

高效液相体积排阻色谱法测定银杏二萜内酯提取物中大分子物质

王 雪^{1,2}, 张 伟^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{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** 建立银杏二萜内酯提取物中大分子物质的高效液相体积排阻色谱(HPSEC-RI)检测方法。**方法** 色谱柱为Phenomenex Biosep-SEC-S2000 (300 mm×7.8 mm, 5 μm); 以0.05 mol/L 硫酸钠为流动相; 体积流量为0.7 mL/min; 柱温30 ℃; 示差检测器, 按面积归一化法计算大分子物质的质量分数。**结果** 相对分子质量在2 500~84 400的物质, 其相对分子质量对数-保留时间呈现良好的线性关系($r=0.998\ 3$); 平均回收率为96.8%, RSD为1.5%; 5批银杏二萜内酯提取物和14批银杏二萜内酯葡胺注射液均未检出大分子物质。**结论** 本方法简便易行, 结果准确可靠, 可作为银杏二萜内酯提取物及银杏二萜内酯葡胺注射液质量控制方法。

关键词: 银杏二萜内酯提取物; 大分子物质; 高效液相体积排阻色谱; 右旋糖酐; 银杏二萜内酯葡胺注射液

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)03-0436-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.014

Determination of high molecular weight substance in ginkgo diterpene lactone extraction by HPSEC-RI

WANG Xue^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{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 (HPSEC) method for the determination of high molecular weight substances in ginkgo diterpene lactone extraction. **Methods** The chromatographic column Phenomenex Biosep-SEC-S2000 (300 mm × 7.8 mm, 5 μm) was used with 0.05 mol/L sodium sulfate as the mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min, with refractive index detector (RID), and the temperature of the column was 30 ℃. High molecular weight substances in samples were calculated with area normalization method. **Results** In the range of 2 500—84 400 of substance molecular weights, a linearity was achieved ($r = 0.998\ 3$). The average recovery rate was 96.8%, and RSD was 1.5%. The high molecular weight substances in five batches of ginkgo diterpene lactone extraction were not detected. **Conclusion** This method is simple, quick, accurate, and suitable for the quality control of high molecular weight substances in ginkgo diterpene lactone extraction.

Key words: ginkgo diterpene lactone extraction; high molecular weight substances; high performance size exclusion chromatography; dextran; Ginkgo Diterpene Lactone Meglumine Injection

银杏二萜内酯提取物是从银杏叶中提取纯化所得, 是银杏二萜内酯葡胺注射液的原料, 其主要成分为银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯K等^[1]。银杏二萜内酯葡胺注射液具有活血通络之功效, 用于中风病中经络(轻中度脑梗死)恢复期痰瘀阻络证, 症见半身不遂、口舌歪斜、肢体麻木等, 也有

报道用于动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期(痰瘀阻络证)的治疗^[2-4]。有文献报道, 银杏叶提取物中含有鞣质、蛋白质等杂质^[5], 银杏叶药材中除含有鞣质、蛋白质外, 还有多糖成分^[6]。

有学者认为中药材中的植物蛋白、鞣质等大分子物质可能是引起过敏反应的因素之一^[7-8], 为保证

收稿日期: 2015-06-16

基金项目: 科技部重大新药创制: 现在中药创新集群与数字制药科技平台(2013ZX09402203); 国家重大科技成果转化专项

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药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

临床用药的安全性, 增加大分子物质检查项十分必要, 从而能够进行严格且有效的质量过程控制。银杏二萜内酯提取物作为银杏二萜内酯葡胺注射液的原料, 控制其大分子物质可以更好地提高产品质量, 且国内外尚未见相关大分子物质检测方法的报道, 本研究通过摸索并建立了银杏二萜内酯提取物大分子物质检测方法, 经过系统考察证明该方法简便易行, 准确可靠, 可作为其大分子物质检测质控方法。

1 仪器与材料

岛津 LC-20AB 高效液相色谱仪(示差检测器)。水为高纯水, 无水硫酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯。银杏二萜内酯提取物: 江苏康缘药业股份有限公司, 批号 121101、121102、121104、110302、110401; 葡甲胺, 西安力邦制药有限公司, 批号 100608B; 银杏二萜内酯葡胺注射液: 康缘药业股份有限公司, 批号 110101、110102、110103、110601、130301、130901、130903、140603、140604、140605、140606、140607、140608、140609; 右旋糖酐相对分子质量标准套: 含 D₁ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 2 500, 批号 140638-201002)、D₂ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 4 600, 批号 140639-201002)、D₃ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 7 100, 批号 140640-201002)、D₄ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 10 000, 批号 140641-201002)、D₅ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 21 400, 批号 140642-201002)、D₆ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 41 100, 批号 140643-201002)、D₇ 右旋糖酐对照品(相对分子质量 84 400, 批号 140644-201002), 均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Biosep-SEC-S2000 柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm); 以 0.05 mol/L 硫酸钠水溶液为流动相; 体积流量为 0.7 mL/min; 柱温 30 ℃; 示差检测器。理论板数按右旋糖酐 D₂ 计算应不低于 3 000。

2.2 对照品及供试品溶液的制备

精密称取 D₁、D₂、D₃、D₄、D₅、D₆、D₇ 右旋糖酐对照品各适量, 分别加流动相溶解并配制成一定质量浓度的对照品溶液, 即 D₁ 0.94 mg/mL、D₂ 1.008 mg/mL、D₃ 1.42 mg/mL、D₄ 0.92 mg/mL、D₅ 1.21 mg/mL、D₆ 1.26 mg/mL、D₇ 1.15 mg/mL, 作为各对照品溶液; 取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡

甲胺(银杏二萜内酯提取物不溶于水, 需加葡甲胺进行助溶) 50 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 相对分子质量对数-保留时间曲线的绘制

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: $Y = -0.298 8 X + 7.449 5$, $r = 0.998 3$ 。在此色谱条件下, 相对分子质量在 2 500~84 400 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

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

对照品	相对分子质量 (M)	$\lg M$	t_R/min
D ₁	2 500	3.398	13.400
D ₂	4 600	3.663	12.595
D ₃	7 100	3.851	12.086
D ₄	10 000	4.000	11.805
D ₅	21 400	4.330	10.461
D ₆	41 100	4.614	9.489
D ₇	84 400	4.926	8.349

2.4 精密度考察

取线性关系考察中 D₂ 对照品溶液, 精密取 10 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 考察保留时间和峰面积, 结果保留时间依次为 12.590、12.605、12.604、12.609、12.605、12.597 min, RSD 为 0.05%; 峰面积依次为 104 145、104 350、104 728、104 529、105 021、104 852, RSD 为 0.31%, 表明在此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 取线性关系考察中的 D₂ 右旋糖酐对照品溶液, 分别于 0、1、2、4、6、8 h 精密量取 10 μL, 注入液相色谱仪, 考察保留时间和峰面积, 结果保留时间在 8 h 内无明显变化, RSD 为 0.14%, 但峰面积在 6 h 后略有增加, RSD 为 2.1%, 故最好在 6 h 内完成进样。

2.5.2 供试品溶液稳定性考察 取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡甲胺 50 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液①, 分别

于 0、2、5、8、12、16 h 精密量取供试品溶液① 10 μ L, 注入液相色谱仪, 考察主峰保留时间和峰面积, 结果保留时间和峰面积无明显变化, RSD 均小于 2%, 且均未检出大分子物质, 故供试品溶液①在 16 h 内稳定性良好。

另取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡甲胺 50 mg、D₂ 右旋糖酐约 2 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液②, 分别于 0、1、2、4、6、8、12、16 h 精密量取供试品溶液② 10 μ L, 注入液相色谱仪, 考察主峰和 D₂ 右旋糖酐的保留时间和峰面积, 结果主峰保留时间、D₂ 右旋糖酐的保留时间及主峰峰面积均无明显变化, RSD 均小于 2%, 但 D₂ 右旋糖酐的峰面积在 6 h 后略有增加, 故供试品溶液②在 6 h 内稳定性良好。

2.6 定量限和检出限考察

精密量取线性关系考察下 D₂ 对照品溶液适量, 加流动相稀释成一定质量浓度的溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果当进样量为 604.8 ng 时, 信噪比约为 3, 故检测限为 604.8 ng; 当进样量为 2.016 μ g 时, 信噪比约为 10, 故定量限为 2.016 μ g。

2.7 加样回收率及分离度考察

取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡甲胺 50 mg、右旋糖酐 D₂ 约 2 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 平行制备供试品溶液 6 份。另取右旋糖酐 D₂ 对照品适量, 加流动相溶解并制成 0.2 mg/mL 的溶液作为对照品溶液。取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡甲胺 50 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为空白溶液。精密量取供试品溶液、对照品溶液、空白溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 考察 D₂ 与邻近峰的分离度及加样回收率, 结果右旋糖酐 D₂ 与邻近峰的分离度均大于 1.5, 平均回收率为 96.8%, RSD 为 1.5%, 回收率良好, 该色谱条件可以满足测定要求, 见表 2。色谱图见图 1。

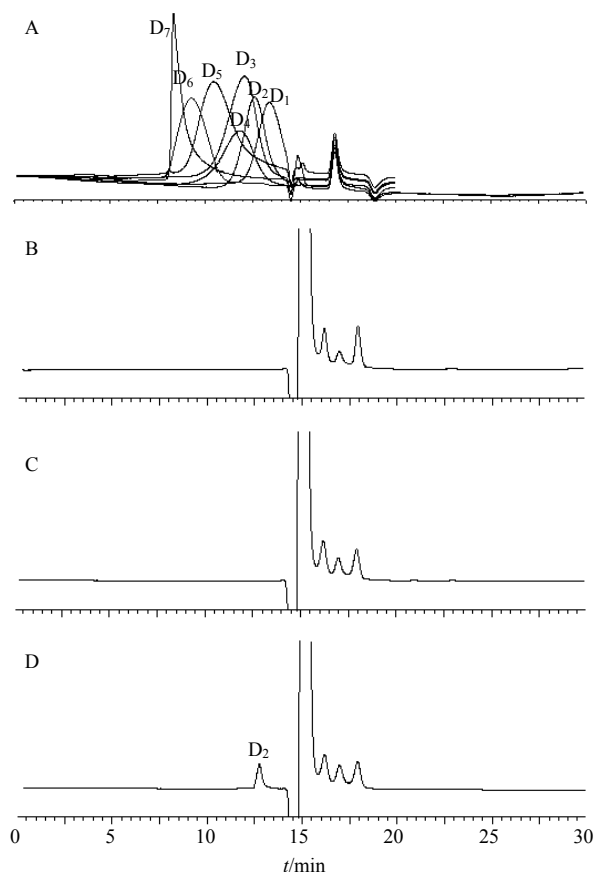
2.8 重复性考察

取银杏二萜内酯提取物 50 mg、葡甲胺 50 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶内, 加水适量, 于热水浴内振摇溶解后加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 平行制备 6 份。精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 考察主峰保留时间, 计

表 2 分离度和加样回收率考察结果

Table 2 Results of resolution and recovery rates

样品	D ₂ 与邻近峰分离度	加入量/mg	实测值/mg	加样回收率/%
1	1.883	1.92	1.86	96.8
2	1.834	1.88	1.83	97.3
3	1.777	2.02	2.01	99.5
4	1.707	1.88	1.80	95.9
5	1.950	1.93	1.85	95.6
6	1.928	1.91	1.83	95.7



图中倒峰为溶剂(水)所产生
Peak in figures produced by solvent (water)

图 1 混合对照品 (A)、银杏二萜内酯葡胺注射液 (B) 和银杏二萜内酯提取物 (C) 以及银杏二萜内酯提取物 + D₂ (D) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances (A), Ginkgo diterpene lactone meglumine injection (B), ginkgo diterpene lactone extraction (C), and ginkgo diterpene lactone extraction + D₂ (D)

算大分子物质的量。结果供试品溶液的保留时间基本保持不变, RSD 为 0.1%, 6 份供试品溶液均未检出相对分子质量大于 4 600 的大分子物质, 本测定

方法重复性较好。

2.9 样品测定

按上述色谱条件测定,将先于右旋糖酐 D₂(相对分子质量 4 600)出峰时间的峰视为大分子物质,按面积归一化法计算其量。按此方法对 5 批银杏二萜内酯提取物进行大分子物质测定,结果均未检出相对分子质量大于 4 600 的大分子物质。

同时对银杏二萜内酯葡胺注射液进行大分子物质检测,初步考察该方法适用性,直接取银杏二萜内酯葡胺注射液作为供试品溶液。按上述方法测定,结果发现 14 批成品均未检出相对分子质量大于 4 600 的大分子物质。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

有文献报道^[9]以蛋白为对照,采用 HPSEC-UV 法对中药注射剂进行大分子物质测定,本研究考虑到对于紫外检测器无响应的物质,如聚合物、多糖类成分等,选用 HPSEC-RI 法进行测定,示差检测器为通用型检测器,几乎对所有物质均有响应,可以更全面的控制大分子物质。

3.2 流动相体系的优选

考察了以水、0.05 mol/L 磷酸盐、0.05 mol/L 硫酸钠为流动相体系, D₁、D₂、D₃、D₄、D₅、D₆、D₇ 的线性关系及供试品的色谱行为。结果发现,以水为流动相,供试品出峰较早,在加入一定浓度的无机盐后,呈现一定的分离;以 0.05 mol/L 硫酸钠为流动相,5 种对照品的线性关系较 0.05 mol/L 磷酸盐好;从供试品溶液的色谱行为和 5 种对照品的相对分子质量对数-保留时间曲线关系来看,选用 0.05 mol/L 硫酸钠为流动相。

3.3 检测方法的选择

银杏二萜内酯提取物为银杏二萜内酯葡胺注射液的原料,本研究结合生产工艺的特点,选取右旋糖酐 D₂(相对分子质量 4 600)作为参照物,将先于右旋糖酐 D₂出峰时间的峰视为大分子物质,按面积归一化法计算其量。通过全面的方法学考察证明

本方法操作简便、准确可靠。

3.4 样品测定

因 5 批银杏二萜内酯提取物和 14 批成品均未检出相对分子质量大于 4 600 的大分子物质,故本研究同时对桃仁赤芍中间体、黄芪中间体、红花中间体、栀子水提液按照该方法进行大分子物质检测,以验证该方法的适用性,结果黄芪中间体和栀子水提液中均检测到一定量的大分子物质,其他样品未检出。结合方法学及多种样品的测定结果,说明本方法可作为银杏二萜内酯提取物大分子物质的内控方法,同时可考虑将其扩展到其他样品的大分子物质检测。

参考文献

- [1] 伍清龙,孙永成,万 琴,等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 255-258.
- [2] 赵宾江,王振中,凌 娅,等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期(痰瘀阻络证) III 期临床试验 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3525-3530.
- [3] 陈春苗,周 军,陈 健,等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 133-136.
- [4] 李 芳,赵 妮,王振中,等. 抗银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的单克隆抗体制备 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2828-2832.
- [5] 李 俊,李 健,苏小健. 银杏叶提取物杂质去除方法的研究 [J]. 化学世界, 1998(5): 243-247.
- [6] 王 敏,吕凤霞,陆兆新,等. 银杏叶多糖提取及超滤工艺的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1589-1591.
- [7] 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, 19(2): 89-91.
- [8] 周隆参. 中药注射剂不良反应分析. 中国社区医师 [J]. 医学专业, 2012, (6): 225-226.
- [9] 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分子物质 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1412-1415.