30	0.8755	0.9654
40	0.8791	0.9562
50	0.8874	1.1650
60	0.8945	1.2570

精密量取丹参注射液成品稀释液 25 mL, 加至已盛有干酪素 0.6 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中, 密塞, 置 30 °C 水浴中保温 1 h, 时时振摇, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加入 Folin 试液 2 mL”起, 加水 9 mL, 分别在 20, 30, 40, 50, 60 min 设放置点, 依法测定吸光度 A 值。结果见表 3。

表 3 稳定性试验(不被吸附的多酚)

Tab 3 Stability test (not adsorbed polyphenols)

显色时间/min	吸光度值 n=6	RSD/%
20	0.3324	1.2110
30	0.3651	1.0650
40	0.3715	1.1560
50	0.3954	0.9654
60	0.3926	1.1250

从结果可知, 在显色反应的 30~40 min 之间, 吸光度值接近且 RSD 较小, 显色反应在这段时间内较为稳定, 因此确定显色反应放置时间为 30 min。

2.5 重复性试验

精密量取丹参注射液 5 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 稀释至刻度, 精密量取 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加入 Folin 试液 2 mL”起, 加水 9 mL, 依法测定吸光度, 从标准曲线中读出没食子酸的量(mg), 计算, 即得总酚量。

精密量取丹参注射液稀释液 25 mL, 加至已盛有干酪素 0.6 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中, 密塞, 置 30 °C 水浴中保温 1 h, 时时振摇, 取出, 放冷,

摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加入 Folin 试液 2 mL”起, 依法测定吸光度, 从标准曲线中读出没食子酸的量(mg), 计算, 即得不被吸附的多酚。

同法取丹参注射液(同一批次)进行试验, 重复 6 次, 测定结果见表 4。

按下式计算鞣质含量:
鞣质含量=总酚量-不被吸附的多酚量

表 4 重复性试验
Tab 4 Repeatability tests

测定次数	含量	平均值	RSD/%
1	1.498	1.463	1.805
2	1.459		
3	1.488		
4	1.426		
5	1.462		
6	1.447		

2.6 样品鞣质含量测定

取市售丹参注射液按“2.5”项下的方法进行鞣质含量测定。测定结果见表 5。

表 5 市售样品鞣质含量测定结果
Tab 5 Determination of tannin in commercial samples

样品号	厂家	鞣质含量	鸡蛋清法	明胶法
11033	A 公司	1.01	澄清	澄清
11031	A 公司	0.83	澄清	澄清
10311	A 公司	0.98	澄清	澄清
10291	A 公司	1.16	澄清	略浊
10283	A 公司	1.17	澄清	略浊
10282	A 公司	1.09	澄清	略浊
10273	A 公司	1.3	澄清	浑浊
10272	A 公司	1.31	澄清	浑浊
09201	B 公司	1.72	澄清	浑浊
10012	B 公司	1.57	澄清	浑浊
07131	C 公司	1.81	澄清	浑浊
11203	C 公司	2.06	澄清	浑浊

由结果可知, 不同厂家生产的丹参注射液虽然在鞣质限度检查一法(鸡蛋清法)检查中均能合格(通常不含聚山梨酯-80 的样品默认是一法检

查), 但实际鞣质含量存在有较大差异。而鞣质限度检查二法(明胶法)的限度要求比一法(鸡蛋清法)更严格, 更能反映出鞣质含量的差异。

3 讨论

本实验测定方法是在 2005 版中国药典中鞣质含量测定方法(干酪素法)的基础上改良而来, 主要的改良措施有: ①用 4% Na₂CO₃ 溶液与 0.03 mol NaOH 溶液的 1:1 混合液替代了 29%的 Na₂CO₃ 溶液。避免了在环境温度较低的情况下高浓度的 Na₂CO₃ 溶液迅速结晶析出而导致的试验干扰。②用市售的 Folin 试剂替代了自配的磷钼钨酸试剂。避免了磷钼钨酸试剂繁琐的配制过程, 且市售的 Folin 试剂更加稳定且易于保存。③应选用分析纯级的干酪素, 避免普通干酪素中含有的杂质(有紫外吸收)对试验的空白干扰。④由于干酪素不吸附没食子酸已得到证实^[5], 本实验不再重复。在采取上述措施后, 笔者发现该测定方法的可操作性得到了有效改善。

由样品测定结果可知, 中国药典一部鞣质限度检查一法(鸡蛋清法)和二法(明胶法)的限度要求并不一致, 二法(明胶法)要严格得多, 鞣质含量需要控制在 1.0 mg·mL⁻¹ 以下才能合格, 而一法(鸡蛋清法)却要宽松得多。

REFERENCES

[1] WANG J, XU Z S, MAO H L. Traditional Chinese medicine injection method to remove this layer [J]. Primary J Chin Mater Med(基层中药杂志), 2001, 15(5): 51-52.

[2] HEN J, XU J Z, HU J H, et al. Tungsten molybdenum phosphorus acid-GanLaoSu method for the determination of the content of herbs salvia miltiorrhiza tannins [J]. Analytical Chemistry(分析化学), 2008, 36(4): 553-555.

[3] HE G Y, ZHOU M D, TONG S Q, et al. Optimizing process of radix salvia miltiorrhiza ethanol precipitation by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(2): 118-122.

[4] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: Appendix 62.

[5] XIE D G, SONG G Z, LIU J. When the content determination method (China pharmacopoeia 2005 version of a appendix XB) methodology test and verify [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med(世界科学技术-中医药现代化), 2006, 8(6): 50-53.

收稿日期: 2012-03-08