

不同孔径超滤膜对栀子苷热原去除工艺的影响

陈伟^{1,2}, 张鹏^{1*}, 彭国平², 郑云枫², 李贺敏²

(1. 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的:考察不同孔径超滤膜对去除栀子苷热原工艺的影响。方法:考察不同孔径超滤膜去除栀子苷中热原的效果,以鲎试剂动态浊度法定量测定超滤前后栀子苷原料中内毒素含量,筛选去除栀子苷中热原的最佳工艺。结果:100 kDa 孔径的超滤膜可较好地去除栀子苷药液中热原,对栀子苷成分的影响较小。结论:采用超滤法去除栀子苷中热原的工艺可行,可为其他中药注射剂及原料生产工艺中热原去除提供参考。

[关键词] 超滤; 栀子苷; 细菌内毒素

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)10-0011-03

[doi] 10.11653/syfy2013100011

Effects of Different Aperture Ultrafiltration Membranes on Removal Process of Pyrogen for Geniposide

CHEN Wei^{1,2}, ZHANG Peng^{1*}, PENG Guo-ping², ZHENG Yun-feng², LI He-min²

(1. Research and Development Centre, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To investigate effects of different aperture ultrafiltration membranes on removal technology of pyrogen for geniposide. Method: Effect of removal process of pyrogen in geniposide with different aperture ultrafiltration membranes was investigated, kinetic turbidimetric limulus reagent method was adopted to quantitative determine the content of endotoxin in raw material of geniposide before and after ultrafiltration, in order to screen the best removal process of pyrogen in geniposide. Result: The 100 kDa aperture ultrafiltration

[收稿日期] 20121202(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772755,81073060);国家科技重大专项(2009ZX09103-317)

[第一作者] 陈伟,硕士,从事中药化学研究,E-mail:540584399@qq.com

[通讯作者] * 张鹏,博士,副研究员,从事药物化学研究,Tel:010-62835640,E-mail:onflown@sina.com

[8] Sanna V, Gavini E, Cossu M, et al. Solid lipid nanoparticles(SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate; *in-vitro* characterization, *ex-vivo* and *in-vivo* studies [J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59 (8):1057.

[9] 侯永春,严孜. 葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18 (3):184.

[10] 闫福岭,鲁国,王雅琼,等. 葛根素对 AD 大鼠脑内 A β (1-40)和 Bax 表达的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2006,5(2):158.

[11] 叶峻. 乳化-超声法纳米氧化锌的制备[J]. 四川师范大学学报:自然科学版,2009,32(5):654.

[12] 陈锋,金日显,陈燕军,等. 纳米结构脂质载体的研究 [J]. 中国新药杂志,2008,17(6):456.

[13] 陈燕军,金日显,周雅琴,等. 芎归散超临界 CO₂ 萃取物固体脂质纳米粒的制备及体外释药特性评析[J]. 中国中药杂志,2006,31(5):326.

[14] 杨勇,奉建芳,张慧,等. 星点设计-效应面法优化蟾酥固体脂质纳米粒制备工艺[J]. 中国中药杂志,2006, 31(8):650.

[责任编辑 全燕]

membrane could be better remove pyrogen in geniposide liquid, and it had little influence on geniposide.

Conclusion: Ultrafiltration method could be used to remove pyrogen in geniposide, this result could provide reference for removing pyrogen in other traditional Chinese medicine injections and raw material production processes.

[Key words] ultrafiltration; geniposide; bacterial endotoxin

栀子苷是栀子中主要成分,常作为中药注射剂原料,但其中内毒素(热原)是中药注射剂的主要致热物质,因此,除去热原已成为现代中药注射剂的研究难点之一。目前注射剂的热原去除多采用活性炭吸附、膜过滤等方法^[1-2]。随着各种膜材料的发展,过滤除去热原的方法逐渐成熟,本实验考察了各种膜材料对栀子苷热原的去除效果及超滤过程中对其含量的影响。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 安捷伦公司), AE240 型电子天平(瑞士 METTLER 公司),超滤柱芯(截留相对分子质量分别为 30, 50, 100 kDa, 北京旭邦膜设备有限责任公司), 输液泵(MILLIPORE 公司), BET-16M 型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司), FZQ-2 型蜗旋混合仪(天津市天大天发科技有限公司), HG101-1 型电热鼓风干燥箱(南京实验仪器厂)。

动态浊度法鲎试剂(批号 0910160, 湛江博康海洋生物有限公司), 栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 11079-200410), 栀子苷(批号 090412, 纯度 92.95%, 实验室自制), 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素标准曲线的制备^[3] 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作对照品溶解并稀释, 配制成内毒素浓度分别为 2, 0.5, 0.125, 0.031 25 EU·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 各取 0.1 mL, 分别加入预先加有鲎试剂溶液 0.1 mL 的反应管内, 混合均匀, 于定量检测仪内进行检测。以细菌内毒素浓度为横坐标, 反应时间的对数为纵坐标, 得标准曲线 $\log t = 3.022\ 6 - 0.325\ 8 \log C$ ($r = -0.999\ 5$), 表明内毒素浓度在 2 ~ 0.031 25 EU·mL⁻¹ 呈良好线性相关。

2.2 干扰试验及内毒素定量测定 用细菌内毒素检查用水分别将各供试品稀释一定倍数, 并以此稀释液作为供试液(NPC), 分别将此倍数稀释液配制成 0.5 EU·mL⁻¹ 的内毒素对照品溶液, 作为阳性对

照(PPC)。取 NPC 和 PPC 各 0.1 mL, 分别加入预先加有 0.1 mL 鲎试剂反应管内, 混匀, 插入细菌内毒素定量检测仪内进行检测($n = 2$)。按下式计算回收率。

$$R = (C_{\text{PPC}} - C_{\text{NPC}}) / \lambda_m \times 100\%$$

式中, C_{PPC} 为样品阳性对照液中细菌内毒素的质量浓度, C_{NPC} 为样品液中细菌内毒素质量浓度, λ_m 为标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度(0.5 EU·mL⁻¹)。

2.3 不同孔径超滤膜去除栀子苷中热原的比较

2.3.1 样品的配制 称取栀子苷适量, 配制成质量浓度为 100 g·L⁻¹ 的溶液 3 份, 每份 2 L。

2.3.2 样品的超滤处理 取配制好的栀子苷溶液, 经 30, 50, 100 kDa 超滤膜超滤, 由于超滤设备有一定死体积, 超滤系统中会有一定量水液, 因此溶液在超滤前首先应进行平衡, 平衡循环 > 2 倍原溶液体积, 原液经超滤膜超滤, 待超滤完全后, 取超滤液测定内毒素含量和损失率。

2.3.3 内毒素检测 以动态浊度法定量检测原液及超滤液中细菌内毒素的含量。

2.4 栀子苷含量测定

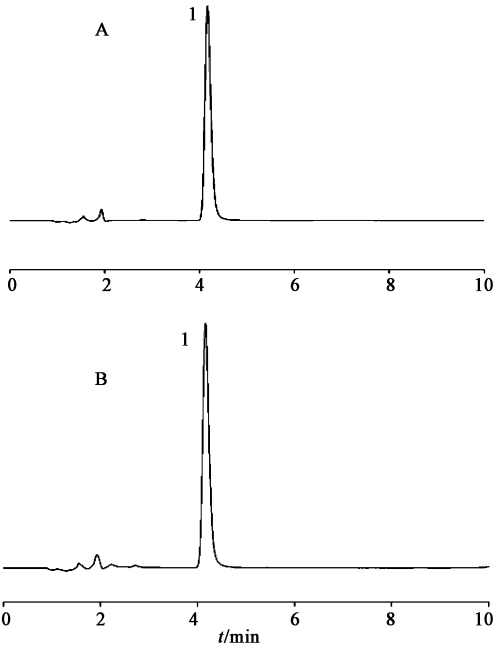
2.4.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(15:85), 柱温 25 ℃, 检测波长 238 nm, 流速 1 mL·min⁻¹。见图 1。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得 377 mg·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密量取超滤前后的溶液适量, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按比例稀释至线性范围内, 即得。

2.4.4 线性关系考察 吸取对照品储备液适量, 按等比例稀释, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样 10 μL, 按上述色谱条件测定峰面积。以栀子苷质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 11\ 207X + 9.69$ ($r = 0.999\ 9$), 表明栀子苷在 11.78 ~ 377 mg·L⁻¹ 线性良好。

2.4.5 精密度和稳定性试验 精密吸取同一对照



A. 对照品;B. 供试品;1. 栀子苷

图 1 栀子超滤液 HPLC

品溶液,重复测定 6 次,测定栀子苷峰面积,结果 RSD 1.79%,说明仪器精密度良好。取供试品溶液适量,于 10 h 内稳定每间隔 2 h 测定 1 次,结果 RSD 0.15%,表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.4.6 重复性试验 精密称取栀子苷 6 份(批号 090412),重复测定,结果栀子苷平均质量分数 92.95%,RSD 0.54%。

2.4.7 回收率试验 精密称取 9 份已知含量的栀子苷适量,分别加入一定量栀子苷对照品,按供试品溶液的制备方法进行制备,测定栀子苷含量,计算回收率,结果平均回收率 98.15%,RSD 0.91%。

2.4.8 样品测定 取超滤前、后栀子苷溶液,按适当倍数稀释,分别按色谱条件进样 10 μL,测定,计算栀子苷含量,结果见表 1。

表 1 不同孔径超滤膜去除栀子苷热原的效果

膜孔径 /kDa	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹		去效率 /%	栀子苷 损失率/%
	超滤原液	超滤液		
30	46.73	1.15	97.53	30.32
50	49.46	1.32	97.33	16.88
100	46.78	1.43	96.94	5.23

由表 1 可知,3 种孔径的超滤膜均能很好地去

除栀子苷中的热原,其中 30,50 kDa 超滤膜对栀子苷影响较大,100 kDa 的影响较小,综合考虑,100 kDa 超滤膜去除栀子苷药液中热原的效果最佳,达到预期要求。

3 讨论

超滤膜一般分为板框式(板式)、中空纤维、管式、卷式等多种结构,本实验使用中空纤维膜用于注射剂除热原处理^[4-5],结果不同孔径滤膜均能达到除去热原的目的。同时考虑到尽量减少成分损失,故选择 100 kDa 超滤膜为最佳。动态鲎试剂浊度法是常用的热原检测方法^[6-7],但易引起假阳性结果,必须进行方法学验证。

中药注射剂的优点在于药效迅速,适于抢救危重病症之用,是中医治疗急症必不可少的剂型,也是中药现代化不可缺少的剂型,但目前存在很多技术难题,其中热原问题及其他大分子杂质是引起不良反应的主要因素,通过超滤法,既能除去原料中热原,又能起到精制作用,这将是今后注射液的发展方向。

[参考文献]

[1] 李森,徐玉玲,宋娟,等.热毒宁注射液生产过程中关键工序对细菌内毒素去除效果研究[J].中国中药杂志,2011,36(6):663.

[2] 尹楠,李红阳,彭国平,等.超滤法去除中药注射液中的细菌内毒素[J].中国医药工业杂志,2008,39(12):927.

[3] 曹春雨,刘婷,郭静,等.显色基质法检测 6 种中药注射液内毒素含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):88.

[4] 潘晓鸥,李健,宋毅,等.超滤法在中药分离、纯化工艺中的应用进展[J].华西医学,2004,19(2):351.

[5] 李印秋,马玉奎.超滤和活性炭在注射剂生产工艺中的应用比较[J].齐鲁药事,2008,27(10):690.

[6] 郝然,刘婷,易艳.动态浊度法检测 5 种中药注射液的内毒素含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):120.

[7] 王莉,张红宇,赵祎,等.左卡尼汀注射液细菌内毒素检查法研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):50.

[责任编辑 仝燕]