

道的有薄层扫描法^[1]、高效液相色谱法^[2]。薄层扫描法操作较繁琐,且影响结果的因素较多,因此选用高效液相色谱法对该样品中淫羊藿苷进行测定。经比较,采用乙腈-水(27:73)为流动相,检测波长为 270 nm,柱温为 30 ℃时,能使各峰得到较好分离,且基线稳定。

References:

- [1] Yang X, Luo X P. Determination of the contents of icariin in Yingyanghuo and Xlongfeng Capsule by double-wave HTLC methods [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24 (10): 520.
- [2] Zhang L H, Liu Y H. Improvement of determination of icariin in Shenbao Mixture [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(5): 378-380.

天芎注射液干扰鲎试验检查的研究

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)

天芎注射液由天麻和川芎组成,临床上主要用于治疗头疼和风湿痹症。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学以来,世界各国越来越多地通过鲎试验法来替代家兔热原检查法以检测药品、生物制品中的致热物质。近年来国内也逐步开展了鲎试验在中药注射液细菌内毒素检查中的应用,但由于大多数中药注射液成分复杂,对鲎试验存在较大的干扰作用。天芎注射液细菌内毒素的量是关系到该药质量好坏的一个重要指标。本实验采用普通鲎试剂和特异性鲎试剂,通过调节 pH 值、稀释法和超滤法对天芎注射液干扰鲎试验的检查进行了研究,考察了该药进行细菌内毒素检查的可行性,同时为建立中药注射液细菌内毒素检查法提供一定参考。

1 材料与仪器

天芎注射液由广东彼迪药业公司提供,规格为 100 mL/瓶,批号分别为 020806、020814、020822。普通鲎试剂(灵敏度 λ 为 30 EU/L,批号为 2002621)、特异性鲎试剂(λ 为 60 EU/L,批号为 20020806)由广东湛江海洋生物制品厂生产,普通鲎试剂(λ 为 30 EU/L,批号为 0301151)、特异性鲎试剂(λ 为 60 EU/L,批号为 0206052)由广东湛江安度斯生物有限公司生产,细菌内毒素标准品(9000 EU/瓶,批号为 981)由中国药品生物制品检定所提供。细菌内毒素检查用水(规格为 5.0 mL/瓶,批号为 020309)由湛江海洋生物制品厂生产。

漩涡振荡器和 19A 恒温水浴系统均由德国 Ju-

labo 公司生产;PB-20 pH 计由德国 Sartorius 公司生产;超滤系统(包括三醋酸纤维素滤膜)由美国 Millipore 公司生产;实验所用的玻璃器皿经重铬酸钾浓硫酸洗液处理后,以 250 ℃干烤 2 h 去除外源性细菌内毒素。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂标示灵敏度(λ)的复核:按《中国药典》2005 年版的方法对所用鲎试剂(TAL)进行灵敏度复核,结果鲎试剂实测灵敏度在 0.5~2.0 λ ,符合规定。

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定^[1]:药品中细菌内毒素的限值 $L=K/M$,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 iv 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,企业内控标准规定天芎注射液的成人每次最大临床用量为 100 mL,故 $M=1.67$ mL/(kg·h),得 $L=3$ 000 EU/L。

2.3 样品中细菌内毒素的常规检查:取 3 批样品分别稀释 100 倍,并以灵敏度为 30 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 1。可见样品阳性管出现阴性,表明样品原液对细菌内毒素检查有一定的干扰抑制作用。

2.4 样品调节 pH 值后细菌内毒素的检查:取 3 批样品分别测定其 pH 值,结果在 3.2~3.6。推测上述样品阳性管出现阴性的原因可能是由于样品的 pH 值不在鲎试剂缓冲范围 6.0~8.0 内,因而对细菌内毒素检查产生了干扰抑制作用。取上述 3 批样品,以

收稿日期:2006-09-01

作者简介:肖贵南(1972—),男,江西南康人,硕士,副主任药师,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

表 1 天芎注射液中细菌内毒素的常规检查结果
Table 1 Results of routine test for bacterial endotoxins in Tianxiong Injection

批号	样品反应	阴性对照	阳性对照	样品阳性对照	结果
020806	— —	— —	+	— —	抑制作用
020814	— —	— —	+	— —	抑制作用
020822	— —	— —	+	— —	抑制作用

不含细菌内毒素的 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0, 稀释 100 倍和 50 倍, 分别以 30 EU/L 普通鲎试剂和 60 EU/L 特异性鲎试剂进行细菌内毒素检查, 结果完全相同, 见表 2。可见样品管和样品阳性管均呈阳性反应, 说明样品中细菌内毒素的量超标, 或样品对鲎试验检查存在一定的干扰增强作用, 因此简单调节样品的 pH 值和稀释并不能完全消除干扰作用。

2.5 样品调节 pH 值后的稀释法干扰试验: 市售鲎试剂灵敏度一般在 30~500 EU/L, 故在确定了天芎注射液的细菌内毒素限值为 3 000 EU/L 后, 可算出其有效稀释倍数为 6~100 倍。分别取灵敏度 λ

表 2 调节 pH 值后普通鲎试剂和特异性鲎试剂的细菌内毒素检查结果
Table 2 Results of test for bacterial endotoxins by common TAL and endotoxin-specific TAL after pH modulation

批号	样品反应	阴性对照	阳性对照	样品阳性对照	结果
020806	+	—	+	+	增强作用或阳性反应
020814	+	—	+	+	增强作用或阳性反应
020822	+	—	+	+	增强作用或阳性反应

为 30 EU/L 普通鲎试剂和 60 EU/L 特异性鲎试剂, 参照有关文献^[2]对本品的 100 倍和 50 倍稀释液进行干扰试验, 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)和用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 3、4。可见样品在调节 pH 值并经最大有效稀释后, 对普通鲎试剂和特异性鲎试剂的细菌内毒素检查仍然有较强的干扰增强作用, 甚至连对照管都出现阳性反应, 推测可能还存在其他的干扰因素。

表 3 普通鲎试剂的干扰试验结果
Table 3 Results of interfering test by common TAL

鲎试剂批号	样品批号	细菌内毒素浓度/(EU · L ⁻¹)				阴性对照	结果/(EU · L ⁻¹)
		60	30	15	7.5		
2002621	BET 水	+	+	+	+	—	$E_s=30$
	020806	+	+	+	+	+	干扰作用
	020814	+	+	+	+	+	干扰作用
	020822	+	+	+	+	+	干扰作用
0301151	BET 水	+	+	+	+	—	$E_s=30$
	020806	+	+	+	+	+	干扰作用
	020814	+	+	+	+	+	干扰作用
	020822	+	+	+	+	+	干扰作用

表 4 特异性鲎试剂的干扰试验结果
Table 4 Results of interfering test by endotoxin-specific TAL

鲎试剂批号	样品批号	细菌内毒素浓度/(EU · L ⁻¹)				阴性对照	结果/(EU · L ⁻¹)
		125	60	30	15		
20020806	BET 水	+	+	+	+	—	$E_s=60$
	020806	+	+	+	+	+	干扰作用
	020814	+	+	+	+	+	干扰作用
	020822	+	+	+	+	+	干扰作用
0206052	BET 水	+	+	+	+	—	$E_s=60$
	020806	+	+	+	+	+	干扰作用
	020814	+	+	+	+	+	干扰作用
	020822	+	+	+	+	+	干扰作用

2.6 样品超滤后的干扰试验和细菌内毒素的检测: 取 3 批样品以事先除去细菌内毒素的三醋酸纤维素滤膜系统进行超滤, 弃去滤液, 取留在滤膜上的物质以细菌内毒素检查用水稀释至 100 mL, 采用灵敏度为 30 EU/L 的普通鲎试剂进行细菌内毒素的常规

检查及干扰试验, 结果见表 5、6。可见样品中细菌内毒素的量均低于 3 000 EU/L, 而且滤膜上层检查液对鲎试验检查无干扰作用。

3 讨论
鲎试剂为东方鲎或美洲鲎的血液变形细胞溶解

表 5 天芎注射液超滤后的细菌内毒素常规检查结果

Table 5 Results of routine test for bacterial endotoxins in Tianxiong Injection after ultrafiltration

批号	样品反应	阴性对照	阳性对照	样品阳性对照	结果/(EU · L ⁻¹)
020806	— —	— —	+	+	<3 000
020814	— —	— —	+	+	<3 000
020822	— —	— —	+	+	<3 000

表 6 天芎注射液超滤后的干扰试验检查结果

Table 6 Results of interfering test for Tianxiong Injection after ultrafiltration

鲎试剂批号	样品批号	细菌内毒素浓度/(EU · L ⁻¹)				阴性对照	结果/(EU · L ⁻¹)
		60	30	15	7.5		
2002621	BET 水	+	+	+	+	—	Es=30
	020806	+	+	+	+	—	Et=50
	020814	+	+	+	+	—	Et=42
	020822	+	+	+	+	—	Et=36
0301151	BET 水	+	+	+	+	—	Es=30
	020806	+	+	+	+	—	Et=42
	020814	+	+	+	+	—	Et=50
	020822	+	+	+	+	—	Et=36

述物质进行细菌内毒素检查时,可使普通鲎试剂的反应性增强而出现假阳性。特异性鲎试剂由于去除了 G 因子或使 G 因子处于钝态,能有效抑制非内毒素类物质的激活,避免了假阳性的发生。所以当本实验中特异性鲎试剂检查结果为阳性时,表明还可能其他的未知干扰性物质参与。

一个新的中药品种是否适于应用细菌内毒素检查法,很重要的一点就是要研究该样品本身是否存在干扰因素,以及如何消除干扰因素。常见的干扰因素大多可以通过稀释法消除,但一些成分复杂的中药注射液在调节 pH 值和应用稀释法均难于消除干扰因素时,可考虑采用超滤法。这是由于细菌内毒素的相对分子质量大于 10 000 且多以微团形式存在,而药物的相对分子质量一般不超过 2 000。因此实验选用截留相对分子质量 5 000 的三醋酸纤维素滤膜对药品进行超滤,可有效滤除药物,并将细菌内毒素截留在滤膜上。这样就可以在内毒素的量不变的情

况下有效消除干扰作用,而滤膜上含有细菌内毒素的物质可以冲洗下来进行鲎试验检查和干扰试验。

况下有效消除干扰作用,而滤膜上含有细菌内毒素的物质可以冲洗下来进行鲎试验检查和干扰试验。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. App 85. 2005.
- [2] Xiao G N, Lu H W, Yi Q. Investigation for bacterial endotoxins in kurorinone for injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36(9): 1332-1335.

本刊重要启事

承蒙广大作者、读者的厚爱和支持,本刊稿源十分丰富,为了进一步缩短稿件刊出周期,增加信息量,本刊由 A4 开本每期 120 页扩版为 160 页,现定价为 19.80 元。

衷心感谢广大读者、作者、编委和协办单位对本刊的关心和支持,编辑部将不辜负大家的期望,与时俱进,开拓创新,为把《中草药》杂志办成知名的精品期刊而努力奋斗!

《中草药》杂志编辑部