

用量为处方-乳糖 (1:10 g/g)。

3.2 本实验得到的紫草红素自微乳粒径约为150 nm, 粒径较大。但通过静置2个月来初步观察其稳定性, 结果本释药系统均一稳定, 未出现分层、沉淀现象, 说明虽然粒径超过100 nm, 但其稳定性较好。这可能是由于中药成分复杂, 在微乳形成过程中不同成分会共同参与形成微乳结构, 从而导致粒径偏大, 但由于乳化剂的存在, 影响微乳稳定性的界面张力并未增大, 因此其稳定性也可达到预期目标。

3.3 本实验对蔗糖和乳糖作为紫草红素自乳化固体颗粒吸附剂进行了比较, 乳糖吸附效果比较理想, 对自微乳液的粒径影响不大。但固体吸附剂用量较大, 其载药量受到限制, 随着近年来新型脂质辅料和制药技术的发展, 更多更好的固体自乳化技术不断涌现^[10-12], 今后可考虑对紫草红素自微乳的固体化技术进行进一步研究, 以制备性质稳定, 使用方便的固体自乳化剂。

本实验对紫草素进行精制得到紫草红素, 优选出了紫草红素自乳化系统的处方, 粒径考察和稳定性考察结果表明本制剂粒径均一, 符合自乳化要求, 且稳定性良好, 制备成固体颗粒载药量符合一般要求。

参考文献:

[1] Gursoy R N, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems

(SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(3): 173-182.

- [2] 凌 婧, 孙明辉, 翟雪珍, 等. 自(微)乳化制剂的固体化技术[J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(4): 245-248.
- [3] 袁海建, 陈 彦, 贾晓斌. 中药自乳化药物传递系统的研究与应用[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(6): 524-527.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 320.
- [5] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1973: 732.
- [6] 连文元, 李 悦, 王新春, 等. 微乳对左旋紫草素增溶作用的实验研究[J]. *中成药*, 2010, 32(5): 879-881.
- [7] 齐雪萍, 桂双英, 鲁传华, 等. 汉防己甲素自微乳的研制[J]. *安徽医药*, 2010, 14(4): 399-401.
- [8] 潘国梁, 贾晓斌, 魏惠华, 等. 药用微乳伪三元相图的几种制备方法比较研究[J]. *中国药房*, 2006, 17(1).
- [9] 陈小新, 原 素, 谢称石, 等. 葛根素自微乳给药系统的制备及其质量评价[J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1512-1516.
- [10] Balakrishnan P, Lee B T, Oh B H, et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) [J]. *Eur J Pharm*, 2009, 72(3): 539-545.
- [11] Yi T, Wan J L, Xu H B, et al. A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(2): 439-444.
- [12] Ito Y, Kusawake T, Ishida M, et al. Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent [J]. *J Controlled Release*, 2005, 105(12): 23-31.

总有机碳法用于复方丹参装囊滴丸清洁验证的可行性研究

周庆凯^{1,2}, 孙 巍², 曹凤兰², 杭太俊¹

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 211198; 2. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300402)

摘要: 目的 证实总有机碳法确实可以应用于中药产品的清洁验证, 并建立总有机碳(TOC)中药产品清洁验证方法。方法 测定复方丹参装囊滴丸总有机碳量, 结合方法学验证数据与检测实例评价总有机碳法用于清洁验证的效果。结果 总有机碳法方法学验证结果符合人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)关于方法学实验的相应指导原则的(Q2B)方法学验证要求。总有机碳法与超高效液相色谱法实例对比, 检测结果更为准确。结论 总有机碳法可以用于复方丹参装囊滴丸这一中药产品的清洁验证, 并据此推论, 总有机碳法可以用于部分中药的清洁验证。

关键词: 总有机碳法; 清洁验证; 复方丹参滴丸

中图分类号: R284.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2012)11-2114-04

收稿日期: 2012-02-12

作者简介: 周庆凯(1987—), 男, 硕士生, 研究方向: 药物分析。Tel: 18722497832, E-mail: zpkepu@163.com

Study on feasibilities about total organic carbon for cleaning validation of Compound Danshen Dripping Pills

ZHOU Qing-kai^{1,2}, SUN Wei², CAO Feng-lan³, HANG Tai-jun^{1*}

(1. China Pharmaceutical University Nanjing 211198 China; 2. Tianjin Tasly Pharmaceutical Co. Ltd China Tianjin 300402 China)

KEY WORDS: total organic carbon; cleaning validation; Compound Danshen Dripping Pills

1 引言

药品的清洁验证就是对现行的清洁程序进行规定,并验证现行的清洁规程能否一如既往的达到良好的清洁效果。也就是通过对擦拭取样与淋洗取样的检测,来确定残留量,从而验证清洁方法是否能够将残留物清洁至标准值以下。

总有机碳(Total Organic Carbon,以下简称TOC法)检测方法用于纯化水和注射用水的检测早在20世纪90年代就已被美国和欧洲药典先后收录,我国在《中国药典》2005年版也对该方法进行了收录。TOC方法是通过对水中的有机物进行氧化,使有机物中的碳转化为二氧化碳,并通过检测二氧化碳的量,来计算水中有机物的量。TOC检测方法之所以能够用来检测水质,就是因为TOC法能够较为精确的确定水中的有机物是否超出标准。从而达到检测水质的目的。根据相同原理,TOC检测方法同样可以用于清洁验证。

1.1 中药产品清洁验证所面临的挑战 西药产品由于自身成分单一,毒理学数据全面,清洁验证过程相对简单,且已经形成了一套完善的标准建立方法^[1]。但对于中药产品清洁验证仍然存在挑战。

首先,中药产品成分复杂,一种中药产品往往存在着成百上千种不同的成分,其中大部分成分为痕量,想要对残留的每一种成分都进行定量是不现实的。

其次,中药缺少毒理学数据。西药复方产品清洁验证往往是选择其中活性最大或者是最难清洁的物质作为标志物,通过控制标志物的量,确定标志物的残留量低于所设立的标准,来达到控制残留,验证清洁效果的目的。但是对于中药来说,毒理学数据的缺少导致很难,甚至是无法确定清洁标志物,这就造成了我们无法完全借鉴西药清洁验证的经验。而毒理学数据的缺少也会对中药清洁验证限度的建立造成影响。

再次,对于中药来说,尤其是对于准备走出国门的中药产品来说,国外的清洁验证标准较为严

格^[2],对试验数据的要求也更高。对于植物药,中国传统中药,国外一直保持谨慎的态度,中药想要走出国门,就需要提供足够的的数据,这对中药产品来说无疑是存在困难的。而就清洁验证来言,需要提供方法的原理,可行性,限度的建立,依据等等相应数据。对于中药来说,国外严格的清洁验证标准,全面的数据需求,都对中药的清洁验证提出了挑战。

最后,目前常用的清洁验证方法不能满足中药清洁验证的需要^[3]。中药常用的清洁验证检测方法为HPLC法,UV法等^[4],UV法仅能对存在共轭基团的化合物产生响应,灵敏度低,检测存在局限性。HPLC法的灵敏度虽然较UV法高,但其仍然不能满足清洁验证痕量检测的需要,且使用HPLC检测时,由于样品中存在多种物质,可能在HPLC色谱图中出现未知杂峰,而FDA需要对未知峰进行解释,可见目前常用的检测方法对于中药产品清洁验证均存在局限性^[5]。

1.2 TOC法的优势 TOC检测法为非专属性方法,检测范围广,响应物质多^[6]。中药制剂所含成分大多为蛋白质,纤维素,糖类,生物碱类,皂苷类,挥发油类,有机酸类,鞣质等,传统的清洁验证方法如HPLC法,UV法,GC法,滴定法等,一般仅能对其中某一种或者某一类成分进行定量检测。而TOC检测法为非专属性方法,能对所有含碳的有机物产生响应值,而非某一种或者某一类物质。上述物质均为含有有机碳的有机物。TOC法通过对于总有机碳量进行限度设置,检测总有机碳量,判断其是否低于标准从而达到验证清洁效果的目的。将中药产品中所含全部有机物视为一个整体进行限量,既可以达到良好的清洁验证效果,又可以有效地回避清洁标志物无法确定,未知峰无法解释的问题。

TOC法的应用并不受限于毒理学数据。因为TOC法对有机物中的碳具有专属性,无需寻找清洁标志物,而限度的制定,也可以根据多批次样品

检测进行的数据积累而从经验角度制定。这样就解决了中药产品毒理学数据的不足所引起的问题。

TOC法具有满足痕量检测的灵敏度。它对于有机碳的灵敏度可达 1×10^{-9} ，比传统检测方法灵敏度高 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 倍，可以满足中药产品对于痕量检测的要求，而且由于是将所有有机物视为一个整体进行检测，可以较好的回避无法对每一种残留物质均进行定量的难题。

由此可见，TOC法理论上可以解决中药清洁验证所面临的难题，应该是一种比较科学，高效的清洁验证方法。

2 仪器与试剂

2.1 仪器 GE sievers 900 实验室型总有机碳分析检测仪；Waters Acquity™ UPLC 分析仪。

2.2 试剂 蔗糖对照品（中国药品生物制品检定所，批号 111507-200001）；1,4-对苯醌标准品（Dr. Enrenstorfer，批号 Cl0537000）；磷酸（天津市化学试剂三厂，批号 20090606）；碳酸钠（天津市人船化学试剂科技有限公司，批号 20050428）。

2.3 供试品 复方丹参装囊滴丸（生产厂家：天士力股份有限公司，批号：DP006002031）。

3 实验与结果

3.1 方法学验证 TOC方法也是分析检测方法，所以也要通过方法学的验证后才能应用于实际检测^[5]。人用药物注册技术要求国际协调会对于方法学实验的相应指导原则简称ICH Q2B^[7]为其提出了实验内容。笔者以复方丹参装囊滴丸为例，对TOC检测法的线性，精密度，准确度，检测限与定量限，稳定性，耐用性，残留物回收率等进行方法学验证。经过试验（仪器为GE Sievers 900 实验室型总有机碳分析检测仪），得到如下数据：

线性^[8]：使用蔗糖对照品（批号 111507-200001 中国药品生物制品检定所）适量，加入适量超纯水，溶解，定容，配置成 TOC 质量浓度约为 50 000 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液，用超纯水分别稀释适宜倍数，分别对溶液编号为 1~6，检测超纯水空白与 1~6 号溶液的 TOC 值，绘制线性散点图。

结果：超纯水空白为 84.6 $\mu\text{g/L}$ ，线性方程为 $y = 1.0071x$ ，相关系数 $r = 0.9999$ ，范围为 200 ~ 25 000 $\mu\text{g/L}$ 。

精密度：对于复方丹参装囊滴丸清洁验证样品 1 连续检测 6 次，计算 RSD，结果 RSD 为 0.466%

重复性：制作复方丹参装囊滴丸样品 6 份，编号为 1~6，依次进行总有机碳检测，计算 RSD。

结果 RSD 为 1.540%

准确度：检测 6 份复方丹参装囊滴丸样品的总有机碳浓度，加入已知总有机碳浓度的蔗糖对照品溶液，计算回收率与回收率 RSD。结果：平均回收率为 100.25%，RSD 为 2.37%

检测限与定量限：对空白超纯水溶液进行 10 次检测，计算 10 次结果的标准偏差 σ ，检测限 = $3.3 \sigma/k$ ，定量限 = $10 \sigma/k$ ， k = 线性方程的斜率。结果：空白超纯水样品标准偏差为 0.83，线性方程斜率为 1.0071，检测限为 2.72 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 8.24 $\mu\text{g/L}$ 。

稳定性：取复方丹参装囊滴丸样品，分别于 0、2、4、6、8、24 h 进行 TOC 检测。观察结果变化。结果：24 h 内检测结果未发生显著变化。

耐用性：取已知有机碳浓度的蔗糖与 1,4-对苯醌对照品，分别用磷酸及碳酸钠调节样品为 pH4，pH7，pH10，进行 TOC 检测。观察结果变化。结果：pH 的改变未对结果产生显著影响。

取样回收率^[9]：取生产设备表面相同材质钢板，面积为 10 cm × 10 cm，6 块，分别滴加 100 μL 、200 μL 、500 μL 、750 μL 、1 mL、1.5 mL 的配制好的复方丹参装囊滴丸溶液，待其自然晾干后，使用规定的 TOC 擦拭专用棉签按规定的的方法擦拭钢板表面，将棉签折断于装有 40 mL 超纯水的低 TOC 取样瓶中，将样品分别编号为 1~6。按编号顺序上样检测总有机碳质量浓度。分别取等量复方丹参装囊滴丸溶液置于装有空白擦拭棉签与 40 mL 超纯水的低 TOC 取样瓶中，上样检测总有机碳质量浓度，计算回收率。结果：擦拭回收率 65.8% ~ 73.5% RSD 为 5.2%

验证结论：TOC 检测方法各项验证结果均符合方法学验证规定^[10]，其残留物回收率证明了该取样方法对复方丹参装囊滴丸具有较好的回收率，证实了该方法可以作为复方丹参装囊滴丸的清洁验证方法。

3.2 TOC方法与UPLC方法应用于清洁验证实例的对比 目前，天津天士力股份公司复方丹参装囊滴丸的含量测定方法采用超高效液相色谱法（UPLC）方法，该方法可对复方丹参装囊滴丸中 8 个主要成分进行定量检测。其检测限根据各成分的不同最低可达 50 $\mu\text{g/L}$ ，该方法应用于定量测定可以达到很好的检测效果，但应用于清洁验证却仍存在着局限性，首先，清洁验证属于痕量检测，UPLC 方法的灵敏度仍不足以达到要求，其次，清洁验证

不仅需要检测药品的残留，还要同时关注辅料，清洁剂等其他应用于生产，清洁等过程的原料的残留。而UPLC方法因为对检测物响应的限制，无法满足以上要求。

TOC法，对有机碳的检测限可达2 μg/L，而复方丹参装囊滴丸产品中，无论是产品本身，还是辅料，清洗剂均属于有机物，使用TOC方法可以同时对所有有机碳的残留量进行检测。通过限制残

表1

20个取样点TOC方法与UPLC方法检测结果

Tab. 1 Results of cleaning validation of twenty sampling points with TOC and UPLC methods

取样点	TOC测定 / (mg · L ⁻¹)	UPLC测定	取样点	TOC测定 / (mg · L ⁻¹)	UPLC测定
1	8.19		11	1.23	
2	0.48		12	4.2	
3	1.76	未出峰	13	1.39	未出峰
4	3.7		14	7.3	
5	0.89		15	24	峰形小，难于定量
6	0.25		16	18.5	
7	0.31		17	18.6	
8	0.47	未出峰	18	20.8	峰形小，难于定量
9	1.14		19	20.8	
10	2.94		20	20.8	

由表1可见TOC方法可以准确地检测出清洁验证样品中的有机碳残余量，从而真实地反映出清洁效果。而UPLC方法由于灵敏度和检测范围的关系，无法真实地反映残余情况，由此可见，对于复方丹参装囊滴丸的清洁验证来说，TOC方法确实更科学，更准确。

4 讨论

通过以复方丹参装囊滴丸为例证实，TOC法确实可以应用于中药产品的清洁验证中，但笔者发现，TOC检测方法也有以下缺点。

TOC法对有机碳具有专属性，如果残留物中有可能存在无机活性成分，则TOC法无法对其产生响应值，这时候仍需要使用传统专属性方法，例如UPLC法，GC法等对该无机活性成分进行定量检测；TOC法对于乙醇较为敏感。中药生产中有些步骤必须使用乙醇，或者使用乙醇进行清洁，甚至整个过程都需要在乙醇中进行，使用TOC法有可能出现问题^[11]；对于一些不溶或难溶于水的中药，也不建议使用TOC法，TOC法可以准确地检测出溶解于水中的有机物的总有机碳量，但对于不溶于水中的物质，则很难反映出真实的残留情况。比如一些中药中含有的难溶于水的油性化合物。虽然也可通过擦拭取样回收，但检测时可能会出现检测结果RSD相差较大的情况^[12]。综上所述，TOC法对于水溶性中药产品，是一种科学有效的清洁验

留的有机碳的量，达到验证清洁效果，控制药品质量的作用。

以上，仅从理论上证实TOC法较UPLC法更适合作为复方丹参装囊滴丸的清洁验证方法。

通过对20个复方丹参装囊滴丸生产线清洁验证样品分别使用TOC法与UPLC法进行检测，比较检测结果，见表1。

证方法。

参考文献:

- [1] 左敏. 固体制剂生产设备的清洁验证[J]. 机电信息, 2009, 8(8): 30-33.
- [2] 陈雯秋. 清洁验证合格标准的制定[J]. 医药导报, 2005, 24(5): 452-453.
- [3] 刘华本, 陈晓平, 范愿军. 制药设备清洁验证的关键步骤[J]. 医药导报, 2009, 28(5): 681.
- [4] 黎阳. 浅谈药品生产设备清洁验证[J]. 中国药事, 2008, 22(8): 654.
- [5] 程艳. 制药企业工艺设备的清洁规程及清洁验证[J]. 中国药业, 2006, 15(9): 19-20.
- [6] 邹大光, 袁曦. 一种清洁验证新方法-TOC法[J]. 中国药事, 2002, 16(1): 19.
- [7] ICH "Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology" FDA, Rockville, MD 1996.
- [8] Herbert J K, Bruce R. Validation of analytical methods used in cleaning validation [J]. J Validat Technol, 2004, 10(3): 219.
- [9] 陈雯秋. 清洁验证中的分析方法验证[J]. 中国药业, 2005, 14(4): 17-19.
- [10] William E, Hall M. Determining appropriate acceptance criteria for cleaning programs [J]. J Valid Technol, 2004, 10(2): 120.
- [11] 罗迪, 梁毅. 总有机碳检测方法在药品清洁验证中的应用[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 6-7.
- [12] 梁毅, 蔡红波. 对中药制剂设备清洁验证的探讨[J]. 中国药房, 2005, 16(9): 651.