· 制剂与质量 ·

基于微量量热法检测注射用双黄连冻干粉针质量波动性的研究

张雅铭[1,2]，鄢 丹[2*]，张 萍[2]，任永申[2]，张少峰[2]，冯 雪[2]，肖小河[2*]

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所，北京 100850；2 中国人民解放军第 302 医院 全军中药研究所，北京 100039)

摘 要：目的 从生物检定角度，探索并建立表征注射用双黄连冻干粉针质量波动性的方法。方法 采用微量量热法，建立基于痢疾杆菌的注射用双黄连冻干粉针质量波动评价方法，制备避光室温、高温(60 ℃)及光照(4 500±500) lx 样品 S1~ S9。以生物热活性图谱的相似度和微量量热学参数如指数生长期速率常数(k_1)，最大发热功率(P_1)、达峰时间(T_1)、发热量(Q_1)，稳定期最大发热功率(P_2)、达峰时间(T_2)、发热量(Q_2)为评价指标，进行定性定量分析，以生物热活性图谱相似度 S、参数 T'_m、P'_m 为指标进行聚类分析。结果 相似度分析结果显示，与避光室温(22 ℃)样品 S1~ S4 相比，光照(4 500±500) lx 样品 S7~ S9 相似度较高(R> 0.85)，而高温(60 ℃)样品 S5~ S6 的生物热活性图谱相似度较低(R≤0.700)。结论 以相似度及微量量热学特征参数定性定量表征不同样品的抑菌活性，所建立的生物热活性图谱全面反映模型生物的热生物学信息，提供了专属性较强的二维信息，可作为化学指纹图谱的有益补充，可以用于注射用双黄连冻干粉针的质量波动性检测。

关键词：注射用双黄连冻干粉针；微量量热法；痢疾杆菌；生物热活性图谱；质量波动

中图分类号：R286.02 文献标识码：A 文章编号：0253-2670(2010)07-1084-04

Investigation on quality fluctuation of Shuanghuanglian Freeze-dried Powder used for Injection by microcalorimetry

ZHANG Ya-ming[1,2], YAN Dan[2], ZHANG Ping[2], REN Yong-shen[2], ZHANG Shao-feng[2], FENG Xue[2], XIAO Xiao-he[2]

(1. Institute of Toxicology and Pharmacology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2 China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To provide the methods for quality fluctuation of Shuanghuanglian Freeze-dried Powder for Injection (SFPI) including bioassay method. **Methods** Biological profiles of SFPI on *Shigella dysenteriae* had been established by microcalorimetry. Samples 1—4 were kept at room temperature; Samples 5—6 were kept at storage at 60 ℃; Samples 7—9 were kept under the condition of illumination intensity (4 500±500) lx. All samples were analyzed qualitatively and quantitatively by similarity values of biological profiles and thermodynamics parameters, such as T_m^1, P_m^1, Q_1, k_1, T_m^2, and I. The normal samples and special samples could be distinguished by cluster analysis with similar values (S), the main thermal activity parameters (T_m^1, P_m^1). **Results** Compared with samples 1—4, the similarity tendency of samples 7—9 was similar, while similar values of S5—S6 was less than or equal to 0.700. **Conclusion** All the results show that the biotic thermal activity of different samples could be evaluated qualitatively and quantitatively by similarity values of biological profiles and thermodynamics parameters. In conclusion, characterized by two-dimension, microcalorimetry could supply thermograms as biological profiles characterized to describe the bioactivity of drugs, which were beneficial supplement to chemical analysis. Biological profiles are proposed as an efficient strategy for quality fluctuation of SFPIs.

Key words: Shuanghuanglian Freeze-dried Powder for Injection (SFPI); microcalorimetry; *Shigella dysenteriae;* biological profile; quality fluctuation

* 收稿日期：2009-12-03

基金项目：国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09502-003, 2009ZX09502-022)；国家自然科学基金资助项目(30701109)

作者简介：张雅铭(1978—)，女，山西平定人，主管药师，药剂学博士，2007 年获军事医学科学院药物分析学硕士学位，研究方向为中药制剂及质量控制。Tel：(010)66933324 E-mail：yaming_52@126.com

* 通讯作者 肖小河 Tel：(010)66933322 E-mail：pharmacy302@126.com

鄢 丹 Tel：(010)66933325 E-mail：yd277@126.com

中药注射剂是我国独创的中药新剂型, 在抢救危重症过程中发挥着其他剂型难以替代的独特作用, 近年来不良反应报道较多, 原因可以概括为两个方面: 一是临床合理用药问题; 二是产品质量问题。从生产质控环节入手保证中药注射剂质量的均一性, 减少不良反应发生。目前常规的分析方法中, 化学指纹图谱通过对指纹图谱各色谱峰峰形、保留时间、峰面积及相似度的描述, 反映了样品整体化学组分的波动, 与生物活性(尤其是不良生物活性)之间不一定有直接的量效关系, 难以评价中药注射剂疗效的大小, 所以笔者建立生物活性检测方法, 以弥补目前检验指标仅仅能控制已知成分的不足, 从生物活性角度控制药品的质量[1,2]。本实验以注射用双黄连冻干粉针为模式药, 它是由金银花、黄芩、连翘精制而成, 是《中国药典》2005 年版的一种静脉给药中药粉针剂, 具有良好的抗菌、抗病毒、抗炎解热的功效, 尤其对金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、痢疾杆菌等均有抑制作用。近年来不良反应报道较多, 以呼吸系统、全身性损害为主, 严重影响其临床的进一步应用, 所以对其进行质量控制和安全性评价非常重要。本实验在现有中药注射剂质控方法基础上, 结合前期研究[3,4], 将微量量热法引入中药注射剂生物检测评价体系。与管碟法相比, 基于微量量热法的生物热活性图谱, 不仅能够提供重要的微量量热学参数定量的表征其质量, 其本身的"热-时"效应曲线提供了专属性较强的二维特征图谱, 还可以作为表征样品抑菌活性的"指纹图谱", 为该方法能够提供全面的信息[5,6]。

1 仪器与材料

TAM Ⅲ12 通道毫瓦级热导式量热仪(瑞典 Thermometric AB), 实验时系统控温 37 ℃, YX-QLS—B 全自动立式电热蒸汽灭菌器(上海降拓仪器设备有限公司)。

痢疾杆菌 *Shigella dysenteriae* CMCC B51252 菌株由中国药品生物制品检定所提供。Luria-Bertani 培养基: 取蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 5.0 g, 加蒸馏水 1 000 mL 使溶解, 调 pH 7.0~7.2, 121 ℃灭菌 30 min, 置 4 ℃冰箱中保存备用。注射用双黄连冻干粉针购于哈尔滨中药二厂, 样品批号: S1(0802101)、S2(0805108)、S3(0802109)、S4(0802112)、S5(0802101)、S6(0805108)、S7(0802101)、S8(0805108)、S9(0802112), 其中样品 S1~S4、S5~S6 及 S7~S9 分别于避光室温、高温(60 ℃)及光照(4 500 ±500) lx 条件放置 10 d。

2 方法与结果

2.1 测定方法: 在恒温 37 ℃无菌条件下, 采用微量量热仪的安瓿法测定, 先将痢疾杆菌接种到蛋白胨培养基中形成悬浮液(细胞浓度 1×10^6 cells/mL), 分别与用灭菌水配制不同浓度的注射用双黄连(冻干)供试品溶液混合, 一并加入安瓿瓶中, 加盖瓶塞、密封, 放入微量量热仪中跟踪记录痢疾杆菌生长代谢的生物热活性图谱, 当曲线重新返回基线时停止[7], 通过 Origin 软件作图并提取微量量热学参数。

2.2 痢疾杆菌的生长热谱曲线: 在密闭的安瓿瓶中营养物和氧的供给是有限的, 结合微生物生长代谢的一般规律, 痢疾杆菌的生长代谢的热谱曲线分为 4 个期: 指数生长期(A-B)、停滞期(B-C)、稳定期(C-D)、衰亡期(D-E)[8]。以达峰时间(T)、发热功率(P)、指数生长期生长速率常数(k)和总发热量(Qt)等参数对其进行分析, 37 ℃下安瓿法测定的痢疾杆菌在未加药时生长代谢的热谱曲线见图 1。

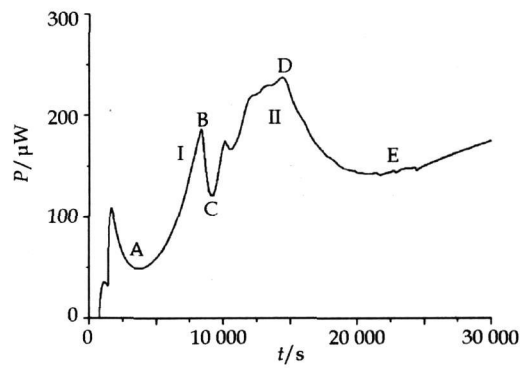

图 1 痢疾杆菌的生长热谱曲线

Fig. 1 *P-t* Growth curve of *S. dysenteriae*

峰Ⅰ、Ⅱ的达峰时间和发热功率分别为(T^1_m, P^1_m)和(T^2_m, P^2_m)。基于细菌细胞的多种热动力学模型中以指数模型最为常用[9], 指数模型认为在细菌细胞的生长过程中的指数生长期有:

$$P_m = P_0\exp(kt) \text{ 或 } \ln P_m = \ln P_0 + kt \qquad \text{公式(1)}$$

P_m 为生物热活性图谱中指数生长期内 t 时刻的输出热功率

将图谱的两个指数生长期 P_m、t 值代入公式(1)中, 进行线性拟合可得痢疾杆菌的指数生长期和稳定期生长速率常数 k_1 和 k_2 值; 对图谱积分可以求得曲线下面积即得总发热量(Qt); 从图谱上可以直接读取指数生长期的最大发热功率(P^1_m)及达峰时间(T^1_m)和稳定期的最大发热功率(P^2_m)及达峰时间(T^2_m)。这些微量量热学参数均可反映样品的抑菌活性。经计算, 未经药物干预时痢疾杆菌生长代谢的指数生长期生长速率常数 k_1 = (1.306 ± 0.005) h^{-1}, RSD 为 0.956% (n = 5), 说明实验结果

具有良好的重现性。

2.3 注射用双黄连冻干粉针作用于痢疾杆菌的量-效关系考察：S1 样品 5 个浓度梯度的抑菌活性考察结果见图 2。

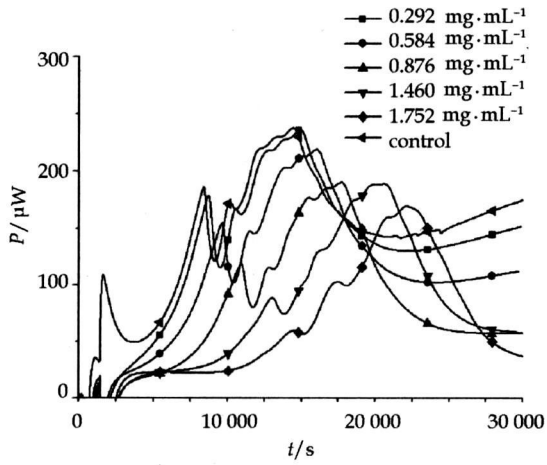

图 2 不同浓度注射用双黄连冻干粉针的痢疾杆菌生长热谱图

Fig. 2 *P*-*t* Growth curves of *S. dysenteriae* with different concentations of SFPI

由微量量热学参数分析，随着供试品溶液浓度增加，抑菌作用增强，其表现为：相对于空白对照，痢疾杆菌生长曲线整体呈“下降、后延”趋势；细菌指数生长期(P_m^1)、(k_1)、指数生长期发热量(Q_1)、稳定期(P_m^2)、稳定期生长速率常数(k_2)和稳定期发热量(Q_2)、(Qt)均相应减小，指数生长期(T_m^1)、(T_m^2)，且均与剂量呈较好的线性关系(r 分别为 0.991、0.982、0.939、0.941、0.854、0.927、0.927、0.998、0.997)。

图 2 显示痢疾杆菌受药物作用下的生长状况与指数生长期 T_m^1 相关性最显著，可作为评价供试品溶液抑菌活性强弱的客观指标，因此选择 T_m^1 计算 I 为注射用双黄连冻干粉针作用于痢疾杆菌生长代谢量效关系的评价指标，按公式(2)进行计算，并且 I 与剂量的量效关系重现性、稳定性均较好(r= 0.998)。

$$I = (T_m^1 - T_0^1)/T_0^1 \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

式中 T_0^1 为未经药物干预时痢疾杆菌生长代谢的指数生长期的达峰时间，T_m^1 为药物干预时痢疾杆菌生长代谢的指数生长期的达峰时间

2.4 不同注射用双黄连冻干粉针样品生物热活性图谱相似度分析

2.4.1 相似度分析：在以上系列浓度中，选择合适测试浓度，测定了注射用双黄连冻干粉针作用于痢疾杆菌的生长曲线。采用向量余角法对不同样品生物热活性图谱进行相似度分析，确认了 3 个共有峰 a、b、c，结果见表 1、图 3。

表 1 不同样品生物热活性图谱相似度结果

Table 1 Similarity values of biological profiles of S1—S9

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.926	S6	0.695
S2	0.923	S7	0.895
S3	0.948	S8	0.894
S4	0.948	S9	0.892
S5	0.700		

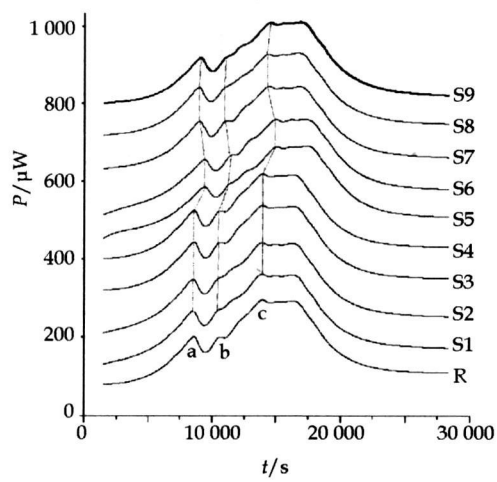

图 3 注射用双黄连冻干粉针相似度分析

Fig. 3 Similarity analysis of SFPI

2.4.2 微量量热学参数分析：提取注射用双黄连冻干粉针各样品微量量热学参数见表 2。

表 2 注射用双黄连冻干粉针生物热活性图谱微量量热学参数及其抑制率(n= 3)

Table 2 Biothermodynamic parameters of SFPI on *S. dysenteriae* and their inhibitory rates (n= 3)

样品	T_m^1/s	P_m^1/μW	K_1/h^{-1}	Q_1/J	T_m^2/s	P_m^2/μW	k_2/h^{-1}	Q_2/J	Qt/J	I%
S1	11 330	98	1.03	0.36	16 182	160	0.769	1.49	2.27	0.35
S2	11 339	91	1.85	0.19	16 295	155	0.709	1.50	1.82	0.35
S3	11 887	93	1.24	0.33	18 016	156	0.666	1.50	1.83	0.42
S4	11 416	101	1.24	0.37	16 333	165	0.720	1.64	2.01	0.36
S5	12 172	87	1.36	0.29	19 468	160	0.665	1.63	1.92	0.45
S6	12 176	80	1.57	0.21	19 371	151	0.751	1.54	1.79	0.45
S7	11 809	92	1.37	0.30	16 798	154	0.732	1.50	1.81	0.40
S8	11 747	97	1.29	0.34	18 840	158	0.654	1.68	2.02	0.40
S9	11 260	97	1.64	0.29	16 131	160	0.715	1.60	1.90	0.34

综合分析, 注射用双黄连冻干粉针剂量与参数 T_m^1、P_m^1、Q_1、k_1、T_m^2、I 均有较好的线性关系, 其中指数生长期生长速率常数 T_m^1 和发热功率 P_m^1 更能表征药物作用于细菌随时间生长变化特征和总体特征, 故选 T_m^1、P_m^1 作为基本评价参数。

以样品编号为因素变量, 微量量热学参数 T_m^1、P_m^1 为因变量, 进行单因素方差分析(ANOVA)、组间有显著性差异($P < 0.05$), 见表 3。提示注射用双黄连冻干粉针各样品间有一定的差异。

表 3 单因素方差分析 ANOVA

Table 3 One-way ANOVA

项目	方差	自由度	离均差	F 值	显著性
T_m^1	4 458 380	8	557 297.550	85.616	0.000
	305 759.6	36	8 493.322		
	4 764 140	44			
P_m^1	1 185.174	8	148.147	136.239	0.000
	39.436	36	1.095		
	1 224.640	44			

2.4.3 综合聚类分析: 以生物热活性图谱相似度 S、参数 T_m^1、P_m^1 进行多指标聚类分析, 见图 4。所用样品可以分为三大类, 其中 S1、S2、S3、S4 被聚为一类, 为室温避光放置样品; S7、S8、S9 被聚为一类, 为光照(4 500±500) lx 放置样品; S5、S6 被聚为一类, 为高温 60 ℃放置样品, 均与实际相符, 抑菌作用已发生一定的变化, 提示质量发生了改变。

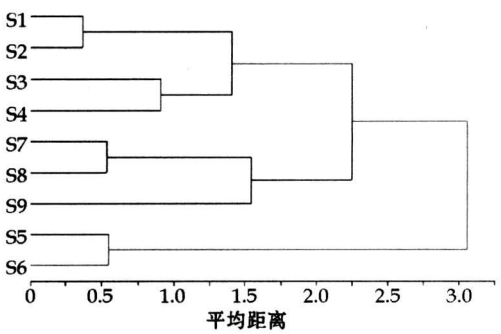

图 4 不同注射用双黄连冻干粉针样品聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of different samples of SFPI

2.4.4 综合分析: 与避光室温放置样品相比, 高温(60 ℃)放置样品的生物热活性图谱指数生长期 T_m^1 和稳定期 T_m^2 均后移, 指数生长期发热功率减小, 峰形变得平缓, 其整个代谢过程的时间增加, 而光照(4 500±500) lx 放置样品的生物热活性图谱变化不明显。结果表明高温(60 ℃)放置样品与避光室温放置样品相比, 抑菌活性增强, 而光照(4 500±500) lx 条件放置样品与室温(22 ℃)条件放置样品相比, 抑菌活性差异不明显。

3 讨论

本研究从生产质控角度出发, 以注射用双黄连冻干粉针为模型药, 建立了基于痢疾杆菌生物热活性图谱的质量均一性评价方法, 可以辨识高温和光照条件下样品产生的质量差异, 旨在模拟考察产品在储存、运输过程中受光照和高温等因素影响导致的微小质量变化, 为早期预警药源性不良反应提供技术参考。对样品进行盲法编号, 以保证试验结果的客观性和准确性。

微量量热法是基于生化反应中普遍存在的热交换而建立的, 能在线、量化、动态地反映微生物生长代谢过程中的动态整体信息, 其热谱曲线可直接全面的反映微生物生长代谢热量变化的整体特征, 从而有效的弥补常规方法信息单一的不足[10,11]。因此, 微量量热学方法有望为中药注射剂的质量控制提供新的思路和技术平台。

本实验建立了生物热活性图谱, 可以定性定量地刻画注射用双黄连冻干粉针的合格样品及特殊样品的质量信息, 以期建立合格样品质量标准信息数据库, 采用模式识别技术, 通过比对特殊样品质量信息, 筛选标准质量变化的关键信息, 设定其阈值范围, 建立判别函数, 通过对样品质量检验过程中采用模式识别、参数放行技术, 以实现对注射用双黄连冻干粉针质量波动的早期预警的目的。

参考文献:

[1] 肖小河, 金 城, 赵中振. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377-1381.

[2] 肖小河, 金 城, 鄢 丹, 等. 中药大质量观及实践[J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508

[3] 王珈伯. 中药品质生物评价与控制的示例大黄研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008

[4] 李 远. 板蓝根的生物测定和质量控制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008

[5] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 微量热法研究黄连与吴茱萸分煎后配伍时的药性差异[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1893-1897.

[6] 马建凤, 刘华钢, 朱 丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 42-45.

[7] 刘 义, 王戈林, 赵儒铭. 重组质粒对大肠杆菌 HB101 生长影响的微量热研究[J]. 化学学报, 2005, 63(4), 327-331.

[8] Lin X Y, Liu Y, Liu P, *et al*. Microcalorimetric investigation on the growth model and the protein yield of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Biochem Biophys Methods*, 2004, 59(3): 267-274.

[9] 刘 义, 谢卫红, 谢昌礼. 细菌有限生长热动力学研究[J]. 物理化学学报, 1996, 1(2): 156-158.

[10] 严诗楷, 辛文锋, 王义明. HPLC/ELSD 指纹图谱和星座图聚类法在清开灵注射液质量评价中的应用[J]. 药学学报, 2005, 40(9): 842-845.

[11] Yan D, Xiao X H, Jin C, *et al*. Microcalorimetric investigation of the effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth [J]. *Sci Sin B*, 2008, 51(9): 640-645.