

HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺的含量*

伍清龙^{1,3}, 孙永成^{2,3}, 李雪峰^{2,3}, 王伟^{2,3}, 王振中^{2,3},
毕宇安^{2,3}, 萧伟^{2,3**}

(1. 南京中医药大学药学院 南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司 连云港 222001;
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

摘要:目的:建立注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺含量测定方法。方法:采用 HPLC-ELSD 法,以乙腈-50 mmol·mL⁻¹ 乙酸铵为流动相,色谱柱 Waters XBridge Amide(4.6 mm×150 mm 3.5 μm),梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30℃;漂移管温度 90℃,氮气流速 2.0 L·min⁻¹。结果:甘露醇在 1.966 5~19.665 μg 范围内呈良好线性关系,平均回收率为 100.57%(RSD=0.92%,n=9);葡甲胺在 0.483 8~4.638 μg 范围内呈良好线性关系,平均回收率为 100.67%(RSD=0.72%,n=9)。结论:该方法简便准确,重复性好,可作为测定注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺的含量测定方法。

关键词:注射用银杏二萜内酯 甘露醇 葡甲胺 HPLC-ELSD

doi: 10.11842/wst.2013.09.023 中图分类号:R284.1 文献标识码:A

注射用银杏二萜内酯主要成分是银杏内酯 A、B、C、K,研究表明银杏内酯是很强的血小管活化因子(Platelet Activating Factor,PAF)拮抗剂^[1],具有抗血小板聚集作用、保护中枢神经系统、对缺血损伤的保护作用和抗动脉粥样硬化和抗炎等药理作用^[2,3]。临床上用于治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死。注射用银杏二萜内酯以葡甲胺和甘露醇为辅料,其中有机碱葡甲胺作为助溶剂,用以提高难溶性药物的溶解度^[4];赋形剂甘露醇作为载体,用于形成硬质的均匀骨架,改善制剂的外观。虽然目前尚未有关于葡甲胺和甘露醇作为辅料的不良反应报道,但一般认为辅料常与注射剂中含有的杂质、植物蛋白等发生反应而产生潜在的过敏源^[5]。因此,为了确保制剂的安全性,本实验采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD),建立一种能同时测定注射用银

杏二萜内酯中辅料甘露醇和葡甲胺含量的方法。该方法简便、快速、准确,为注射用银杏二萜内酯的安全性和质量控制提供了一定的科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(自动进样器,四元低压梯度泵,柱温箱,美国安捷伦公司),Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器(美国奥泰公司),XP6 型电子分析天平、BP211D 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),乙腈(批号:20110012,上海星可生化有限公司),乙酸铵(批号:0D1390,陕西奥联科技有限公司),葡甲胺(批号:H61020954,西安力邦制药有限公司),甘露醇对照品(批号:100533-201002,中国药品生物制品检定所),注射用银杏二萜内酯(批号:20121005,自制),水为纯化水。

收稿日期:2013-11-11

修回日期:2013-11-19

* 科学技术部国家重大新药创制项目(2013ZX09402203)现代中药创新集群与数字制药技术平台,负责人:王振中。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向:中药制剂的研究与开发。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用色谱柱 Waters XBridge Amide (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈(A)-50 mmol·mL⁻¹ 乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱, 程序为 0~5 min, 90%~80%A, 5~20 min, 80%~60%A; 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 蒸发光检测器, 以氮气为载气, 流速 2.0 L·min⁻¹, 漂移管温度 90℃, 撞击器为“on”, 增益 2。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称定甘露醇对照品 9.83 mg 和葡甲胺对照品 2.32 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成甘露醇浓度为 0.983 mg·mL⁻¹, 葡甲胺浓度为 0.232 mg·mL⁻¹ 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取注射用银杏二萜内酯 3 瓶, 分别精密加水 5 mL 溶解, 混匀, 精密量取 1 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.2.3 阴性样品溶液的制备

按注射用银杏二萜内酯的处方工艺制备不含甘露醇和葡甲胺的阴性样品。

2.3 系统适用性试验及阴性对照试验

分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL, 在“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果表明甘露醇、葡甲胺能与制剂中其他成份达到良好分离, 阴性样品在甘露醇和葡甲胺峰

相应的保留时间处无干扰。结果见图 1~3。

2.4 线性关系考察

精密称定甘露醇对照品 98.33 mg 和葡甲胺对照品 23.21 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 精密量取 1、3、5、7、9 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得到系列标准溶液。精密吸取溶液 10 μL 注入色谱仪中, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积常用对数(lgY)为纵坐标, 质量常用对数(lgX)为横坐标, 进行线性回归。甘露醇在 1.966 5~19.665 μg 范围内具有良好的线性关系, 得到甘露醇回归方程为 $Y=1.5865X+4.9851$ ($r=0.9996$); 葡甲胺在 0.483 8~4.638 μg 范围内具有良好的线性关系, 得到葡甲胺回归方程为 $Y=1.7627X+4.9891$ ($r=0.9999$)。

2.5 精密度试验

取上述“2.2.1”项下对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样 10 μL, 计算甘露醇和葡甲胺的峰面积, RSD 分别为 0.35%、1.11%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h, 进样 10 μL, 测定峰面积。计算甘露醇和葡甲胺的峰面积, RSD 分别为 0.30%、0.99% ($n=6$), 结果表明供试品溶液放置 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验

按“2.2.2”项下的方法, 制备 6 份供试品溶液,

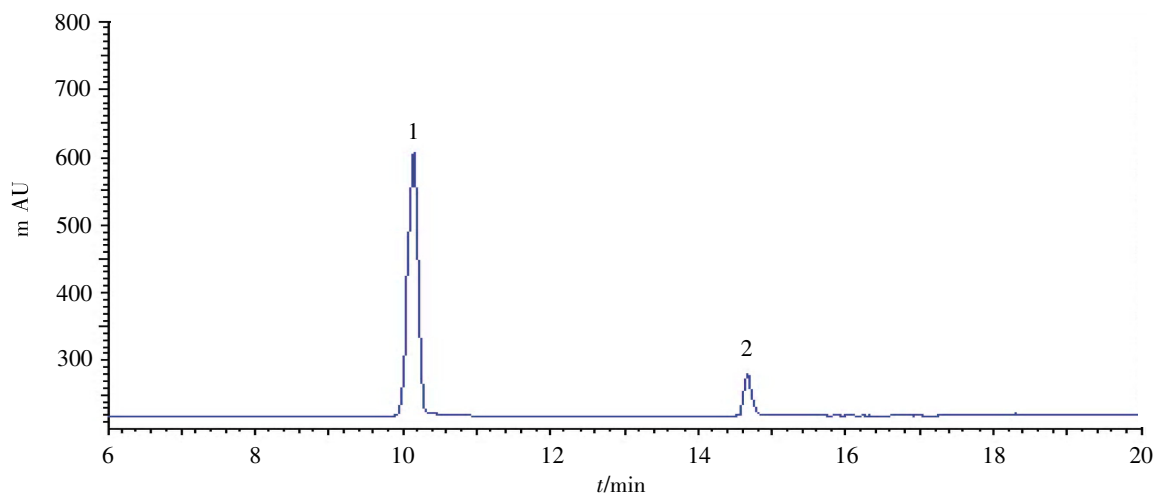


图1 甘露醇和葡甲胺对照品图

注: 1. 甘露醇 2. 葡甲胺。

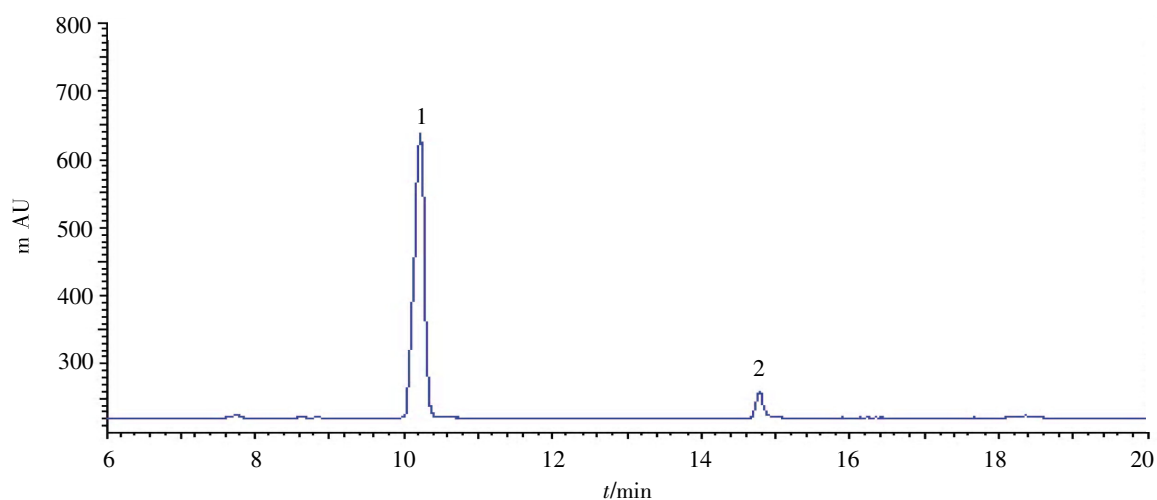


图2 注射用银杏二萜内酯样品图
注:1. 甘露醇 2. 葡甲胺。

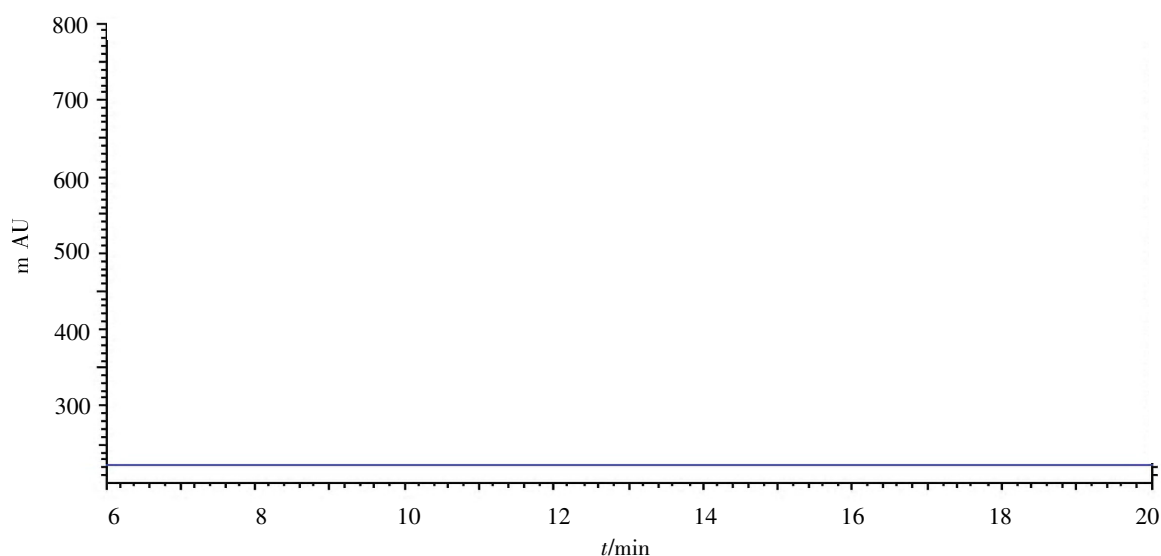


图3 阴性样品图

测定含量,结果表明甘露醇的平均含量为 $25.660 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,RSD 为 $1.66\%(n=6)$,葡甲胺的平均含量为 $4.346 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,RSD 为 $0.76\%(n=6)$,表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收试验

取注射用银杏二萜内酯 6 瓶,分别精密加水 5 mL 溶解,摇匀,精密量取 0.5 mL(相当于甘露醇 12.830 mg、葡甲胺 2.173 mg),置于 25 mL 容量瓶中,精密称取对照品甘露醇、葡甲胺适量加入 25 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。按上述

色谱条件测定,求的甘露醇、葡甲胺平均加样回收率分别为 100.57% 、 100.67% ,RSD 分别为 0.92% 、 $0.72\%(n=9)$,表明该方法回收率良好。结果见表 1。

2.9 含量测定

按“2.2.2”项下的方法,制备 6 批注射用银杏二萜内酯样品,每次进样量 $10 \mu\text{L}$ 。取“2.2.1”项下的对照品溶液,分别进样 $5 \mu\text{L}$ 和 $15 \mu\text{L}$ 。按上述色谱条件测定,以峰面积的对数值按外标二点法计算,结果样品中的甘露醇和葡甲胺的含量范围分别是

表 1 加样回收率试验结果($n=9$)

测定成分	样品含量/mg	加入的对照品量/mg	实测量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
甘露醇	12.830	9.542	22.344	99.7	100.6	0.92
	12.830	9.533	22.325	99.6		
	12.830	9.526	22.276	99.2		
	12.830	12.861	25.811	100.9		
	12.830	12.972	26.045	101.9		
	12.830	12.821	25.808	101.2		
	12.830	16.239	29.287	101.3		
	12.830	16.435	29.427	101.0		
	12.830	16.609	29.489	100.3		
葡甲胺	2.173	1.819	3.995	100.2	100.7	0.72
	2.173	1.801	3.990	101.0		
	2.173	1.771	3.928	99.1		
	2.173	2.162	4.343	100.4		
	2.173	2.175	4.366	100.8		
	2.173	2.658	4.851	100.8		
	2.173	2.671	4.879	101.3		
	2.173	2.695	4.888	100.8		
	2.173	2.658	4.851	100.8		

25.53~25.71 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、4.35~4.47 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见表 2。

3 讨论

甘露醇无紫外吸收^[6,7],文献报道多采用碘量法^[8]、旋光法^[9]及 HPLC-RID^[10]进行含量测定,但示差折光检测器灵敏度低,同时外界环境如温度、湿度对测定影响较大,限制该检测方法的使用。葡甲胺分子极性很强,且结构中不含发色基团,除紫外末端外基本无吸收,中国药典采用酸碱滴定法测定其含量^[8]。本文采用 HPLS-ELSD 法同时测定注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺的含量,结果表明该方法准确度高、专属性强,精密度及稳定性均较好,能客观反映甘露醇和葡甲胺的含量,可作为测

定注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺的质量控制方法。

表 2 注射用银杏二萜内酯中甘露醇和葡甲胺含量测定结果($n=6$)

样品批号	甘露醇/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	葡甲胺/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
20121005	25.53	4.44
20121008	25.64	4.35
20121011	25.73	4.39
20121015	25.68	4.47
20121018	25.57	4.45
20121021	25.71	4.41

参考文献

- 1 Braquet P. The ginkgolides: Potent platelet activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drugs Future*, 1987, 12(7):643~699.
- 2 郑卫平, 楼凤昌. 银杏内酯的研究概况. *药学进展*, 1999, 23(2):82~86.
- 3 王旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯的药理研究进展. *中草药*, 2005, 36(11):1741~1743.
- 4 郑俊民主译. 药用辅料手册(第4版). 北京: 北京化学工业出版社, 2004:440~442.
- 5 吴毅, 梁成罡, 金少鸿, 等. SEC-ELSD 法测定中药注射液中聚山梨酯 80 的含量. *药物分析杂志*, 2008, 28(1):12~15.
- 6 杨昕, 涂秩平, 李高. HPLC-ELSD 法测定不同来源人工蛹虫草子实体中甘露醇的含量. *药物分析杂志*, 2009, 29(10):1667~1672.
- 7 韩瑜, 王永林, 王爱民, 等. 高效液相色谱法测定注射用辛芍中甘露醇含量. *贵阳医学院报*, 2009, 34(2):199~203.
- 8 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- 9 陈学凤, 马素芳. 甘露醇注射液含量测定方法比较. *西北药学杂志*, 2000, 15(ZL):87~88.
- 10 宋更申, 裴丽娟, 庞文哲, 等. 高效液相色谱法测定甘露醇注射液的含量. *解放军药学报*, 2011, 27(3):246~247.

Determination of Mannitol and Meglumine in Diterpene Lactones of Ginkgo Injection by HPLC-ELSD

Wu Qinglong^{1, 3}, Sun Yongcheng^{2, 3}, Li Xuefeng^{2, 3}, Wang Wei^{2, 3}, Wang Zhenzhong^{2, 3},
Bi Yu'an^{2, 3}, Xiao Wei^{2, 3}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study was aimed to develop the method for determination of mannitol and meglumine in diterpene lactones of Ginkgo Injection. The HPLC-ELSD was used to determine mannitol and meglumine in diterpene lactones of Ginkgo Injection. The analysis was carried out on Waters XBridge Amide (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) column. The mobile phase was the mixture of acetonitrile, and 50 mmol·mL⁻¹ ammonium acetate with a linear gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30°C. The operating conditions of the ELSD were a nebulizer nitrogen with the flow rate of 2.0 L·min⁻¹ and an evaporator tube at the temperature of 90°C. The results showed that mannitol had a good linear relationship in a range of 1.9665 μg – 19.665 μg. The average recovery rate was 100.57% (RSD = 0.92%, n = 9). The meglumine showed a good linear relationship in a range of 0.4838 μg – 4.638 μg. The average recovery rate was 100.67% (RSD = 0.72%, n = 9). It was concluded that this method was simple and accurate with good reproducibility. It met with the requirement of the determination of the contents of mannitol and meglumine in diterpene lactones of Ginkgo Injection.

Keywords: Diterpene Lactones of Ginkgo Injection, mannitol, meglumine, HPLC-ELSD

(责任编辑 叶丽萍 张志华, 责任译审 王 晶)