HPLC 法测定茵栀黄注射液中水解产物没食子酸

尹胜利，浦益琼，张　彤*，陶建生
上海中医药大学，上海　201203

摘　要：目的　建立灵敏度高、专属性强的茵栀黄注射液中鞣质的检测方法。**方法**　以茵栀黄注射液为模型药物，采用高效液相色谱法测定注射液中水解没食子酸。Diamonsil ODS 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液（5∶95）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 271 nm；柱温室温；进样量 20 μL。**结果**　没食子酸进样量在 36.125～231.20 ng 与峰面积线性关系良好，平均回收率为 99.6%，RSD 为 1.77%。茵栀黄注射液中不能检测出游离没食子酸，而水解没食子酸量较高，提示茵栀黄注射液中含有一定量的可水解鞣质。**结论**　通过测定注射液中水解没食子酸，可以达到间接控制注射液中鞣质残留量的目的。

关键词：茵栀黄注射液；鞣质；水解产物；没食子酸；高效液相色谱
中图分类号：R284.2；R286.02　　**文献标志码：A**　　**文章编号：**0253 - 2670(2011)02 - 0288 - 03

Determination of hydrolysate gallic acid in Yinzhihuang Injection by HPLC

YIN Sheng-li, PU Yi-qiong, ZHANG Tong, TAO Jian-sheng
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Key words: Yinzhihuang Injection; tannin; hydrolysate; gallic acid; HPLC

随着中药注射剂应用的增加，与该剂型相关的不良反应的报道日益增多，其质量和安全性正引起全社会的广泛关注[1-4]。有报道认为鞣质是致敏的可能原因之一，鞣质的存在会影响中药注射液微粒系统的稳定性[5]，导致不良反应的发生[6]；此外鞣质还能与组织蛋白结合形成硬结，使注射部位产生疼痛、坏死，一旦入血还能作为半抗原与血浆蛋白的氨基结合成为高致敏原，诱发严重不良反应。而《中国药典》所用的鞣质检查方法为鸡蛋清和氯化钠 - 明胶法[7]，但方法灵敏度低，易出现假阴性结果。

茵栀黄注射液由茵陈、栀子、金银花提取物及黄芩苷配制而成，具有清热解毒、利胆退黄、降低转氨酶的作用，临床上有较多不良反应报道[8-9]。茵栀黄注射液中栀子等药材含有较多的鞣质类成分，现有注射液制备工艺通常难以除尽鞣质。本实验以茵栀黄注射液为模型药物，利用可水解鞣质在一定条件下水解成没食子酸的性质，建立了高效液相色谱法测定水解没食子酸的方法，达到间接控制注射液中鞣质残留量的目的，为建立灵敏度高、专属性强的鞣质残留量的检测方法提供了一种新的思路。

1　仪器与材料

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪；F5HA 型恒温水浴锅（上海申生科技有限公司）；80—2 台式低速离心机（上海医疗器械有限公司手术器械厂）；PHS×3C 型 pH 计（上海精密科学仪器有限公司）。

没食子酸对照品（批号 110831-200302）购自中国药品生物制品检定所；甲醇（色谱纯）、磷酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯；水为重蒸水；茵栀黄注射液（10 mL/支），山西三九万荣制药厂提供。

2　方法与结果

2.1　波长的选择

没食子酸对照品溶液在紫外 - 可见光全波长扫描，在 271 nm 处有最大吸收，所以选择测定波长为 271 nm。

2.2　色谱条件

Diamonsil ODS 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液（5∶95）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 271 nm；柱温室温；进样量 20 μL。在上述条件下，没食子酸与两个相邻色谱峰的分离度大于 1.5。理论板数按没食子酸峰

收稿日期：2010-06-09
基金项目：国家自然基金重大研究计划（90709047）；上海市教委资助项目（SZY-07025, J50302）
作者简介：尹胜利（1983—），男，河北唐山人，硕士，研究方向为中药制药技术。Tel: (021) 51322318　Email: yinsl2009@126.com
*通讯作者　张　彤　Tel: (021)51322318　Email: zhangtdmj@yahoo.com.cn

计算不低于 19 000。色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察

精密称定没食子酸对照品适量，置 10 mL 量瓶中，用流动相溶解并加至刻度，制成对照品储备液。精密吸取没食子酸对照品储备液，用流动相分别稀释配制成 115.6、57.8、28.9、14.45、7.225、3.612 5、1.806 2 μg/mL，进样，测定峰面积。以进样量为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，得线性方程 A＝59 588 C－2.436（r＝0.999 9），结果表明没食子酸进样量在 36.125～231.20 ng 与峰面积线性关系良好。

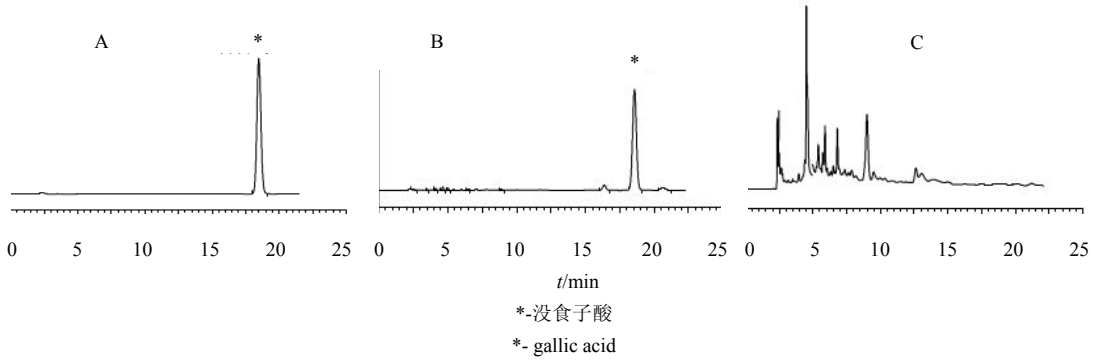

图 1 没食子酸对照品（A）、水解后（B）和水解前（C）样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of gallic acid reference substance (A), sample after hydrolysis (B), and sample before hydrolysis (C)

2.4 供试品溶液的制备

取茵栀黄注射液 5 mL 于 10 mL 量瓶中，加入 4 mol/L HCl 溶液 0.5 mL，在 100 ℃水解 4 h；待冷却至室温后以 3 000 r/min 离心，取上清液用 0.5 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 2～3，测定总体积；精密量取 1 mL 于 25 mL 量瓶中，用蒸馏水稀释，定容，混匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.5 精密度试验

取高、中、低（57.8、14.45、3.612 5 μg/mL）3 个质量浓度的对照品溶液，连续进样测定，记录没食子酸峰面积，计算得其 RSD 分别为 0.43%、0.60%、0.03%（n＝5）。取高、中、低 3 个质量浓度的对照品溶液，5 d 内重复进样测定，记录没食子酸峰面积，计算得其 RSD 分别为 0.26%、0.49%、0.28%（n＝5）。

2.6 稳定性试验

取批号 0505282 样品制备供试品溶液，分别在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，进样量为 20 μL，记录没食子酸峰面积，计算得其 RSD 为 0.85%。

2.7 重现性试验

批号 0505282 茵栀黄注射液样品平行取样 5 份，制备供试品溶液，每次进样 20 μL，记录没食子酸峰面积，计算质量分数的 RSD 为 1.08%。

2.8 加样回收率试验

取批号 0505282 茵栀黄注射液样品 2.5 mL，共 9 份，水解后分别按 80%、100%、120%的量加入没食子酸对照品，每一个水平平行 3 份，制备供试品溶液，测定，计算回收率，结果平均加样回收率为 99.6%，RSD 为 1.77%。

2.9 样品测定

取批号 0505281、0505283、0505284 茵栀黄注射液，制备供试品溶液，进样测定，进样量为 20 μL，结果见表 1。

表 1 3 批茵栀黄注射液中没食子酸的测定结果

Table 1 Determination of gallic acid in three batch of Yinzhihuang Injection

批号	没食子酸/(mg·mL^{-1})	RSD/%
0505281	1.43	0.69
0505283	1.41	3.00
0505284	1.48	2.30

3 讨论

中药注射剂质量和安全性是近年来药学科研工作的热点之一。目前的中药注射剂可以通过测定和指纹图谱技术控制其所含的有效成分，同时也可以通过处方筛选以及规范的制备方法来尽量减少热原反应、溶血反应的发生[10-11]。然而与中药注射剂安全性相关的因素还有很多，如鞣质残留与中药注射液安全性也密切相关。然而中药注射液成分复杂，现有的鞣质检查和测定方法存在灵敏度低、可靠性差、容易出现假阴性结果的缺点。

鞣质又称单宁或鞣酸，从化学结构和性质上可分为可水解鞣质、缩合鞣质和复合鞣质。可水解鞣质水解后能产生没食子酸。本实验利用鞣质的这个性质，以茵栀黄注射液为研究对象，考察茵栀黄注射液中水解鞣质的水解条件，通过 HPLC 法测定注射液中残留鞣质水解后产生的没食子酸的量，达到间接控制注射液中鞣质残留量的目的，为建立灵敏度高、专属性强的鞣质检测方提供了一种新的思路。

茵栀黄注射液不能检测出游离没食子酸，而水解没食子酸的量较高，说明茵栀黄注射液中含有一定量结合的可水解鞣质。中药注射液制备工艺中的鞣质去除方法有待进一步研究。

参考文献

[1] 李　静, 郑新元, 唐元泰. 关于中药注射剂安全性问题的探讨 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1578-1579.

[2] 刘桂林, 张韻慧, 王生田, 等. 中药注射剂安全性问题分析及对策 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 附 1-附 3.

[3] 张　倩, 金　城, 肖小河, 等. 中药注射剂不良反应与质量波动早期预警方法的商建 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 337-340.

[4] 刘春平, 易智彪. 关于中药注射剂研究开发及安全性问题的思考 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1162-1166.

[5] 段立运, 陈爱萍. 影响中药注射液不溶性微粒的因素 [J]. 中华临床医药, 2004, 5(12): 75-76.

[6] 岳大彪, 代喜国. 中药注射液中不溶性微粒所致临床不良反应的研究 [J]. 黑龙江中医药, 2007(6): 53-55.

[7] 王晓春, 杨建春, 徐军辉. 中药注射液中鞣质检查法的探讨 [J]. 中国药品标准, 2002(2): 30-31.

[8] 常学文，赵桂清. 茵栀黄注射液不良反应 23 例临床分析[J]. 中国社区医师, 2008 (10): 79.

[9] 张　红, 王术梅, 魏　月. 茵栀黄注射液致不良反应临床分析 [J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(7): 86-87.

[10] 郭　青, 吴晓燕, 史清水, 等. 中药注射剂质量评价的有关研究思路、方法和建议 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 351-360.

[11] 李丽香, 李水福. 中药注射剂不良反应的发生原因及预防对策 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 附 4-附 6.

郑 重 声 明

天津中草药杂志社（出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicine*s（CHM）、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊）未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议，凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动，均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益，天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利，特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“**www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com**”，切勿上当受骗；若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况，请检举揭发。

电话：022-27474913　　E-mail:zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社