

# 温度、pH 对甘草酸溶液中内毒素团聚状态的影响

李贺敏<sup>1</sup>, 李存玉<sup>1</sup>, 彭国平<sup>1\*</sup>, 郑云枫<sup>1</sup>, 李贺莱<sup>2</sup>, 陆洪波<sup>3</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 中国人民解放军 61769 部队, 山西 文水 041000;  
3. 南京市梅山钢铁有限公司热轧厂, 南京 210039)

**[摘要]** 目的: 考察温度及 pH 对甘草酸溶液中内毒素团聚状态的影响。方法: 采用 30 kDa Millipore 膜过滤不同温度及 pH 条件下甘草酸溶液, 通过动态浊度法测定超滤液中内毒素活性浓度, HPLC 检测超滤前后有效成分的变化, 利用内毒素纳米粒径仪测定不同温度及 pH 条件下内毒素团聚状态的粒径分布。结果: 温度 60 ℃, pH 4 时, 内毒素团聚状态的粒径分布和去除率均最大, 甘草酸溶液经 30 kDa Millipore 膜超滤前后有效成分含量 > 98%。结论: 随温度的升高, 甘草酸溶液中内毒素团聚状态的粒径分布变大, 而随 pH 的增大则变小。

**[关键词]** 温度; pH; 内毒素; 超滤; 团聚状态; 甘草酸

**[中图分类号]** R283.6; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0020-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013180020

## Effects of Temperature and pH on Agglomeration State of Endotoxin in Glycyrrhizic Acid Solution

LI He-min<sup>1</sup>, LI Cun-yu<sup>1</sup>, PENG Guo-ping<sup>1\*</sup>, ZHENG Yun-feng<sup>1</sup>, LI He-lai<sup>2</sup>, LU Hong-bo<sup>3</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;  
2. The Chinese People's Liberation Army 61769 Army, Wenshui 041000, China;  
3. Hot Rolling Plant of Meishan Iron Steel Co. Ltd, Nanjing 210039, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of temperature and pH on agglomeration state of endotoxin in glycyrrhizic acid solution. **Method:** Under different temperature and pH conditions, glycyrrhizic acid solution was filtered with 30 kDa Millipore membrane, the concentration of Endotoxin in ultrafiltrate was determined by dynamic turbidity method, contents change of active components was examined by HPLC, particle size of agglomeration state of endotoxin was determined with nanometer particle size instrument under different temperature and pH conditions. **Result:** When temperature was 60 ℃ and pH was 4, particle size distribution and removal of endotoxin agglomeration state were optimal. The contents of active components in glycyrrhizic acid solution was above 98% after filtering by 30 kDa Millipore membrane. **Conclusion:** With increasing of temperature, particle size distribution and removal of endotoxin agglomeration state increased, but when pH increased from 4 to 10, particle size and removal decreased.

**[Key words]** temperature; pH; endotoxin; ultrafiltration; agglomeration state; glycyrrhizic acid

热原反应是中药注射剂最常见的不良反应之一<sup>[1-2]</sup>。热原又称为内毒素<sup>[3]</sup>, 主要为革兰氏阴性菌产生的致热性物质, 其活性相对稳定, 高温不易失

活<sup>[4]</sup>。内毒素相对分子质量为几千至几万不等, 结构中含有亲水性多糖和疏水性长链脂肪酸, 性质类似于非离子型表面活性剂<sup>[5]</sup>, 在水溶液中易形成胶团状缔

**[收稿日期]** 20130331(014)

**[基金项目]** 江苏省优势学科建设工程中药学一级学科建设开放基金项目(2011ZYX3-008); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ11-0793)

**[第一作者]** 李贺敏, 硕士, 讲师, 从事中药及其制剂有效成分的研究, Tel: 025-86798186, E-mail: lihemins2006@sina.com

**[通讯作者]** \* 彭国平, 博士, 研究员, 从事中药及其制剂有效成分的研究, Tel: 025-86798186, E-mail: guopingpeng@sohu.com

合物,缔合物相对分子质量可达几百万,与溶液的温度<sup>[6]</sup>、pH等因素存在相关性。目前温度和pH对内毒素团聚状态的影响规律尚未明确,因此溶液中内毒素去除条件的选择存在一定盲目性。本实验选择甘草酸溶液为研究对象,通过超滤法及内毒素纳米粒径分析仪考察温度、pH等对内毒素粒径的影响,为甘草酸二胺注射剂除热原工艺研究提供参考。

## 1 材料

BET-16M型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司), Millipore型聚砜膜(PS,截留相对分子质量50 kDa,美国Millipore公司), FZQ-2型涡轮混合仪(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), CN-11型内毒素溶液在线纳米粒度分析仪(成都精新粉体测试设备有限公司), Agilent 1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 准阴汉邦科技公司)。

动态浊度法鲎试剂( $\lambda = 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格0.6 mL·Amp<sup>-1</sup>, 湛江博康海洋生物有限公司), 细菌内毒素工作对照品(批号2000-9, 规格50 EU·Amp<sup>-1</sup>, 中国食品药品检定研究院), 细菌内毒素检查用水(规格5 mL·Amp<sup>-1</sup>, 湛江博康海洋生物有限公司), 甘草酸原料(南京泽朗药液有限公司, 纯度>95%, 批号20120405), 甘草酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号110731-200614), 乙腈为色谱醇, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。所有玻璃器材经洗液浸泡清洗干净后干燥箱干燥, 用锡纸包好放入灭菌箱250℃灭菌2h, 除去热原。

## 2 方法与结果

**2.1 药液的配制** 取甘草酸苷原料适量, 用水配成10 g·L<sup>-1</sup>的药液, 通过外加内毒素, 使其质量浓度约60 EU·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 内毒素的检测<sup>[7]</sup>

**2.2.1 动态浊度法** 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, 配成内毒素质量浓度分别为2, 0.5, 0.125, 0.031 25 EU·mL<sup>-1</sup>的系列对照品溶液, 各取0.1 mL分别加至预先盛有鲎试剂溶液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2管, 结果见表1。

以细菌内毒素质量浓度为横坐标, 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 $\log t = 3.20297 - 0.21718 \log C$  ( $r = -0.9996$ ), 表明内毒素质量浓度在0.031 25 ~ 2 EU·mL<sup>-1</sup>, 反

表1 动态浊度法测定内毒素含量标准曲线的可靠性试验

样品	外加内毒素 /EU·mL <sup>-1</sup>	反应时间 /s	变异系数 /%	实测内毒素 /EU·mL <sup>-1</sup>
阴性对照	-	>4 370		
	-	>4 370		
	-	>4 370		
内毒素对照品	2.0	1 348	1.03	2.0667
	2.0	1 365		
	2.0	1 376		
	0.5	1 888	2.53	0.489 8
	0.5	1 893		
	0.5	1 809		
	0.125	2 492	1.85	0.118 1
	0.125	2 586		
	0.125	2 536		
	0.031 25	3 595	6.22	0.032 7
0.031 25	3 222			
0.031 25	3 246			

应时间在1 348 ~ 3 595 s时, 阴性对照管的反应时间大于标准曲线最低质量浓度的反应时间, 故标准曲线成立。

**2.2.2 干扰试验** 分别将各样品药液用细菌内毒素检查用水稀释一定倍数, 作为供试液(NPC), 同时分别将各稀释液配成含内毒素对照品0.5 EU·mL<sup>-1</sup>的溶液, 作为阳性对照(PPC)。分别取上述溶液0.1 mL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( $n = 2$ ), 计算回收率。

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

式中 $C_{\text{PPC}}$ 为样品阳性对照液中细菌内毒素含量,  $C_{\text{NPC}}$ 为样品液中细菌内毒素的含量,  $\lambda m$ 为标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素质量浓度0.5 EU·mL<sup>-1</sup>。当细菌内毒素的回收率在50% ~ 200%, 则认为此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。取平均回收率50% ~ 200%, 且更接近于100%的稀释倍数时所测的内毒素值作为样品中内毒素含量。

### 2.3 样品检测<sup>[8]</sup>

**2.3.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱, 流动相甲醇-0.2 mol·L<sup>-1</sup>乙酸胺-冰乙酸(67:33:1), 检测波长250 nm, 进样量5 μL, 流速1 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取甘草酸对照品适量, 加甲醇制成0.53 g·L<sup>-1</sup>的溶液, 即得。

**2.4 微粒粒径检测<sup>[9]</sup>** 取配制好的10 g·L<sup>-1</sup>甘草酸药液, 内毒素活性浓度约60 EU·mL<sup>-1</sup>, 用纳米粒度分析仪检测, 室温下甘草酸药液中内毒素的粒径分布见图1。

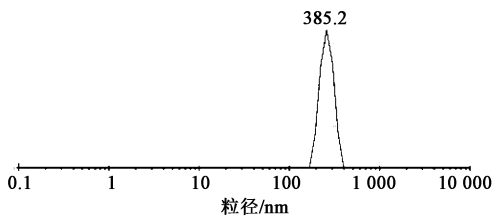


图 1 甘草酸药液中内毒素粒径分布

### 2.5 单因素试验考察<sup>[10]</sup>

**2.5.1 温度** 取配置好的甘草酸药液,分别于 10, 20, 30, 40, 50, 60 °C 时经 30 kDa 的 Millipore 超滤膜超滤,平衡循环 4 倍药液体积时,取超滤液,采用动态浊度法定量检测,结果原液及不同温度下超滤后细菌内毒素活性浓度分别为 60.31, 14.96, 14.05, 11.76, 10.19, 6.51, 4.34 EU·mL<sup>-1</sup>。计算药液中细菌内毒素去除率与粒径分布,见图 2,说明内毒素的粒径和去除率随温度的升高呈现增大趋势,与超滤法检测结果一致。测定不同温度下甘草酸透过率分别为 98.6%, 99.7%, 98.2%, 98.9%, 98.4%, 99.1%,说明温度对甘草酸药液的透过率影响不大。

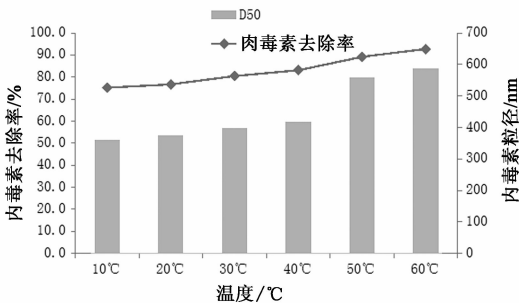


图 2 不同温度下甘草酸药液中细菌内毒素的去除率及内毒素的粒径分布(D50 表示平均粒径,图 3 同)

**2.5.2 pH** 取配置好的甘草酸药液,分别调节 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 经 30 kDa 的 Millipore 超滤膜超滤,平衡循环 4 倍药液体积时,取超滤液,测定内毒素活性浓度分别为 12.32, 12.68, 12.91, 13.55, 18.71, 21.95, 29.37 EU·mL<sup>-1</sup>。内毒素去除率及粒径分布见图 3,表明 pH 越大,内毒素粒径越小,去除率越差。测定不同温度下甘草酸透过率分别为 98.9%, 98.7%, 98.2%, 98.2%, 99.9%, 99.3%, 99.6%,说明 pH 对甘草酸药液中有效成分的透过率无明显影响,碱性条件下甘草酸的透过率略大。

### 3 讨论

随温度的升高,超滤液中内毒素活性浓度呈减小趋势,去除率和粒径呈增大趋势。原因可能是由于温度的升高,内毒素的布朗运动加剧,有利于内毒素分子聚集成胶团,粒径增大,致使超滤液中内毒素

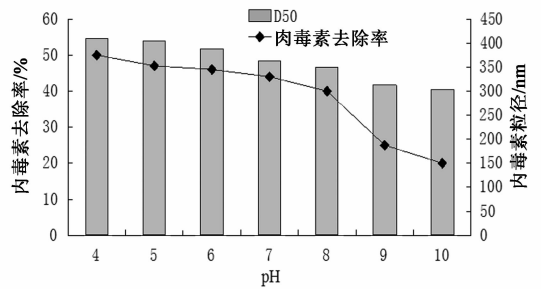


图 3 不同 pH 下甘草酸药液中细菌内毒素的去除率和粒径分布  
活性浓度降低;同时温度升高削弱了内毒素结构中亲水基的水化层,有利于内毒素胶团的形成,从而粒径增大,内毒素去除率升高。

酸性条件下甘草酸超滤液中内毒素去除率和粒径均大于碱性条件下。可能是由于内毒素性质类似于非离子型表面活性剂,酸性和中性条件下内毒素易团聚,故粒径增大;碱性条件下内毒素结构链端的磷酸根易以离子形式存在,分子间彼此排斥,致使内毒素不易团聚,粒径减小。碱性条件下甘草酸透过率较高主要是因为碱性条件下甘草酸易成盐,成分水溶性增大,成分的超滤行为也相应得到改善。

### [参考文献]

- [1] 周述香,张勇,张宇靖,等. 中药注射剂不良反应报表 175 份分析[J]. 中医药导报, 2006, 12(11): 68.
- [2] 王彩霞,王利霞. 从 8 例热原反应谈中药注射剂的质量问题[J]. 中国药业, 2000, 9(11): 49.
- [3] 李存玉,郑云枫,李红阳,等. 细菌内毒素定量法研究活性炭与超滤法热原去除工艺[J]. 医药导报, 2010, 29(2): 142.
- [4] 楼福乐,毛伟钢,陆晓峰,等. 超滤技术在制药工业中除热原的应用[J]. 膜科学与技术, 1999, 19(3): 8.
- [5] 罗漾. 超滤技术在狂犬病疫苗生产中除内毒素的应用[J]. 中国药业, 2008, 17(16): 51.
- [6] Mueller K. Removal of pyrogen by steam-sterilizable ultrafiltration membrane [J]. Int Chim, 1989, 302(3): 147.
- [7] 尹楠,李红阳,彭国平,等. 超滤法去除中药注射液中细菌内毒素[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(12): 927.
- [8] 徐浩坤,李存玉,彭国平,等. 基于超滤技术的甘草酸二铵注射液工艺研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2011, 13(7): 76.
- [9] 李贺敏,郑云枫,支兴蕾,等. 活血通络注射剂活性炭法与超滤法工艺比较[J]. 中药材, 2012, 35(12): 2012.
- [10] 李贺敏,彭国平,郑云枫,等. 不同材质及不同截留分子量超滤膜对三七总皂苷热原去除及成分的影响[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1943.

[责任编辑 全燕]