

鞣质含量测定法(中国药典 2005 年版 一部附录 XB)方法学验证*

□ 谢道刚** 宋光志 刘 静 (四川省中医药研究院中医研究所 成都 610031)

摘 要:目的:验证鞣质含量测定法(中国药典 2005 年版一部附录 XB)。方法:采用干酪素空白干扰试验,确定方法存在的问题。结果:鞣质吸附剂-干酪素含有干扰测定的物质,导致方法测定结果明显偏低。结论:鞣质含量测定法(中国药典 2005 年版一部附录 XB)应予修正。

关键词:鞣质 含量测定 中国药典 干酪素

鞣质为中药材中广泛存在的一类多元酚化合物,现研究表明鞣质为一类中药有效部位,但化学结构复杂^[1]。鞣质含量测定曾多采用皮粉法(中国药典 2000 年版一部附录 XB),但该法为吸附重量法,样品取样量大,重现性差,结果误差高,且耗时(2 个工作日)应予以新法替代^[2]。中国药典(2005 年版一部)现制定了以磷钼钨酸为显色剂,以没食子酸为对照品,以干酪素为吸附剂的鞣质含量测定法(以下简称干酪素法)^[3],替代陈旧的皮粉法。但该干酪素法在应用中存在鞣质含量测定结果明显偏低的现象,为此,对干酪素法的方法学进行验证,查明原因,以利应用。

一、仪器与试药

1. 仪器

722 型分光光度计(上海分析仪器三厂)。

2. 试药

没食子酸(中国药品生物鉴定所),碳酸钠(重庆

北碚精细化工厂),干酪素(成都科龙化学试剂厂,批号 041005;杭州天和微生物试剂厂,批号 041028)。中华老鹳草鞣酸(自制,批号 050307)。中华老鹳草鞣酸精制品(自制,大孔树脂精制,批号 050429)。

磷钼钨酸试剂:取钨酸钠 100g,钼酸钠 25g,加水 700mL 使溶解,加盐酸 100mL,磷酸 50mL,加热回流 10 小时,放冷,再加硫酸锂 150g,水 50mL 和溴 0.2mL,煮沸除去残留的溴(约 15min),冷却,加水稀释至 1000mL,滤过,即得。(所用试药均为分析纯)。

二、方法及结果

1. 对照品溶液的配制

精密称取没食子酸 0.0541g,置于 100mL 棕色量瓶中,加水溶解,定容,混匀后,吸取 5.0mL 置于 100mL 棕色量瓶中,以水定容,混匀,备用(每 mL 含没食子酸 0.02705mg)。

2. 标准曲线的制定

精密量取对照品溶液 0.5mL,1.0mL,2.0mL,3.0mL,4.0mL,5.0mL 分别置于 25mL 棕色量瓶中,各

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2006-02-13

* 国家中医药管理局科学技术研究专项课题(02-032L11):鞣质含量测定法 2000 版一部替代法研究,课题负责人:吴春燕。

** 联系人:谢道刚,主任药师,研究方向:中药制剂与新药开发,Tel: 028-86698203, E-mail: xdg0513@163.com。

加入磷钼钨酸试液 1mL,再分别加入水 11.5mL,11mL,10mL,9mL,8mL,7mL,用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置 30min 以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(附录 VA),在 760nm 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。

直线回归方程: $A = 5.188C - 0.005668$

3. 干酪素的空白干扰试验

称取干酪素(批号 041005 及 041028)0.6g,置于 100mL 锥形瓶内,(各 5 份),每份样品中加入蒸馏水 25mL,置 30℃ 水浴中保温 1h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 2mL,置 25mL 棕色量瓶中,照标准曲线的制备项下的方法自“加入磷钼钨酸试液 1mL”起,加水 10mL,依法测定吸光度。

试验结果表明:干酪素水浸出液中,含有干扰试验物质;不同生产厂及批号的干酪素,干扰试验物质含量有明显差异。故“不被吸附多酚”测定中,应采用同生产厂家、同批号的干酪素做空白试验。

4. 干酪素对没食子酸的吸附试验

称取干酪素(批号 041005)0.6g,置 100mL 锥形瓶中(共 5 份),分别加入没食子酸对照液($0.02705\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)3.0mL 及蒸馏水 22mL 混匀后,置 30℃ 水浴中保温 1h,时时振摇,取出放冷,摇匀,滤过。弃去初滤液,精密量取滤液 2mL,置 25mL 棕色量瓶中,照标准曲线制备项下方法测定吸光度。

另外,精密吸取没食子酸对照液 2mL 置 25mL 棕色容量瓶中,照标准曲线制备项下方法测定吸收度 A 值为 0.425;以蒸馏水 25mL 为空白对照,照干酪素的空白干扰试验(1.2.3)测定 A 值为 0.061。除去干酪素空白干扰 A 值为: $0.487 - 0.061 = 0.426$ 。

由上试验结果表明:干酪素不吸附没食子酸。

5. 精密度试验

精密吸取没食子酸对照品液($0.02705\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)2.0mL,置 25mL 棕色量瓶中,加入磷钼钨酸试液 1mL,加水 10mL,用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置 30min,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(附录 VA),在 760nm 的波长处测定吸光度(A),连续测定 5 次,测定结果见表 4。

由上试验结果表明,精密度良好。

6. 稳定性试验

精密吸取没食子酸对照品液($0.02705\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)2.0mL,置 25mL 棕色量瓶中,加入磷钼钨酸试液 1mL,再加水 10mL,用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,分别在 5min, 10min, 15min, 30min, 45min, 60min, 90min 放置时间点,测定其样品液的吸光度(A)值,结果见表 5。

表 1 不同浓度对照品溶液的吸光度测定

对照品溶液取量(mL)	A 值	对照品溶液取量(mL)	A 值
0.5	0.066	3.0	0.413
1.0	0.135	4.0	0.543
2.0	0.278	5.0	0.706

$b = -0.005668, a = 5.188, r = 0.9995$ 。

表 2 干酪素的空白干扰试验结果

干酪素批号	空白试验吸光度						RSD%
	1	2	3	4	5	X	
041005	0.060	0.057	0.061	0.066	0.063	0.061	5.51
041028	0.101	0.114	0.099	0.124	0.116	0.111	9.54

表 3 干酪素对没食子酸的吸附试验结果

样品号	吸光度(A)	样品号	吸光度(A)
1	0.482	4	0.485
2	0.487	5	0.493
3	0.490	X	0.487

表 4 精密度测定结果

测试次数	吸光度(A)值	测试次数	吸光度(A)值
1	0.291	4	0.291
2	0.291	5	0.290
3	0.290		

表 5 稳定性测定结果

加入显色剂后 放置时间(min)	吸光度 (A)值	加入显色剂后 放置时间(min)	吸光度 (A)值
5	0.295	45	0.289
10	0.293	60	0.288
15	0.291	90	0.284
30	0.290		

试验表明:显色放置后,吸光度有下降趋势,测定吸光度的时间以显色液放置 30min 是必要的。

7. 重现性试验

(1) 称取中华老鹳草鞣酸(批号 050307)约 0.06g,精密称定,(共 6 份),分别置 100mL 棕色量瓶中,以水稀释至刻度(样品备用液)。精密量取样品备用液 5mL,置 100mL 棕色量瓶中,以水定容,供作样品液。分别精密量取样品液 2mL,置 25mL 棕色量瓶中,照标准曲线制备项下方法测定吸光度,并计算总酚量。

(2) 精密量取供试样品液 25mL,加至已盛有干酪素 0.6g 的 100mL 具塞锥形瓶中,密塞,置 30℃ 水浴中保温 1h,时时振摇,取出放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取滤液 2mL,置 25mL 棕色瓶中,照标准曲线的制备项下方法测定吸光度,并计算不被吸附的多酚量(应扣除干酪素 0.6g 空白试验值)。

按下式计算鞣质含量:

鞣质含量 = 总酚量 - 不被吸附的多酚量

由上试验结果表明,鞣质平均含量为 63.56%, RSD2.35% (测试结果见表 6)。

8. 加样回收率试验

(1) 供试样品备用液的配制:称取中华老鹳草鞣酸约 0.6g,精密称定(供 6 份),每份分别置 100mL 棕色量瓶中,以水溶解并定容,摇匀,备用。

(2) 中华老鹳草鞣酸精制品备用液的配制:称取中华老鹳草鞣酸精制品约 0.06g,精密称定,置 100mL 棕色中,以水溶解后并定容。摇匀,备用。

(3) 供试验用溶液的制备:精密量取供试样品备用液 5.0mL,置 100mL 棕色量瓶中(共 6 份),再依次分别精密量取加入中华老鹳草鞣酸精制品备用液 1.0mL,1.0mL,2. mL,2. mL,3. 0mL,3. 0mL,分别加水定容,摇匀。

(4) 测试方法:分别精密量取供试验用溶液 2.0mL,照鞣质含量测定方法(附录 XB)中测定法,测定总酚及不被吸附的多酚,并计算供试样品鞣质含量。测试结果见表 7。

加样回收率试验结果表明,干酪素法测定中华老鹳草鞣酸,鞣质含量其回收率 95.65 ~ 97.66% 之间

(平均 96.94%, RSD0.912%)。

9. 样品鞣质含量测定

称取中华老鹳草鞣酸(中试品)约 0.06g,精密称定,置 100mL 棕色量瓶中,以水溶解后,加水至刻度,摇匀,再精密量取 5.0mL 置 100mL 棕色量瓶中,以水稀释至刻度,摇匀,作供试品液。按鞣质含量测定法(中国药典 2005 一部附录 XB)测定,不被吸附的多酚测定,增加干酪素空白试验,按下式计算:

不被吸附多酚量 =

过干酪素后该液多酚量 - 干酪素空白试验多酚量
3 批中试品测试结果见表 8。

表 6 重现性测试结果

试验号	样品量(g)	鞣酸含量(%)	X(%)	RSD
1	0.0626	65.76		
2	0.0694	63.12		
3	0.0649	62.73	63.56	2.35
4	0.0575	61.45		
5	0.0685	63.72		
6	0.0617	64.55		

表 7 加样回收率测定

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	鞣质回 收率/%	平均值 (%)(X)	RSD (%)
0.03537	0.01199	0.04530	95.65		
0.03566	0.01199	0.04384	96.04		
0.03637	0.02397	0.05845	96.87		
0.03631	0.02397	0.05887	97.66	96.94	0.912
0.03493	0.03596	0.06931	97.77		
0.03454	0.03596	0.06868	97.42		

表 8 中试样品测试结果

样品批号	总酚 (%)	不被吸附的 多酚(%)	鞣质含量 (%)		含量误 差率(%)
050307	74.36	18.77*	10.20**	55.59* 64.16**	13.36
050314	73.36	18.64*	10.17**	54.4* 62.88**	13.47
050321	71.65	17.49*	8.38**	54.16* 63.27**	14.40

样品测定结果表明:鞣质含量测定法中不被吸附多酚测定中未进行干酪素空白试验(即未扣除干酪素对测定的影响),样品测定结果偏低(- 13.36% ~ - 14.0%)

三、讨 论

干酪素法(中国药典 2005 年版一部附录 XB),所采用鞣质吸附剂 - 干酪素,含有干扰试验的物质,明显影响“不被吸附多酚”的含量测定,由于中国药典 2005 年版规定方法中,未进行干酪素空白对照试验,未扣除干酪素空白试验值,故样品鞣质含量测定结果偏低,不能准确反映鞣质实际含量。

不同生产厂及批号的干酪素,其空白对照试验值有明显的差异,测定中应使用同批次的干酪素。

干酪素法与原皮粉法比较具有样品取量少,灵敏,快速等特点。但影响方法准确性的因素甚多,其主要因素之一为干酪素中微量杂质的影响。

鞣质含量测定法(中国药典 2005 年版一部附录 XB)应予修正,在“不被吸附的多酚”项增添干酪素的空白试验,计算时应予扣除。

参考文献

- 1 北京医学院. 中草药成分化学. 北京:人民卫生出版社 1981, 479.
- 2 宋光志,刘静,谢道刚. 鞣质含量测定法(中国药典 2000 版一部)的替代法研究(一). 世界科学技术 - 中医药现代化, 2004. 第 6 卷第 6 期 63 ~ 66.
- 3 中华人民共和国药典委员会. 中国药典 2005 年版一部. 北京:化学工业出版社. 2005. 附录 57.

Tannin Measurement and Associated Methodological Verification (Chinese Pharmacopoeia 2005)

Xie Daogang, Song Guangzhi, Liu Jing

Sichuan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicines, Chengdu 610031

Tannin content measurement and associated methodological verification (Chinese Pharmacopoeia 2005, Volume 1, Appendix XB) is a major subject of the study. In the study, blank interference test of casein was used to verify the accuracy of measuring. It is found that casein, or tannin adsorbent, contains some elements that muddle the measuring, which results in an unreasonably low measuring result. Authors believe that the tannin measuring process set up by the Chinese Pharmacopoeia 2005 should be modified.

Keywords: Tannin measurement, Chinese Pharmacopoeia, casein

(责任编辑:刘维杰,责任编审:周立东,责任译审:邹春申)

新疆特产沙枣胶多糖项目通过验收

近日,中国科学院高技术研究与发展局组织专家对院“西部行动”项目“新疆特产资源沙枣胶多糖的综合开发利用”进行了验收。

新疆特产资源沙枣胶多糖的综合开发利用项目由中国科学院长春应用化学研究所与中科院新疆理化技术研究所共同承担完成。该项目形成了沙枣胶采收的全配套技术,实现了沙枣胶百吨级的分离和纯化工艺,为大规模沙枣树种植与

沙枣采收建立了技术基础。并已申请了 2 项专利,获得授权专利 1 项,在本工艺研究中得到实施。项目组在《任务书》规定的目标之外还开展了以沙枣胶为基质的复合多糖研究,实现了葡萄糖的控制释放,在治疗便秘、肥胖方面开展了研究工作,取得了有益的研究结果。

专家组听取了总结报告,审阅了相关资料,考察了中试现场。经过讨论,专家组同意项目通过验收。

(文摘)