体积排阻色谱法测定热毒宁注射液中高分子物质

王 雪[1,2]，李家春[1,2]，张 伟[1,2]，毕宇安[1,2]，王振中[1,2]，萧 伟[1,2*]

1. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏 连云港 222001

摘 要：目的 建立热毒宁注射液中高分子物质的测定方法。**方法** 采用体积排阻色谱法，色谱柱为 TSK G2000SWxl 凝胶色谱柱（300 mm×7.8 mm，5 μm）；以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液（30∶70）为流动相；体积流量 0.7 mL/min；检测波长 214 nm；柱温 30 ℃。**结果** 相对分子质量在 3 108～66 446 的物质，其相对分子质量对数与保留时间呈现良好的线性关系（r=0.992 0）；11 批热毒宁注射液均未检出高分子物质。**结论** 本方法简便易行，结果准确可靠，可作为热毒宁注射液质量内控方法。

关键词：热毒宁注射液；高分子物质；体积排阻色谱；蛋白质；相对分子质量

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)11 - 1412 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.010

Determination of high molecular weight substance in Reduning Injection by size exclusion chromatography

WANG Xue[1,2], LI Jia-chun[1,2], ZHANG Wei[1,2], BI Yu-an[1,2], WANG Zhen-zhong[1,2], XIAO Wei[1,2]

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a high performance size exclusion chromatography for the determination of high molecular weight substance in Reduning Injection. **Methods** The chromatography on TSK G2000 SWxl column (300 mm × 7.8 mm, 5 μm) was used with 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution-acetonitrile (70∶30) as the mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min, and the detection wavelength was at 214 nm at column temperature of 30 ℃. **Results** In the range of 3 108—66 446, the molecular weight was linear with retention time (r = 0.992 0). The high molecular weight substances were not detected in 11 batches of Reduning Injection. **Conclusion** This method is simple, quick, and accurate, and suitable for the quality control of Reduning Injection.

Key words: Reduning Injection; high molecular weight substance; size exclusion chromatography; protein; relative molecular weight

中药注射剂是我国中医药创新的重要成果，其生物利用度高、作用迅速，在治疗急重症方面具有优势，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[1-3]。引起不良反应的因素很多，有学者认为工艺过程中大分子物质的存在亦是其因素之一[4-5]。热毒宁注射液处方由栀子、金银花、青蒿 3 味药材组成，具有清热、疏风、解毒等功效，其除有效成分外，也可能含有导致不良反应的大分子物质，如蛋白质、聚合物等。为保证临床用药的安全，更好地控制药品质量，增加中药注射剂高分子物质检测十分必要。本实验采用体积排阻色谱法测定热毒宁注射液中可能存在的高分子物质，结果表明该法可以有效控制热毒宁注射液的质量。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪（VWD 紫外检测器），乙腈、三氟乙酸为色谱纯（进口分装），水为重蒸馏水。

热毒宁注射液（康缘药业股份有限公司，批号 100919、100906、101011、110702、110703、110705、

收稿日期：2012-11-16

基金项目：“973”计划项目（中药制药过程控制技术模式和方式研究，2010CB735604）

作者简介：王 雪（1983—），女，硕士，工程师，从事药品质量标准研究。Tel: 13961382410 E-mail: wangxue815@126.com

*通信作者 萧 伟，研究员级高级工程师，博士，主要研究方向为中药新制剂的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: wzhzh-nj@tom.com

网络出版时间：2013-04-22 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130422.0914.001.html

110708、110710、110711、110712、110714）；热毒宁注射液工艺过程样品：超滤前液（康缘药业股份有限公司，批号 Z1111-09、Z1112-10、Z1112-14）；标准蛋白物质（对照品）：牛血清白蛋白（相对分子质量 66 446，批号 BSA081110，中国计量科学研究院），胰蛋白酶（相对分子质量 23 463，批号 1997B017，美国 Sigma 公司），核糖核酸酶 A（相对分子质量 13 700，批号 140635-200802，中国食品药品检定研究院），人胰岛素（相对分子质量 5 800，批号 11070738-201106）、胸腺肽 α1（相对分子质量 3 108，批号 110321050-201106，美国 Amresco 公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

TSK G2000SWxl 凝胶色谱柱（300 mm×7.8 mm，5 μm）；以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液（30∶70）为流动相；体积流量 0.7 mL/min；检测波长 214 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。理论板数按胸腺肽 α1 计算应不低于 10 000。

2.2 对照品及供试品溶液的制备

分别精密称取胸腺肽 α1、核糖核酸酶 A、胰蛋白酶、牛血清白蛋白标准品适量，分别加水溶解并制成一定浓度的标准品溶液，另称取人胰岛素标准品适量，加 0.025%三氟乙酸溶解并制成一定浓度的标准品溶液，即胸腺肽 α1 为 28.5 μg/mL、核糖核酸酶 A 为 56.5 μg/mL、胰蛋白酶为 35.4 μg/mL、牛血清白蛋白为 845.0 μg/mL、人胰岛素为 32.2 μg/mL 作为对照品溶液；取热毒宁注射液 1 mL，加流动相稀释至 10 mL，摇匀，作为成品供试品溶液；取超滤前液样品 1 mL，加流动相稀释至 10 mL，摇匀，作为超滤前液供试品溶液。

2.3 相对分子质量对数-保留时间曲线绘制

精密量取各对照品溶液 10 μL，注入高效液相色谱仪，记录色谱图。以保留时间为横坐标（X），相对分子质量对数为纵坐标（Y）绘制相对分子质量对数-保留时间曲线，得回归方程 $Y=-0.273\,5X+7.197\,7$，$r=0.992\,0$。在此色谱条件下，相对分子质量在 3 108～66 446 的物质呈现良好的线性关系。结果见表 1。

表 1 对照品相对分子质量对数-保留时间关系表

Table 1 Logarithm relationship of relative molecular weight with retention time of reference substances

对照品	相对分子质量 (M)	lg$M$	保留时间 / min
胸腺肽 α1	3 108	3.492	13.203
人胰岛素	5 800	3.763	12.844
核糖核酸酶 A	13 700	4.137	11.265
胰蛋白酶	23 463	4.370	10.437
牛血清白蛋白	66 446	4.822	8.574

2.4 进样精密度考察

取胸腺肽 α1 对照品溶液，精密量取 10 μL 注入液相色谱仪，连续进样 6 次，保留时间依次为 13.230、13.227、13.227、13.219、13.225、13.213 min，其 RSD 为 0.05%，表明在此色谱条件下进样精密度良好。

2.5 溶液稳定性考察

2.5.1 对照品溶液稳定性考察 分别于 0、0.5、1、1.5、2、3、5 h，精密量取胸腺肽 α1 对照品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，考察保留时间及峰面积，保留时间依次为 13.230、13.227、13.227、13.219、13.225、13.213、13.222 min，RSD 为 0.05%；峰面积依次为 118.0、118.9、118.0、117.1、118.4、116.9、103.2，RSD 为 4.5%，由结果可以看出，当放置 5 h 时，其峰面积明显降低，而在 3 h 内峰面积变化不大，说明对照品溶液在 3 h 内稳定性良好。

2.5.2 供试品溶液稳定性考察 取热毒宁注射液（批号 100919）1 mL，加流动相稀释至 10 mL，摇匀，分别于 0、2、4、6、8、12 h 精密量取此溶液 10 μL，注入液相色谱仪，考察保留时间及峰面积，保留时间的 RSD 为 0.04%，峰面积的 RSD 为 0.5%，故供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6 检出限考察

取胸腺肽 α1 对照品适量，加水稀释并制备成 57.0、5.70、2.28 μg/mL 的溶液，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，发现当进样量为 11.4 ng 时，信噪比约为 3，故确定检出限为 11.4 ng。

2.7 分离度及加样回收率试验考察

精密量取胸腺肽 α1 对照品贮备液 50 μL 和热毒宁注射液 100 μL 于 1 mL 量瓶内，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液，平行制备 6 份；精密量取胸腺肽 α1 对照品贮备液 50 μL 于 1 mL 量瓶内，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液；精密量取热毒宁注射液 100 μL 于 1 mL 量瓶内，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为空白供试品溶液。

精密量取供试品溶液、对照品溶液及空白供试

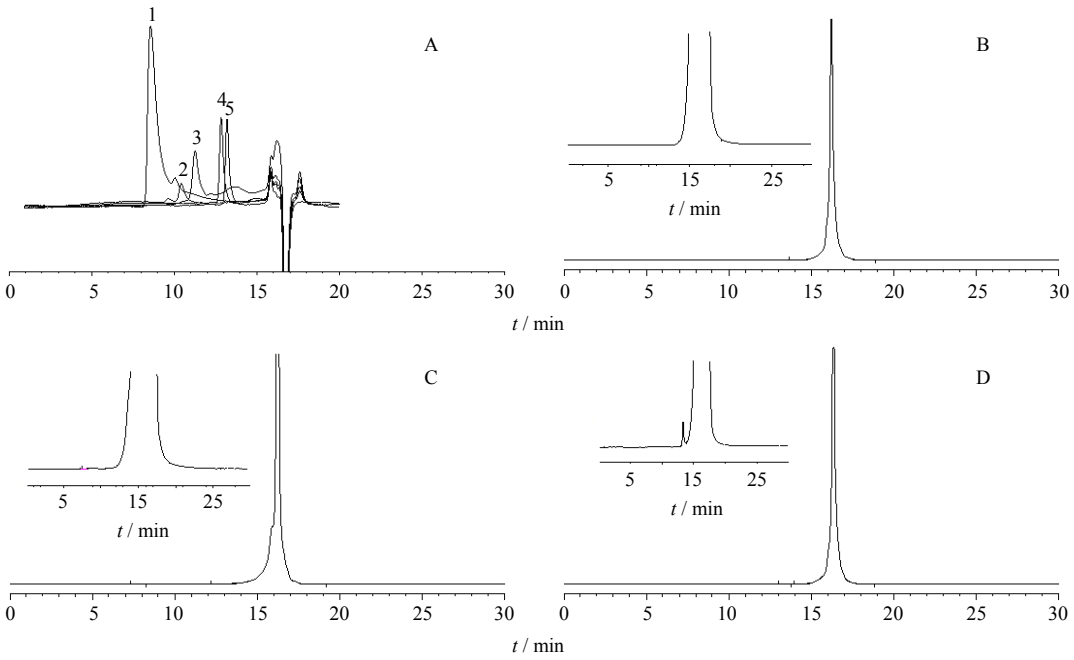
品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，考察胸腺肽 α1 与邻近峰的分离度及加样回收率，结果其分离度依次为 8.24、8.39、8.31、8.42、8.31、8.29，满足测定要求；加样回收率依次为 103.6%、104.2%、105.4%、104.6%、104.8%、103.7%，平均回收率为 104.4%，RSD 为 0.7%，符合测定要求。

2.8 重复性考察

取热毒宁注射液成品（批号 100919）和超滤前液样品（批号 Z1111-09），各平行制备 6 份供试品溶液，按上述色谱条件和测定方法检测，计算高分子物质的量。结果 6 份成品供试品溶液均未检出相对分子质量大于 3 108 的高分子物质；6 份超滤前液供试品溶液中均检出相对分子质量大于 3 108 的高分子物质，其量均为 0.01%，表明方法重复性较好。

2.9 样品测定

分别精密量取胸腺肽 α1 对照品溶液及供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，将先于胸腺肽 α1 保留时间的色谱峰所对应的物质视为高分子物质，按照峰面积归一化法计算。按此方法对 11 批热毒宁注射液成品及 3 批超滤前样品进行测定。结果 11 批成品均未检出高分子物质，3 批超滤前样品检出一定高分子物质，Z1111-09、Z1112-10、Z1112-14 批结果依次为 0.01%、0.02%、0.01%，其量均不高于 0.02%，结果见图 1。



1-牛血清白蛋白 2-胰蛋白酶 3-核糖核酸酶 A 4-人胰岛素 5-胸腺肽 α1

1-bovine serum albumin 2-trypsin 3-ribonuclease A 4-human insulin 5-thymosin α1

图 1 混合对照品 (A)、成品 (B)、超滤前样品 (C) 及分离度考察 (D) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), sample before ultrafiltration (C), and resolution test (D)

3 讨论

3.1 测定方法的选择

根据体积排阻理论[6-7]，溶质分子的保留是由于小分子化合物进入填满溶剂的填料孔，而较大的分子根据其体积的大小而被排阻，大分子物质优先于小分子物质被洗脱出来。本研究选用牛血清白蛋白、胰蛋白酶、核糖核酸酶 A、人胰岛素及胸腺肽 α1 作为对照品，建立其相对分子质量对数-保留时间关系曲线，结果表明在此色谱条件下，相对分子质量在 3 108～66 446 的物质呈现良好的线性关系，被测样品中组分将按照相对分子质量由大到小的顺序被洗脱下来。同时结合热毒宁注射液生产工艺的特点（截留相对分子质量 5 000 以下有效物质），本实验采用体积排阻色谱法，将先于胸腺肽 α1（相对分子质量 3 108）保留时间的色谱峰所对应的物质视为高分子物质，按峰面积归一化法计算其量，对 11 批成品进行检测，结果均未检出高分子物质。

3.2 流动相体系的优选

考察了以 0.1 mol/L 硫酸钠、3 种不同浓度三氟乙酸水溶液-乙腈体系为流动相体系，胸腺肽 α1、

人胰岛素、核糖核酸酶 A、牛血清白蛋白的线性关系。结果发现以 0.1 mol/L 硫酸钠水溶液为流动相 4 种蛋白呈现非理想排阻行为；以三氟乙酸水溶液-乙腈体系为流动相，随着三氟乙酸浓度的增大，4 种蛋白的色谱行为由非理想逐渐理想，且随酸度的增大，线性关系越好。同时考虑色谱柱自身的耐受范围，确定以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液（30∶70）为流动相。

3.3 生产工艺的验证

热毒宁注射液生产工艺特点之一是采用超滤技术，截留相对分子质量 5 000 以下有效物质。热毒宁注射液成品及超滤前液样品的测定结果表明，该方法能够用于热毒宁注射液工艺过程中大分子物质的检测，同时证明了该超滤技术能够有效去除大分子物质。

3.4 小结

本研究建立了热毒宁注射液高分子物质检测方法，通过重复性、分离度、检出限、精密度、相对分子质量对数-保留时间曲线、溶液稳定性考察，证明本方法操作简便、灵敏度高、重复性好，对中药注射液工艺过程质量控制具有指导意义。

参考文献

[1] 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.

[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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 肖树雄, 李泳雪. 中药注射液安全性问题及质量控制探析 [J]. 中国药师, 2009, 12(7): 955-957.

[6] Liu C G, Xie H F, Wang Z L, *et al*. Composition determination of binary polymer mixtures by size exclusion chromatography with light scattering detection [J]. *Chin J Polymer Sci*, 2010, 28(3): 291-297.

[7] 刘国诠, 余兆楼. 色谱柱技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.