

基于酶活性的复方地龙胶囊质量标准再评价研究

徐玉玲¹, 伍月¹, 李鹏程², 谭悦琪¹, 张宇雪¹, 刘涛^{1*}

1. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

2. 成都大学四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052

摘要:目的 以活血和抗凝血活性为指标, 对复方地龙胶囊质量标准进行再评价研究。方法 采用纤维蛋白平板法, 以尿激酶和凝血酶作为对照, 分别测定复方地龙胶囊的抗凝血和活血活性。结果 尿激酶在 200~1 000 U/mL 与透明圈面积呈良好线性关系, $r=0.999$; 凝血酶在 8~40 U/mL 与沉淀圈面积呈良好线性关系, $r=0.997$ 。暂时规定复方地龙胶囊的抗凝血和活血活性分别不低于 12 840 U/g 和 113 822 U/g。结论 本法可以快速、简便、准确地测定复方地龙胶囊的抗凝血和活血活性, 可用于复方地龙胶囊的质量控制。

关键词: 复方地龙胶囊; 纤维蛋白平板法; 尿激酶; 凝血酶; 质量标准再评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1340-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.013

Re-evaluation for quality standard of Compound Lumbrical Capsule based on enzyme activity

XU Yu-ling¹, WU Yue¹, LI Peng-cheng², TAN Yue-qi¹, ZHANG Yu-xue¹, LIU Tao¹

1. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052, China

Abstract: **Objective** The quality standard of Compound Lumbrical Capsule (CLC) was re-evaluated using blood and anti-coagulation intensity as indexes. **Methods** Fibrin plate method was used to determine the strength of promoting blood circulation and anti-coagulation for CLC by selecting urokinase and thrombin as reference substances. **Results** The results of urokinase concentration and transparent circle area showed a good linear relationship in 200—1 000 U/mL, $r = 0.999$; The results of thrombin concentration and precipitation circle area showed a good linear relationship in 8—40 U/mL, $r = 0.997$. The blood anti-coagulant activity of compound earthworm capsule of temporary regulations were not less than 12 840 U/g and 113 822 U/g. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate for determining the activity of promoting blood circulation and anticoagulation for compound lumbrical capsule, thus it can be used for the quality control of CLC.

Key words: Compound Lumbrical Capsule; fibrin plate method; urokinase; thrombin; re-evaluation of quality standards

理想的质量标准应能说明质量与疗效, 即物质基础与疗效的关系, 并能够指导临床用药, 但目前中成药的质量标准多以测定药品中指标性成分的量为主来控制产品的质量, 远远还达不到该水平, 特别在控制药品临床有效性方面, 尚有很大差距, 因此, 有必要对已上市药品进行质量再评价研究^[1-5]。

复方地龙胶囊是由地龙等药材制成, 具有化痰通络、益气活血的疗效, 用于缺血性脑卒中经络恢复期气虚血瘀证, 症见半身不遂、口舌歪斜、言语蹇涩或不语、偏身麻木、乏力、心悸气短、流涎、

自汗等^[6], 复方地龙胶囊为 CFDA 批准的第 1 个含有蚓激酶的复方制剂, 具有较强的药效^[7]。临床主要用于脑梗死、糖尿病、高血压等疾病的治疗^[8-9]。该制剂的现行质量标准中仅建立了化学成分定性鉴别及对川芎中所含阿魏酸进行定量测定, 定量测定的成分不能直接反映疗效, 不能有效地控制产品质量。其水平较差, 质量控制标准有待进一步完善^[10]。

为了进一步提高质量标准, 增强对复方地龙胶囊的临床有效性的控制, 本研究在其现行质量标准的基础上, 按照中成药质量再评价研究的思路, 采

收稿日期: 2016-11-06

基金项目: 四川省千人计划 (2013332)

作者简介: 徐玉玲, 女, 硕士, 副教授, 从事中成药新药开发与再评价研究。Tel: (028)84616590 E-mail: xuyuling@cdu.edu.cn

*通信作者 刘涛, 男, 研究员级高级工程师, 研究方向为中成药质量再评价研究。E-mail: liutao0578@sina.com

用纤维蛋白平板法,分别以尿激酶和凝血酶作为活血及抗凝血指标,对其所含酶的活血作用强度和抗凝血作用强度进行测定^[11],经过再评价研究,建立的新标准能够直接控制产品临床药效,可作为中成药质量标准再评价与提升的一种方法。

1 仪器与试剂

SQP 型分析电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);HS-3120 超声波清洗器;JJ-CJ-2FD 洁净工作台(苏州市金净净化设备科技有限公司);DH 系列电热恒温培养箱(西安禾普生物科技有限公司);XFS-280 手提式压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司);702N Hamilton 微量进样器(瑞士哈美顿博纳图斯股份公司);150 mm 数显游标卡尺(卡夫威尔实业有限公司)。

牛血纤维蛋白原试剂,上海经科化学科技有限公司,批号 F20150901;注射用尿激酶试剂,活性为 10 万单位,丽珠集团丽珠制药厂,批号 151202A;凝血酶试剂,活性为 1000 单位,上海经科化学科技有限公司,批号 T201503;氯化钠注射液,四川科伦药业有限公司,批号 B15042001;琼脂粉,成都市科龙化工试剂厂,批号 20101130。复方地龙胶囊,南京恒生制药有限公司,批号 151102、150801、160104、151203。其中批号 150801、160104 的为 12 粒装,批号 151102、151203 的为 24 粒装。

2 方法与结果

2.1 活血作用测定

2.1.1 纤维蛋白平板的制备^[12-17] 取经高压蒸汽灭菌后的直径为 10 cm 的平皿,分别依次加入加热至 85 ℃ 的 1% 琼脂溶液 25 mL,0.3% 的纤维蛋白原溶液 20 mL 和 40 U/mL 的凝血酶溶液 1.5 mL,轻轻摇匀,冷却静置 30 min,分别打出直径为 3.5 mm 的孔,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取复方地龙胶囊内容物 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入 100 mL 纯净水,称定质量,超声 25 min (功率为 1 200 W),放冷,用水补足减失质量,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 对照品溶液及阴性样品的制备 将活性为 10 万单位的尿激酶粉末适量,用生理盐水制成浓度为 600 U/mL 的对照品溶液,备用。阴性样品为纯净水。

2.1.4 标准曲线的绘制 取纤维蛋白平板,分别精密吸取 30 μL 浓度为 200、400、600、800、1 000 U/mL 的尿激酶进行点样后,置于恒温培养箱中(37 ℃)

培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈,以尿激酶浓度(U/mL)为横坐标(X),溶出透明圈的面积(mm^2)为纵坐标(Y),得线性方程为 $Y=0.212\ 16\ X+37.174$, $r=0.999$ 。结果表明,尿激酶在 200~1 000 U/mL 与透明圈面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验

(1) 同板精密度试验:取纤维蛋白平板,分别精密吸取 600 U/mL 的尿激酶溶液 30 μL,进行同板点样,共点样 6 次,置于恒温培养箱中(37 ℃)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,计算得其 RSD 值为 2.68%,表明同板精密度良好。

(2) 异板精密度试验:取纤维蛋白平板,分别精密吸取 600 U/mL 尿激酶溶液 30 μL,进行异板点样,共点样 6 次,置于恒温培养箱中(37 ℃)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,计算得其 RSD 值为 2.47%,表明异板精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批号(批号 151203)的复方地龙胶囊,按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,取纤维蛋白平板,分别精密吸取 30 μL,同板点样(同时点阴性样品),置于恒温培养箱中(37 ℃)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,计算得其 RSD 值为 0.92%,表明重复性良好。阴性样品无干扰。

2.1.7 稳定性试验 取批号为 151203 的复方地龙胶囊,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,取出纤维蛋白平板,分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 后点样,每次点样量为 30 μL (同时点阴性样品),置于恒温培养箱中(37 ℃)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,计算其 RSD 值。结果 RSD 为 0.83%,阴性样品无干扰,重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取同一批复方地龙胶囊(批号 151203,活性值为 153 482 U/g) 6 份,每份 0.25 g,分别加入浓度为 500 U/mL 尿激酶 50 mL,再精密加入纯净水 50 mL,称定质量,超声(1 200 W)提取 25 min,放冷,用水补足减失质量,滤过,取续滤液即得供试品。取纤维蛋白平板,分别精密吸取供试品溶液 30 μL,同板点样(同时点阴性样品),置于恒温培养箱中(37 ℃)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,计算加样回收率。结果平均加样回收率为 96.51%,RSD 为 2.74%,阴性样品无干扰。

2.1.9 样品测定 分别精密称取 4 批不同批号(批号 151102、150801、160104、151203)的复方地龙

胶囊,按“2.1.2”下项方法制备供试品溶液,取纤维蛋白平板,分别精密吸取供试品溶液 30 μL ,同板点样,置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,取出,测定溶出的透明圈面积,根据尿激酶浓度与透明圈面积的量效关系,计算地龙胶囊的活血活性,结果见表 1。根据样品测定结果,4 批样品活性平均值为 142 277.5 U/g,因此,将复方地龙胶囊的活血活性暂定为平均值的 80%,即不低于 113 822 U/g。

表 1 复方地龙胶囊样品活血活性值测定结果

Table 1 Active value determination of CLC

样品批号	长径/mm	短径/mm	面积/ mm^2	活性值/($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)
150801	14.83	14.58	169.75	124 978
160104	14.91	14.61	171.02	126 174
151102	16.89	15.95	211.65	164 476
151203	16.01	15.91	199.96	153 482

2.2 抗凝血作用的测定

2.2.1 纤维蛋白平板的制备 取经高压蒸汽灭菌后的直径为 10 cm 的平皿,分别依次加入加热至 85 $^{\circ}\text{C}$ 的 1%琼脂溶液 25 mL,0.3%纤维蛋白溶液 20 mL,摇匀,冷却静置 30 min,分别打出直径为 3.5 mm 的孔,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取复方地龙胶囊内容物 0.25 g 于具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入 50 mL 纯净水,称定质量,超声提取 25 min (1 200 W),放冷,用水补足减失质量,滤过,取续滤液,与 40 U/mL 凝血酶溶液(1:10),混匀反应 1 h 后即成供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液及阴性样品的制备 精密称取活性为 10 000 U 的凝血酶粉末适量,用生理盐水配制浓度为 40 U/mL 的溶液,备用。阴性样品为纯净水。

2.2.4 标准曲线的绘制 取纤维蛋白平板,分别精密吸取 30 μL 浓度为 8、16、24、32、40 U/mL 的凝血酶进行点样后,置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,取出,测定沉淀圈,以凝血酶浓度(U/mL)为横坐标(X),沉淀圈面积(mm^2)为纵坐标(Y),得线性方程为 $Y=7.4916X+152.78$, $r=0.997$ 。结果表明,凝血酶在 8~40 U/mL 与沉淀圈面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验

(1) 同板精密度试验:取纤维蛋白平板,分别精密吸取 40 U/mL 凝血酶溶液 30 μL ,同板点样,共点样 6 次,置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,测定沉淀圈面积,计算其 RSD 值。结果 RSD 为

2.91%,同板精密度良好。

(2) 异板精密度试验:取纤维蛋白平板,分别精密吸取 40 U/mL 凝血酶溶液 30 μL ,异板点样,共点 6 次,置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,测定沉淀圈面积,计算其 RSD 值。结果 RSD 为 2.92%,异板精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批号(批号 151102)的复方地龙胶囊,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,取纤维蛋白平板,分别精密吸取 30 μL ,同板点样(同时点阴性样品),置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,测定沉淀圈面积,计算其 RSD 值。结果 RSD 为 2.45%,重复性良好,阴性样品无干扰。

2.2.7 稳定性试验 取批号为 151203 的复方地龙胶囊,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取纤维蛋白平板,分别于 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 后点样,每次点样量为 30 μL (同时点阴性样品),置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,测定沉淀圈面积,计算其 RSD 值。结果 RSD 为 1.36%,重复性良好。阴性样品无干扰。

2.2.8 样品测定 分别精密称取 4 批不同批号(批号 151102、150801、160104、151203)的复方地龙胶囊,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取纤维蛋白平板,分别精密吸取供试品溶液 30 μL ,同板点样,置于恒温培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$)培养 20 h,测定沉淀圈面积,根据凝血酶浓度与沉淀圈面积的量效关系,计算抗凝血活性。结果见表 2。结果显示,凝血活性平均值为 16 050 U/g,因此,可将复方地龙胶囊抗凝血活性暂定为平均值的 80%,即不低于 12 840 U/g。

3 讨论

目前对复方地龙胶囊的执行标准为《国家药品标准新药转正标准》第 37 册中^[18],标准中含有地龙、阿魏酸、黄芪、齐墩果酸的定性鉴别和阿魏酸的定量测定。但是,地龙作为本品的君药,为常见

表 2 复方地龙胶囊样品抗凝血活性值测定结果

Table 2 Active value determination of CLC

样品批号	长径/mm	短径/mm	面积/ mm^2	抗凝血活性值/($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)
151102	17.33	16.31	222.09	14 587
150801	16.89	16.07	213.20	16 830
160104	17.12	15.99	215.20	16 587
151203	17.78	15.44	216.58	16196

的活血祛瘀药材, 具有较大的活血功能, 仅对其进行 TLC 定性鉴别, 不符合相关技术指导原则的规定, 且其质量标准未体现出对成品临床有效性的控制作用。

尿激酶是一种酶蛋白, 作用于纤维蛋白溶解系统, 催化裂解纤溶酶原形成纤溶酶。对新形成的血栓起效快、效果好, 毒性很低, 亦无明显抗原性、致畸性、致癌性和致突变性^[19-21]。凝血酶为一种生物活性蛋白, 是血液凝血级联反应中的主要效应蛋白酶, 显现出促凝和抗凝的特性, 促使可溶性纤维蛋白原转化为不溶性的纤维蛋白, 应用于创口, 使血液凝固而止血, 可促进血块稳定, 因此在血栓性疾病的引发和传播上有着核心作用。纤维蛋白平板法是利用纤维蛋白原与凝血酶发生反应, 使可溶性的纤维蛋白原转变为不可溶性的纤维蛋白, 均匀分布在琼脂糖凝胶平板上, 通过向样板孔内加入尿激酶等溶解酶溶液系统, 酶在扩散反应中与底物发生水解, 使纤维蛋白原水解成纤维蛋白, 产生透明圈, 透明圈大小与酶活力呈正相关^[22-24]。本研究基于酶活性研究, 对复方地龙胶囊的质量标准进行了再评价研究, 以活血强度及抗凝血强度作为指标, 分别建立了复方地龙胶囊活血强度值和抗凝血强度值的检测方法和标准, 并规定其活血强度值不低于 113 822 U/g, 抗凝血强度值暂定为平均值的 80%, 即不低于 12 840 U/g。通过再评价研究, 弥补目前复方地龙胶囊法定标准仅对阿魏酸进行定量测定的不足, 增强药品标准对产品质量的可控性。

地龙中含有蚓激酶^[25-26], 用其作为对照物质专属性更强, 但由于蚓激酶在我国仅有肠溶胶囊和肠溶片上市, 成品中含有大量的辅料, 这些辅料在制备对照品溶液时可溶性不好, 无法准确定量, 因此本实验没有采用其作为对照, 有待进一步研究。

再评价研究是药品研究的一个重要环节, 是确保用药安全有效的有效手段, 也是对新药评价的扩大和延伸, 药品质量标准再评价研究最主要的目的是, 通过再评价研究改进或提升药品质量标准以确保药品满足临床需求, 即安全性、有效性、稳定性及可控性。通过中成药再评价研究, 可以提升药品质量标准水平, 保证药品临床安全有效、稳定可控, 促进中药现代化^[27]。

参考文献

[1] 刘涛, 苟小军, 郭晓恒, 等. 基于中成药工艺与质量控制的再评价模式商建 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 873-1877.

- [2] 杨明, 伍振峰, 王芳, 等. 中成药再评价方法与策略研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(24): 2267-2270.
- [3] 何伟. 中药上市后证候疗效再评价的研究思路及方法探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2173-2176.
- [4] 杨杰峰. 中药注射剂安全性再评价管理探究及对策 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [5] 汪慧琪, 魏林, 吴伟, 等. 中医药治疗慢性肾功能衰竭的系统评价再评价 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 738-744.
- [6] 窦倩. 复方地龙胶囊对气虚血瘀证大鼠基础指标及血管内皮损伤研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [7] 王希斌, 王晓燕, 刘广娟, 等. 复方地龙胶囊薄层鉴别方法研究 [J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(6): 1015-1017.
- [8] 赵香生, 郑定容. 复方地龙胶囊对急性脑梗死患者血 IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF- α 水平的影响 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(9): 31-32.
- [9] 李亚丰. 复方地龙胶囊治疗缺血性中风恢复期临床疗效分析 [J]. 北方药学, 2016, 13(10): 84-85.
- [10] 李力, 张金龙, 刘蓉梅. 复方地龙胶囊组方与制备工艺研究 [J]. 药学进展, 2000, 24(6): 358-361.
- [11] 王维亭, 郝春华, 赵专友, 等. 新型抗凝药物研发进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 10-24.
- [12] 班建东, 廖共山, 黄爱民, 等. 纤维蛋白原平板法测定水蛭素活性 [J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(6): 827-828.
- [13] 谢平会, 董锐, 薛成玉, 等. 纤维蛋白平板法测定保健食品中纳豆激酶活力 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(7): 1658-1659.
- [14] 廖共山, 班建东. 一种检测凝血酶、类凝血酶的新方法——纤维蛋白原平板法 [J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6): 967-968.
- [15] 杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进 [J]. 中国酿造, 2008, 27(7): 77-80.
- [16] 刘涛, 谭清红, 王晓霞, 等. 基于酶活性的地龙质量标准再评价研究 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1535-1537.
- [17] 徐玉玲, 谭清红, 伍利华, 等. 地龙渗漉工艺参数优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 41-43.
- [18] 国家药品标准新药转正标准第 37 册 [S]. 2004.
- [19] 张淑英. 尿激酶溶栓在心肌梗死急救中的应用研究 [J]. 实用预防医学, 2012, 19(1): 90-91.
- [20] 史东升. 尿激酶加服血府逐瘀胶囊治疗结核性胸膜肥厚的临床观察 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 613-614.
- [21] 范海宾. 尿激酶溶栓治疗在急性心肌梗死急救中的疗效分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(1): 33-34.
- [22] 马桂平, 杜娟. 老年消化性溃疡并上消化道出血局部用药疗效分析 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(11): 143-145.
- [23] 郑国庆, 黄汉津, 王小同. 脑出血后凝血酶的作用与抗凝血酶治疗 [J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2015, 13(3): 199-202.
- [24] 谢平会, 董锐, 薛成玉, 等. 纤维蛋白平板法测定保健食品中纳豆激酶活力 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(7): 1658-1659.
- [25] 从玉文, 刘耀明, 陈家佩. 蚓激酶的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(3): 159-162.
- [26] 陈立军, 黄文芳, 石召华. Box-Behnken 设计-响应面法优化地龙活性组分的冻干工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3166-3172.
- [27] 杨晓宏. 中药质量标准现代化 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.