

★标准研讨★

舒血宁注射液中总银杏酸的 HPLC法限量检查

杜小伟¹, 王京辉¹, 王萌萌¹, 张小茜¹, 荆芳², 房秀霞², 王海涛², 王连喜²

(1. 北京市药品检验所, 北京 100035; 2 北京双鹤高科天然药物有限责任公司, 北京 102100)

摘要 目的: 建立舒血宁注射液中总银杏酸的限量检查方法, 为舒血宁注射液质量标准相关检测项目提供检测方法和试验依据。方法: 样品以石油醚(60~90℃)振摇提取, 回收溶剂, 甲醇溶解, 制备供试品溶液; 色谱分析条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(85:10), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 300 nm。结果: 白果新酸进样量在 4.4~22 ng范围内线性关系良好, r = 0.9997 平均回收率(n = 12)为 87.81%。结果: 本方法测定结果准确, 可用于舒血宁注射液的限量检查。

关键词: 总银杏酸; 白果新酸; 舒血宁注射液; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0170-03

Limit test of total ginkgolic acid in Shuxuening injection by HPLC method

DU Xiao-wei¹, WANG Jing-hui¹, WANG Meng-meng¹, ZHANG Xiao-qian¹, JING Fang², FANG Xiu-xia², WANG Hai-tao², WANG Lian-xi²

(1. Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035 China

2 Beijing Double-Crane High SCI & TECH. Natural Pharmaceutical CO. LTD, Beijing 102100 China)

Abstract Objective To establish the limit test of total ginkgolic acid and provide the determinate method and experimental foundation for the related item of Shuxuening injection Method Shake the sample with petroleum ether (60-90℃), recover the solvent to dryness and add methanol to dissolve The separation was performed on a Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (85:10), with detection at 300 nm, flow rate at 1 mL·min⁻¹. Results There was a linear relationship with the range of 0.42-2.08 ng r = 0.9997 The average recovery (n = 12) was 87.81%. Conclusion The method is specific, sensitive, accurate, and can be used as the test method of ginkgolic acid

Key words total ginkgolic acid, ginkgolic acid, Shuxuening injection, HPLC

银杏(Ginkgo biloba L.)为银杏科银杏属植物,其活性成分黄酮类化合物和内酯类化合物对心脑血管具有独特的药理作用,被广泛地用于治疗 and 预防心脑血管疾病。银杏酸是银杏中的致敏物质,因此对舒血宁注射液中银杏酸的限量控制显得十分重要。而现行的舒血宁注射液质量标准(国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS₃-B-3707-98-2004)采用薄层色谱鉴别法,以白果对照药材为对照限量检查,方法缺乏科学性和准确性。文献报道,银杏酸的检测方法有薄层扫描法^[1]、高效液相色谱

法^[2-5],因此本研究对该检测项目进行了修订,建立了高效液相色谱法测定总银杏酸的含量方法,专属性强,检测更加准确,可有效地控制产品的质量。

1 仪器、试剂及药品

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 G1312A 四元泵、G1379A 在线脱气、G1314A 紫外检测器、G1313A 自动进样器和 Chem station For LC (Rev A. 10 01 [1635]) 色谱工作站。

HPLC 用乙腈(Merck)为色谱纯; HPLC 用磷酸(北京化工厂)为优级纯;石油醚(60~90℃)、甲

醇、氯化钠(北京化工厂)等均为分析纯。

对照品白果新酸(HPLC归一法测定纯度为98.07%)及总银杏酸均购自中国药品生物制品检定所;舒血宁注射液由6个厂家提供。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 取白果新酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.8 μg的溶液,作为对照品溶液。另取总银杏酸对照品适量,加甲醇制成每1 mL含20 μg的溶液,作为定位用对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 精密量取本品50 mL,加氯化钠约17 g使饱和,用石油醚(60~90℃)振摇提取4次,每次30 mL,合并石油醚液,通过铺有少量无水硫酸钠的漏斗,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇适量使溶解,并转移至2 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-3 C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)柱;检测波长: 300 nm;流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液(85:10);流速: 1 mL·min⁻¹;柱温: 30℃。色谱图见图1。理论塔板数按白果新酸计算不低于4000。

2.3 白果新酸线性关系考察 精密称取白果新酸对照品适量,加甲醇制成浓度为8.80 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹的对照品溶液,分别精密吸取5、10、15、20、25 μL,进样测定计算峰面积积分值。以白果新酸对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为:

$$Y = 0.769X + 1.1928 \quad r = 0.9997$$

结果表明,白果新酸对照品进样量在4.4~22 ng范围内线性关系良好。

2.4 检测限和定量限 以白果新酸测定检测限和定量限。结果检测限(信噪比为3:1):检出浓度为1.916 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹;定量限(信噪比为10:1):检出浓度为8.80 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹,折算成舒血宁注射液的最低检出量为8 ng·mL⁻¹。

2.5 精密度试验 取浓度为8.80 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹白果新酸对照品溶液10 μL重复进样5次,峰面积平均值为9.750, RSD=3.3%。

2.6 稳定性试验 精密量取样品(未检出银杏酸)50 mL,加入8.80 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹白果新酸对照品溶液2 mL,按“2.1.2”项下方法制备溶液,分别在配制后0、5、10、15、24 h各进样10 μL,测定白果新酸峰面积,求得平均峰面积为10.62, RSD=2.2%。

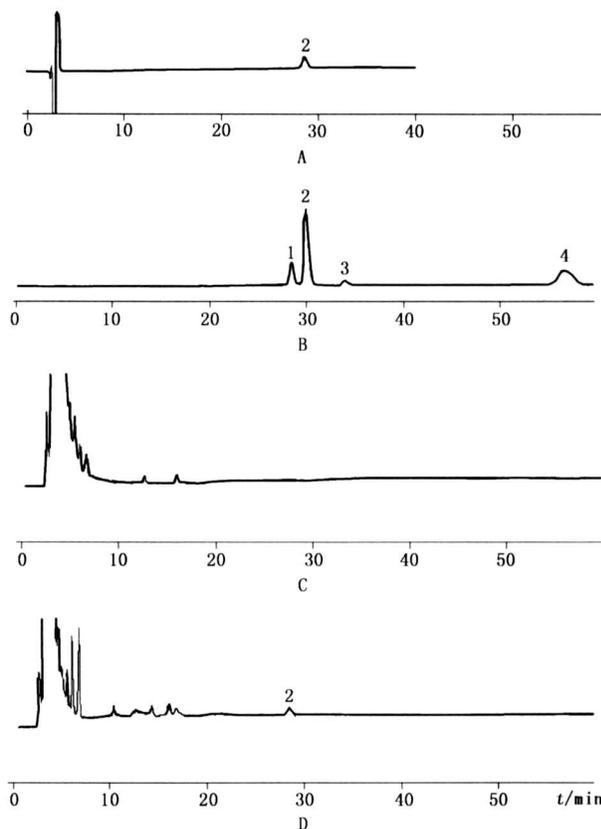


图1 舒血宁注射液 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of Shuxuening injection

A 白果新酸对照品(ginkgolic acid reference substance) B 总银杏酸对照品(total ginkgolic acid reference substance) C 舒血宁注射液(Shuxuening injection) D. 加入白果新酸对照品的舒血宁注射液(Shuxuening injection added ginkgolic acid reference substances)
2 白果新酸(ginkgoneolic acid) 1, 3, 4. 其他银杏酸成分(other ginkgoneolic acids)

2.7 重复性 取样品(某厂家,批号319023)50 mL,6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样10 μL,结果均未检出银杏酸。

2.8 回收率试验 精密量取样品(未检出银杏酸)50 mL,平行操作12份,其中6份分别加入7.664 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹对照品溶液2 mL,3份加入7.664 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹对照品溶液1 mL,3份加入7.664 × 10⁻⁴ mg·mL⁻¹对照品溶液0.5 mL,按“2.1.2”项下方法制备所需溶液,进样10 μL。结果3个加入量的回收率分别为87.06%,87.29%,89.49%;RSD分别为3.3%,3.9%,4.5%。平均回收率(n=12)为87.81%。

2.9 样品测定 精密量取舒血宁注射液50 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样10 μL,测定,采用外标法,以白果新酸为对照,计算总银杏酸的含量。结果测定了6个生产厂家37批样品,其中仅某一厂家1批样品测定结果为14 ng,其他批样品

均为未检出。

3 讨论

3.1 舒血宁注射液投料为每 1000 mL 含 3.5 g 银杏叶提取物, 中国药典 2005 年版银杏叶提取物项下规定总银杏酸不得过百万分之十^[6], 注射液用银杏叶提取物的要求应高于口服制剂用银杏叶提取物, 同时为与国际接轨, 暂定在注射液中不得过百万分之五, 以此折算, 舒血宁注射液中总银杏酸的含量应不得过 20 ng· mL⁻¹, 因此修订后的质量标准规定“每 1 mL 含总银杏酸不得过 20 ng”

3.3 试验中采用石油醚 (60~ 90 °C) 提取, 出现乳白现象, 试用氯化钠约 17 g 使饱和及加盐酸 2 滴破乳, 结果氯化钠使饱和破乳优于加盐酸 2 滴, 因此采用氯化钠使饱和破乳。

参考文献

1 LIDou-wei(李多伟), WANG Yi-Chao(王义潮), WU Tao(吴涛). TLC determination of ginkgolide acid in exotesta of Ginkgo biloba

(薄层扫描法测定银杏外种皮中白果酸含量). *Phys Test Chem Anal(Part B: Chan Anal)* (理化检验 - 化学分册), 2004, 40(7): 401

2 YANG Liu-qing(仰榴青). Advances methods for the analysis ginkgolide acid(银杏酸分析方法研究进展). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(3): 241

3 NE Li-xing(聂黎行), LU Jing(鲁静). Limit test of total ginkgolide acid in the ginkgo biloba extract by HPLC method(银杏叶提取物中总银杏酸的 HPLC 法限量检查). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(8): 909

4 YANG Liu-qing(仰榴青), WU Xiang-yang(吴向阳), CHEN Jun(陈钧). HPLC determination of ginkgolide acids in fruits of Ginkgo biloba(HPLC 法测定白果中银杏酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(6): 636

5 WEI Xu-Li(魏秀丽), TANG Cui(唐翠), YIN Chun-hua(印春华). Determination of ginkgolide acid in extract of Ginkgo biloba leaves by HPLC(银杏叶提取物中银杏酸的 HPLC 测定). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2003, 34(6): 295

6 ChP(中国药典). 2000. Vol II (一部): 281

(本文于 2008 年 11 月 11 日修改回)

体外诊断试剂行业标准审评会在北京召开

中国药品生物制品检定所于 2008 年 12 月 19 日至 20 日在北京召开了体外诊断试剂行业标准审评会。

本次会议由我所体外诊断试剂与培养基室承办。会议邀请了来自检验机构、临床使用单位、生产企业、科研机构等行业的专家, 对丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂盒 (连续监测法) 等 9 个生物化学体外诊断试剂盒行业标准和 MH 肉汤培养基等 6 个微生物培养基行业标准的送审稿进行了全面深入的讨论。

与会人员一致认为此次行业标准的制定, 对加强和规范相关诊断试剂盒的质量管理有着重要的意义。此次审评的 15 个行业标准在编写方面结构严谨, 层次清楚, 内容具体、明确、可操作性强, 具有严谨、科学、规范的特点, 符合标准化工作的要求。

(中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室供稿)