

# 五倍子鞣酸对照品的制备 及质量标准研究\*

□宋光志\*\* 刘 静 谢道刚

(四川省中医药研究院中医研究所 成都 610031)

**摘 要:**目的:制备五倍子鞣酸精制品(对照品)及制定质量标准。方法:应用大孔高分子吸附树脂精制五倍子鞣酸;采用 HPLC 及 LC/MS 图谱研究五倍子鞣酸精制品的质量。结果:五倍子鞣酸精制品含量 $\geq 98\%$ ,没食子酸含量 $< 0.2\%$ ,具稳定的 HPLC 特征图谱。精制收得率 64%。并制定相应的质量标准。结论:以大孔高分子吸附树脂精制五倍子鞣酸可作为鞣酸含量测定法(中国药典 2000 年版一部附录 X B)的替代法的对照品应用。

**关键词:**五倍子 鞣酸 对照品 制备 质量标准 高分子吸附树脂

鞣质(鞣酸)是广泛存在于植物中一类分子量较大的多元酚化合物,五倍子中含有 50~70% 的五倍子鞣酸,现今对鞣酸组分的质量控制,中国药典 2000 版一部采用皮粉法<sup>[1]</sup>测定鞣酸成分的含量,但该方法为吸附重量法,较为原始,测定周期长,重现性低,影响测定因素较多。现未能采用其它测定方法(比色法、络合法、氧化还原法等)的主要原因是:鞣酸作为一类活性物质,多为结构较复杂的多元酚化合物,较难得单一成分纯品。文献报道<sup>[1-4]</sup>鞣酸含

量测定法研究中常以鞣酸(A. R)为对照品,但该品纯度低(鞣酸含量 $< 85\%$ ),杂质含量高。本研究应用大孔高分子吸附树脂精制五倍子鞣酸<sup>[5]</sup>,制备相对纯度较高(含量 $> 98\%$ )且制定相对稳定的质量标准的精制品拟作为对照品。为寻求皮粉法(中国药典 2000 年版一部附录 X B)替代法奠定了基础。

## 一、实验部分

### 1. 仪器和材料、试剂

#### (1) 仪器。

收稿日期:2004-08-11

修回日期:2004-09-10

\* 国家中医药管理局科学技术研究专项课题(02-03ZL11):鞣质含量测定法(中国药典 2000 版一部)的替代法研究,负责人:吴春燕。

\*\* 联系人:宋光志,主管药师,从事药物分析及检验工作,Tel: 028-86698203, E-mail: sgz0369@163.com。

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 63

旋转薄膜蒸发仪, DW-40 低温浴槽, FD-1 冷冻干燥机, Waters 515 泵, Waters996 二极管阵列检测器, M<sup>32</sup> 色谱软件, 7725i 进样阀及 AT-130 柱温箱。

(2) 没食子酸对照品 (中国药品生物制品检定所), 鞣酸(A. R), 皮粉(含铬 A. R), 乙醇(A. R), 硅胶 G, 聚酰胺薄膜(8×8 cm)(浙江, 台州四甲生化塑料厂), AB-8 大孔吸附树脂(南京大学化工厂)。

(3) 大孔吸附树脂柱的安装及处理。

取 AB-8 型大孔高分子吸附树脂 250 g, 添加乙醇浸泡, 超声处理 30' 滤去乙醇液, 添加蒸馏水浸泡, 超声处理 30', 滤去水液, 反复处理 3 次后, 以水浸液装入玻柱(Φ30 mm, H 500 mm)内, 以水洗涤后备用。

### 2. 鞣酸精制品(对照品)的制备

称取鞣酸(A. R) 20 g, 加水 50 ml 溶解后, 添加 95% 乙醇 150 ml, 搅匀, 置冰箱(2~8℃)放置过夜, 次日, 离心(4000rpm), 滤过, 滤液置于薄膜蒸发仪上减压加热回收乙醇, 浓缩(-0.085 Mpa, 30~50℃), 得约 18 g 黄色粉末, 添加水 500 ml, 溶解(配成约 5% 鞣酸溶液), 将水溶液通过已处理的备用 AB-8 型大孔吸附树脂柱(Φ30 mm, H 500 mm), 以流速 20 ml·min<sup>-1</sup> 动态吸附。吸附完毕后, 树脂柱以水(约 1500 ml)淋洗树脂柱。淋洗后, 以 60% 乙醇脱洗树脂柱(脱洗流速 20 ml·min<sup>-1</sup>), 收集乙醇洗脱液约 500 ml, 减压加热回收乙醇, 浓缩(-0.085 Mpa, 30~50℃)至相对密度为(1.15~1.20), 置于低温浴槽内(-40℃), 预冷冻后, 经冷冻(10pa, 冷阱温度-45℃)干燥得黄色粉状 12.8 g。(收得率 64%)。

### 3. 质量标准

(1) 性状。

黄色粉末, 微有特臭, 味极涩。

(2) 鉴别。

①薄层色谱: 取五倍子精制品 0.2 g, 加甲醇 5 ml, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液; 称取没食子酸对照品 5 mg, 加甲醇 5 ml, 超声处理

15 min, 滤过, 滤液作为没食子酸对照品溶液; 再称取鞣酸(A. R) 0.2 g, 加甲醇 5 ml, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液作为鞣酸对照品溶液。分别吸取上述溶液各 2 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(10 cm×20 cm)上, 以氯仿-甲酸乙酯-甲酸(5:5:1)展开(展距 14 cm)或聚酰胺薄膜(8×8 cm)上, 以 95% 乙醇为展开剂展开(展距 7 cm), 取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铁乙醇液, 晾干, 供试品色谱与没食子酸、鞣酸(A. R)色谱比较, 供试品应无没食子酸斑点。

②检查:

水分: 称取样品约 1 g, 精密称定, 按照中国药典 2000 版一部附录 IX H 第三法测定。水分 ≤ 3%。

炽灼残渣: 称取样品 1 g, 精密称定, 按照中国药典 2000 版一部附录 IX J 测定, 炽灼残渣 < 0.1%。

没食子酸: 样品以水配制成 1% 溶液, 取样 5 μl, 按照五倍子鞣酸 HPLC 特征图谱测定法, 参见(3), 特征峰( $t_R \approx 2.8$  min)归一化峰面积值小于 0.2%。

③含量测定: 称取样品约 1 g, 精密称定, 按照中国药典 2000 版一部附录 X B 测定, 按干燥品计算样品鞣酸含量 ≥ 98%。

(3) 五倍子鞣酸 HPLC 特征图谱的测定。

参照高效液相色谱法(中国药典 2000 版一部附录 VID), 结合中药注射剂色谱指纹图谱研究的相关要求进行测试。

①色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Waters Symmetry Shield Rp18 柱, 150×3.9 mm, 5 μm), 柱温 37℃, A 流动相为乙腈(含 0.1% 三氟乙酸), B 流动相为水(含 0.1% 三氟乙酸), 线性梯度洗脱。0~80 min 时 A 为 10%~35%, 81~85 min 时 A 为 70%, 86 min 时 A 回到起始比例; 流速 0.80 ml/min; 检测波长 280 nm, 理论板数按参照峰计算应不低于 5000。

②五倍子鞣酸(A. R)样品液制备: 称取样品 0.1 g, 加水 8 ml 溶解后, 添加水至 10 ml, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得(含鞣酸 10 mg·ml<sup>-1</sup>)。

③五倍子鞣酸精制品样品液制备: 称取样品

0.1g,加水8ml溶解后,添加水至10ml,摇匀,0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即得(含鞣酸10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )。

④测定法:分别取供试样品液各5 $\mu\text{l}$ ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至80min,以参照峰( $t_R\approx 35\text{min}$ )为标准计算各特征峰相对保留值。

五倍子鞣酸精制品8~12此峰组峰面积归一化值>96%,2号峰归一化值<0.2%。

(4)五倍子鞣酸LC/MS图谱的测定——峰组成分研究。

鉴于五倍子鞣酸(混合物)各组分结构十分类似,其理化性质和色谱行为十分相近。本试验选择专属性强、灵敏度高的反相HPLC法进行特征图谱测定,并采用线性梯度洗脱方法,增加组分间的分离度和提高方法的精密度,但均有部分组分(9~12号峰组)难以完全分离。本研究采用各峰组成分进行HPLC-DAD及LC/MS研究。检验结果表明,这4个峰组内的化合物具有类同的紫外光谱和相近的质谱,进一步说明各峰组内的化合物是理化性质接近的异构体,[各峰组的分子量差值均为152,以8号峰化合物为母体(分子量为940),以后各峰组均增加一没食子酸基团]。

## 二、结果

1. 采用AB-8型大孔吸附树脂对五倍子鞣酸(A.R)进行纯化,可制备纯度较高的五倍子鞣酸精制品

(以中国药典2000版一部附录XB—鞣酸含量测定法测定鞣酸含量高于98%,没食子酸含量低于0.2%)。其质量指标明显优于A.R品级。比较测试结果见表1。

结果表明:五倍子鞣酸精制品鞣酸含量>98%,相关物质没食子酸含量<0.2%,拟定质量标准明显较五倍子鞣酸(A.R)提高。TLC图谱见图1。

2. 采用HPLC特征图谱研究五倍子鞣酸(A.R)与五倍子鞣酸精制品特征图谱

(具12特征吸收峰或峰群),比较结果见表2。

结果表明:五倍子鞣酸精制品HPLC特征图谱

表1 五倍子鞣酸(AR)与五倍子鞣酸精制品的质量比较

质量指标项目	五倍子鞣酸(A.R)	五倍子鞣酸(精制品)
TLC图谱	具没食子酸特征斑点	无没食子酸特征斑点
水分	9.35%	2.7%
炽灼残渣	2.94%	0.06%
没食子酸	5.2%	0.075%
(T.A)含量	85.7%	98.01%

表2 五倍子鞣酸(AR)与五倍子鞣酸精制品HPLC特征谱比较

峰号	五倍子鞣酸(A.R) 归一化峰面积(%)	五倍子鞣酸(精制品) 归一化峰面积(%)
1~7号峰(2号峰)	11.1(5.2)	3.32(0.075)
8~12号峰	88.9	96.68

表3 五倍子鞣酸精制品HPLC特征吸收峰与分子量的关系

峰号	分子量	没食子酰基数
8	940	5
9	1092	6
10	1244	7
11	1396	8
12	1548	9

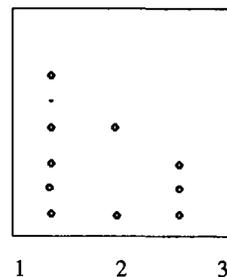


图1 TLC图谱

1. 五倍子鞣酸(A.R); 2. 没食子酸对照品; 3. 五倍子鞣酸精制品。

1~7号峰归一化面积是3.32%,8~12号峰归一化面积是96.68%。

3. 五倍子鞣酸的LC/MS图谱研究表明:五倍子鞣酸精制品各特征吸收峰群具相近分子量

各峰群间分子量相差为152。8~12号峰组为五倍子鞣酸的主要组分。结果见表3。

## 三、讨论

1. 采用AB-8型高分子大孔吸附树脂,应用于五倍子鞣酸的纯化,可以得较高纯化的五倍子鞣酸精制品

精制工艺收率可达64%。鞣酸含量达98%以上,没食子酸(相关物质)<0.2%以下。

2. 五倍子鞣酸及五倍子鞣酸精制品的 HPLC 特征图谱比较研究表明,五倍子鞣酸精制品,虽然具多吸收峰群,但已无没食子酸等低分子物质峰

根据图谱相对吸收峰面积的归一化法计算,鞣酸含量与皮粉法测试结果相吻合。通过 LC/MS 图谱进行研究结果,证实五倍子鞣酸精制品图谱中的主要吸收峰群分子量在 940 ~ 1548 范围内,具较稳定图谱。

3. 五倍子鞣酸为一类多元酚化合物,系由一分子葡萄糖与 5-9 没食子酸以  $\beta$ - 键结合,为不同分子量的混合物,采用一般分离方法难以制得单一成分

采用大孔高分子吸附树脂制备五倍子鞣酸精制品,虽不为单一成份化合物,但具有较稳定的 HPLC 特征图谱,且干扰含量测定的没食子酸及低分子类鞣酸大幅度降低。制定之质量标准能反映和控制其对照品质量。五倍子鞣酸精制品作为中国药典鞣质含量测定法替代法(酒石酸亚铁比色法)的方法学研究的对照品是可行的。

#### 参考文献

- 1 国家药典委员会,中华人民共和国药典 2000 年版一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 附录 X B.
- 2 叶世云, 吕军. 国产云实属植物单宁酸含量分析 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(5): 265 ~ 266.
- 3 林余霖, 程惠珍. 五倍子及其寄生植物的单宁酸含量分析 [J]. 中国中药杂志, 1977, 22(1): 16 ~ 17.
- 4 谢道刚, 张庭燕. 多叶咽宁口含液中鞣质含量测定方法探讨 [J]. 华西药学杂志, 1995, 10(3): 138 ~ 140.
- 5 专刊公开号 CN1323582A[P].

(责任编辑:刘维杰)

#### 生物科技前沿的华人方阵(下)

在生物技术方面,现任美国纽约爱伦戴蒙德艾滋病研究中心主任的何大一教授,因发现可抑制艾滋病的“鸡尾酒疗法”,被美国《时代》周刊评选为 1996 年度风云人物的科学家。

当然还有克隆牛的杨向东教授,搞水稻分子生物学的吴瑞先生,现在担任耶鲁大学生物系主任的许田教授……

在国内生物学领域中,陈竺因在白血病发病原理理论和新型的白血病基本可以治愈,而在 2003 年当选为美国科学院外籍院士。我国在生命科学和生物技术方面的发展,近年来是突飞猛进的,2002 年在科学引证索引,也就是国际上最权威的统计范围内发表的科学论文,中国已经占到世界的第六位。

曾任德车马普学会生物化学研究所所长,1988 年因确定光合作用反应中心的三维立体结构而与另外两名德国科学家分享获诺贝尔化学奖的胡贝尔教授,在 7 月 17 日的一次讲演中说,“可以肯定的是,中国的生物技术近年来发展很快,像人类基因组、水稻基因组及抗击 SARS 等方面的研究均取得了突出成绩。如果中国不在生物、医药方面大量投入,那么这方面的发现就会在别的国家完成,中国应该抓住机会。”

正如王晓东教授当选美国科学院院士后对记者说的:“华人在生物学领域可以做得一点都不比别人差!”

“讲到华人在生物学方面的贡献,不能不提到 1958 年到 1964 年间中国科学家成功合成胰岛素,领先世界,这是完全可以得到诺贝尔奖的成就。可是因为当时中国与世隔绝,所以此成就未能获奖。”杨振宁教授这样评价华人在生物学领域的成就。

杨振宁认为生物学发展势头和活力与上世纪初的物理学有些相似。从资助资金、文章发表数目来看,其他学科都无法和生物学相比。在上个世纪 50 年代,华裔科学家在数学、物理学与工程方面的贡献已经很多了,受到国际上的广泛关注,但在生物学与医学的西方杂志中,华人的名字出现得还不太多。不过从上世纪七八十年代以来,情形完全不同了,华人已经打入世界生物学与医学界的前沿;简悦盛、徐立之、何大一和其他华人生物学与医学研究者,已经被多次提名到诺贝尔奖委员会。华裔科学家获生物医学诺贝尔奖,应该是不久以后会再度引起我们极大欢欣的新闻。(文摘)

tion, emphatically probes into the feasibility and superiority of this technology in its application to the separation of the elements of saponin, and analyzes the prospects of the application of this technology as well.

**Key Words:** foam separation, saponin, separation, application

### **Studies on Preparation and Quality Standard of Tannin Reference Substance**

*Song Guangzhi, Liu Jing and Xie Dao gang*

( *Institute of Tradition<sup>l</sup> Chinese Medicine, Sichuan Academy of Tradition Chinese medicine<sup>l</sup>, Chengdu 610031, China* )

**Objective:** To prepare purified products (reference substances) of tannin from *Galla Chinensis* and formulate their quality standards. **Method:** To prepare tannin from *Galla Chinensis* with macropore high molecular absorption resin and analyze the quality of the purified tannin by HPLC method and LC/MC spectra. **Result:** The purified tannin product obtained from *Galla Chinensis* contains NLT 98% of tannic acid and less than 0.2% of gallic acid, and has stable HPLC characteristic spectrum. The yield of purification processing is 64% and relevant quality standards are formulated. **Conclusion:** Tannin prepared with macropore high molecular absorption resin can be used as reference substance in the substitution method of tannin assay (Appendix XB, Volume I, CP2000).

**Key Words:** macropore high molecular absorption resin, tannin, galla, reference substance, quality standard, preparation

### **A Personal View of Quality Control of Traditional Chinese Medicine**

*Li Zhonghong and Du Guanhua*

( *Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences  
and Peking Union University of Medical Sciences, Beijing 100050* )

On the basis of the examination and testing of the label components of some Chinese medicines and the analysis of their mode of quality control by fingerprint and in combination of the authors' study in this area this article proposes that the examination and control of the effective components of traditional Chinese medicine (TCM) should be the direction of TCM quality control. It also expounds the way and feasibility of putting in practice the mode of the testing and control of TCM effective components.

**Key Words:** testing and control of effective components, testing of label components, fingerprint, quality control of Chinese medicine

### **Study on Quality Standards of Composition of Major Constituents of *Rhizoma Coptidis***

*Zhong Guoyue, Huang Xiaoping, Chen Shijiang, Li Longyun and Ma Kaisen*

( *Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China* )

{ *World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica* } 87