

超滤法去除生脉注射液中细菌内毒素的应用分析

支兴蕾, 李存玉, 陈颖, 彭国平*
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:考察超滤技术应用于去除生脉注射液中细菌内毒素的可行性,为该制剂的临床用药安全提供参考。方法:采用不同材质和截留相对分子质量的超滤膜对生脉药液中间体进行超滤,利用HPLC和动态浊度法分别检测超滤前后药液中有有效成分(人参皂苷Rg₁, Re, Rb₁及五味子醇甲)和细菌内毒素含量的变化,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 0~10% A; 30~40 min, 10%~23% A; 40~50 min, 23% A; 50~85 min, 23%~60% A; 85~95 min, 60%~100% A),检测波长203 nm,优选生脉注射液的超滤工艺。结果:经不同孔径、材质的超滤膜超滤后,生脉药液中间体各有效成分的透过率存在明显差异;100 kDa复合材质超滤膜对各有效成分的透过率均>99%,对细菌内毒素去除率达97.79%,明显优于相同孔径的聚醚砜超滤膜。结论:使用100 kDa复合材质超滤膜超滤生脉注射液的适用性良好,超滤技术在保证有效成分透过率的同时可有效去除细菌内毒素,为生脉注射液制备工艺的改进提供实验依据。

[关键词] 生脉注射液; 细菌内毒素; 超滤; 人参皂苷类成分; 五味子醇甲

[中图分类号] R283.6; R284.1; R286.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230021

Research on Application of Removing Bacterial Endotoxin in Shengmai Injections by Ultrafiltration

ZHI Xing-lei, LI Cun-yu, CHEN Ying, PENG Guo-ping*

(Schol of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[收稿日期] 20140505(013)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(12KJB360009)

[第一作者] 支兴蕾, 讲师, 博士, 从事中药化学分析研究, Tel:13601588491, E-mail:12317231@qq.com

[通讯作者] * 彭国平, 研究员, 博士, 从事中药化学研究, Tel:02586798186, E-mail:guopingpeng@sohu.com

- [16] Xie W H, Zhu W P, Shen Z Q. Synthesis, isothermal crystallization and micellization of mPEG-PCL diblock copolymers catalyzed by yttrium complex[J]. Polymer, 2007, 48(23):6791.
- [17] Lee H, Zeng F Q, Dunne M, et al. Methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(delta-valerolactone) copolymer micelles for formulation of hydrophobic drugs[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(6):3119.
- [18] 王孝平, 刑树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3):40.
- [19] Gu C H, Le V, Lang M D, et al. Preparation of polysaccharide derivates chitosan-graft-poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery[J]. Colloid Surface B, 2014, 116:745.
- [20] Wang Y J, Chien Y C, Wu C H, et al. Magnolol-loaded core-shell hydrogel nanoparticles: drug release, intracellular uptake, and controlled cytotoxicity for the innibition of migration of vascular smooth muscle cells[J]. Mol Pharm, 2011, 8(6):2339.
- [21] Dong P W, Wang X H, Gu Y C, et al. Self-assembled biodegradable micelles based on star-shaped PCL-b-PEG copolymers for chemotherapeutic drug delivery[J]. Colloid Surface A, 2010, 358(1/3):128.
- [22] 朱亚明, 张琰, 刘子路, 等. MePEG-b-PCL-b-PDMAEMA的可控合成及性能研究[J]. 化学学报, 2010, 68(23):2449.
- [23] Liu G J, Ma S, Li S, et al. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes[J]. Biomaterials, 2010, 31(29):7575.

[责任编辑 刘德文]

[Abstract] Objective: To investigate feasibility of ultrafiltration technique for applicability on removal of bacterial endotoxins in Shengmai injections and provide a reference for clinical medication safety of this preparation. **Method:** Shengmai intermediates was ultrafiltered by ultrafiltration membranes with different materials and relative molecular weight cut off. In order to optimize ultrafiltration process, kinetic-turbidimetric method was used to determine the content of bacterial endotoxins in Shengmai intermediates before and after using ultrafiltration; change of contents of active components was examined by HPLC, taking ginsenoside R_{g1}, Re, Rb₁ and schisandrin as mark components, mobile phase was acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-30 min, 0-10% A; 30-40 min, 10% -23% A; 40-50 min, 23% A; 50-85 min, 23% -60% A; 85-95 min, 60% -100% A), detection wavelength was 203 nm. **Result:** Through ultrafiltration membranes with different apertures and materials, transmittance of Shengmai intermediates showed obvious differences. Transmittance of active components were above 99% and removal rate of endotoxins was 97.79% after 100 kDa composite ultrafiltration membrane, which were better than that of the same aperture of polyether sulfone ultrafiltration membranes. **Conclusion:** Applicability of ultrafiltration for Shengmai injections is good using 100 kDa composite ultrafiltration membrane. Ultrafiltration technique can be used to remove bacterial endotoxins with high recovery rate of active components in Shengmai intermediates, thus providing experimental basis for production improvement of this preparation.

[Key words] Shengmai injections; bacterial endotoxins; ultrafiltration; ginsenosides; schisandrin

生脉注射液是生脉散经过剂型改革而制成的一种灭菌水溶液,由红参、麦冬、五味子组成,具有益气生脉、扶正固脱的作用,可稳定血压,增加心肌收缩力,临床用于治疗心血管系统和内分泌疾病的效果良好^[1-2]。在国家食品药品监督管理局国家药品标准(WS₃-B-2865-98-2011)中^[3],现有生脉注射液的制备方法是对人参、麦冬、五味子分别进行提取后合并药液,由于在药液合并过程中易引入细菌污染,故采用了传统的活性炭法吸附药液中热原,但对该法对内毒素的去除率无法保证,且存在药效成分被吸附的问题^[4-5]。超滤是一种以压力为驱动力,根据物质相对分子质量来进行分离的膜过滤技术^[6]。超滤技术过程简单、无相变、节能、高效、无二次污染、无需高温或其他化学方法,且分离效果好,尤其适用于改善中药注射液的质量、稳定性和安全性^[7-8],该法还是一种较理想的除热原方法^[9]。故本实验利用复合和聚醚砜材质超滤-膜考察生脉注射液的超滤适用性^[10],在保证有效成分超滤前后含量不受影响的基础上,考察其去除细菌内毒素的效果,为该制剂的工业生产提供参考。

1 材料

BET-72M 型细菌内毒素测定仪和 FZQ-2 型涡旋混合器(天津市天大天发科技有限公司),XX814V230 型蠕动泵(美国 Millipore 公司),1100 系列高效液相色谱仪(G1311A 型泵,HT-230A 型柱温箱,美国安捷伦公司)。

复合材质超滤膜(聚醚砜与聚偏氟乙烯复合,截留相对分子质量 10,30,100 kDa,南京拓鈺医药科技有限公司),卷式超滤膜(聚醚砜,截留相对分子质量 10,30,100 kDa,浙江润达环保科技有限公司)。红参、麦冬、五味子购自安徽亳州药材市场,经本校中药资源与鉴定教研室吴德康教授鉴定均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;人参皂苷 R_{g1},Rb₁,五味子醇甲及细菌内毒素工作对照品(规格 160 EU·Amp⁻¹)(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110704-200918,110703-201026,110857-200906,150601-201174),人参皂苷 Re 对照品(批号 070319,上海融禾医药科技发展有限公司),细菌内毒素检查用水(规格 5 mL·Amp⁻¹)、动态浊度法鲎试剂(灵敏度 0.03 EU·mL⁻¹,规格 0.6 mL·Amp⁻¹)均购自湛江博康海洋生物有限公司,乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 生脉药液中间体的制备 参照《国家药品标准》(WS₃-B-2865-98-2011)及其修订件(ZGB2011-48)中生脉注射液的制备工艺。称取红参 100 g,麦冬 312 g,五味子 156 g,采用乙醇回流法提取红参,水蒸气蒸馏法分别提取麦冬和五味子,合并得生脉药液中间体 1 L(每 10 mL 约相当于红参 1 g,麦冬 3 g,五味子 1.5 g)。

2.2 生脉药液中间体的超滤 取一定量生脉药液中间体,调节 pH 7.5^[3],置于已用水处理过的超滤

系统中,分别经截留相对分子质量 10,30,100 kDa 的复合材质和聚醚砜超滤膜超滤,超滤循环平衡 60 min,待超滤完全后取样,计算人参皂苷 R_{g_1} , Re, R_{b_1} 和五味子醇甲的回收率 (R);以动态浊度法定量检测超滤前后细菌内毒素的含量,计算药液中细菌内毒素的去除率 (Q)。

$$R = A_{\text{滤}}/A_{\text{原}} \times 100\%$$

$$Q = (C_{\text{原}} - C_{\text{滤}})/C_{\text{原}} \times 100\%$$

式中 $A_{\text{滤}}$ 为超滤液中各有效成分的峰面积, $A_{\text{原}}$ 为原药液中各有效成分的峰面积, $C_{\text{滤}}$ 为超滤液中细菌内毒素含量, $C_{\text{原}}$ 为原药液中细菌内毒素含量。

2.3 有效成分的含量测定

2.3.1 色谱条件^[11] Waters symmetry shield™ RP₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 0~10% A; 30~40 min, 10%~23% A; 40~50 min, 23% A; 50~85 min, 23%~60% A; 85~95 min, 60%~100% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_{g_1} , Re, R_{b_1} 和五味子醇甲对照品适量, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 0.10, 0.08, 0.20, 0.02 g·L⁻¹ 的混合溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取生脉药液中间体每次超滤前原液和超滤后滤液适量作为供试品溶液, 待测。

2.4 细菌内毒素的检查

2.4.1 限值^[12] 生脉注射液成人的最大用量 60 mL·h⁻¹, 人均体重按 60 kg 计, 即最大剂量 (M) 1 mL·kg⁻¹, 人体致热阈值 (K) 5.0 EU·kg⁻¹, 按 K/M 计算生脉注射液的细菌内毒素最大限值 (L) 5.0 EU·mL⁻¹。

2.4.2 标准曲线制作 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, 配成细菌内毒素浓度为 2, 0.5, 0.125, 0.031 25 EU·mL⁻¹ 的系列溶液, 各精密量取 0.1 mL, 分别加至预先盛有鲎试剂 0.1 mL 的反应管内, 混合均匀, 插入细菌内毒素定量检测仪内进行检测 ($n=3$), 同时作阴性对照 3 管, 以浓度 (C) 为横坐标, 反应时间的对数为纵坐标, 按最小二乘法进行统计分析, 得标准曲线 $\log t = 2.987 - 0.316 \log C$ ($r = -0.9927$), 细菌内毒素浓度在 0.031 25 ~ 2 EU·mL⁻¹ 时, 反应时间 840 ~ 335 7 s, 而阴性对照管的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间, 故标准曲线成立。

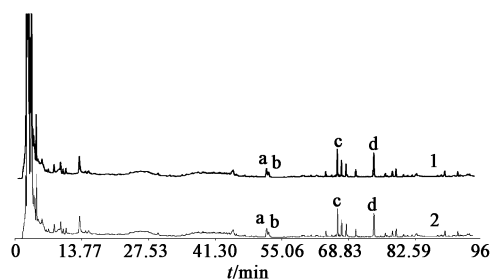
2.4.3 干扰试验 按最大有效稀释倍数 (MVD) = $L \cdot C \cdot \lambda_1^{-1}$ 计算, 其中 λ_1 为标准曲线的最低浓度 0.031 25 EU·mL⁻¹, 得样品试验时 MVD 约 160 倍。分别将各样品药液用细菌内毒素检查用水稀释 20, 40, 80, 160 倍, 作为供试液 (NPC); 分别将稀释液配成含细菌内毒素对照品 0.5 EU·mL⁻¹ 的阳性对照溶液 (PPC)。取上述溶液各 0.1 mL 加至预先盛有鲎试剂 0.1 mL 的反应管内, 混匀, 检测 ($n=2$), 按 $R = (C_{\text{PPC}} - C_{\text{NPC}})/\lambda_m \times 100\%$ 计算, λ_m 为标准曲线中点或一个靠近中点的细菌内毒素浓度, 即 0.5 EU·mL⁻¹。当细菌内毒素回收率在 50% ~ 200%, 则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用, 计算回收率分别为 36%, 84%, 103%, 175%, 取平均回收率 50% ~ 200% 且更接近于 100% 的稀释倍数时所测细菌内毒素质量浓度作为样品中内毒素含量, 故选择稀释数 80 倍。

2.5 有效成分透过率的测定 生脉药液中间体经 2 种材质超滤膜 (截留相对分子质量 10, 30, 100 kDa) 超滤后, 各有效成分透过率见表 1。结果显示复合材质超滤膜优于聚醚砜超滤膜, 随着膜孔径的增大, 各有效成分透过率均有相应提升; 而当 2 种材质的膜孔径达 100 kDa 时, 各有效成分透过率均 > 90%, 且 3 种有效成分全部能透过 100 kDa 的复合材质超滤膜。经 HPLC 检测, 对比 100 kDa 复合材质膜超滤药液前后色谱图中各有效成分的峰面积, 见图 1, 说明 4 种成分几乎无损失。

表 1 不同超滤膜对生脉药液中间体中有效成分透过率的影响

膜材质	截留相对分子质量 /kDa	透过率/%			
		人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 Re	人参皂苷 R_{b_1}	五味子醇甲
复合	10	48.01	46.67	35.78	95.24
	30	85.93	75.14	65.62	98.60
	100	100.34	99.95	99.81	101.29
聚醚砜	10	38.36	35.92	27.77	92.13
	30	76.90	55.37	52.18	95.41
	100	97.21	95.18	94.64	100.02

2.6 细菌内毒素去除效果考察 生脉药液中间体经 2 种材质超滤膜超滤前后细菌内毒素的含量变化见表 2。结果显示原药液经不同截留相对分子质量超滤膜超滤后, 内毒素含量均明显降低; 相同孔径的超滤膜对细菌内毒素的去除率复合材质明显高于聚醚砜材质, 经 100 kDa 超滤膜超滤后药液中内毒素



1. 超滤前药液;2. 超滤后药液;a. 人参皂苷 R_{g1};
b. 人参皂苷 Re;c. 人参皂苷 R_{b1};d. 五味子醇甲

图 1 生脉药液中间体经 100 kDa 复合材质膜超滤前后 HPLC 比较

表 2 不同材质超滤膜对生脉药液中间体中
细菌内毒素的去除效果

膜材质	截留相对分子 质量/kDa	细菌内毒素/EU·mL ⁻¹		去除率 /%
		原液	超滤液	
复合	10	46.27	0.037	99.92
	30	46.27	0.865	98.13
	100	46.27	1.022	97.79
聚醚砜	10	46.27	0.376	99.19
	30	46.27	5.172	88.82
	100	46.27	22.98	50.33

注:原药中细菌内毒素浓度 46.27 EU·mL⁻¹。

含量远低于临床上生脉注射液中内毒素的限值 5.0 EU·mL⁻¹。

3 讨论

现有生脉注射液制备工艺中通过合并复方药液并采用传统活性炭法去除热原,针对该方法的弊端,本文通过比较复合和聚醚砜 2 种材质超滤膜超滤生脉药液中间体的效果,结果发现采用截留相对分子质量 100 kDa 的复合材质超滤膜进行超滤时,人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 和五味子醇甲几乎无损失,同时还能有效去除药液中细菌内毒素,满足临床限量要求。说明超滤技术在保证生脉注射液有效成分透过

率的同时,与活性炭去除热原相比,不仅消除了竞争吸附和吸附饱和等问题,还在很大程度上保障了注射剂的安全性,为生脉注射液的制备工艺提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 冯立红,朱立勤.生脉注射液在心脑血管疾病中的药理研究及临床应用[J].天津药学,2013,25(5):59.
- [2] 周忠宏,公为亮.生脉注射液临床应用概况[J].时珍国医国药,1999,10(5):386.
- [3] 国家食品药品监督管理总局.国家药品标准[S].WS₃-B-2865-98-2011.
- [4] 陈前进,冯淡开.活性炭对生脉注射液人参皂苷 Re 的吸附作用[J].基层中药杂志,2002,16(5):23.
- [5] 张海荣,陈同坡,王黎.活性炭吸附细菌内毒素的条件[J].中国现代应用药学杂志,1998,15(6):62.
- [6] 李宏伟.超滤设备及技术在中药粉针生产中的应用[J].科技咨询导报,2007,20(2):75.
- [7] 张同星,尹楠,李红阳,等.超滤工艺对风痛宁注射液中有有效成分的影响[J].中华医药学刊,2010,28(1):2374.
- [8] 王学松.膜分离技术及其应用[M].北京:科学出版社,1994:83.
- [9] 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.
- [10] 陈伟,张鹏,彭国平,等.不同孔径超滤膜对栀子苷热原去除工艺的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):11.
- [11] 国家食品药品监督管理总局.国家药品标准(修订)颁布件[S].ZGB2011-48.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录 89.

[责任编辑 刘德文]