

道^[3,4],采用甲醇-1%冰醋酸(30:70),金丝桃苷和芦丁保留时间分别约为21、22 min,但本品采用该色谱条件时,两者不能达到基线分离,为使其达到完全分离的目的,实验对流动相甲醇与1%冰醋酸的比例进行了筛选,甲醇与1%冰醋酸的比例分别为30:70、29:31及乙腈与冰醋酸的比例为20:80时,样品中金丝桃苷和芦丁均不能达到基线分离,最终确定甲醇与1%冰醋酸的比例为28:72时,两者的分离度达到了1.5,采用HPLC-二极管阵列检测器检测峰纯度为0.999,理论板数分别为4 805、4 228,保留时间分别约为37、40 min。

3.3 提取方法的研究:采用乙醇和70%乙醇加热

回流30 min的方法处理样品,发现安神颗粒的70%乙醇溶液黏度大,不易滤过,而乙醇溶液色谱峰形不理想。另外取本品加甲醇分别采用加热回流30 min、超声处理20、30 min进行测定,测定结果无明显差异,因此选择超声20 min处理样品。

参考文献:

- [1] 万德光,裴瑾,严铸云.几种金丝桃属药用植物的金丝桃苷含量测定[J].中药材,2004,27(6):397-398.
- [2] 许乾丽,熊慧林,茅向军.黔产3种金丝桃属植物药中金丝桃苷的含量测定[J].药物分析杂志,2003,23(6):414-417.
- [3] Wu Y, Zhou S D, Li P. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* by HPLC analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 37(4): 280-282.
- [4] 黄琴伟,张文婷,赵维良. HPLC法测定鱼腥草不同生长季节、不同药用部位中黄酮类成分[J]. 中草药,2007,38(8):1253-1255.

热毒宁注射液中细菌内毒素的测定研究

刘涛^{1,2}, 萧伟¹, 王振中¹, 万德光², 彭国平³, 王永香^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2. 成都中医药大学, 四川成都 610075;

3. 南京中医药大学, 江苏南京 210046)

摘要:目的 对热毒宁注射液进行细菌内毒素定量检查试验,建立定量检测热毒宁注射液中细菌内毒素的试验方法。方法 采用《中国药典》2005年版二部附录检测细菌内毒素的动态浊度法。结果 热毒宁注射液在稀释至120倍时用细菌内毒素定量法检测无干扰因素影响,内毒素回收率在50%~200%。结论 使用动态浊度法可以高效地测定热毒宁注射液的细菌内毒素。

关键词:热毒宁注射液;细菌内毒素;动态浊度法;干扰试验

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)10-1585-03

热毒宁注射液主要组成药味为青蒿、栀子、金银花,具有清热、疏风、解毒之功效,临床用于上呼吸道感染(外感风热症)所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症,其疗效显著。热毒宁注射液质量标准中对注射剂采用家兔法进行热原检查,但家兔法进行热原检查操作复杂,时间长。根据细菌内毒素定量检测方法(动态浊度法)具有灵敏度高、快速、准确、操作简便等优点,本实验按《中国药典》2005年版二部附录的细菌内毒素法及其应用指导原则建立热毒宁注射液细菌内毒素定量检测方法,确保临床用药安全。

1 仪器与材料

BET-16M 细菌内毒素测定仪(天津市天大天

发科技有限公司);涡旋混合器(天津天大天发科技有限公司);FZQ-2型涡旋混合器(江苏泰县医疗器械厂)。

鲎试剂(批号0812062, $\lambda = 0.03$ EU/mL,规格0.6 mL/Amp,湛江博康海洋生物有限公司);细菌内毒素工作标准品(批号150601-20086,160 EU/Amp,中国药品生物制品检定所);细菌内毒素检查用水(批号080320,规格5 mL/Amp,湛江博康海洋生物制品有限公司)。热毒宁注射液由江苏康缘药业股份有限公司生产。

2 方法和结果

2.1 细菌内毒素细菌内毒素限值(L)的确定:按《中国药典》2005年版二部附录可知人每千克每小

* 收稿日期:2009-03-12

基金项目:国家科技攻关项目(2004BA721A42)

作者简介:刘涛(1976—),男,四川南充人,高级工程师,成都中医药大学在读博士,研究方向为中药品种、质量及资源开发研究,已在各类核心期刊发表论文15篇,曾荣获江苏省科技进步二等奖、连云港市科技进步特等奖等8项市级以上奖励,享受连云港市政府特殊津贴。Tel:(0518)85521943 E-mail:liutao0578@sina.com

* 通讯作者 王永香 Tel:(0518)85521933

时最大能承受细菌内毒素的量为 5 EU/(kg·h), 人均体质量按 60 kg 计算, 则人体最大能承受细菌内毒素的量为 $5 \times 60 = 300$ EU/(kg·h), 根据《中国药典》2005 年版二部得 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液中细菌内毒素不得大于 0.5 EU/mL, 则 250 mL 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液中含细菌内毒素限值为 $0.5 \times 250 = 125$ EU, 则热毒宁注射液中细菌内毒素限值 (L) 为 $(300 - 125) / 20 = 8.75$ EU/mL。

2.2 标准曲线的可靠性试验: 用细菌内毒素检查用水对细菌内毒素标准品溶解, 并稀释至最终浓度为 2.0、0.5、0.125、0.031 25 EU/mL 的溶液。各取 0.1 mL 分别加到预先装有复溶的 0.1 mL 鲎试剂反应管内, 混合均匀, 进行检测, 同时设阴性对照管, 其中每一浓度重复 3 管, 检测时间设定为 3 600 s, 见表 1, 得回归方程 $\lg T = 3.0655 - 0.244 \lg C$, $r = -0.9985$, 最低内毒素检测浓度 $\lambda_1 = 0.03125$ EU/mL, 空白对照管在规定检测时间外, 内毒素标准曲线成立。

表 1 标准曲线的可靠性试验

Table 1 Reliability of standard curve

样品溶液/ (EU·mL ⁻¹)	反应时间/s	实测内毒素浓度/ (EU·mL ⁻¹)	变异系数
0	> 3 600	0	
	> 3 600	0	
	> 3 600	0	
2.0	997	1.858 7	0.25
	1 002		
	1 000		
0.5	1 368	0.527 4	0.63
	1 359		
	1 351		
0.125	1 833	0.139 9	2.53
	1 867		
	1 928		
0.031 25	2 904	0.028 5	4.54
	2 654		
	2 755		

2.3 干扰预试验

2.3.1 供试品最大有效稀释倍数 (MVD) 的计算^[1]: 按 $MVD = CL/\lambda_1$ 计算, 式中 C 为供试品的溶液浓度, 其中当 L 以 EU/mL 表示时, C 为 1.0 mL/mL, L 为供试品的内毒素限值 (为 8.75.0 EU/ml), λ_1 为标准曲线的最低浓度 0.031 25 EU/mL, 计算得供试品的 MVD 为 280 倍。

2.3.2 供试品溶液的预干扰试验: 将热毒宁注射液用细菌内毒素检查用水依次稀释为 15、30、60、120、240 倍, 每个倍数两个平行样, 记为 A_i 液; 同时另取 5 管, 进行同样倍数稀释, 并在稀释液中添加近中点

内毒素浓度 λ_m 为 0.5 EU/mL 的细菌内毒素标准液, 作为供试品阳性对照管, 记为 B_i 液。分别取上述各液 0.1 mL 加入预先加有 0.1 mL 鲎试剂溶液的反应管内, 混匀后立刻插入浊度仪内进行检测, 其中每个浓度重复 2 管, 计算回收率 [回收率 = (B_i 液内毒素浓度值 - A_i 液内毒素浓度值) / $\lambda_m \times 100\%$], 结果见表 2。可见 60、120、240 稀释倍数下的热毒宁注射液添加内毒素的回收率均在 50%~200%, 为了得到更好的回收率, 干扰试验时选用 120 倍稀释液。

表 2 热毒宁注射液干扰预试验结果

Table 2 Determination of pre-interference test of Reduning Injection

稀释液倍数	内毒素浓度/(EU·mL ⁻¹)		回收率/%
	A _i	B _i	
15	< 0.031 25	0	0
30	< 0.031 25	0.095 3	19
60	< 0.031 25	0.044 42	88
120	< 0.031 25	0.677	135
240	< 0.031 25	0.717 5	143

2.3.3 供试品溶液的干扰试验: 取 7 批热毒宁注射液, 细菌内毒素检查用水分别稀释 120 倍, 另取 7 管进行同样倍数稀释, 并在稀释液中添加近中点内毒素浓度 λ_m 为 0.5 EU/mL 的细菌内毒素标准溶液, 作为供试品阳性对照管。同时制备内毒素标准曲线各浓度系列, 分别取上述各液 0.1 mL 加入预先加有 0.1 mL 鲎试剂溶液的反应管内, 混匀后立刻插入浊度仪内进行检测, 其中每一浓度重复 2 管, 结果见表 3。结果表明: 热毒宁注射液中的内毒素均在检测限以下, 且添加内毒素回收率均在 50%~200%, 表明热毒宁注射液在稀释 120 倍时, 检测已完全排除了干扰因素影响。且实测内毒素值也恰在选用细菌内毒素标准曲线以内, 故热毒宁注射液的日常检验取 120 倍稀释液即可。

表 3 热毒宁注射液干扰试验结果

Table 3 Determination of interference test of Reduning Injection

批号	内毒素浓度/(EU·mL ⁻¹)		回收率/%
	120 倍液	120/ λ_m 液	
080309	< 0.031 25	0.704 9	139
080501	< 0.031 25	0.953 4	190
080601	< 0.031 25	0.966 8	193
080701	< 0.031 25	0.456 0	91
080801	< 0.031 25	0.906 8	181
080905	< 0.031 25	0.965 2	193
081005	< 0.031 25	0.943 5	188

2.4 供试品的检测: 按上述细菌内毒素定量测定法规定方法, 按 8.75 EU/mL 内毒素限值对 11 批热

毒宁注射液在稀释 120 倍时进行内毒素定量检测,同时与热原检查法进行对比试验,结果见表 4。

表 4 热毒宁注射液细菌内毒素的检测结果

Table 4 Determination of endotoxin in Reduning Injection

样品 批号	阴性对照反 应时间/s	120 倍反 应时间/s	变异系 数/%	实测内毒素/ (EU · mL ⁻¹)	原液/ (EU · mL ⁻¹)	热原检 测结果
080309	>3 600	3 184	4.19	0.012 8	1.536	合格
080501	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080502	>3 600	3 123	2.40	0.018 1	2.172	合格
080601	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080610	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080701	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080801	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080809	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080901	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
080905	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格
081005	>3 600	>3 600	—	—	<检测限	合格

3 讨论

干扰试验结果表明热毒宁注射液用定量试剂检测在稀释 1~30 倍出现干扰,以致无法检测,将样品稀释至 60 倍时,方可完全排除干扰因素影响,内毒素回收率在 50%~200%。根据表 3 可得热毒宁注射液的日常检验取 120 倍稀释液即可。

对 10 批热毒宁注射液中的内毒素定量检测表明,热毒宁注射液内毒素实际检测值均远远低于限值(8.75 EU/mL);表明热毒宁注射液在生产过程中未被污染,较为安全。

中药注射剂由于组分较复杂,干扰因素多,加之原药材和制备工艺的变化使干扰因素变化不定,在用本法测定内毒素时,应同时进行加样加收考察以排除可能因素对实验结果的干扰。

HPLC 法测定板蓝根和板蓝根颗粒中 RS-告伊春和腺苷

王钢力¹, 聂黎行¹, 迟玉明², 姚令文¹, 刘莹², 刘丽丽^{*}, 张晓兰², 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 北京同仁堂科技发展股份公司, 北京 100075)

摘要:目的 建立板蓝根颗粒及药材中腺苷和 RS-告伊春的测定方法。方法 RS-告依春的测定采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-三乙胺(10:90:0.2, 用冰醋酸调 pH 值 5.2); 柱温: 室温; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 245 nm; 腺苷的测定采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(5:95); 柱温: 室温; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm。结果 RS-告依春的线性范围为 0.676~13.1 μg/mL; 板蓝根颗粒和药材的平均回收率分别为 101.66%、99.74%, RSD 分别为 0.9%、1.4% (n=6); 腺苷的线性范围分别 0.005~0.05 mg/mL, 板蓝根颗粒和药材的平均回收率分别为 97.76%、97.32%, RSD 分别为 1.62%、0.62% (n=6)。结论 所建立的方法准确、可靠, 可用于板蓝根颗粒及药材的质量控制。

关键词: 板蓝根; 板蓝根颗粒; RS-告依春; 腺苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)10-1587-03

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 含有生物碱类、核苷类、氨基酸类及有机酸类成分, 具有清热解毒、凉血利咽之功效, 主要用于瘟毒发斑、舌绛紫暗、大头瘟疫、疟腮、烂喉丹痧、丹毒、痈肿等症。《中国药典》2005 年版一部板蓝根项下仅有以精氨酸为对照的薄层色谱鉴别和性状鉴别项。现有的板蓝根制剂包括颗粒剂、茶剂、片剂、注射剂、糖浆剂等多种剂型, 其中板蓝根颗粒是《中国药典》2005 年版一部收载品种, 仅收载了理化鉴别和检查项。现代药理研究表明: 板蓝根中的腺苷具有抗炎作用, 还可用于冠心病诊断, 具有较高的

敏感性和特异性^[1]; RS-告依春具有明显的抗流感病毒作用^[2]。因此本实验建立了高效液相色谱法, 分别测定腺苷和专属性成分 RS-告依春, 为板蓝根制剂及其原料质量标准的修订与完善和制剂生产的过程控制提供了可供借鉴的检测手段和科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695-2487 HPLC 色谱系统, Empower 色谱工作站。

乙腈(Merck)为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。RS-告依春对照品、腺苷对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 板蓝根颗粒(含糖型

* 收稿日期: 2009-01-28

基金项目: 北京市科技计划项目(H30230130011)

作者简介: 王钢力(1969—), 女, 北京人, 研究员, 2001 年毕业于北京中医药大学, 获博士学位, 从事有关中药活性成分及质量控制的研究工作。Tel: (010) 67095424 E-mail: dunneer@163.com

* 桂林医学院 2004 级药理学本科实习生