

清开灵注射液中高分子物质相对分子质量高效凝胶渗透色谱研究

肖雪^{1,2}, 付婵^{2,3}, 陈丽², 梁琼麟², 王义明², 罗国安^{1,2,3*} (1. 南开大学药学院, 天津 300071; 2. 清华大学分析中心, 北京 100084; 3. 江西中医学院研究生部, 南昌 330004)

摘要: 目的 清开灵注射液中高分子物质的测定研究。方法 采用高效凝胶渗透色谱法, 测定了 16 批清开灵注射液样品。色谱柱为 TSK-Gel GPWXL4000 (7.8 mm × 300 mm); 流动相为 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液; 柱温为 40 °C, 流速为 0.6 mL · min⁻¹, 蒸发光散射检测器 (氮气流速 3.2 L · min⁻¹; 漂移管温度 115 °C)。结果 5 家公司清开灵注射液 $M \geq 10\,000$ 平均分子累计峰面积比为 0.107%, 0.127%, 0.727%, 0.283% 和 0.553%。结论 该方法可用于清开灵注射液中高分子物质相对分子质量及其分布的测定; 测定结果可为清开灵注射液质量标准提高提供依据。

关键词: 清开灵注射液; 相对分子质量; 高效凝胶渗透色谱

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-2494(2011)24-1946-03

Study of Relative Molecular Mass of Polymers in Qingkailing Injection by High Performance Gel Permeation Chromatography

XIAO Xue^{1,2}, FU Chan^{2,3}, CHEN Li², LIANG Qiong-lin², WANG Yi-ming², LUO Guo-an^{1,2,3*} (1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Analysis Center, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the determination method of the relative molecular mass of polymers in Qingkailing Injection. **METHODS** High performance gel permeation chromatography was used to determine a total of 16 samples. The column was TSK-Gel GPWXL4000 (7.8 mm × 300 mm), and the mobile phase was 10 mmol · L⁻¹ NH₄ Ac with the flow rate of 0.6 mL · min⁻¹. The column temperature was 40 °C, and ELSD detector was used. **RESULTS** The average total peak area ratios ($M \geq 10\,000$) were 0.107%, 0.127%, 0.727%, 0.283% and 0.553%. **CONCLUSION** The method can be used for the determination of molecular weight and molecular weight distribution of polymers in Qingkailing Injection. The data obtained are useful for the quality control of Qingkailing Injection.

KEY WORDS: Qingkailing injection; molecular weight; high performance gel permeation chromatography

清开灵注射液^[1-3]是由栀子^[4]、板蓝根^[5]、金银花^[6]等 8 味药材制备而得。根据其生产工艺及存放条件等因素考虑, 其应有少量多糖甚至存在类蛋白质成分等高分子物质, 应对其相对分子质量及其分布进行质量控制, 但现有法定标准无相应研究方法。本实验采用高效凝胶渗透色谱法^[7]测定清开灵注射液中高分子的相对分子质量及其分布, 为清开灵注射液质量标准提高提供依据^[8-9]。

1 仪器与试剂

Milli-Q Synthesis 超纯水系统; Agilent 1200 型高效液相色谱 (美国 Agilent 公司); Alltech ESLD 2000 型蒸发光散射检测器; N2000 信号采集器; 醋酸铵 (分析纯); 右旋糖苷对照品 批号为 140638 ~ 140646-2000-01, 中国药品生物制品检定所, 相对分子质量 (M_r) 分别为 D0 (180)、D1 (2 500)、D2

(4 600)、D3 (7 100)、D4 (10 000)、D5 (21 400)、D6 (41 100)、D7 (84 400)、D8 (133 800)、D2000 (2 000 000)]; 清开灵注射液 (5 个厂家 16 批次)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取右旋糖苷 D0 ~ D8 对照品, 加二次水分别制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取清开灵注射液适量, 用二次水稀释 5 倍, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 色谱条件

凝胶柱 (TSK-Gel GPWXL4000, 7.8 mm × 300 mm), 以 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液为流动相, 柱温为 40 °C, 流速为 0.6 mL · min⁻¹, 蒸发光散射检测器 (干燥气流速 3.2 L · min⁻¹; 漂移管温度 115

作者简介: 肖雪, 男, 博士 研究方向: 中药质量分析 * 通讯作者: 罗国安, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 中医药临床系统生物学研究
与中药现代化研究 Tel/Fax: (010) 62781688 E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

℃);进样体积 20 μL。

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定,记录 25 min 色谱图。将所得的一系列对照品溶液的色谱保留时间和对照品的重均分子量(M_w)作二次回归方程后,计算供试品溶液的分子量分布,即得。右旋糖苷标准品色谱图,见图 1。

2.5 标准曲线的制备

取右旋糖苷对照品溶液,注入高效液相色谱仪,采用 ELSD 检测,记录对照品保留时间。以标准分子量的对数值为纵坐标 Y ,相应的色谱峰保留时间为横坐标 X ,进行二次回归,结果的回归方程为: $Y = -0.0258X^2 + 0.257X + 5.9202$, $r = 0.9902$ 。

2.6 精密度实验

取 D4 对照品溶液,连续进样 6 次,计算保留时间 RSD 为 0.09%,峰面积 RSD 为 2.17%,表明系统精密度良好。

2.7 重复性实验

取批号 10071621 样品溶液,连续进样 6 次,计算 $R_t = 14.94$ 、15.51、16.73,相对峰面积比 RSD 为 4.16%、2.32%、0.97%,表明系统重复性良好。

2.8 稳定性实验

取供试品溶液(生产厂家编号 S,批号:10071611),室温放置 0,2,4,8,20,24 h 时分别进样测定,计算保留时间 RSD 为 0.2%,峰面积的 RSD 为 4.8%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.9 样品测定

取生产厂家 S、B、Y、M、T 的清开灵注射液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。由标准曲线可得, $M = 10\ 000$ 时, $R_t = 14.94$; $M = 5\ 000$ 时, $R_t = 15.51$; $M = 1\ 000$, $R_t = 16.73$,根据相应保留时间对各样品色谱图手动积分,计算各分子量段的

累计峰面积比。结果见表 1。

3 讨论

3.1 清开灵注射液共有 9 家生产企业,本实验测定了其中的 5 家企业、共计 16 批次样品。这 5 家企业清开灵的市场份额约占全国清开灵市场 90% 以上,基本上代表了国内市场上的清开灵注射液的品质。

3.2 若以 $M \geq 10\ 000$ 的累计峰面积比计算,各企业排名依次为 Y、T、M、B、S;若以 $M \geq 10\ 000$ 的累计峰面积比排序,最大值为 Y 公司 10061302 批,其累计峰面积比为 1.069%,最小值为 S 公司 10071621 批,其累计峰面积比为 0.061%;若以 $M \geq 1\ 000$ 的累计峰面积比计算,各企业排名依次为:Y、T、S、M、B。说明不同公司在不同的生产条件下,清开灵注射液的产品质量存在着差距;同一公司在相似的条件生产,可能由于原料、生产环节的不确定性,导致了最终的产品质量也不稳定。

3.3 清开灵注射液是目前国内市售效果较好的中药注射液品种之一,但是由于诸多不确定因素,导致了其不良反应时有发生。本实验在研究过程中,发现清开灵注射液中的高分子不仅仅是多糖这类成分,还包括蛋白质、结合氨基酸等成分,故题目未明确表示其为多糖成分。综上,加强清开灵注射液质量控制研究,提高其质量标准是十分必须的。

表 1 清开灵注射液样品检测结果

Tab. 1 Result of Qingkailing injection samples

No.	Batch number	Total peak arearatio ($M \geq 10\ 000$) /%	Total peak area ratio($10\ 000 \geq$ $M \geq 5\ 000$) /%	Total peak area ratio($5\ 000 \geq$ $M \geq 1\ 000$) /%
S	10072151	0.247	2.168	18.390
	10072152	0.050	2.291	22.668
	10071611	0.071	3.966	21.354
	10071621	0.061	3.752	21.336
	Average	0.107	3.044	20.937
B	011704A	0.084	1.866	14.98
	4011705A	0.260	2.242	17.897
	911402A	0.039	1.210	15.568
	Average	0.127	1.773	16.150
Y	100529 02	0.159	2.193	14.394
	100613 02	1.069	6.333	31.703
	100614 02	0.951	6.255	33.979
	Average	0.727	4.927	26.692
M	20081004	0.438	2.705	15.923
	20100701	0.256	2.102	18.850
	2010702	0.154	2.163	16.913
	Average	0.283	2.323	17.229
T	100515	1.055	4.514	23.308
	100516	0.170	1.954	20.509
	100522	0.434	3.274	20.377
	Average	0.553	3.247	21.398

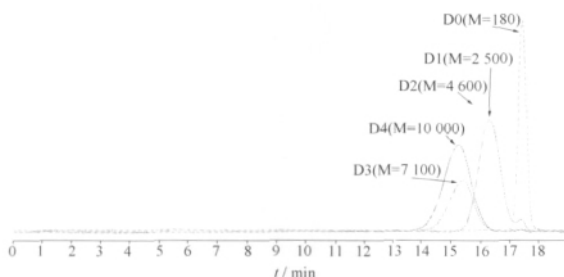


图 1 右旋糖苷标准品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substances

REFERENCES

- [1] WANG Q, CAO J, LIU J X, *et al.* HPLC Specific chromatogram of Qingkailing injection and its application in quality control [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(1): 37.
- [2] PANG L Q, LIANG Q L, LIU Q F, *et al.* Identification of metabolites of complicated Qingkailing in rat [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2007, 35(10): 1421-1424.
- [3] ZHANG H Y, WANG Y L, HU P, *et al.* Fingerprints of Qingkailing injection by HPLC/UV/MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2006, 28(4): 469-473.
- [4] YAN S K, LUO G A, WANG Y M, *et al.* Study on real-time control of extraction procedure of furitrus gardenia by near infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(6): 1026-1030.
- [5] XIAO X, LUO G A, WANG Y M, *et al.* Fingerprints of isatidis radix by HPLC [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*(江西中医学院学报), 2010, 22(3): 67-69.
- [6] DUAN H X, LIU Y S, LUO G A, *et al.* In combination of the extent similarity and the clustering analysis to evaluate the quality of Flos loniceræ japonicæ [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2007, 29(3): 318-321.
- [7] JIAN L H, XIA J, SHEN Y Y, *et al.* Study of relative molecular mass of polysaccharides in Huangqi injection by high performance gel permeation chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(11): 2037-2039.
- [8] PU Y Q, XIE J T, ZHANG T, *et al.* Study on effect of tannin on insoluble particle system in Yinzhihuang injection [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(6): 466-468.
- [9] WU Y S, ZHANG Q, JIN C, *et al.* Investigation on the bioactivity fingerprint of Qingkailing injection by microcalorimetry [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2009, 44(6): 471-474.

(收稿日期: 2011-04-07)

霉酚酸粗品结晶母液回收工艺研究

石磊(微生物药物国家工程研究中心, 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015)

摘要: 目的 建立霉酚酸粗品结晶母液有效成分的回收工艺。方法 根据霉酚酸的化学特性, 先用 NaOH 水溶液改变结晶母液 pH, 使霉酚酸从结晶母液中转化成易溶于水的相应盐, 再采用大孔吸附树脂 D312 作为吸附剂从溶液中提取富集霉酚酸。结果 霉酚酸转化为钠盐收率在 90% 以上。回收工艺使提取总收率提高了 10% 以上, 产品质量符合要求。结论 霉酚酸结晶母液回收工艺在提高总收率和降低生产成本上操作可行。该工艺具有工业参考的价值, 为企业生产提供了一条新思路。

关键词: 霉酚酸; 结晶母液; 回收工艺

中图分类号: R979. 5; TQ465

文献标志码: A

文章编号: 1001-2494(2011) 24-1948-04

Study on the Recovery Process of Mycophenolic Acid from Mother Liquor of Crude Crystalline

SHI Lei(*National Engineering Research Center of Microbial Medicine, New Drug R&D Co. Ltd of North China Pharmaceutical Group Co. Ltd, Shijiazhuang 050015, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a recovery process for mycophenolic acid from mother liquor of crude crystalline. **METHODS** First, mycophenolic acid was transformed into the form of water-soluble salt by sodium hydroxide solution. Then mycophenolic acid was separated from the solution by macroporous resin D312. **RESULTS** The yield of transformation was over 90%. The overall yield of mycophenolic acid was increased by 10%, and product's quality met the standards. **CONCLUSION** This process has the advantages of high yield and low cost, so it is satisfactory and provides a new thread for the industrial production of mycophenolic acid.

KEY WORDS: mycophenolic acid; crystal-mother liquor; recovery process

霉酚酸(mycophenolic acid, 麦考酚酸) 是一种新型免疫抑制剂, 可以采用化学全合成或微生物发酵(短密青霉菌: *Penicillium brevicompactum*) 方法制备。化学全合成工艺仍很复杂而难以产业化^[1-2], 而微生物发酵法比合成法更适合工业化大规模生产^[3-4]。

霉酚酸有两个最重要的衍生物: 霉酚酸酯(瑞

士 Roche 公司开发, 商品名 Cellcept®) 和霉酚酸钠(瑞士 Novartis 公司开发, 商品名 Myfortic®)。霉酚酸酯分别在 1995, 1998 年被美国食品药品监督管理局(FDA) 正式批准应用于肾移植、心脏移植的治疗。霉酚酸钠分别于 2002, 2004 年被瑞士药品管理局、FDA 正式批准用于肾移植。因此, 霉酚酸作为一种重要的前体, 有广泛的应用价值和市场前景。

基金项目: 国家科技重大专项-重大新药创制(2008ZX09401-005)

作者简介: 石磊, 男, 硕士, 高级工程师

研究方向: 天然药物及微生物药物生产工艺研究开发

Tel: (0311) 85993812

E-mail: 2005hbsl

@163.com

• 1948 •

Chin Pharm J, 2011 December, Vol. 46 No. 24

中国药理学杂志 2011 年 12 月第 46 卷第 24 期