银杏内酯注射液及其制备方法

技术领域

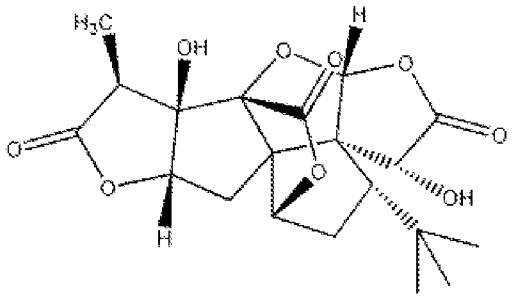
本发明涉及一种中药制剂的制备方法，特别涉及银杏内酯注射液及其的制备方法，属于药物领域。

背景技术

自上世纪 60 年代开始，许多国家采用现代分离技术对银杏叶的化学成分进行研究，经药理实验和临床验证，发现银杏叶的多方面生物活性与其所含特定化学成分有关。德国 Dr. Willar Schwabe 首次注册了银杏叶的一种简单提取物，于 1972 年申请了专利（W Schwabe DE 176708 和 DE 2117429），定名为 EGb761，用于治疗心脑血管疾病和神经系统疾病，具有显著疗效，且无毒副作用，银杏内酯类化合物（ginkgolids）具有强血小板活化因子（PAF）拮抗作用。银杏制剂被列为治疗药物的国家有德国、法国和中国，其他国家均用为保健食品或非处方用药，美国开发出的银杏保健食品已经获得 FDA 批准。

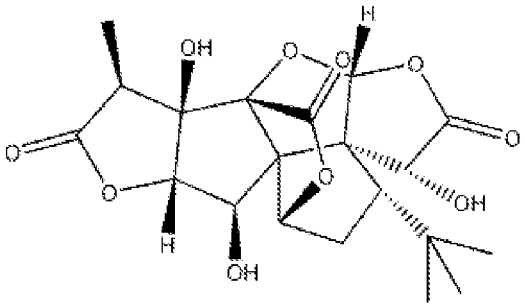
银杏内酯属于萜类化合物，称为萜类内酯，由倍半萜内酯和二萜内酯组成，是银杏叶中一类重要的活性成分。白果内酯（bilobalide）属倍半萜内酯，由 R.T.Major 于 1967 年和 K.Weinges 于 1969 年分离得到，目前从银杏叶中发现的唯一的一个倍半萜内酯化合物。银杏内酯 A、B、C、M、J（ginkgolid A、B、C、M、J）为二萜内酯化合物，于 1932 年由 S.Furukawa 首次从银杏叶中分离出来，1967 年才由 K.Nakanish、M.Maruyama 和 K.Okabe 等人进一步分离和确定其化学结构。从结构上看，白果内酯类分子骨架由 15 个碳原子组成，具有互相稠合在一起的 4 个五元环，其中有 1 个五元碳环，3 个五元内酯碳环，五元环上连有 1 个天然产物中罕见的叔丁基。白果内酯有很强的生物活性，具有促进神经生长的作用，可防止脑细胞线粒体氧化应激引起的功能改变，改善老年记忆功能，防止老年痴呆的发生，以及防止脑、脊髓神经脱髓鞘作用，其神经营养、神经保护作用比银杏内酯强。银杏内酯 B 有抗炎、抗休克、保护心脑血管、治疗急性胰腺炎等作用。而银杏内酯类化合物的分子骨架由 20 个碳原子组成，具有 6 个五元环，其中有 2 个五元碳环，3 个五元内酯环，1 个四氢呋喃环，两个五元碳环以螺环的形式连接在一起，其余的环以稠合的方式连接，形成一个刚性笼状的特殊立体化学结构。银杏内酯分子中均具有天然产物中罕见的叔丁基。银杏内酯包括二萜类和倍半萜类内酯，二萜类内酯主要有银杏内酯 A、B、C、J、M 等，半萜类内酯有白果内酯。

自 20 世纪 70 年代初发现了 PAF 后，药理学家对银杏内酯进行了研究，明确银杏萜内酯是强血小板活化因子拮抗剂，免疫系统、中枢神经系统、缺血损伤有保护作用，并有抗休克、抗过敏及抗炎作用。银杏内酯 A、B、C、M、J 结构差别在于含有的羟基数目和羟基连接的位置不同。银杏内酯均为强血小板活化因子拮抗剂，是银杏叶中特殊生理活性的关键成分。



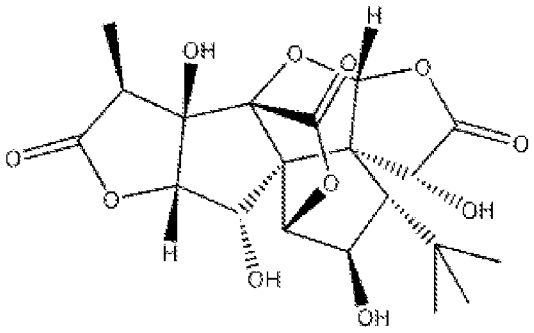
银杏内酯 A 结构式

分子式： $C_{20}H_{24}O_9$ 分子量：408.4



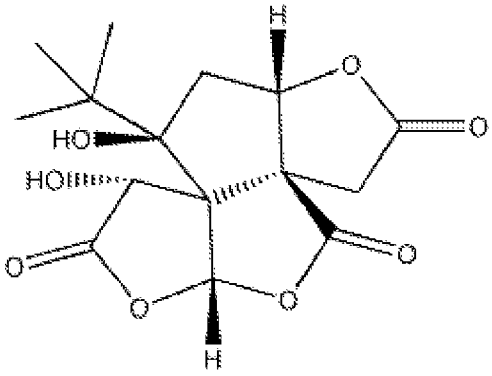
银杏内酯 B 结构式

分子式：$C_{20}H_{24}O_{10}$ 分子量：424.4



银杏内酯 C 结构式

分子式：$C_{20}H_{24}O_{11}$ 分子量：440.4



白果内酯结构式

分子式：$C_{15}H_{18}O_8$ 分子量：326.3

银杏内酯对血小板活化因子 PAF 受体有强大的特异性抑制作用，其中银杏内酯的抗 PAF 活性最高。PAF 是血小板和多种炎症组织分泌产生的一种内源性磷脂，是迄今发现的最有效的血小板聚集诱导剂，它与许多疾病的产生、发展密切相关。而银杏内酯目前被认为是最有临床应用前景的天然 PAF 受体拮抗剂，其拮抗作用活性与化学结构密切相关。当内酯结构中 R3 为羟基或羟基数目增多时，对 PAF 的拮抗活性减弱，而当 R2 为羟基且 R3 为 H 时，则活性显著增强，其中以银杏内酯 B 对 PAF 产生的拮抗作用最强。

银杏内酯的提取及纯化方法较多，主要有：溶剂萃取法、柱提取法、溶剂萃取-柱提取法、超临界提取法及色谱或柱层析纯化法等。这些方法都不能有效地分离出高含量的银杏内酯组合物，且银杏内酯各组成比例不确定，因此，在临床使用上药效各不相同，由于其含量不高，也存在一定的安全风险，无完整的药理毒理及临床试验数据，因此，上述方法均处于试验阶段，未实施于药品生产过程，在中国虽有银杏内酯注射液相关专利，但其组成均与本发明不同，经 ICH 成员国多家官方网站检索，迄今尚无其它银杏内酯注射剂产品上市。银杏内酯类成分的测定目前多采用 HPLC-UV 法、HPLC –MS 和 HPLC-ELSD 法，这些方法仅能对银杏内酯各成分的含量进行测定，由于缺乏对其产品中有害物质的严格控制，并不能真实的反映出药品的质量特性，不形成一个完善的药品质量控制体系。

在其它发明专利中有采用葡甲胺或氢氧化钠作为助溶剂，由于银杏内酯在独特五元环

结构，在碱性条件下可导致内酯开环而失去药物疗效，不可避免的给临床用药带来巨大的安全隐患。本发明欲提供一种具有优良的生产工艺和严格的质量控制方法的银杏内酯注射液。

发明内容

由于银杏内酯为脂溶性物质，在水中几乎不溶，采用安全性极高的药用辅料乙醇和甘油作为本发明的助溶剂，严格控制助溶剂比例在 1:1~5:1 之间，银杏内酯的结构不发生变化，有效地解决了药物的溶解性问题，用枸橼酸或盐酸作为 pH 调节剂，可以使药物更加稳定，避免了药物放置过程析晶导致澄明度和不溶性微粒不合格，解决了临床使用的安全隐患。

本发明所解决的技术问题是提供一种银杏内酯注射液，具有组分清晰且比例固定的优点，而且有效地去除了大分子、蛋白质，避免了不良反应的发生。本发明注射液的活性成分是采用高纯度，组分清晰且比例固定的银杏内酯，有效部位含量在 95%以上，其中 4 种组分含白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）为 25.0%~50.0%、银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）为 20.0%~45.0%、银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）为 10.0%~30.0%、银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）为 5.0%~15.0%。

本发明银杏内酯注射液含有下述成分：

银杏内酯（以萜类内酯计）	1-10mg/ml（优选 5mg/ml）
甘　　油	0.2-0.5ml/ml（优选 0.4ml/ml）
乙　　醇	0.4-0.7ml/ml（优选 0.6ml/ml）
注射用水	0-0.5ml/ml（优选 0ml/ml）

在上述处方中，实质存在两种情形：

1、当注射用水取 0 时，采用甘油和乙醇作为助溶剂。

严格控制助溶剂体积比例在 1:1~5:1 之间，即乙醇、甘油的体积比为乙醇 1~5 份，甘油 1 份。

优选处方如下：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　　油	800ml
加乙醇至	2000ml
制　　成	1000 支

即本发明银杏内酯注射液含有下述成分：

银杏内酯（以萜类内酯计）	5mg/ml
甘　　油	0.4ml/ml
乙　　醇	0.6ml/ml。

2、当注射用水不为零时，采用甘油和乙醇作为助溶剂。

严格控制助溶剂体积比例在 1:1~5:1 之间，即乙醇、甘油的体积比为乙醇 1~5 份，甘油 1 份。

优选处方如下：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　油	400ml
乙　醇	1200ml
加注射用水至	2000ml
制　成	1000 支

即本发明银杏内酯注射液每毫升含有下述成分：

银杏内酯（以萜类内酯计）	5mg/ml
甘　油	0.2ml/ml
乙　醇	0.6ml/ml
注射用水	0.2ml/ml。

乙醇与甘油和注射用水具有良好的互溶性，混合后溶液具有良好的稳定性，作为溶剂可以保持药物原有的化学结构，有利于人体吸收，发挥药物疗效。银杏内酯在乙醇中具有良好的溶解性，但完全以乙醇作为注射用溶剂对人体的刺激性较大，因此，用甘油及少量注射用水稀释乙醇，可有效的缓解静脉注射过程中的疼痛和人体对乙醇的耐受性，不会改变溶液对药物的溶解性和溶液的稳定性。

本发明银杏内酯注射的制备方法如下：

a）配制：混合乙醇和甘油（助溶剂比例要求 1:1~5:1），加入银杏内酯，搅拌溶解，补加乙醇或注射用水至全量，用 5~10%枸橼酸溶液或 1~10%盐酸溶液调节 pH 值至 2.5～6.5；优选 pH 值为 3.2～3.8。

b）过滤除菌；

c）灌封；

d）灭菌。

本发明注射液的质量控制方法包括：

性状：无色澄明液体。

pH 值：为 3.0~4.5。优选 pH 值为 3.2～3.8。

溶液颜色：小于黄色 4 号标准比色液（中国药典）。

鞣质、树脂、草酸盐、钾离子：不得检出。

异常毒性：制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液，符合静脉注射法给药。

热原：剂量按家兔体重每 1kg 注射 5ml 合格（中国药典）。

溶血与凝聚：取本发明注射液 6ml 加入到 0.9%氯化钠注射液 100ml 中稀释，检查合格（中国药典）。

过敏试验：取本发明注射液，加 0.9%氯化钠注射液稀释至以萜类内酯计 0.4mg/ml，静脉注射供试品溶液 30 分钟内，不得出现过敏反应。

刺激性试验：取本发明注射液用 0.9%氯化钠注射液稀释成浓度为 0.5mg/ml 溶液，取家兔 3 只，雌雄不拘，称重，每日家兔右侧耳缘静脉滴注供试品溶液 10ml/kg，同时左侧耳缘静脉滴注等体积 0.9%氯化钠注射液，共滴注 3 次。于每次给药前和给药后 1、6 小时以及末次

给药后 48 小时，肉眼观察注射部位血管有无充血、出血、坏死等刺激反应症状。于末次注射后 48 小时，颈动脉放血处死家兔，自滴注进针处近心端 1 厘米处，剪取耳缘 2 厘米，FAA 液固定，常规脱水，石蜡包埋切片，HE 染色，在光学显微镜下对血管组织进行病理学检查，判断是否具有刺激性。静脉滴注供试品，不得出现血管刺激反应。

总银杏酸：色谱柱 C18，流动相：甲醇－1％冰醋酸（90：10），检测波长为 310nm。以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸含量不超过 1ppm。

指纹图谱：色谱柱 C18，流动相：甲醇-四氢呋喃-水（25:10:65），蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃，载气流速：3.00L/min，柱温：40℃，以白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品为参照物，按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱四个共有峰与对照指纹图谱相似度大于 0.95。

无菌：照薄膜过滤法，用 0.9%无菌氯化钠溶液稀释过滤，并用 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗滤膜 3 次，无菌合格（中国药典）。

含量：色谱柱 C18，流动相：甲醇-四氢呋喃-水（25:10:65），用蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃；载气流速：3.00L/min；柱温：40℃。用 Extrelut-20 柱吸附处理样品后测定，每 1ml 含萜类内酯以白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）、银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）、银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）和银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）的总量计为 4.5~5.5mg。

银杏内酯注射液具有活血化瘀，通经活络的功效。用于中风病中经络（轻中度脑梗塞）恢复期淤血阻络症，症见半身不遂，口舌歪斜，言语謇涩，肢体麻木等。

本发明注射液采用高纯度、组分清晰且比例固定的银杏内酯，有效部位含量在 95％以上，其中 4 种组分含白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）为 25.0%~50.0%、银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）为 20.0%~45.0%、银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）为 10.0%~30.0%、银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）为 5.0%~15.0%，总银杏酸小于 5ppm，符合欧盟要求。整个生产工艺确保了萜类内酯成分比例稳定和临床疗效，并将凝胶色谱法和液-质联用技术应用到检测领域，解决了常规中药注射剂生产工艺中大分子物质、聚合物和蛋白质的残留，大大地降低了不良反应的发生，指纹图谱 4 个共有峰相似度大于 0.95。针对萜类内酯不溶于水的性质，筛选出有效的助溶剂——乙醇-甘油混合溶剂，即解决了常规工艺的技术难题，避免采用其它酸碱性辅料导致银杏内酯开环而破坏主成分结构，使有效成分更加稳定，同时也达到了注射剂的无菌要求。质量控制指标从多角度、全方位控制产品质量，有效地建立了完善的杂质控制方法，采用了指纹图谱、异常毒性、刺激性试验、溶血与凝聚、过敏试验等目前中药注射液最为严格的检测技术控制产品质量，大大的提高了临床使用的安全性，质量控制技术已远远超过目前国际上公认银杏叶提取物注射液，已达到国际先进水平。

本发明为有效部位中药注射剂，有效地去除了大分子、蛋白质，避免了不良反应的发生，并且具有能耗低、疗效确切、操作简单、质量易控、生产成本低等特点，比其它银杏类注射液安全性更高。

附图说明

图 1　01 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~1000）。

图 2　01 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~3000）。

图 3　02 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~1000）。

图 4　02 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~3000）。

图 5　03 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~1000）。

图 6　03 批银杏内酯注射液 LC-MS 图（分子量 400~3000）。

图 7　白果新酸线性关系图。

图 8　银杏内酯注射液对照指纹图谱；

其中共有峰中峰 2：银杏内酯 C，峰 3：白果内酯，峰 4：银杏内酯 A，峰 5：银杏内酯 B。

具体实施方式

本发明原料银杏内酯含白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）25.0%~50.0%、银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）20.0%~45.0%、银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）10.0%~30.0%、银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）5.0%~15.0%，且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量大于 95%。

以下是选择助溶剂及 pH 调节剂的依据。

一、助溶剂的选择：根据原辅料的性质和注射液的制备工艺要求，筛选溶剂及助溶剂的用量比例。

试验 1：取乙醇 1200ml 和甘油 800ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 2：取乙醇 400ml 和甘油 1600ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 3：取乙醇 300ml 和甘油 1700ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 4：取乙醇 1200ml 和甘油 400ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，加注射用水至 2000ml，调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 5：取乙醇 400ml 和甘油 1000ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，加注射用水至 2000ml，调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

将上述样品进行低温冻融试验循环 3 次，分别检查溶液的性状、不溶性微粒和溶液 pH 变化，并观察试验后是否有晶体析出。试验结果见表 1。

表 1　助溶剂筛选试验结果

试验名称	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5
配液时溶解状况	搅拌后快速溶解	搅拌后快速溶解	搅拌后缓慢溶解	搅拌后快速溶解	搅拌后缓慢溶解
试验后外观性状	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，有晶体析出。	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，有晶体析出。
不溶性微粒	合格	合格	不合格	合格	不合格
溶液 pH	基本不变	略有变化	升高 0.5	基本不变	升高 0.6

不加注射用水时，药液中乙醇与甘油的体积比例为 1:1~5:1，最佳比例为 3:2；加注射用水时最佳比例为 4:1。乙醇比例越大，银杏内酯溶解速度越快。药液经冻融试验后 pH、不溶性微粒及外观性状均符合药典规定。

二、pH 调节剂的选择：由于银杏内酯在弱酸性条件下相对稳定，分别用 5~10%枸橼酸溶液或 1~10%盐酸溶液进行筛选。

试验 1：取乙醇 1200ml 和甘油 800ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，用 5%盐酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 2：取乙醇 400ml 和甘油 1600ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，用 10%盐酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 3：取乙醇 1200ml 和甘油 400ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，加注射用水至 2000ml，用 10%枸橼酸溶液调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

试验 4：取乙醇 1200ml 和甘油 800ml，混匀，加入银杏内酯 10g，搅拌溶解，用 10%枸橼酸溶液调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

分别检查溶液的性状、不溶性微粒和灭菌前后溶液 pH 变化，将样品于低温（0~6℃）放置 3 天，观察低温放置条件下是否有晶体析出。试验结果见表 2。

表 2　pH 调节剂筛选试验结果

试验名称	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4
外观性状	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，无晶体析出。	无色澄明液体，无晶体析出。
不溶性微粒	合格	合格	合格	合格
灭菌后溶液 pH	pH 升高 0.2	pH 升高 0.3	基本不变	基本不变

经 pH 调节剂筛选试验，本品中 pH 调节剂可用 5~10%枸橼酸溶液或 1~10%盐酸溶液，用盐酸溶液调节 pH，灭菌后略有升高，但变化不大，枸橼酸为弱酸，调节 pH 更加稳定。盐酸和枸橼酸均可作为溶液 pH 调节剂。

发明人对上述发明内容进行了研究与说明，用于证明本发明的技术效果。下述试验用于进一步说明与解释本发明，但不限制本发明。

试验例 1　银杏内酯质量控制——含量测定

色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-四氢呋喃-水（25:10:65）为流动相；用蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃；载气流速：3.00L/min；柱温：40℃；理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

对照品溶液的制备：分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量，加甲醇溶解并定量稀释制成每 1ml 分别含 0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg 的混合溶液，摇匀，即得。

供试品溶液的制备：取银杏内酯 6mg，精密称定，置 10ml 量瓶中加甲醇 1ml 溶解，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得。

测定法：分别精密吸取对照品溶液 10μl、20μl 和供试品溶液 10~20μl，注入高效液相色谱仪，记录色谱图，用外标两点法对数方程分别计算白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量，即得。

按干燥品计算，含白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）为 25.0%~50.0%，含银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）为 20.0%~45.0%，含银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）为 10.0%~30.0%，含银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）为 5.0%~15.0%，且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量不低于 95.0%。

试验例 2　银杏内酯注射液质量控制——有关物质检查

（1）蛋白质：取本发明注射液 2ml，加水制成 50ml，作为供试品溶液。称取考马斯亮蓝 G-250 约 50mg，溶于 25ml 乙醇中，再加入 85%（w/v）的磷酸 50ml，加水稀释至 500ml，摇匀，过滤，精密量取滤液 5ml 置试管中，再加入 1ml 供试品贮备溶液，摇匀，放置 3min。同法做空白，于 595nm 波长下，测定吸光度，供试品溶液吸光度小于 0.05。

（2）鞣质：取本发明注射液 1ml 加入稀醋酸 1 滴，再加明胶氯化钠试液 5 滴，摇匀，放置 10 分钟，未出现浑浊或沉淀。

（3）树脂：取本发明注射液 5ml，加盐酸 1 滴，放置 30 分钟，应无树脂状物质析出。

（4）草酸盐：取本发明注射液 2ml，用稀盐酸调节 pH 值至 1～2，滤过，滤液用氨水调节 pH 值为 5～6，加 3%氯化钙溶液 3 滴，放置 10 分钟，未出现浑浊或沉淀。

（5）钾离子：取本发明注射液 2ml，置 10ml 纳氏比色管中，加碱性甲醛溶液 0.6ml、3%EDTA 溶液 2 滴、3%四苯硼钠溶液 0.5ml，加水稀释至 10ml，另取标准氯化钾溶液 0.8ml，同法试验，供试品溶液的浊度低于对照溶液。

试验例 3　银杏内酯注射液质量控制——异常毒性检查

供试品溶液的制备：取本发明注射液加氯化钠注射液制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液。

检查法：取体重 17~20g 小鼠 5 只，分别注入小鼠尾静脉供试品溶液 0.5ml，48 小时内无死亡。

试验例 4　银杏内酯注射液质量控制——热原检查

供试品溶液的制备：取本发明注射液 2ml，加入到 0.9%氯化钠注射液 50ml 中，摇匀。

检查法：取家兔 3 只，测定其正常体温后 15 分钟内，按家兔体重每 1kg 注射 5ml 自耳静脉缓缓注入供试品溶液，每隔 30 分钟测定体温 1 次，共测 6 次，体温升高均应低于 0.6℃，并且 3 只家兔体温升高总和低于 1.3℃。

试验例 5　银杏内酯注射液质量控制——溶血与凝聚检查

供试品溶液的制备：取本发明注射液 6ml，加入到 0.9%氯化钠注射液 100ml 中摇匀。

检查法：取洁净玻璃试管 5 只，编号，1、2 号管为供试品管，3 号管为阴性对照管，4 号管为阳性对照管，5 号管供试品对照管。按表 3 所示依次加入 2%红细胞悬液、0.9%氯化钠溶液、蒸馏水，混匀后立即置 37℃±0.5℃的恒温箱中进行温育。

试验试液加入量见表 3。

表 3　溶血和凝聚试验试液加入量

试管编号	1	2	3	4	5
2%红细胞悬液/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	
0.9%氯化钠溶液/ml	2.2	2.2	2.5		4.7
蒸馏水/ml				2.5	
供试品溶液/ml	0.3	0.3			0.3

如试管中的溶液呈澄明红色，底部无细胞残留或有少量红细胞残留，表明有溶血发生；如红细胞全部下沉，上清液无色澄明，或上清液虽有色澄明，但 1、2、5 号管肉眼观察无明显差异，则表明无溶血发生。若溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀，轻轻倒转 3 次仍不分散，表明可能有红细胞凝聚发生。

3 小时后观察无溶血和凝聚反应。

试验例 6　银杏内酯注射液质量控制——大分子物质及聚合物检查

a.试验仪器及试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，紫外检测器，示差折光检测器。Phenomenex BioSep-SEC-S2000 凝胶色谱柱。

右旋糖酐对照品 D2000（蓝色葡聚糖 2000），中国药品生物制品检定所，批号 140646-2000-01

葡萄糖对照品（D0），含量：99.5%，批号 086K0166，SIGMA。

超纯水用 Millipore-Q 超纯水系统制得。

其余试剂为分析纯。

样品来源：银杏内酯注射液，批号 100501，100502，100503，规格均为：2ml。

b.流动相的选择

选取 0.71%（内含 0.02%的叠氮化钠）硫酸钠溶液作为流动相。

c.检测器的选择

选用通用型检测器示差折光检测器，该检测器对于存在折光系数差异的物质均有良好的响应。

d.拟确定的色谱条件

色谱柱：Phenomenex BioSep-SEC-S2000，300×7.8mm，5um

流动相：0.71%（内含 0.02%的叠氮化钠）硫酸钠溶液

柱温：35℃，检测器温度：35℃，流速：0.5ml/min

e.银杏内酯的分子量

银杏内酯	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C	白果内酯	银杏内酯 J
分子式	$C_{20}H_{24}O_9$	$C_{20}H_{24}O_{10}$	$C_{20}H_{24}O_{11}$	$C_{15}H_{18}O_8$	$C_{20}H_{24}O_{10}$
分子量	408.4	424.4	440.4	326.3	424.4

f.方法学研究

①将右旋糖酐和葡萄糖对照品分别加流动相制成 10mg/ml 的溶液，分别精密吸取对照品溶液各 20μl，注入色谱仪，记录色谱图，结果右旋糖酐在保留时间 9.816'出峰，葡萄糖在保留时间 18.712'出峰，表明采用凝胶色谱法，分子量大的物质先出峰，分子量小的物质后出峰。

②取银杏内酯注射液 2ml，加入右旋糖酐对照品溶液（10mg/ml）1ml，混匀，精密吸取 10μl，注入色谱仪，记录色谱图，结果在保留时间 9.698'检出右旋糖酐，银杏内酯注射液成分峰均在 18min 以后出峰，表明分子量在 180~450 出峰时间在 18min 左右，分子量 5000~2000000 出峰时间在 9min 左右，表明采用凝胶色谱法来检测大分子物质是可行的。

为了再一次验证本品中不含大分子、聚合物，故又进行了 LC-MS 液质联用试验。

a.色谱条件

流动相：甲醇-水（90:10）、色谱柱：Agilent RX-C_{18}（2.1×50mm）

柱温：25℃ 流速：0.3ml/min

b.供试品溶液的制备

精密量取本发明银杏内酯注射液 2ml 置 10ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，供试品溶液的制备。

c.LC-MS 联用测试

根据确定的试验方法，分别取三批供试品溶液各 10μl，注入色谱仪，在 400~1000 和 400~3000 分子量范围内测试分子量，试验结果见表 4。

表 4 LC-MS 联用分子量测定结果

$[M+Na]^+$	419.1、431.5、447.4、463.3、475.7、532.2、588.8、701.8
M	396.1、408.5、424.4、440.3、452.7、509.2、678.8

从 LC-MS 联用分子量测定结果来看，分别检出银杏内酯 A（分子量 408.5）、银杏内酯 B（分子量 424.4）、银杏内酯 C（分子量 440.4），与银杏内酯的有效组分分子量完全一致，由于测试分子量范围分别在 400~1000 和 400-3000 之间，未对白果内酯分子量（326.3）进行测试，本发明注射液中未检出大于 700 以上分子量的物质，其它微量低分子量的物质存在，不影响本发明注射液质量，经 LC-MS 对银杏内酯中不同成份的分子量测试，说明本品中不含大分子或聚合物。

三批银杏内酯注射液测定分子量范围分别为 400~1000 和 400~3000 之间，LC-MS 图谱见图 1~6。

试验例 7 银杏内酯注射液质量控制——总银杏酸检查

色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇－1%冰醋酸（90：10）为流动相；流速 1.0ml/min；检测波长为 310nm。理论板数按白果新酸峰计应不低于 4000。

对照品溶液的制备：取白果新酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 5μg 的溶液作为对照品溶液；另取总银杏酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 100μg

的溶液，作为定位用对照溶液。

供试品溶液制备：取本发明注射液 1ml，加水稀释至 10ml，摇匀，用正已烷萃取 3 次（20ml、15ml、15ml），合并正已烷液，置水浴上蒸干，残渣加甲醇溶解并稀释至 2ml，摇匀，作为供试品溶液。

测定法：精密吸取供试品溶液、对照品溶液及定位用对照溶液各 20μl，注入液相色谱仪，计算供试品溶液中与总银杏酸对照品相应色谱峰的总峰面积，以白果新酸对照品外标法计算总银杏酸含量。含总银杏酸低于 1ppm。

方法学研究：

a.线性试验

对照品溶液的制备：取白果新酸对照品，加甲醇制成每 1ml 含白果新酸 0.104mg 的溶液，作为对照品溶液（1）；精密量取对照品溶液（1）0.5ml 置 100ml 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液（2）。

测定法：分别精密量取对照品溶液（1）2.5μl、5μl、10μl、20μl 和对照品溶液（2）10μl，注入液相色谱仪，在上述色谱条件下记录色谱图。试验结果见表 5。

表 5　白果新酸线性试验结果

进样量（ng）	5.2	260	520	1040	2080
峰面积	2545	102162	213093	426512	843249

以进样量为纵坐标，以峰面积为横坐标，进行线性回归得回归方程：Y=0.0025X－0.6448 r=0.9999。

试验结果表明，白果新酸进样量在 5.2～2080ng 之间，进样量与峰面积呈良好的线性关系。

白果新酸线性关系图见图 7。

b.定量限检测限试验

测定法：分别精密量取线性试验项下对照品溶液（2）5μl 和 2μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，计算白果新酸的定量限和检测限，白果新酸定量限为 2.24ng，检测限为 0.69ng。

c.精密度试验

测定法：精密量取白果新酸对照品溶液（2）20μl，连续进样 5 次，记录色谱图，计算 RSD 值。试验结果见表 6。

表 6　精密度试验结果

序号	1	2	3	4	5
峰面积	4850	4874	4845	4873	4837

对照品溶液峰面积 RSD 值为 0.35%，试验结果表明精密度良好。

d.稳定性试验

测定法：精密量取白果新酸对照品溶液（2）20μl，分别于 0、2、4、8、12 小时注入液相色谱仪，在上述色谱条件下，记录色谱图，计算 RSD 值。试验结果见表 7。

表 7 对照品溶液稳定性试验结果

时间（h）	0	2	4	8	12
峰面积	4861	4853	4865	4843	4870

试验结果表明，对照品溶液在 12 小时内稳定。

e.回收率试验

对照品溶液的制备：精密称取白果新酸对照品 5.03mg 置 10ml 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

供试品溶液制备：取本发明注射液 9 份，每 3 份分别加入对照品溶液 1.6ml、2.0ml 和 2.4ml，摇匀，用正已烷萃取 3 次（20ml、15ml、15ml），合并正已烷萃取液，置水浴上蒸干，残渣加氯仿溶解并定量稀释至 2ml，摇匀，作为供试品溶液。

测定法：分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各 20μl，在上述色谱条件下，记录色谱图，计算回收率。试验结果见表 8。

表 8 回收率试验结果

编号	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.8046	0.780	96.95	98.04	1.41
2		0.797	98.97		
3		0.778	96.67		
4	1.006	1.007	100.05		
5		0.997	99.06		
6		1.001	99.46		
7	1.272	1.161	96.18		
8		1.173	97.16		
9		1.181	97.85		

平均回收率为 98.04%，RSD 为 1.41%，试验结果表明，方法检测银杏酸的限量准确可靠。

试验例 8 银杏内酯注射液质量控制——指纹图谱检查

色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-四氢呋喃-水（25:10:65）为流动相；用蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃；载气流速：3.00L/min；柱温：40℃；理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

参照物溶液的制备：分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量，加甲醇制成每 1ml 分别含 0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg 的混合溶液，摇匀，作为参照物溶液。

供试品溶液的制备：精密量取本发明注射液 1ml，加磷酸盐缓冲溶液（pH6.5）14ml，摇匀，上 Extrelut-20 柱，吸附 15 分钟，用乙酸乙酯 100ml 洗脱，收集洗脱液，置水浴上蒸

干，残渣用流动相溶解并转移至 10ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，用 0.45μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。

测定法：分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 20μl，注入液相色谱仪，记录 60 分钟的色谱图。

按中药色谱指纹图谱相似度评价系统，供试品指纹图谱与对照指纹图谱经相似度计算大于 0.95。

发明人对上述发明内容进行了研究与说明，用于证明本发明的技术效果。下述试验用于进一步说明与解释本发明，但不限制本发明。

在银杏内酯指纹图谱中，其中峰 2 为银杏内酯 C、峰 3 为白果内酯、峰 4 为银杏内酯 A、峰 5 为银杏内酯 B，本发明注射液中 4 个特征峰在指纹图谱中均能一一对应。银杏内酯注射液对照指纹图谱见图 8。

首先采用药典委员会 2004 年指纹图谱指定软件——中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版对 10 批银杏内酯注射液生成对照指纹图谱，再按中药色谱指纹图谱相似度评价系统 B 版，计算 10 批银杏内酯供试品指纹图谱与对照指纹图谱相似度。试验结果见表 9。

表 9　10 批银杏内酯相似度结果

批号	相似度
100501	0.991
100502	0.987
100503	0.995
100504	0.996
110201	0.993
110202	0.989
110203	0.992
110701	0.989
110702	0.993
110703	0.991

本发明 10 批银杏内酯注射液指纹图谱 4 个共有峰与对照指纹图谱的相似度均大于 0.95。

试验例 9　银杏内酯注射液质量控制——含量测定

色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-四氢呋喃-水（25:10:65）为流动相；用蒸发光散射检测器，漂移管温度：105℃；载气流速：3.00L/min；柱温：40℃；理论板数按白果内酯峰计算应不低于 2500。白果内酯峰与银杏内酯 C 峰的分离度应大于 1.5。

对照品溶液的制备：分别精密称取白果内酯对照品、银杏内酯 A 对照品、银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品适量，加甲醇制成每 1ml 分别含 0.15mg、0.12mg、0.1mg、0.1mg 的混合溶液，摇匀，作为对照品溶液。

供试品溶液的制备：精密量取本发明注射液 1ml，加磷酸盐缓冲溶液（pH6.5）14ml，摇匀，上 Extrelut-20 柱，吸附 15 分钟，用乙酸乙酯 100ml 分次洗脱，收集洗脱液，于水浴上蒸干，残渣用流动相溶解并转移至 10ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，用 0.45μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。

测定法：分别精密吸取对照品溶液 10μl、20μl 和供试品溶液 15μl，注入高效液相色谱仪，记录色谱图，用外标两点法对数方程分别计算白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的含量。

本发明注射液每 1ml 含银杏萜类内酯以白果内酯（$C_{15}H_{18}O_8$）、银杏内酯 A（$C_{20}H_{24}O_9$）、银杏内酯 B（$C_{20}H_{24}O_{10}$）和银杏内酯 C（$C_{20}H_{24}O_{11}$）的总量计，含量为 1-10mg/ml，优选 4.25~5.75mg。

以下本发明注射液制备例。

实施例 1

处方：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　油	600ml
加乙醇至	2000ml
制　成	1000 支

按处方取甘油和总量 80%的乙醇，混匀，加入银杏内酯，搅拌溶解，加乙醇至全量，搅拌均匀，用 1~10%盐酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

实施例 2

处方：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　油	800ml
加乙醇至	2000ml
制　成	1000 支

按处方取甘油和总量 80%的乙醇，混匀，加入银杏内酯，搅拌溶解，加乙醇至全量，搅拌均匀，用 5~10%枸橼酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

实施例 3

处方：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　油	1000ml
加乙醇至	2000ml
制　成	1000 支

按处方取甘油和总量 80%的乙醇，混匀，加入银杏内酯，搅拌溶解，加乙醇至全量，搅拌均匀，用 5~10%枸橼酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

实施例 4

处方：

银杏内酯（以萜类内酯计）	10g
甘　油	400ml
乙　醇	1200ml
注射用水加至	2000ml
制　成	1000 支

按处方取乙醇和甘油，混匀，加入银杏内酯，搅拌溶解，加注射用水至全量，搅拌均匀，用 5~10%枸橼酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

实施例 5

处方：

银杏内酯（以萜类内酯计）	25g
甘　油	1000ml
乙　醇	3000ml
加注射用水至	5000ml
制　成	1000 支

按处方取乙醇和甘油，混匀，加入银杏内酯，搅拌溶解，加注射用水至全量，搅拌均匀，用 1~10%盐酸调节 pH 至 3.2～3.8，中间体检验合格后，过滤至澄明，灌封、灭菌。

上述实施例 1~5 的活性成分含量、注射液质量均符合本发明银杏内酯注射剂质量要求。

权利要求书

1、银杏内酯注射液，其特征在于：所述注射液含有下述成分：

银杏内酯：以萜类内酯计 1-10mg/ml

甘 油 0.2-0.5ml/ml

乙 醇 0.4-0.7ml/ml

注射用水 0-0.5ml/ml。

2、根据权利要求 1 所述的银杏内酯注射液，其特征在于：所述注射液含有下述成分：

银杏内酯：以萜类内酯计 5mg/ml

甘 油 0.4ml/ml

乙 醇 0.6ml/ml。

3、根据权利要求 1 所述的银杏内酯注射液，其特征在于：所述注射液含有下述成分：

银杏内酯：以萜类内酯计 5mg/ml

甘 油 0.2ml/ml

乙 醇 0.6ml/ml

注射用水 0.2ml/ml。

4、根据权利要求 1 所述的银杏内酯注射液，其特征在于：乙醇与甘油的体积比为乙醇 1~5 份，甘油 1 份。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的银杏内酯注射液，其特征在于：银杏内酯按干燥品计算，含白果内酯为 25.0%~50.0%，含银杏内酯 A 为 20.0%~45.0%，含银杏内酯 B 为 10.0%~30.0%，含银杏内酯 C 为 5.0%~15.0%；且白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 总量不低于 95.0%。

6、权利要求 1 所述的银杏内酯注射液的制备方法，其特征在于：按注射液含有下述成分制备：

银杏内酯：以萜类内酯计 1-10mg/ml

甘 油 0.2-0.5ml/ml

乙 醇 0.4-0.7ml/ml

注射用水 0-0.5ml/ml；

步骤如下：

a）配制：混合乙醇和甘油，加入银杏内酯、溶解，补加乙醇或注射用水至全量，用 5~10% 枸橼酸溶液或 1~10%盐酸溶液调节 pH 值至 2.5～6.5；

b）过滤除菌；

c）灌封；

d）灭菌。

7、根据权利要求 6 所述的银杏内酯注射液的制备方法，其特征在于：步骤 a）配制调 pH 值至 3.2～3.8。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的银杏内酯注射液的制备方法，其特征在于：步骤 a）配制时，乙醇与甘油的体积比为乙醇 1~5 份，甘油 1 份。