

角度激光光散射仪和体积排阻色谱法 联用检测双黄连注射液中的高分子物质

吴春丽¹ 李攀¹ 马慧艳¹ 李爱星¹ 乔家彬¹ 任常忠²

(1. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 2. 郑州华伦生物技术有限公司, 郑州 450042)

摘要 目的:多角度激光光散射仪与体积排阻色谱法联用(MALLS-SEC)测定双黄连注射液中的高分子物质。方法:以0.7% Na₂SO₄缓冲液(加0.05% NaN₃)为流动相,流速0.5 mL·min⁻¹,TSK-GEL G3000SWxl凝胶排阻色谱柱与多角度激光光散射仪和示差折光检测器联用。结果:该方法对相对分子质量4600~133800 g·mol⁻¹范围内物质线性关系良好($r=0.9922$)。结论:本方法简便、快速、准确。

关键词:多角度激光光散射仪;体积排阻色谱法;高分子物质;双黄连注射液

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2011)10-1954-03

Determination of macromolecules in Shuanghuanglian injection by combination of multiangle laser light scattering instrument and size exclusion chromatography

WU Chun-li¹ LI Pan¹ MA Hui-yan¹ LI Ai-xing¹ QIAO Jia-bin¹ REN Chang-zhong²

(1. College of Pharmacy Zhengzhou University Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Heallen Biotechnology Zhengzhou 450042, China)

Abstract Objective: To determine the macromolecules in Shuanghuanglian injection by the combination of multiangle laser light scattering instrument and size exclusion chromatography (MALLS-SEC). **Method:** A gel size exclusion chromatography in conjunction with refractive index detector and multi-angle laser lights scattering instrument was performed on TSK-Gel G3000SWxl column using 0.7% Na₂SO₄ buffer (added 0.05% NaN₃) as a mobile phase system and the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 4600-133800 g·mol⁻¹ ($r=0.9922$). **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate and can be applied to determine the macromolecules in Shuanghuanglian injection.

Key words: multiangle laser light scattering instrument; size exclusion chromatography; macromolecules; Shuanghuanglian injection

双黄连注射液系由金银花、黄芩、连翘提取物制成的最终灭菌小容量注射剂,具有清热解毒、增强机体免疫功能的作用^[1]。其中含有咖啡酸、绿原酸、黄芩苷、连翘苷等有效成分,也会含有导致不良反应的多肽、聚合物、热原等高分子杂质。为确保临床用药的安全性,保证药品的质量,从质量控制角度增加高分子量物质检查项,从而有效地控制生产过程中可能带入的高分子杂质。对于双黄连注射液中高分子杂质测定,国内外未见报道,为此笔者探索了用高效色谱系统联合多角度激光光散射仪^[2~4]检测双黄

连注射液中高分子杂质,结果表明该法可有效地控制高分子量物质,结果准确可靠。

1 仪器与试剂

高效液相色谱系统:日本岛津 LC-10AD 泵, DGU-20A3 脱气装置, CTO-10A 柱温箱;美国 Wyatt 十八角度激光光散射仪(DAWN HELEOS II)及示差折光检测器(Optilab REX);Astra 色谱工作站。日本 AEG-45SM 十万分之一电子天平;北京 Molecular 超纯水机(元素级)。

对照品:右旋糖酐标准相对分子质量(D0~D8,

批号 1406379 - 2000 - 01 ~ 140645 - 2000 - 01)、绿原酸(批号 110753 - 200413)、黄芩苷(批号 110715 - 200815)、咖啡酸(批号 110885 - 200102)、连翘苷(批号 110821 - 200711),均购自中国药品生物制品检定所,内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司,批号 20091110),注射用水和双黄连注射液(河南福森药业有限公司),氯化钠注射液(郑州永和制药有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验 TSK - GEL G3000SWxl 色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 5 μm)及预柱;流动相:0.7% Na₂SO₄ 缓冲液(加 0.05% NaN₃),流速 0.5 mL · min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 50 μL,检测角度:11°。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取系列右旋

糖酐标准相对分子质量(D0 ~ D8),分别加流动相溶解配制成 10.0 mg · mL⁻¹的溶液,摇匀,作为标准相对分子质量对照品溶液。另精密称取黄芩苷、绿原酸、咖啡酸、连翘苷对照品,用 50% 甲醇溶液配制为 0.2 mg · mL⁻¹、40 μg · mL⁻¹、30 μg · mL⁻¹、20 μg · mL⁻¹。

2.3 系统峰的确定 取双黄连注射液(批号 0910022 - E)(如图 1),“2.2”项下的绿原酸、黄芩苷、连翘苷、咖啡酸等对照品溶液、纯水、注射用水、细菌内毒素检查用水(无热原)、氯化钠注射液、流动相及空气,准确吸取 50 μL 分别进样,然后进 1 针空针,结果显示除了流动相及空针,其他的样品第 1 个峰均在保留时间 t_R 约为 11 min 的位置。对 11 min 峰进行了一系列的研究,最终确定此峰为系统峰。

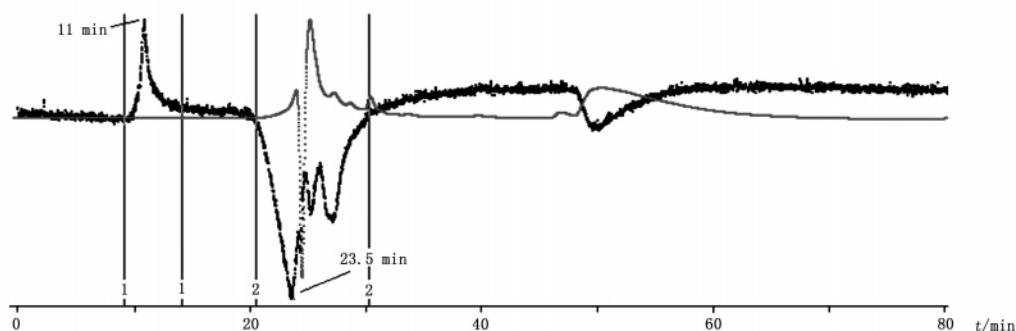


图 1 双黄连注射液(批号 0910022 - E) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Shuanghuanglian injection(Batch No. 0910022 - E)

2.4 标准曲线的建立 取“2.2”项下的所有系列右旋糖酐标准相对分子质量溶液,精密吸取 50 μL,分别进样,记录保留时间 t_R ,以 t_R 为横坐标,以相对分子质量对数 $\log(M)$ 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程为:

$$\log M = -0.1288t_R + 6.595 \quad r = 0.9922$$

说明该色谱系统对相对分子质量 4600 - 133800 g · mol⁻¹ 范围的物质是呈线性分离的。

2.5 精密度试验 取“2.2”项下右旋糖酐标准相对分子质量($M_w = 10000$ g · mol⁻¹) 溶液,精密吸取 50 μL,连续进样 5 次,测定 t_R 分别是 20.59, 20.59, 20.61, 20.60, 20.60 min, RSD = 0.04%。表明仪器精密度符合要求。

2.6 重复性试验 取双黄连注射液(批号 0910024 - E) 溶液 6 份,精密吸取 50 μL,按本文色谱条件测

定,共出现 4 个色谱峰,4 个色谱峰的 t_R 基本保持不变, RSD 分别为 0.76%, 0.64%, 0.28%, 0.27%。表明本方法重现性符合要求。

2.7 稳定性试验 取双黄连注射液(批号 0910022 - E),室温放置,精密吸取 50 μL,分别在 0, 4, 8, 16, 24 h 进样,测定样品 4 个色谱峰的 t_R , RSD 分别为 0.17%, 0.16%, 0.09%, 0.56%。表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 样品的测定方法 取双黄连注射液(批号为 0910022 - E, 1001004, 1001005, 1001006, 0910023 - E) 50 μL 注入 HPLC 仪,记录色谱图。将先于右旋糖酐对照品($M_w = 4600$ g · mol⁻¹) t_R 的峰(见图 2) 视为高分子量物质。结果按样品峰的 t_R 相比,均未检出高分子物质。

3 结论

3.1 检测器和灵敏度 DAWN HELEOS II 型激光光散射仪可从 18 个角度对散射光进行检测,收集散射光的强度。散射光角度的变化与分子的大小有关。通过十八角度激光光散射检测器所测得的峰

为高斯分布,代表的是物质的相对分子质量范围,测定范围为 $10^3 \sim 10^8$ 道尔顿,不是特定的物质,即相对分子质量在此范围内的物质均能被准确检测出来,和供试品溶液浓度无关,所以本实验不用进行与浓度有关的灵敏度实验。

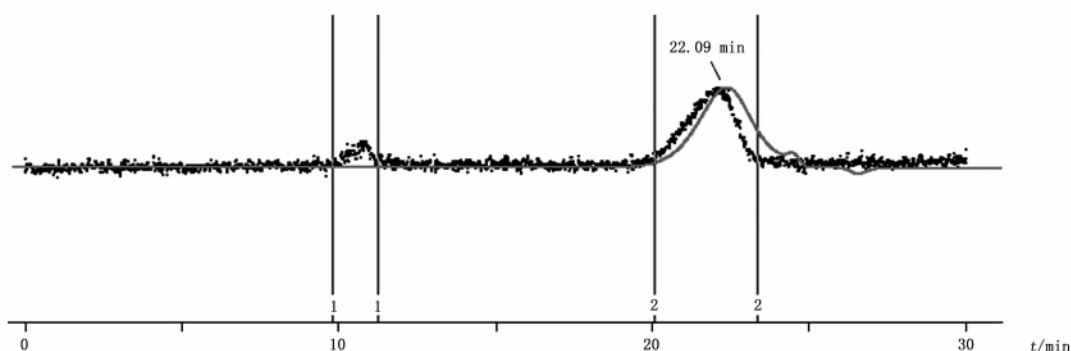


图2 右旋糖酐标准相对分子质量($M_w = 4600 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)的色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of Dextran($M_w = 4600 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

3.2 色谱峰中倒峰 当照射光未经滤光片过滤后,色谱峰和样品溶液的颜色有关系,有色的样品溶液颜色呈现倒峰,本台仪器未安装滤光片,因此图1中的样品(红棕色液体)峰呈现倒峰,而图2中对照品(无色液体)峰呈现正峰^[5]。由于峰型的不规则,不能使用计算方法计算双黄连注射液高分子物质的绝对分子量,只能采用相对于标准相对分子质量的峰的 t_R 位置判断。

3.3 本文建立了双黄连注射液中的高分子物质测定方法,并对此方法进行了精密度、重现性的考察,证明该法具有操作简便,灵敏度高、重现性好及分离性好的特点,对控制产品的质量具有指导意义。

参考文献

- 1 CHENG Guang-wen(程光文), ZENG Jing(曾婧), MAO Zong-fu(毛宗福). Analysis on influential factors of ADR caused by shuang-huanglian injection (影响双黄连注射剂不良反应的因素分析). *Chin J Med Drug Appl*(中国现代药物应用) 2010 4(4): 4
- 2 YANG Yan-hui(杨艳辉), WANG Zhe-zhi(王喆之). Preliminary

study on polysaccharide of *Salvia miltiorrhiza*(丹参多糖的初步研究): [Thesis(学位论文)]. Shasnx(陕西): Shaanxi Normal University Master(陕西师范大学) 2007

- 3 DING Hou-qiang(丁厚强), WANG Hai-ying(王海英), GUO Xue-ping(郭学平). Determination of molecular weight and its distribution of hyaluronic acid by combination of multiangle laser light scattering instrument and size exclusion chromatography(多角度激光光散射仪与尺寸排阻色谱法联用测定透明质酸相对分子质量及其分布). *Food Drug*(食品与药品) 2009 11(3): 24
- 4 GU Li-su(顾立素), HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿). Studies on the separation and quality control of high molecular weight impurities in augmentin(安美汀中高分子杂质的分离分析与质量控制). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2001 21(1): 13
- 5 ZHONG Xuan-wei(仲宣惟), HUANG Qing-quan(黄清泉), XI Ting-fei(奚廷斐). Determination of molecular weight and molecular weight distribution of chitosan by multiangle laser light scattering instrument and refractive index detector(多角度激光光散射检测器和示差折光检测器联用测定壳聚糖分子量及分子量分布). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006 26(9): 1258

(本文于2010年9月9日收到)