

试管底部少许红棕色沉淀, 杂峰数量可明显减少。新鲜尿液加入浓盐酸酸化的目的是为了防止尿液中的维生素 C 在中性和碱性的条件下转化为草酸而影响测定^[2]。

3.3 健康人尿草酸和枸橼酸含量

我国是世界上泌尿系结石的三个主要流行地区之一^[7]。尿石中, 以草酸钙结石最为多见, 草酸代谢异常所致的高草酸尿在结石形成上具有重要意义^[8]。枸橼酸是尿路结石的重要抑制因子, 枸橼酸根离子由于其特殊的空间结构, 不但能与钙离子强烈配位, 抑制草酸钙等尿石矿物的成核和生长, 还可以碱化尿液, 使酸性类结石如尿酸结石和胱氨酸结石的溶解度增加^[9]。低枸橼酸尿症的人群患尿石症的危险性是尿枸橼酸水平正常人群的 1.5 倍多^[10]。本实验建立的高效液相同时测定尿草酸和枸橼酸含量的方法无疑为尿石症病因的研究打下了良好的基础。

经测定 27 名健康人尿草酸和枸橼酸, 24h 尿草酸平均含量为 (31.00±23.40)mg(89.27~198mg); 24h 尿枸橼酸平均含量为 (402.28±323.44)mg(1218.96~25.58mg)。可见从本实验测试的小样本来看, 健康人的 24h 尿草酸和枸橼酸含量差别均可有十倍之多。

据文献报道^[8], 24h 尿草酸含量在 60mg 以上的人群有 80% 的可能产生尿路结石。本研究中, 虽然 24h 尿草酸含量的平均值趋于正常, 但含量在 60mg 以上的有 4 人, 另有两例尿草酸含量在 55~60mg, 共 6 人, 占受试人数的 22.22%。可见有产生尿路结石倾向的人群数量不可低估。

一般而言轻度至中度低枸橼酸尿多与环境因素有关, 例如, 食用过量动物性蛋白和盐、饥饿等, 此时尿中枸橼酸排泄量约为 100~320mg/d^[11]。本研究中尿枸橼酸排泄量低于 320mg/24h 的有 14 人, 占受试人数的 51.85%。值得关注的是, 3 人的 24h 尿草酸含量在 55mg 以上, 同时 24h 尿枸橼酸含量低于 320mg/d 理论上较易形成尿路结石, 占总受试人数的 11.11%。

来源于饮食肠道吸收的草酸, 虽然仅占尿草酸总来源的 15~20%, 但对尿草酸浓度变化的影响很大^[12]。因此, 提高人群健康意识, 改变饮食习惯, 控制草酸的摄入, 同时增加进食富含枸橼酸的食物已非常必要。本实验尚属小样本研究, 对国人饮食和排泄的草酸、枸橼酸的含量以及与尿路结石的

关系, 还有待深入探索。

参考文献

[1] Y N Y L, J N J ZHANG B, *et al* Unprocessed rice bran in the treatment of hypercalcaemic patients with urinary stone[J]. Chin J Urol(中华泌尿外科杂志), 1998, 19(9): 563-565

[2] ZHANG H J, ZHANG S D, REN J M, *et al* Determination of oxalate in plasma and urine by high performance liquid chromatography[J]. Acta Acad Third Mil Med Univ(第三军医大学学报), 1997, 19(1): 87-88

[3] CHEN Z Q, ZHANG X, YANG W M, *et al* Calcium Oxalate Precipitation as a Pretreatment Method for Urine in Oxalate Sclermination by Means of Ion Chromatography[J]. Acta Univ Med Tongji(同济医科大学学报), 2000, 29(6): 540-541, 544

[4] PFEIFFER K, BERG W, BONGARTZ D, *et al* The direct determination of urinary oxalate by non-suppressed ion chromatography[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1997, 35(4): 305-308.

[5] HOLMES R P. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance[J]. Clin Chem, 1995, 41(9): 1297-1301.

[6] JANUZORIC L J, PRTENJAK G. Quantitative chemical analysis of calcium oxalate and calcium oxalate phosphate urinary stones[J]. Clin Chem, 1990, 36: 1164

[7] MIH, DENG Y L. Epidemiology Study on Urolithiasis Urolithiasis[M]. Beijing: People's Medicine Press(泌尿系结石), 2003: 31-55

[8] MA T X, SUN G. Modern Urology[M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2000: 587-588.

[9] OUYANG J M. Chemical Basis in Inhibition of Urinary Stones by Citric Acid and Its Salts[J]. J Inorg Chem, 2004, 20(12): 1377-1382

[10] HE Y N, CHEN X M, XU G H, *et al* A case-control study of risk factors for urolithiasis[J]. Chongqing Med(重庆医学), 2003, 32(6): 659-660

[11] SUN X Z, GUO H Q, YE Z Q. Causation of the Urolith[J]. J Clin Urol(临床泌尿外科杂志), 2003, 18(6): 321-326

[12] WANDZAILAK T R, WILLIAMS H E. The hyperoxaluria syndrome[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1990, 19: 851-853

收稿日期: 2005-06-24

高效液相色谱法测定溃疡宁胶囊中靛蓝的含量

楼云雁¹, 田涛², 葛卫红³, 杭清⁴ (1. 杭州第四医院, 杭州 310002; 2. 成都军区联勤部成都药材供应站; 3. 浙江中医药大学; 4. 杭州市疾病预防控制中心预防保健门诊部)

摘要: 目的 为溃疡宁胶囊质量控制提供新方法。方法 色谱柱: Agilent hypersil ODS(4.6mm×250mm, 5μm); 流动相: 甲醇-水(70:30); 检测波长: 280nm; 柱温: 35℃; 流速: 1.0mL·min⁻¹。结果 靛蓝线性范围: 0.077 63~0.580 21g·mL⁻¹, 相关系数 *r* 分别为 0.999 8 回收率为 100%, RSD 为 1.24%。结论 本方法简便、可靠、重现性好, 能起到控制溃疡宁胶囊中靛蓝含量的作用。

Quantitative Determination of Indigotin in Kuiyangning Capsules by RP-HPLC

LOU Yun-yan¹, TIAN Tao², GE Weirong³, HANG Qing⁴ (1 The Fourth Hospital in Hangzhou, Hangzhou 310002 China; 2 Chengdu Military Area; 3 Zhejiang Traditional Chinese Medical College; 4 The Prevention Clinic of the Diseases Control Center in Hangzhou)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To develop an effective quality control method for Kuiyangning capsules. **METHODS** Indigotin in Kuiyangning capsules was determined by RP-HPLC, using Agilent hypersil ODS (4.6 × 250mm, 5μm) column, methanol/water (70:30) as mobile phase and UV detector was set at 280 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linearity range of indigotin was 0.07763~0.5802 μg·mL⁻¹, the average recovery was 100.1% with RSD 1.24%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and repeatable. It can be used for determination of indigotin in Kuiyangning capsules.

KEY WORDS Kuiyangning capsules; indigotin; HPLC

溃疡宁胶囊由青黛、象牙屑、蚕茧(炭)、人指甲(滑石炭)、珍珠、珍珠层粉、牛黄、冰片等组成的复方制剂,具有清热解毒、生肌止痛之功能,用于十二指肠球部溃疡,胃溃疡,糜烂性胃炎属胃热肝郁证。收载于卫生部药品标准中药成方制剂第十八册。

溃疡宁胶囊处方的君药为青黛。化学、药理研究表明,青黛有效成分为靛蓝和靛玉红,靛蓝含量较高,本研究以靛蓝为指标对溃疡宁胶囊进行定量。采用HPLC测定靛蓝含量可以有效地排除干扰,方法成熟,可靠。

1 仪器与药品

高效液相色谱仪 Waters 1515型、2487紫外检测器。

溃疡宁胶囊及其阴性样品(实验室自制)。靛蓝供含量测定用对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0716-200005);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果^[1-5]

2.1 色谱条件

参照文献青黛项下,高效液相色谱法测定样品的靛蓝含量采用的色谱条件为:Agilent hypersil ODS分析柱(4.6mm × 250mm, 5μm)流动相:甲醇-水(70:30);检测波长:280nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35℃。

2.2 系统适应性实验

按样品测定项下方法制备供试品、阴性对照品及对照品溶液,照“2.1”项下色谱条件,各进样20μL,测的HPLC图谱,图谱表明阴性空白溶液色谱没有干扰。理论板数按靛蓝峰计算,应不低于3500。

2.3 线性试验

精密称取靛蓝对照品9.67mg置250mL棕色量瓶中,加氯仿适量,超声溶解,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,即得38.68 μg/mL的靛蓝对照品溶液,精密吸取5mL靛蓝对照品溶液置250mL棕色量瓶中,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,即得0.7736 μg/mL的靛蓝对照品储备溶液。分别精密量取2, 3, 5, 10, 15mL靛蓝对照品储备溶液分别置20mL棕色量瓶中,加氯仿制成浓度为0.07763, 0.11604, 0.1934, 0.3868, 0.5802

μg/mL的靛蓝对照品溶液。分别量取各供试液20μL注入液相色谱仪,记录色谱图,将峰面积A与相应靛蓝浓度C(μg/mL)进行线性回归,得回归方程: $A = 78.818.8C + 345.4$, $r = 0.9998$,表明样品浓度在0.07763~0.5802 μg/mL范围内,靛蓝峰面积A与浓度C呈良好的线性关系。

2.4 定量限测定

精密称取靛蓝对照品9.82mg置100mL棕色量瓶中,加氯仿适量,超声溶解,并加氯仿稀释至刻度,摇匀,精密量取1mL置100mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,得0.98 μg/mL的溶液,分别精密量取5, 2mL置50mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液1[#], 2[#],精密量取1[#]中25mL置50mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液3[#],精密量取3[#]中25mL置50mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀,作为供试液4[#]。供试液1[#]~4[#](浓度分别为:0.0982, 0.0491, 0.0392, 0.02455 μg/mL)。分别量取各供试液20μL注入液相色谱仪,记录色谱图,结果浓度为0.02455 μg/mL的样品色谱讯号约为噪音的10倍,靛蓝的定量限为0.55ng。

2.5 样品提取方法考察

2.5.1 提取溶剂的考察 参照文献青黛项下的提取溶剂和靛蓝的性质选择氯仿为提取溶剂。

2.5.2 提取方法的考察 青黛药材的提取用索氏提取器进行提取,因本品为经提取加工的中成药,用索氏提取费时费力,超声提取可能更为有效方便。本试验比较两种提取方法对本品中靛蓝的提取效果,具体试验如下:取本品(批号:020301)20粒,研匀,精密称取两份,每份0.3g一份置具塞锥形瓶中,精密加入氯仿50mL,密塞,称定重量,超声处理60min,放冷至室温,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,摇匀,静置,精密吸取上清液1mL至200mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀。另一份置索氏提取器中,回流提取至无色(6h),放冷,回收溶剂至适量,转移至50mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,精密吸取上述溶液1mL溶液,至200mL棕色量瓶中,用氯仿稀释至刻度,摇匀。取上述两种

提取方法所得溶液经 0.45μm 滤膜滤过, 取续滤液, 按上述色谱条件测定, 结果索氏提取 6h 靛蓝含量为 3.22mg/粒; 超声提取 1h 为 3.30mg/粒。

试验结果表明, 索氏提取和超声提取效果相当, 但超声提取简单, 省时省力, 故选择超声提取。

2.5.3 提取时间的考察 取本品 (批号: 020301) 20 粒, 研匀, 精密称取 4 份, 每份 0.3g, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入氯仿 50mL, 密塞, 称定重量, 分别超声处理 10、20、40、60min 放冷至室温, 再称定重量, 用氯仿补足减失的重量, 摇匀, 静置, 精密吸取上清液 1mL 至 200mL 棕色量瓶中, 用氯仿稀释至刻度, 摇匀。取上述溶液经 0.45μm 滤膜滤过, 取续滤液, 按上述色谱条件测定, 结果见表 1。

表 1 提取时间考察结果

Tab 1 Comparison of various extraction time	
提取时间 /min	靛蓝 / (mg/粒)
10	0.86
20	3.28
40	3.30
60	3.28

测定结果表明, 提取 40min 效果已达到最大提取率, 故提取时间选用 40min。

2.6 溶液制备

供试品溶液的制备: 依据样品提取方法考察试验结果, 确定样品提取方法为: 取本品 20 粒, 取出内容物, 研匀, 精密称取 0.3g (约为 1 粒溃疡宁胶囊的量), 置具塞锥形瓶中, 精密加入氯仿 50mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 40min, 放冷至室温, 再称定重量, 用氯仿补足减失的重量, 摇匀, 静置, 精密吸取上清液 1mL 至 200mL 棕色量瓶中, 用氯仿稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

对照品溶液的制备: 精密称取靛蓝对照品约 10mg, 置 250mL 棕色量瓶中, 加氯仿适量, 超声溶解, 并加氯仿稀释至刻度, 摇匀; 精密吸取 2mL 靛蓝对照品溶液置 250mL 棕色量瓶中, 并加氯仿稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

阴性供试品溶液的制备: 按溃疡宁胶囊制备方法制得缺青黛药材的阴性样品制剂。取阴性样品制剂, 按供试品溶液的制备方法制得阴性供试品溶液。

2.7 重复性试验

分别精密吸取取溶液制备项下对照品溶液 20μL, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 靛蓝峰面积的 RSD=0.23% (n=6), 结果表明精密度良好。

2.8 对照品溶液及供试品溶液的稳定性试验

分别精密吸取取溶液制备项下对照品和供试品溶液 20.0μL, 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12h 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定靛蓝峰面积积分值。对照品和供试品溶液的靛蓝峰面积 RSD 分别为 2.1% 和 2.2%。试验结果表明, 对照品溶液和供试品溶液制备后 12h 内测定, 色谱峰面积无明显变化, 在此时间内测定供试品溶液稳定。

2.9 回收率试验

分别精密称取靛蓝对照品适量, 加入 020301 批样品适

量, 使总量约为标示量的 80%、100%、120% 的样品各三份, 同上提取处理, 分别作为供试品溶液 1[#]~3[#], 另精密称取靛蓝对照品, 同上操作, 得对照品溶液。分别量取对照品溶液和各供试品溶液 20μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算样品中含靛蓝的量, 减去加入样品中含靛蓝的量, 即为测得靛蓝的量, 除加入靛蓝对照品的量即为回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery test (n=3)					
样品编号	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	/mg	/mg		%	%
1	1.70	1.68	98.82	100.06	1.24
2	1.73	1.74	100.58		
3	1.75	1.73	98.86		
4	1.79	1.82	101.68		
5	1.83	1.81	98.91		
6	1.76	1.78	101.14		
7	2.12	2.15	101.42		
8	2.23	2.20	98.65		
9	2.17	2.18	100.46		

2.10 重现性试验

取 020301 批样品内容物 6 份, 每份约 0.3g, 精密称定, 分置 6 个 100mL 量瓶中, 加氯仿约 40mL, 超声溶解 40min, 加氯仿稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 分别精密量取续滤液 1mL 置 100mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别作为供试品溶液 1[#]~6[#]。分别量取各供试液 20μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见表 3。

表 3 重现性试验结果

Tab 3 Results of repeatability test (n=6)				
样品编号	称样量 /g	峰面积	含量 /mg	RSD /%
1 [#]	0.2908	23798	3.17	1.73
2 [#]	0.3093	24614	3.08	
3 [#]	0.2867	23430	3.17	
4 [#]	0.3190	25102	3.05	
5 [#]	0.2934	23145	3.06	
6 [#]	0.2965	23623	3.09	

经以上方法学研究表明, 用此方法测定样品中靛蓝的含量线性关系好, 准确度高, 精密度较好, 完全能够满足样品的含量测定。

2.11 样品含量测定及含量限度的确定

分别量取对照品溶液和各供试品溶液 20μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算样品中含靛蓝的量。含量测定结果见表 4。

表 4 6 批溃疡宁胶囊的含量测定结果 (n=3)

Tab 4 Determination of indigotin in Kuilyangning capsules (n=3)	
批号	靛蓝的含量 / (mg/粒)
020301	3.12
020302	3.02
020303	3.08
020910	3.28
020911	3.24
020912	3.33

靛蓝在光照下不稳定,因此在配制样品时用棕色量瓶。稳定试验结果表明在此条件下样品稳定,可以达到分析要求。

本方法简便快捷、重复性好、分析结果准确可靠,可作为中成药溃疡宁胶囊的质量控制方法之一。

- [1] WS3-B-3112-98, Traditional Chinese Medicine Vol X VI (中成药方剂第十六册) [S]. 1997: 180.
- [2] LING Q S Ingredient of Herbal Chemistry (中草药成分化学) [M]. Vol Beijing People's Medical Press 1981. 208-215.
- [3] Ch P (2000) Vol I (中国药典 2000年版,一部) [S]. 2000: 18

收稿日期: 2005-09-07

去甲万古霉素致周围神经病 1例

陈莉, 孙秀凤, 魏峰 (河北省沧州中西医结合医院, 河北 沧州 061001)

中图分类号: R978.16 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)01-0077-01

去甲万古霉素为糖肽类抗生素,对各种革兰阳性菌,包括耐药菌具有高度抗菌活性。临床应用中主要的不良反应为肾功能损害、肝功能损害和过敏反应,合并应用其他抗感染药物及年龄 ≥ 60 岁患者中,去甲万古霉素总不良反应发生率较高,但去甲万古霉素致周围神经病的病例未见报道。我院近期使用去甲万古霉素治疗某患者腹腔内耐药屎肠球菌感染的过程中,患者出现从双脚麻木开始的周围神经病症状,并随治疗的进行逐渐加重,最后被迫停药。现就具体情况叙述如下。

患者,女,64岁,胆结石、胆囊破裂,胆囊摘除术后两周,2006年3月16日患者体温突然升高至 38.9°C ,查B超示:右上腹、右下腹两处包裹性积液。3月17日局麻下行切开引流术,引流脓液送细菌培养+药敏,3月20日细菌培养结果回报:屎肠球菌,除对万古霉素敏感外,对其他多种抗菌药物均耐药。引流处理约一星期后,每天引流液的量100mL左右未见明显增多,但引流液明显较开始引流时变得黏稠、脓性。综合分析患者病情,腹腔内局部感染未控制,有进一步加重的趋势,且细菌培养报告为耐药屎肠球菌,故于3月26日加用静脉用抗菌药进行综合抗感染治疗。具体用药方案为:盐酸去甲万古霉素(万迅,华北制药集团新药研究开发有限责任公司,批号:050921)首剂 0.8g 维持剂量 0.4g q 8 h 静滴;磷霉素(东北制药总厂,批号:050921) 3g 静滴, q 8 h。用药前再次取引流液行细菌培养+药敏,3月30日细菌培养结果回报依然为耐药屎肠球菌。

不良反应发生发展过程及症状特点:患者自3月26日首次输液开始时,诉感觉双脚趾端麻木,当时考虑可能与其长时间卧床输液有关,故鼓励患者输液间隙下床活动。3d后,患者右下腹引流液明显较用药前变稀薄,流动性好,抗菌药物治疗感染有效。同时患者诉输液时,双脚麻木明显,停止输液后下床活动至下次输液时可以缓解,但下次输液开始,双脚又再次出现麻木。至此,考虑到患者双脚麻木与用药有相关性,可能为药物引起的不良反应,但因患者感染病情尚未完全控制,在密切观察中继续药物治疗。4月1日,抗感染用药5d时,患者诉小腿、踝关节及双脚均麻木,时儿有针刺样疼痛感,每次输液完毕下床活动,至下次输液时麻木感不能完全缓解。综合分析患者腹部感染病情和药物引起

的不良反应,将治疗方案调整为:①针对腹部感染加用理疗(深部热疗)进行治疗;②停用抗菌药磷霉素组,继续去甲万古霉素治疗,并密切观察患者病情变化;③适当加用 VB_1 、 VB_{12} 、ATR地巴唑等,辅助治疗患者双脚周围神经障碍的症状。4月4日,停用磷霉素48h应用去甲万古霉素治疗9d后,患者诉双下肢麻木症状继续加重,范围扩大至双膝关节,有烧灼样和针刺样疼痛感,且自觉肌力明显减退,行走时举步困难,双足背部轻度水肿。这时患者腹腔感染情况进一步好转,右下腹引流液每天60~70mL,虽然针对患者腹腔感染情况不具备停止使用去甲万古霉素的指征,但考虑到患者目前不良反应的严重程度,以及与用去甲万古霉素的相关性,被迫停止使用去甲万古霉素。

停止使用去甲万古霉素后的症状变化:患者自4月4日8:00停止使用去甲万古霉素,同时,在4月1日肌注 VB_1 和 VB_{12} 的基础上,加用右旋糖酐20葡萄糖注射液500mL,每日1次,静滴,用于改善患者局部微循环。4月5日,患者停止使用去甲万古霉素24h双下肢麻木、烧灼、针刺样疼痛等周围神经病(多发性神经炎)的症状明显好转,患者自诉踝关节至膝盖的症状已经消失,双腿肌力明显恢复,但双脚依然麻木,且以双脚趾趾端和脚背前部为重,但针刺样疼痛的症状明显减轻。4月6日和4月8日分别为停止使用去甲万古霉素48h和96h患者双脚麻木症状进一步向双脚趾端局限,针刺样疼痛基本消失,但麻木症状改善缓慢。

讨论:周围神经病可由多种原因引起,表现为肢体远端对称性感觉、运动和植物神经功能障碍。呋喃坦啶、甲硝唑、异烟肼等为易引起周围神经病的药物,但去甲万古霉素引起的周围神经病未见报道,可能与其主要适用于耐药革兰阳性菌所致的严重感染,使用范围受限制,使用频率较低有关。但随着近年来耐药菌株的不断出现,使用频率增加,一些新的不良反应也可能随之出现。上述患者使用去甲万古霉素治疗耐药屎肠球菌,选择药物恰当,用量及使用方法正确,而且出现的周围神经受损的症状与用药时间有相关性,撤药后受损的神经症状明显改善,所以此例患者的周围神经病系由去甲万古霉素引起,临床使用中应予以注意。

收稿日期: 2006-05-15