

## HPMEC-ELSD法检测注射用丹参多酚酸中大分子物质

李莉<sup>1,2</sup>, 李春<sup>3</sup>, 王江辉<sup>4</sup>, 孙伟<sup>5</sup>, 苏小琴<sup>1,2</sup>, 尚献召<sup>1,2</sup>, 李兵<sup>1,2</sup>, 张磊<sup>1,2\*</sup>, 鞠爱春<sup>1,2\*</sup>

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402
2. 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室, 天津 300402
3. 天津市药品检验研究院 北辰药品检验所, 天津 300400
4. 天津市滨海新区大港医院, 天津 300270
5. 天士力医药集团股份有限公司, 天津 300410

**摘要:** 目的 建立注射用丹参多酚酸(SAFI)中大分子物质(相对分子质量 $\geq 1.0 \times 10^4$ )的高效分子排阻色谱-蒸发光散射(HPMEC-ELSD)检测方法。方法 采用超滤离心方法(截留相对分子质量为3 000, 转速为4 000 r·min<sup>-1</sup>)对供试品溶液中的大分子物质进行分离富集。色谱条件为: 检测器ELSD, Ultrahydrogel 500与Ultrahydrogel 250色谱柱串联, 流动相0.02%甲酸水溶液, 流动相体积流量0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温35 °C, 进样量10  $\mu$ L, 压缩空气体积流量2.5 L·min<sup>-1</sup>, 漂移管温度105 °C, 不分离模式, 增益1。结果 该方法空白无干扰, 专属性良好; 精密度、重复性、加样回收率均良好; 右旋糖酐在相对分子质量2 700~36 800线性良好, 回归方程为 $Y = -0.220 5 X + 10.247 0 (R^2 = 0.994 5)$ ; 对照品溶液和供试品溶液50 h稳定性良好; 不同流动相、流动相体积流量、柱温、压缩空气体积流量、漂移管温度等的耐用性良好。17批SAFI均未检出大分子物质。结论 建立的HPMEC-ELSD方法简便、快捷, 可用于SAFI中大分子物质的检测。

**关键词:** 高效分子排阻色谱-蒸发光散射(HPMEC-ELSD)检测法; 注射用丹参多酚酸(SAFI); 大分子物质; 右旋糖酐; 相对分子质量; 超滤

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2186-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.016

## Determination of macromolecular substances in Salvianolic Acids for Injection by HPMEC-ELSD

LI Li<sup>1,2</sup>, LI Chun<sup>3</sup>, WANG Jianghui<sup>4</sup>, SUN Wei<sup>5</sup>, SU Xiaoqin<sup>1,2</sup>, SHANG Xianzhao<sup>1,2</sup>, LI Bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1,2</sup>, JU Aichun<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China
2. Tianjin Enterprise Key Laboratory for Safety Evaluation of TCM Injections, Tianjin 300402, China
3. Tianjin Beichen Institute for Drug Control, Tianjin 300400, China
4. Dagang Hospital of Tianjin Binhai New Area, Tianjin 300270, China
5. Tasly Group Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To establish a HPMEC-ELSD method for the determination of macromolecules (relative molecular weight  $\geq 1 \times 10^4$ ) in salvianolic acid for injection (SAFI). **Methods** Macromolecular substances in the test solution were separated and enriched by ultrafiltration centrifugation (relative molecular weight cut-off 3 000, rotation speed 4 000 r·min<sup>-1</sup>). The chromatographic conditions were as follows: ELSD as detector, Ultrahydrogel 500 and Ultrahydrogel 250 column in series, 0.02% formic acid aqueous solution as mobile phase, volumetric flowrate of mobile phase 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature 35 °C, injection volume 10  $\mu$ L, compressed air volumetric flowrate 2.5 L·min<sup>-1</sup>, drift tube temperature 105 °C, no separation mode, gain 1. **Results** The method blank without interference, with good specificity. The precision, repeatability, and sample recovery rate were good. The linear range of dextran relative molecular weight was 2 700—36 800, and the regression equation was  $Y = -0.220$

收稿日期: 2023-05-24

第一作者: 李莉(1975—),女,正高级工程师,研究方向为药物制剂工艺研究和质量控制。E-mail:lili4@tasly.com

\*共同通信作者: 鞠爱春(1973—),男,正高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail:juach@tasly.com

张磊(1986—),博士,主要从事中药生产全过程质量控制技术的研究。E-mail:zhanglei201312@tasly.com

$5 X + 10.247$  ( $R^2 = 0.994 5$ ). The reference solution and test solution were stable for 50 h. The durability of different mobile phases, mobile phase volumetric flowrate, column temperature, compressed air volumetric flowrate and drift tube temperature was good. No macromolecular substances were detected in 17 batches of SAFI. **Conclusion** This HPMEC-ELSD method was simple and fast, and can be used for the detection of macromolecular substances in SAFI.

**Key words:** high performance molecular exclusion chromatography with evaporative light-scattering detector (HPMEC-ELSD); Salivianolic Acids for Injection (SAFI); macromolecular substances; dextran; relative molecular weight; ultrafiltration

中药注射剂是我国中医药创新的重要成果,具有生物利用度高、作用迅速等优点,在急重症的治疗方面具有明显优势,广泛应用于临床。随着我国药品不良反应监测工作的发展,中药注射剂的安全性问题也逐渐显现<sup>[1-4]</sup>。《国家药品不良反应监测年度报告(2020年)》<sup>[5]</sup>指出2020年中药不良反应/事件报告按照给药途径统计,注射给药占33.3%;注射给药中iv给药占97.8%。《国家药品不良反应监测年度报告(2021年)》<sup>[6]</sup>指出2021年中药不良反应/事件报告按照给药途径统计,注射给药占27.5%;注射给药中iv给药占97.2%。《国家药品不良反应监测年度报告(2022年)》<sup>[7]</sup>指出2022年中药不良反应/事件报告按照给药途径统计,注射给药占24.8%;注射给药中iv给药占97.1%。从给药途径看,2020—2022年中药注射给药不良反应/事件占比略有下降,但静脉给药占比仍居高不下。引起不良反应的因素很多,段为钢等<sup>[8-10]</sup>认为工艺过程中大分子物质的存在亦是其因素之一。关于征求中药注射剂安全性再评价相关技术评价指导原则意见的函(食药监安函[2010]20号)中7个技术原则明确指出生产工艺过程中应对高分子杂质进行控制,而《中国药典》2020年版注射剂有关物质检查法<sup>[11]</sup>尚未收录高分子杂质检查方法。

注射用丹参多酚酸(SAFI)是以丹参的水溶性有效部位丹参多酚酸为活性成分,以甘露醇为骨架材料制备而成的冻干粉针<sup>[12-13]</sup>。中药中的植物蛋白、鞣质等大分子物质可能是引起过敏反应的因素之一<sup>[14]</sup>,这些大分子物质如果不能在生产过程中去除干净,有可能引起不良反应。鉴于此,本研究建立了高效分子排阻色谱-蒸发光散射(HPMEC-ELSD)测定SAFI中大分子物质(相对分子质量 $\geq 1.0 \times 10^4$ )的方法,并对17批SAFI进行了大分子物质检测。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters Alliance HPLC系统(美国Waters公司,包括e 2695溶剂管理系统和Empower 3.0色谱工作站);Alltech 6 000型蒸发光散射检测器(天津埃文

森科技有限公司);XWK-3A空气泵(天津市华生分析仪器厂);XS105电子分析天平(美国Mettler Toledo公司,称量范围41 g/120 g,精度0.01 mg/0.1 mg);KQ3200E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,超声频率40 kHz,超声功率150 W);Milli-Q Advantage A10超纯水仪(德国Merck公司)。

### 1.2 耗材

Waters Ultrahydrogel™ 500色谱柱(300 mm×7.8 mm, 6 μm)、Waters Ultrahydrogel™ 250色谱柱(300 mm×7.8 mm, 6 μm),美国Waters公司;Vivaspin® 20超滤离心管(德国Sartorius公司,规格:截留相对分子质量为3 000)。

### 1.3 试药和试剂

SAFI(天津天士力之骄药业有限公司,每支装0.13 g,含丹参多酚酸100 mg,批号20180701、20180702、20180703、20180901、20180902、20180903、20180904、20180905、20181001、20181002、20181003、20181004、20181005、20181006、20190101、20190102、20190103);甲酸(上海麦克林生化科技有限公司,色谱纯,批号C10398052);乙酸铵(上海易恩化学技术有限公司,分析纯,批号PH233166);右旋糖酐相对分子质量标准套(右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>,相对分子质量分别为2 700、5 250、9 750、13 050、36 800,中国药品生物制品检定研究院,批号140637~646-201203);丹酚酸B(中国药品生物制品检定研究院,批号111562~201917,质量分数96.60%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为Waters Ultrahydrogel™ 500色谱柱和Waters Ultrahydrogel™ 250色谱柱串联;柱温35 °C;流动相为0.02%甲酸水溶液;体积流量为0.6 mL·min<sup>-1</sup>;进样量为10 μL;漂移管温度为105 °C,压缩空气体积流量2.5 L·min<sup>-1</sup>,不分流模式,增益值1。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取右旋糖酐D<sub>1</sub>、右旋糖

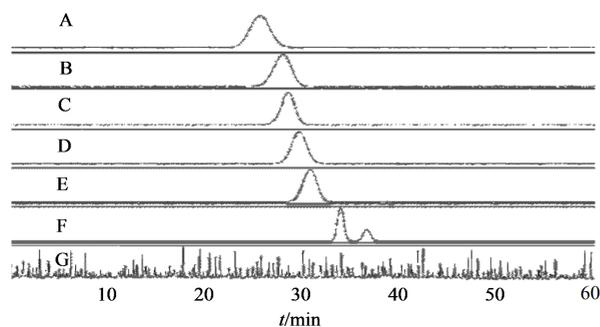
酐D<sub>2</sub>、右旋糖酐D<sub>3</sub>、右旋糖酐D<sub>4</sub>和右旋糖酐D<sub>5</sub>对照品适量,精密称定,分别加超纯水适量,制成每毫升约含上述对照品各1.0 mg的溶液,混合均匀,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取SAFI 1支,加超纯水5 mL溶解,待分散均匀后转移至超滤离心管;再用5 mL超纯水分3次润洗SAFI瓶,并转移至超滤离心管中,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心约35 min,至超滤离心管上管截留液体体积约0.75 mL,转移至2 mL量瓶中,向超滤离心管上层加入适量超纯水,用可调节移液器吹打混匀后一并转移至2 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2.3 空白溶液的制备** 取超纯水10 mL至超滤离心管中,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心至超滤离心管上管截留液体体积约0.75 mL,转移至2 mL量瓶中,向超滤离心管上层加入适量超纯水,用可调节移液器吹打混匀后一并转移至2 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 专属性考察

取“2.2”项下5种对照品溶液、供试品溶液和空白溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。由图1可知,空白溶剂(G)无干扰;对照品溶液(A~E)色谱图中5种右旋糖酐的色谱峰峰形良好。



A-右旋糖酐D<sub>5</sub>;B-右旋糖酐D<sub>4</sub>;C-右旋糖酐D<sub>3</sub>;D-右旋糖酐D<sub>2</sub>;E-右旋糖酐D<sub>1</sub>;F-SAFI;G-空白  
A-dextran D<sub>5</sub>;B-dextran D<sub>4</sub>;C-dextran D<sub>3</sub>;D-dextran D<sub>2</sub>;E-dextran D<sub>1</sub>;F-SAFI;G-blank

图1 空白、右旋糖酐对照品和SAFI HPMEC-ELSD

Fig. 1 HPMEC-ELSD chromatogram of blank, dextran reference substance, and SAFI sample

### 2.4 系统适用性考察

取“2.2”项下5种对照品溶液(右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>),按“2.1”项下色谱条件分别连续进样5次,计算峰面积(A)和保留时间(t<sub>R</sub>)的均值和RSD。右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>对照品溶液A的均值分别为4 013 238、3 427 818、3 742 483、2 218 978、2 146 213,RSD分别为0.3%、0.1%、0.3%、0.1%、0.2%;t<sub>R</sub>的均值分别为

30.764、29.592、28.475、27.974、25.609 min,RSD分别为0.1%、0.1%、0.1%、0.1%、0.2%,系统适用性良好。

### 2.5 精密度考察

取“2.2”项下5种对照品溶液(右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>),按“2.1”项下色谱条件分别连续进样6次,计算A和t<sub>R</sub>的RSD。5种对照品A的均值分别为4 010 319、3 425 903、3 743 234、2 219 251、2 145 212,RSD分别为0.3%、0.2%、0.3%、0.1%、0.2%;t<sub>R</sub>的均值分别为30.771、29.602、28.481、27.988、25.623 min,RSD分别为0.1%、0.1%、0.1%、0.2%、0.2%,表明精密度良好。

### 2.6 重复性考察

根据“2.2”项下供试品溶液的制备方法制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录60 min内的色谱图并计算A和t<sub>R</sub>的RSD。供试品溶液60 min内2个色谱峰A的均值分别为19 999 064和32 165 046,RSD分别为0.7%和0.7%;t<sub>R</sub>均值分别为33.896和36.632 min,RSD分别为0.1%、0.1%,表明重复性良好。

### 2.7 线性考察

取“2.2”项下5种对照品溶液(右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>),按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以对照品相对分子质量的对数为纵坐标,t<sub>R</sub>为横坐标,绘制标准曲线。结果表明,右旋糖酐相对分子质量在2 700~36 800线性良好,回归方程为Y=-0.220 5X+10.247 0(R<sup>2</sup>=0.994 5)。

### 2.8 溶液稳定性考察

**2.8.1 对照品溶液稳定性考察** 取“2.2”项下5种右旋糖酐对照品溶液,分别于室温放置0~50 h,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图并计算A和t<sub>R</sub>的RSD。在50 h内右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>的A的均值分别为3 998 240、3 427 551、3 748 662、2 217 062、2 138 416,RSD分别为0.5%、0.2%、0.3%、0.4%、0.2%;t<sub>R</sub>均值分别为30.785、29.595、28.497、27.969、25.633 min,RSD分别为0.2%、0.1%、0.1%、0.2%、0.2%,表明其在50 h内稳定性良好。

**2.8.2 供试品溶液稳定性考察** 取“2.2”项下供试品溶液,分别于室温放置0~50 h后进样,记录各色谱图并计算A和t<sub>R</sub>的RSD。在50 h内供试品溶液中2个色谱峰A的均值分别为20 050 046、31 873 579,RSD分别为0.8%、1.2%;t<sub>R</sub>的均值分别为33.896、36.632 min,RSD分别为0.0%、0.10%,表明其在50 h内稳定性良好。

## 2.9 检测限

取右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>对照品适量,加水稀释成质量浓度分别为10~100 μg·mL<sup>-1</sup>的系列溶液,分别精密量取适量注入液相色谱仪,通过改变进样体积,考察信噪比,发现右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>对照品进样量分别为0.1、0.1、0.4、0.3、0.4 μg时,信噪比约为3:1,故确定右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>对照品检出限分别为0.1、0.1、0.4、0.3、0.4 μg。

## 2.10 加样回收率考察

取SAFI 1支,精密加入右旋糖酐D<sub>1</sub>对照品溶液2 mL和超纯水3 mL,待分散均匀后转移至超滤离心管;再用5 mL超纯水分3次润洗SAFI瓶,一并转移至超滤离心管中,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心至超滤离心管上管截留液体体积约0.75 mL,转移至2 mL量瓶中,向超滤离心管上层加入适量超纯水,用可调节移液器吹打混匀后一并转移至2 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得截留溶液;记录截留管下溶液体积,摇匀,滤过,取续滤液,即得流出溶液;平行制备6份。同法制备右旋糖酐D<sub>2</sub>~D<sub>5</sub>的截留溶液和流出溶液。按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。因右旋糖酐D<sub>1</sub>相对分子质量与膜截留相对分子质量接近,因此截留液与流出液中均可检出右旋糖酐D<sub>1</sub>(截留溶液回收率均值为68%,流出液回收率均值为26%,总计回收率为94%);右旋糖酐D<sub>2</sub>~D<sub>5</sub>的流出液中均未检出右旋糖酐D<sub>2</sub>~D<sub>5</sub>;右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>的回收率均值分别为94%、97%、98%、99%、101%,RSD分别为1.9%、1.6%、2.0%、1.5%、2.0%,表明准确度良好。

## 2.11 耐用性考察

**2.11.1 色谱柱考察** 取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察Waters Ultrahydrogel™ 500、Waters Ultrahydrogel™ 250 2款色谱柱单用与顺序串联。2款色谱柱顺序串联较单用对照品色谱峰的分离度、线性佳,因此本方法采用上述2款色谱柱顺序串联。

**2.11.2 不同流动相考察** 取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察流动相分别为0.02%甲酸水溶液和0.1 mol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液的色谱行为。2种流动相下对照品和供试品色谱峰峰形、分离度、系统适用性、精密度、相对相对分子质量线性拟合和稳定性均良好,表明本方法流动相(采用0.02%甲酸水溶液或0.1 mol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液)耐用性良好。

**2.11.3 流动相不同体积流量考察** 根据Waters Ultrahydrogel™ 500色谱柱的典型操作体积流量为0.3~0.6 mL·min<sup>-1</sup>、Waters Ultrahydrogel™ 250色

谱柱的典型操作体积流量为0.5~0.8 mL·min<sup>-1</sup>,取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察流动相体积流量分别为0.5、0.6 mL·min<sup>-1</sup>的色谱行为。对照品和供试品色谱峰峰形、分离度、系统适用性、精密度、相对分子质量线性拟合和稳定性均良好,表明本方法流动相体积流量(0.5~0.6 mL·min<sup>-1</sup>)耐用性良好。

**2.11.4 不同柱温考察** 取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察色谱柱柱温分别为30、35 °C的色谱行为。对照品和供试品色谱峰峰形、分离度、系统适用性、精密度、相对分子质量线性拟合和稳定性均良好,表明本方法柱温(30~35 °C)耐用性良好。

**2.11.5 不同压缩空气体积流量考察** 取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察压缩空气体积流量分别为2.5、2.0 L·min<sup>-1</sup>的色谱行为。对照品和供试品色谱峰峰形、分离度、系统适用性、精密度、相对分子质量线性拟合和稳定性均良好,表明本方法压缩空气体积流量(2.5~2.0 L·min<sup>-1</sup>)耐用性良好。

**2.11.6 不同漂移管温度考察** 取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液,考察漂移管温度分别为105、110 °C的色谱行为。对照品和供试品色谱峰峰形、分离度、系统适用性、精密度、相对分子质量线性拟合和稳定性均良好,表明本方法漂移管温度(105~110 °C)耐用性良好。

## 2.12 供试品测定

分别取17批SAFI按“2.2”项下制备供试品溶液,进样测定,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。17批SAFI中均未测到右旋糖酐D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub>,检测到的2个色谱峰,峰1(*t<sub>R</sub>*=33.88 min)和峰2(*t<sub>R</sub>*=36.67 min)的*t<sub>R</sub>*均大于右旋糖酐D<sub>1</sub>的*t<sub>R</sub>*(30.77 min)。右旋糖酐D<sub>1</sub>的相对分子质量为2 700,说明检测到的2个色谱峰对应组分的相对分子质量均小于2 700。《化学名词》第二版(2016年)中指出大分子的相对分子质量通常在1.0×10<sup>4</sup>以上。结果表明,所测17批SAFI均未检出大分子物质。

## 3 讨论

目前,中药注射剂中的大分子物质的检测相关文献报道较少<sup>[14-20]</sup>。中药注射剂由于制作工艺较繁琐导致其杂质难以去除,或是诱发不良反应不能忽视的一个方面<sup>[21]</sup>。有学者认为中药注射剂中的大分子物质是导致安全性问题的主要物质基础,系统地去除大分子物质能有效提高中药注射剂的安全性<sup>[22]</sup>。SAFI是由丹参药材经水提后,提取液经过酸

沉、聚酰胺柱色谱、大孔树脂柱色谱、浓缩、干燥等工序制得丹参提取物,通过活性炭吸附、超滤等工序进行纯化,经冻干而制成的制剂。其主要成分为水溶性酚酸类化合物,多以丹参素和咖啡酸为结构单元,形成不同的聚体,目前从SAFI中分离鉴定的酚酸类化合物有单体(9种)、二聚体(6种)、三聚体(12种)、四聚体(8种)及其他衍生物(200种)。其中主要化学成分为丹酚酸B、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸D及丹酚酸Y等水溶性酚酸类成分等,相对分子质量大多不超过1 000<sup>[23-24]</sup>。由工艺可知相对分子质量较大的物质如蛋白质、多肽、多糖等在提取和制剂工艺过程中已作为杂质而去除。梁爱华等<sup>[25-30]</sup>则认为中药注射剂生产过程中经过超滤技术已经去掉了绝大部分的大分子物质,其残留也得到了控制,所以大分子引起中药注射剂不良反应的可能性较小。

贺福元等<sup>[29-30]</sup>认为中药注射剂的有效成分通常为小分子物质而不具有免疫原性,但可能通过一系列化学反应等形成超分子化合物,而形成载体复合物——超分子半抗原,进而诱发免疫应答的发生,从而解释了某些中成药口服不过敏而作为注射剂使用时具有免疫毒性引发过敏反应的现象。李启艳等<sup>[16]</sup>认为MEC方法需要相近同类物质作为对照,但由于成分复杂、无法准确判断中药中大分子物质的结构,一般选用支链型或球型对照品,如右旋糖酐、胰岛素等。

依据凝胶色谱的分离原理可知,相同实验条件下,物质的相对分子质量越大,越不易进入凝胶空隙,保留时间越短;反之相对分子质量越小,保留时间越长<sup>[31]</sup>。通过对比蒸发光散射检测器和示差折光检测器的试验可知,蒸发光散射检测器较示差折光检测器具有更高的精密度、稳定性和更低的检出限。

本研究以右旋糖酐作为对照,建立其相对分子质量- $t_R$ 关系曲线,对SAFI中多糖类成分进行检测,利用所建曲线计算 $t_R$ 最小组分的相对分子质量;结合《化学名词》第二版中指出大分子的相对分子质量通常在 $1.0 \times 10^4$ 以上和SAFI相关研究<sup>[23-24]</sup>,以不得检出相对分子质量大于 $1.0 \times 10^4$ 的组分作为SAFI中大分子物质的控制限量。17批SAFI的测定中2个色谱峰( $t_{R1}$ 为33.88 min、 $t_{R2}$ 为36.67 min)的保留时间均大于相对分子质量为 $1.0 \times 10^4$ 的组分的保留时间( $t_R=28.33$  min),可以判定这2个色谱峰对应组分的相对分子质量小于 $1.0 \times 10^4$ (2个组分不是

大分子物质),即17批SAFI中均未检出大分子物质。采用HPMEC-ELSD方法,通过选择相对分子质量接近2个组分的对照品进行比对,初步推测2个色谱峰可能为丹酚酸A(相对分子质量494.45)和甘露醇(相对分子质量182.17)。

李月等<sup>[32]</sup>认为大分子物质是影响中药注射剂颜色的重要因素,《中国药典》2020年版四部2400注射剂有关物质检查法中蛋白质和鞣质的检查是基于溶液是否出现浑浊进行判断的,中药注射剂的颜色对浑浊现象的观察具有一定的干扰,本研究采用HPMEC-ELSD法对中药注射剂中大分子物质进行检测,从而减小了检验人员目测观察的不确定性。

《中国药典》2020年版四部2400注射剂有关物质检查法中蛋白质和鞣质的检测限分别是 $125.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (蛋白质,磺基水杨酸法)和 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (缩合鞣质,蛋白吸附法)<sup>[33]</sup>。本方法右旋糖酐 $D_3$ 和右旋糖酐 $D_2$ 的检出限分别为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (检出量 $0.4 \mu\text{g}$ )和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (检出量 $0.1 \mu\text{g}$ ),方法灵敏度较药典方法有所提高。

本研究采用Vivaspin<sup>®</sup> 20超滤离心管(截留相对分子质量为3 000),考察其对质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的右旋糖酐 $D_1 \sim D_5$ (相对分子质量2 700、5 250、9 750、13 050、36 800)对照品溶液的截留效果,下层流出液中均未检出右旋糖酐 $D_2 \sim D_5$ 。因右旋糖酐 $D_1$ 相对分子质量略小于膜截留相对分子质量,因此截留液与流出液中均可检出右旋糖酐 $D_1$ 。

本研究建立了一种可用于SAFI大分子物质分离富集与检测的方法,并对17批SAFI中大分子物质进行筛查。该方法操作简便、结果可靠且灵敏度更高,可用于SAFI中大分子物质的控制,亦可作为其他注射剂中大分子物质控制的借鉴方法。

#### 利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 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.  
Li J, Zheng X Y, Tang Y T. Discussion on the safety of traditional Chinese medicine injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2010, 41(9): 1578-1579.
- [2] 李泳雪,杨立伟,胡珂,等.中药注射液中高分子物质初步研究[J].中国药品标准,2012,13(1):22-25.  
Li Y X, Yang L W, Hu K, et al. The preliminary study on

- the high molecular weight substances in Chinese medicine injection [J]. Drug Stand China, 2012, 13(1): 22-25.
- [3] 毕凤兰, 张力. 中药注射剂安全性问题探讨 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 89-92.
- Bi F L, Zhang L. Discussion on the safety of traditional Chinese medicine injection [J]. Chin J Pharmacovigil, 2012, 9(2): 89-92.
- [4] 王雪, 李家春, 张伟, 等. 体积排阻色谱法测定热毒宁注射液中高聚物质 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1412-1415.
- Wang X, Li J C, Zhang W, et al. Determination of high molecular weight substance in Reduning Injection by size exclusion chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(11): 1412-1415.
- [5] 国家药品监督管理局. 国家药品不良反应监测年度报告(2020年)[EB/OL]. (2021-03-26)[2023-04-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20210325170127199.html>.
- National Medical Products Administration. Annual report of national adverse drug reaction monitoring (2020)[EB/OL]. (2021-03-26)[2023-04-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20210325170127199.html>.
- [6] 国家药品监督管理局. 国家药品不良反应监测年度报告(2021年)[EB/OL]. (2022-03-30)[2023-04-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20220329161925106.html>.
- National Medical Products Administration. Annual report of national adverse drug reaction monitoring(2021)[EB/OL]. (2022-03-30)[2023-04-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20220329161925106.html>
- [7] 国家药品不良反应监测年度报告(2022年) [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(6): 712-719.
- Annual report of national adverse drug reaction monitoring (2022) [J]. Chin J Pharmacovig, 2023, 20(6): 712-719.
- [8] 段为钢, 张陆勇. 中药注射剂大分子杂质与类过敏反应: 线索与原理 [J]. 云南中医学院学报, 2020, 43(1): 93-97.
- Duan W G, Zhang L Y. The relationship between macromolecular impurities in traditional Chinese medicine injection and anaphylactoid reaction: The clues and principles [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(1): 93-97.
- [9] 柯瑾, 张陆勇, 殷华, 等. 大分子物质对中药注射剂的安全性影响 [J]. 中成药, 2014, 36(4): 855-859.
- Ke J, Zhang L Y, Yin H, et al. Effect of macromolecules on the safety of traditional Chinese medicine injection [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(4): 855-859.
- [10] 魏晶, 王瑜歆, 潘卫三, 等. 中药注射剂不良反应与质量标准完善 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(6): 464-467, 503.
- Wei J, Wang Y X, Pan W S, et al. Adverse reactions and quality standardization improvements of traditional Chinese medicine injections [J]. Chin J New Drugs, 2010, 19(6): 464-467, 503.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [12] 李莉, 苏智刚, 李德坤, 等. 注射用丹参多酚酸冲管液安全剂量测定 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(5): 860-865.
- Li L, Su Z G, Li D K, et al. Determination of flushing fluid safe dosage of Salvianolic Acids for Injection [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(5): 860-865.
- [13] 李莉, 李晓凡, 文旺, 等. 注射用丹参多酚酸体外抗氧化研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1535-1540.
- Li L, Li X F, Wen W, et al. Study on antioxidant activity of salvianolic acids for injection *in vitro* [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1535-1540.
- [14] 王璐, 刘永利, 李冬梅, 等. 血栓通注射剂中大分子物质与鞣质残留的测定 [J]. 中国药师, 2013, 16(11): 1667-1669.
- Wang L, Liu Y L, Li D M et al. Determination of residual macromolecular substances and tannin in Xueshuantong Injections [J]. China Pharmacist, 2013, 16(11): 1667-1669.
- [15] 海丽娜, 毕小凤, 段秀梅, 等. HPLC-ELSD检测复方苦参注射液中大分子物质 [J]. 中国药学杂志, 2020, 55(16): 1363-1366.
- Hai L N, Bi X F, Duan X M, et al. HPLC-ELSD detection of macromolecular substances in compound Kushen Injection [J]. Chin Pharm J, 2020, 55(16): 1363-1366.
- [16] 李启艳, 袁波, 吴晓云, 等. 丹红注射液大分子物质筛查方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1451-1455.
- Li Q Y, Yuan B, Wu X Y, et al. Screening of macromolecules in Danhong Injection [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(8): 1451-1455.
- [17] 裴福成, 苏德龙, 李文春, 等. HPSEC法检测注射用双黄连(冻干)中的高相对分子质量物质 [J]. 中医药学报, 2014(3): 52-54.
- Pei F C, Su D L, Li W C et al. Determination of high molecular weight substances in Shuanghuanglian Injection (freeze - drying) by HPSEC [J]. Acta Chin Med Pharmac, 2014, 42(3): 52-54.
- [18] 林锋, 王永刚, 曹晖, 等. 参芪扶正注射液大分子物质研究 [J]. 中药材, 2012, 35(7): 1161-1164.
- Lin F, Wang Y G, Cao H, et al. Study on high molecular weight substances in Shenqi Fuzheng Injection [J]. J Chin

- Med Mat, 2012, 35(7): 1161-1164.
- [19] 王一博, 曲范娜, 岳云飞, 等. HPSEC法检测中药注射液中的高相对分子质量物质 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(5): 353-355.
- Wang Y B, Qu F N, Yue Y F, et al. HPSEC determination of high molecular weight substance in TCM Injection [J]. Drug Stand China, 2011, 12(5): 353-355.
- [20] 赖宇红, 童惠贞, 张肖群, 等. 注射用丹参分子排阻色谱及指纹图谱差减分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 376-379.
- Lai Y H, Tong H Z, Zhang X Q, et al. Subtractive analysis of size exclusion chromatography and fingerprint for *Radix Salviae Miltiorrhizae* Injection [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2009, 20(4): 376-379.
- [21] 刘清成. 中药注射剂大分子物质及细胞毒性检查 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- Liu Q C. Macromolecular substances and cytotoxicity test of traditional Chinese medicine injection [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [22] 殷华, 柯瑾, 段为钢. 中药注射剂大分子物质是活性成分还是杂质? [J]. 医学争鸣, 2018, 9(2): 26-30, 33.
- Yin H, Ke J, Duan W G. Are macromolecules in traditional Chinese medicine injections active components or impurities? [J]. Negative, 2018, 9(2): 26-30, 33.
- [23] 李德坤, 苏志刚, 苏小琴, 等. 注射用丹参多酚酸化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 362-368.
- Li D K, Su Z G, Su X Q, et al. Research progress on chemical composition and quality control of Salvianolic Acids for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 362-368.
- [24] 苏小琴, 张磊, 李海燕, 等. 基于Q-marker的中药注射剂质量控制研究思路: 以注射用丹参多酚酸为例 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4663-4672.
- Su X Q, Zhang L, Li H Y, et al. Quality control of Chinese materia medica injection based on Q-marker—Taking Salvianolic Acids for Injection as an example [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4663-4672.
- [25] 梁爱华. 客观认识中药注射剂 [J]. 中国食品药品监管, 2019(7): 34-39.
- Liang A H. Objectively understanding traditional Chinese medicine injection [J]. China Food Drug Adm, 2019(7): 34-39.
- [26] 云宇, 侯肖霖, 殷华, 等. 4种去大分子中药注射剂的稳定性研究 [J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4): 20-25.
- Yun Y, Hou X L, Yin H, et al. Stability of traditional Chinese medicine injection was improved by removing macromolecules [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2016, 39(4): 20-25.
- [27] 梁爱华, 易艳. 中药注射剂超敏反应评价和风险控制相关问题的思考 [J]. 药学进展, 2020, 44(10): 752-758.
- Liang A H, Yi Y. Thoughts on the related issues of hypersensitivity evaluation and risk control of traditional Chinese medicine injection [J]. Prog Pharm Sci, 2020, 44(10): 752-758.
- [28] 易艳, 李春英, 赵雍, 等. 中药注射剂不良反应及类过敏反应研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(7): 1711-1716.
- Yi Y, Li C Y, Zhao Y et al. Research progress on adverse reactions and pseudo-allergic reactions of traditional Chinese medicine injections [J]. China J Chin Mat Med, 2021, 46(7): 1711-1716.
- [29] 贺福元, 邓凯文, 周逸群, 等. 中药注射剂(类)致敏反应的超分子作用分析与研究方法探讨 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(9): 3-9.
- He F Y, Deng K W, Zhou Y Q et al. S Investigation of action analysis and research approach of supramolecule on (homeo-)sensitization responses for the Chinese matria medica injection [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2013, 33(9): 3-9.
- [30] 文雯, 贺福元, 刘文龙, 等. 基于免疫指纹图谱法筛查双黄连注射剂的致敏成分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1588-1595.
- Wen W, He F Y, Liu W L et al. Screening of Shuanghuanglian Injection allergenic ingredients based on immune fingerprint [J]. China J Chin Mat Med, 2019, 44(8): 1588-1595.
- [31] 刘国詮, 余兆楼. 色谱柱技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- Liu G Q, Yu Z L. *Chromatographic Column Technology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [32] 李月, 段金连, 白雯, 等. 大分子物质对中药注射剂外观颜色的影响 [J]. 中医药导报, 2018, 24(23): 43-48.
- Li Y, Duan J L, Bai W, et al. Influence of macromolecule on appearance quality of traditional Chinese medicine injections [J]. China Ind Econ, 2018, 24(23): 43-48.
- [33] 夏恒, 范楠, 李月, 等. 中药注射剂蛋白质和鞣质检查方法的改进 [J]. 中医药导报, 2020, 26(1): 15-17, 38.
- Xia H, Fan N, Li Y, et al. Improved methods in detecting proteins and tannins in traditional Chinese medicine injections [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(1): 15-17, 38.