

2.8 加样回收率试验:精密称取约 6.0 mg 含莪术醇 0.040 4 mg/mL 的样品 3 份,置 2 mL 量瓶中,分别精密加入莪术醇对照品储备液 0.10、0.30、0.50 mL,制备供试品溶液,依法测定,结果平均回收率为 99.69%,RSD 为 0.82% ($n=9$)。

2.9 样品测定:取复方莪术油软胶囊 3 批,制备供试品溶液,注入气相色谱仪,内标两点法测定莪术醇的质量分数,结果见表 1。

表 1 复方莪术油软胶囊中莪术醇测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of curcuminol in Compound Ezhu Oil Soft Capsules ($n=3$)

批号	莪术醇/(mg·mg ⁻¹)	RSD/%
20030501	0.040 3	0.33
20030502	0.040 5	0.32
20030503	0.040 3	0.24

3 讨论

由于复方莪术油软胶囊的成分大多是极性较小的成分,且成分复杂,传统的填充柱不能使各成分完全分离。文献报道^[1,3,4]的色谱柱也大多数为非极性毛细管色谱柱,其中最多的为聚硅氧烷类色谱柱,所以本实验采用了 OV-1 毛细管色谱柱。

本实验曾采用了文献报道^[3]的程序升温,初始温度为 75℃,以 3℃/min 升至 145℃。但此时莪术醇与相邻物质未实现基线分离,所以尝试采用了

1.5℃/min 升到 132℃,此时莪术醇与相邻物质实现基线分离。在待测物质流出色谱柱后,采用 50℃/min 到 210℃,维持 4 min,这样使其他高沸点的物质尽快流出色谱柱,从而达到减少分析时间的目的。

文献报道^[4]的内标物为正十三烷。本实验采用正十三烷作内标时,由于复方莪术油软胶囊成分复杂,未达到基线分离。用萘作内标时出峰时间较早,与陈皮油中成分未达到基线分离。用正十八烷作内标时,它与莪术醇未达到基线分离。基于上述现象,采用沸点较高的内标物质。本实验尝试用了正二十烷、正二十五烷、蒎烯,三者都能实现基线分离,但是正二十五烷、蒎烯的保留时间过长,正二十烷保留时间适中,所以本实验采用正二十烷作为内标。

References:

- [1] Zhou X, Liang G Y, Shen W Y. Study on chemical components of essential oil of *Rhizoma Curcumae* [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2002, 17 (3): 201-203.
- [2] Li J S, Jia M R, Wang D G. *Identification Science of Chinese Materia Medica* (中药鉴定学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [3] Li A Q, Hu X J, Deng Y H, et al. Constituents in volatile oil of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen C. Ling [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (9): 782-783.
- [4] Xie Y, Hang T J, Zhang Z X, et al. Comparisons of curcuminol contents in essential oil from four species of *Rhizoma Curcumae* L [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (7): 600-602.

注射用苦参素细菌内毒素检查法的研究

肖贵南¹, 陆惠文^{1*}, 宜全²

(1. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180; 2. 广州医学院, 广东 广州 510182)

摘要:目的 探讨注射用苦参素进行细菌内毒素检查的可行性。方法 采用凝胶法和动态浊度法鲎试验对样品中的细菌内毒素进行定性和定量检测。结果 3 批注射用苦参素稀释至 500 mg/L 和 250 mg/L 后对细菌内毒素检查均没有干扰作用;所测样品的细菌内毒素均小于 1 000 EU/g,凝胶法和动态浊度法鲎试验均证实了这一点。结论 可建立注射用苦参素的细菌内毒素检查法,日常细菌内毒素检查时可将样品稀释至 500 mg/L 以下以排除其干扰作用。

关键词:注射用苦参素;细菌内毒素;鲎试验;干扰作用

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)09-1332-04

Investigation for bacterial endotoxins in kurorinone for injection

XIAO Gui-nan¹, LU Hui-wen¹, YI Quan²

(1. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China;

2. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

收稿日期:2004-12-22

作者简介:肖贵南(1972—),男,江西南康人,副主任药师,硕士,发表论文 21 篇,研究方向为新药药理及细菌内毒素分析。

Tel: (020) 81853842 E-mail: gzxgn@163.com

* 通讯作者 陆惠文

Key words: kurorinone for injection (KFI); bacterial endotoxins; tachypleus amebocyte lysate (TAL) test; interference effects

自从 20 世纪 60 年代阐明鲎血凝集的机制并由此建立鲎试验方法以来,世界各国越来越多地以细菌内毒素检查药品生物制品中的致热物质来替代兔热原检查以控制药品质量,如《中国药典》2005 年版规定进行细菌内毒素检查的品种为 69 个,而《美国药典》24 版已达 586 种。苦参素的主要成分为氧化苦参碱,是从豆科槐属植物苦参、广豆根、管萼山豆根等植物中提取的生物碱,临床主要用于慢性病毒性乙型肝炎、肿瘤放疗和化疗后引起的白细胞减少等症,其细菌内毒素是影响该药疗效好坏的重要指标,《中国药典》2001 年版尚未收载该品种。本实验对注射用苦参素(kurorinone for injection, KFI)进行了细菌内毒素的凝胶法定性及动态浊度定量法鲎试验研究,以考察该药进行细菌内毒素检查的可行性。

1 材料与仪器

注射用苦参素(批号 030308、030309、030310;每瓶 100 mg)由深圳清华源兴药业有限公司生产;细菌内毒素标准品(批号 981;每瓶 9 000 EU)由中国药品生物制品检定所提供;细菌内毒素检查用水(批号 020309;每瓶 5.0 mL,细菌内毒素小于 5.0 EU/L)由湛江海洋生物制品厂生产;灵敏度为 250 EU/L(批号 020125)的普通鲎试剂及 30 EU/L(批号 010402-C;每瓶 1.2 mL)的定量鲎试剂由湛江海洋生物制品厂生产;灵敏度为 250 EU/L(批号 0204032)的普通鲎试剂由湛江安度斯生物有限公司生产。

BET—32B 型细菌内毒素定量测定仪由天津大学无线电厂生产;旋涡振荡器(IKA—MS—1 型)及恒温水浴箱(19A 型)由德国 Julabo 公司生产;实验所用玻璃器皿经浓硫酸洗液处理后再以 250 ℃干烤 2 h 去除外源性的细菌内毒素。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂标示灵敏度(λ)的复核^[1]:按《中国药典》规定的方法对实验所用鲎试剂进行灵敏度复核,结果鲎试剂的实测灵敏度均在(0.5~2.0) λ ,符合规定,正式试验时以标示的鲎试剂灵敏度 λ 为准。

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定^[1]:细菌内毒素限值 $L=K/M$,其中 K 为人用每千克体重每小时最大可接受的细菌内毒素剂量,非放射性药品在静脉途径给药时 K 值定为 5 EU/(kg·h); M 为人用

每千克体重每小时最大可接受的药品剂量,注射用苦参素的成人(60 kg)每次最大临床用量为 600 mg^[2],2 h 内静脉滴注完,经过计算求得 L 值为 1 000 EU/g。

2.3 样品的干扰试验(凝胶法)

2.3.1 干扰试验有效稀释质量浓度的计算:目前市场上用于药品检验的鲎试剂其灵敏度一般在 30~500 EU/L,故在确定了 KFI 的细菌内毒素限值为 1 000 EU/g 后,可计算出样品的有效稀释质量浓度范围为 $\lambda_0/L \sim \lambda_m/L$,即 30~500 mg/L。由此可知待测样品的最小非干扰质量浓度不能低于 30 mg/L。

2.3.2 样品的干扰预试验:任取 1 批 KFI 样品(批号为 030309)稀释至 250 mg/L 及 500 mg/L,参照有关文献报道^[3]以 250 EU/L(批号为 020125)的鲎试剂进行细菌内毒素检查的干扰试验,并计算以样品稀释液配制的细菌内毒素溶液反应终点质量浓度的几何均值(E_t)及用细菌内毒素检查用水配制的内毒素溶液反应终点浓度的几何均值(E_s),结果见表 1。表明样品在两种质量浓度下对鲎试验检查均无干扰作用。

表 1 注射用苦参素的干扰预试验
Table 1 Pre-interference test for KFI

样品 批号	$p/(mg \cdot L^{-1})$	细菌内毒素/(EU·L ⁻¹)					结果
		500	250	125	62.5	NC	
水	-	++++	++++	----	----	--	$E_t=250$
030309	250	++++	++++	----	----	--	$E_t=250$
030309	500	++++	++++	----	----	--	$E_s=297$

+表示阳性反应,形成了凝胶;—表示阴性反应,未形成凝胶
+ indicates positive reaction with gelatination; — indicates negative reaction without gelatination

2.3.3 样品的干扰试验:取 2 个厂家灵敏度为 250 EU/L(批号为 020125 和 0204032)的鲎试剂,分别对 250 mg/L 及 500 mg/L 的 KFI 稀释液进行细菌内毒素检查的干扰试验,并计算以样品稀释液配制的细菌内毒素溶液反应终点浓度的几何均值(E_t)及用细菌内毒素检查用水配制的内毒素溶液反应终点浓度的几何均值(E_s),结果见表 2。可见 KFI 稀释至 500 mg/L 或 250 mg/L 时其 E_t 与相应的 E_s 相比均在 0.5~2.0,且 E_s 在(0.5~2.0) λ ,表明此时样品稀释液对鲎试验检查无干扰作用。

2.4 样品中细菌内毒素的常规检测:取上述 3 批 KFI 稀释至 250 mg/L,以灵敏度为 250 EU/L 的普

通鲎试剂进行常规凝胶法细菌内毒素检查,结果见表 3。表明 KFI 中的细菌内毒素均小于 1 000 EU/g。

2.5 样品的干扰试验及其定量检查(动态浊度法)

2.5.1 标准曲线的制作及其可靠性评价:按照定量用鲎试剂的装量加入细菌内毒素检查用水并分装 0.10 mL 鲎试剂于各反应管中(10 mm×75 mm),各加入 0.10 mL 500、250、125、62.5、31.25 EU/L 细菌内毒素,阴性对照管加入 0.10 mL 内毒素检查用水,上述各反应管插入细菌内毒素定量测定仪中进行检测,每 1 浓度重复 3 管,建立成胶时间对数值(lgT)与细菌内毒素浓度对数值(lgC)的相关性,全部数据采用最小二乘法回归处理。要求标准曲线的相关系数 $|r|>0.980$,且阴性对照管的成胶时间在检测时间限度之外时,结果才成立。

表 2 注射用苦参素的干扰试验
Table 2 Interference test for KFI

样品 批号	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	干扰试验结果/(EU·L ⁻¹)	
		020125	0204032
水	—	Es=250	Es=250
030308	250	Et=297	Et=250
030308	500	Et=297	Et=354
030309	250	Et=250	Et=297
030309	500	Et=354	Et=297
030310	250	Et=250	Et=297
030310	500	Et=297	Et=297

表 3 注射用苦参素中细菌内毒素的常规检查
Table 3 Routine examination of bacterial
endotoxins in KFI

样品 批号	样品管	阴性 对照	阳性 对照	样品阳 性对照	结果/ (EU·g ⁻¹)
030308	—	—	++	++	<1 000
030309	—	—	++	++	<1 000
030310	—	—	++	++	<1 000

+表示阳性反应,形成了凝胶;-表示阴性反应,未形成凝胶
+ indicates positive reaction with gelatination; - indicates
negative reaction without gelatination

2.5.2 干扰预试验:取 1 批 KFI 分别稀释至 500、250、125、62.5、31.25 mg/L 作为 A 液;另取 A 液添加终浓度为 125 EU/L 细菌内毒素作为 B 液。同时制备标准曲线进行干扰预试验,样品中添加内毒素的回收率=[(B 液内毒素值-A 液内毒素值)/125]×100%,结果求得曲线方程为 $\lg T = 3.041\ 16 - 0.242\ 63\ \lg C$ (T 单位为 s,C 单位为 1 000 EU/L),相关系数 $r = -0.992\ 8$,阴性对照管未出现成胶信号,结果见表 4。

表 4 干扰预试验
Table 4 Pre-interference test

稀释倍数	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	外加内毒素/(EU·L ⁻¹)	回收率/%
2	500	125	68
4	250	125	98
8	125	125	114
16	62.5	125	108
32	31.25	125	110

可见 KFI 稀释至 500 mg/L 或更低浓度时其添加细菌内毒素的回收率在 50%~200%,表明此时对细菌内毒素检查无干扰作用,正式试验时取 KFI 的 4 倍稀释液(质量浓度为 250 mg/L)进行干扰试验和细菌内毒素定量分析。

2.5.3 干扰试验及细菌内毒素定量检查:取 3 批 KFI 稀释至 250 mg/L 作为 A 液;另取 A 液添加终浓度为 125 EU/L 的细菌内毒素作为 B 液。参照有关文献报道^[4]进行干扰试验及细菌内毒素的定量检查,结果求得曲线方程为 $\lg T = 2.980\ 24 - 0.240\ 16\ \lg C$ (T 单位为 s,C 单位为 1 000 EU/L),相关系数 $r = -0.996\ 4$,且阴性对照管无成胶信号出现,结果见表 5。

表 5 注射用苦参素的干扰试验及细菌内毒素的定量检测
Table 5 Interference test and quantitative determination
of bacterial endotoxins in KFI

批号	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	外加内毒素/(EU·L ⁻¹)	回收率/%	含内毒素量/(EU·g ⁻¹)
030308	250	125	88	126.26
030309	250	125	103	71.28
030310	250	125	122	100.32

可见 3 批 KFI 稀释至 250 mg/L 时其添加内毒素的回收率均在 75%~125%,表明样品在该浓度下对鲎试验检查无干扰作用;定量检查结果表明所测 3 批 KFI 的细菌内毒素均小于 1 000 EU/g。

3 讨论

鲎试剂为东方鲎或美洲鲎的血液变形细胞溶解物的冻干品,在一定条件下(适宜的温度、pH 值及无干扰作用时)该试剂能与微量的内毒素反应形成凝胶,细菌内毒素的检查正是基于上述机制。主要的方法有凝胶法和比浊法及比色法,前者为定性或半定量试验;后二者为定量试验,由于其操作简便、直观、准确、能迅速排除干扰,并可检测各种输液药品、水质、食品及医疗器械中污染的细菌内毒素;临床上可通过监测血液、腹水、脑脊液等体液中的细菌内毒素,诊断革兰氏阴性杆菌内毒素血症、肝硬化、脑膜炎等病症及评价烧伤病人的治疗效果,因而这种方法在临床及药物分析部门得到了广泛的重视和应

用,《中国药典》2000年版二部已经正式收载了该方法。

一个新的中药品种是否可以采用细菌内毒素检查法,首先要证实该样品本身是否存在干扰因素,进行干扰试验的目的就是要确定该品种在什么样的有效稀释浓度范围内进行细菌内毒素检查时既可以克服干扰因素,又能客观地反映其所含内毒素的量是否符合规定的限值;本实验在确定注射用苦参素的细菌内毒素限值为1 000 EU/g后,应用2个厂家不同灵敏度的鲎试剂对3批注射用苦参素进行了细菌内毒素检查的干扰试验,动态浊度法定量试验及普通凝胶法鲎试验均证实样品在稀释至500 mg/L或

更低浓度时对细菌内毒素检查无干扰作用,说明可建立该品种的细菌内毒素检查法。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Liu J, McIntosh H, Lin H. Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B: a systematic review [J]. *Liver* (肝脏), 2001, 21 (4): 280-286.
- [3] Xiao G N, Ou X, Lu H W, et al. Study of tachypleus amebocyte lysate test for bacterial endotoxins in propafenone hydrochloride injection [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20 (2): 226-229.
- [4] Xiao G N, Wu Z D, Guan Y Y. Quantitative study of kinetic turbidimetric limulus test for bacterial endotoxins in cisplatin injection [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19 (4): 435-437.

六味地黄纳米颗粒的显微结构及丹皮酚的测定

马培艳^{1,2}, 傅正义¹, 张金咏¹, 王玉成¹, 王为民¹, 张清杰¹

(1. 武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 武汉理工大学理学院 应化系, 湖北 武汉 430070)

六味地黄作为一种滋补肾阴的传统复方药物已被使用了几千年,近年来,六味地黄因具有抗癌、提高人体免疫作用^[1]而备受关注。虽然它的药效明显,但由于煎煮时间长,味苦,同时较低的溶出率也抑制了六味地黄中成药的发展。纳米技术在生物、医药领域的迅速发展对中药产生了深刻的影响。受到矿物中药的启示,徐辉碧教授发现药物的药效不仅取决于药物组成,与药物制备时的状态也有关。当药物颗粒达到纳米级别时,药物会呈现出常态时不具有的新的物理化学、生物特性,据此提出了纳米中药的概念。目前已有一些纳米药物和专利的报道^[2~5],这些研究都表明了纳米技术可以显著提高矿物中药的药效。本实验采用高速离心剪切粉碎机制备了纳米六味地黄颗粒,对所得纳米颗粒进行了粒度分布测定和红外光谱分析,并测定了指标成分丹皮酚,为研究纳米粉碎对六味地黄化学成分的影响奠定基础。

1 仪器与试剂

HSCS 粉碎机(日本 NARA 机械制造有限公司);1110 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);DEGASSER 在线脱气机(美国);Quat Pump, DAD (美国);Analyst 色谱数据工作站;ZetaPALS 粒度

分析仪(美国 Brookhaven 公司);药材从湖北省中药材公司购得,经湖北中医研究院中药研究中心鉴定。丹皮酚对照品(质量分数 99.92%)由中国药品生物制品检定所提供;所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 纳米六味地黄的制备:药材清洗、干燥,均匀粉碎后过 80 目筛,得六味地黄细粉。取该细粉适量投入到 HSCS 粉碎机的投料罐中粉碎,即得。

2.2 粒度和粒度分布:粉末用 ZetaPALS 粒度分析仪进行粒度分析,见图 1。六味地黄粉碎后的平均粒径为 161.9 nm,并且曲线分布较窄,说明通过纳米粉碎技术可以得到均匀分布的纳米六味地黄粉末。

2.3 红外光谱分析:将六味地黄纳米粉末用 KBr 压片法进行红外光谱的测试,六味地黄细粉用同样的方法测试。结果见图 2。纳米粉碎前后六味地黄无论峰的位置还是峰的形状都相差不大,说明纳米粉碎后六味地黄主要成分的基团结构并没有发生变化。

2.4 丹皮酚的 HPLC 测定

2.4.1 色谱条件:色谱柱: C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(55:45);体积流量:

收稿日期:2005-04-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50272047,59925207)

作者简介:马培艳(1974—),女,河北人,讲师,博士,研究方向为纳米技术在中药中的应用。Tel: (027) 62581510