盐酸左布比卡因及其注射剂细菌内毒素检查方法的建立

于海洲[1*],代秀梅[2],于风平[2#],都　婧[3](1.烟台市食品药品检验检测中心,山东 烟台　264000;2.淄博市食品药品检验所,山东 淄博　255086;3.烟台市烟台山医院检验科,山东 烟台　264000)

中图分类号　R927.12　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2015)09-1252-03
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.36

摘　要　目的:建立盐酸左布比卡因及其注射剂细菌内毒素的检查方法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大不干扰质量浓度,并进行方法学验证。结果:样品的质量浓度为1.56 mg/ml(λ=0.25 EU/ml)时对鲎试剂与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰;样品的细菌内毒素限值确定为0.08 EU/mg。结论:所建立的方法可用于盐酸左布比卡因及其注射剂的细菌内毒素检查。

关键词　盐酸左布比卡因;注射剂;细菌内毒素检查;干扰试验

Establishment of Endotoxins Test Method of Levobupivacaine Hydrochloride and Its Injection

YU Hai-zhou[1], DAI Xiu-mei[2], YU Feng-ping[2], DU Jing[3] (1.Yantai Municipal Food and Drug Inspection and Testing Center, Shandong Yantai 264000, China; 2.Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China; 3.Dept. of Laboratory, Yantaishan Hospital of Yantai City, Shandong Yantai 264000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish a method for the detection of endotoxins in Levobupivacaine hydrochloride (LH) and its injection. METHODS: According to the requirements of 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (second part) bacterial endotoxin inspection, the largest noninterfere quality concentration of samples was determined by interfering test with and method validation. RESULTS: There was no interference in the endotoxins test when the concentration of LH was 1.56 mg/ml (λ of TAL was 0.25 EU/ml). The limitation of endotoxins was 0.08 EU/mg. CONCLUSIONS: The established method is feasible for the endotoxins test of LH and its injection.

KEYWORDS　Levobupivacaine hydrochloride; Injection; Endotoxins test; Interference experiment

取3个批次的经痛舒颗粒各适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件下进样10 μl,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表2。

表2　样品含量测定结果(n=3,μg/g)

Tab 2　Results of content determination of samples (n=3, μg/g)

批号	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱
130101	13.66	0.94	3.12
130102	13.34	1.02	3.16
130103	13.58	0.98	3.11

3　讨论

研究表明,附子经过炮制,其中的双酯型生物碱(新乌头碱、乌头碱、次乌头碱)会水解成苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等单酯型生物碱,使其毒性大大降低,提高了临床应用的安全性[3]。然而,目前报道的用于附子中生物碱含量测定的HPLC方法大都集中于双酯型生物碱[4],而对于单酯型生物碱的含量测定鲜有报道。

本研究参照有关文献[5-7]的提取方法,对异丙醇-乙酸乙酯(1∶1,V/V)与甲醇两种溶媒的提取率进行了比较。结果表明,甲醇的提取率优于异丙醇-乙酸乙酯(1∶1,V/V)。由于本研究中的3种单酯型生物碱的化学结构相似、极性相似,在色谱柱上的保留时间比较接近,因此在进行梯度洗脱时,需缩小梯度变化范围,使洗脱时间延长,以达到良好的分离效果。

综上所述,该方法操作简单,结果准确可靠,可作为经痛舒颗粒中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量测定方法。

参考文献

[1]　国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:177.
[2]　邓江,龙丽娜,杜方麓.市售乌头炮制品种中的乌头总碱、酯型生物碱、乌头碱的含量检查[J].中成药,2007,29(12):附14.
[3]　陈东安,易进海,黄志芳,等.附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):64.
[4]　王瑞,刘芳,孙毅坤,等.不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱含量的HPLC测定[J].药物分析杂志,2006,26(10):1 361.
[5]　邵峰,俞瑜,任刚.HPLC法同时测定附子理中丸中3种单酯型生物碱含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):57.
[6]　孙兰,周海燕,赵润怀,等.HPLC法同时测定附子中6种单酯和双酯型生物碱[J].中草药,2009,40(1):131.
[7]　侯大斌,赵祥升.不同样品制备方法对RP-HPLC法测定附子生物碱含量的影响[J].中国药房,2010,21(19):1 763.

(收稿日期:2014-02-27　修回日期:2014-05-10)
(编辑:孙　冰)

*主管药师。研究方向:药物质量控制与分析。电话:0535-6243276-8007。E-mail:haizhou_aa@sina.com
#通信作者:副主任药师。研究方向:药物质量控制与分析。电话:0533-7866119。E-mail: yfplover@sina.com

盐酸左布比卡因是长效酰胺类局部麻醉药布比卡因的左旋光学异构体[1]。与布比卡因相比，其麻醉效能相似、作用时间更长、心血管和神经系统的毒性更低[2-3]，可用于神经阻滞、椎管内麻醉及分娩、术后镇痛等[4-7]。由于盐酸左布比卡因是以静脉注射或者鞘内注射的方式进入人体，临床用药中可能会由于细菌内毒素污染而引起发热、寒颤等副反应甚至死亡。为了控制药品质量，本文参考相关文献[8-11]对盐酸左布比卡因原料药和盐酸左布比卡因注射液细菌内毒素的检查方法进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

TAL-40D型试管恒温仪（湛江安度斯生物有限公司）；ZH-2型漩涡混合器（天津药典标准仪器厂）；PHS-3D型精密pH计（上海精密科学仪器有限公司）。

1.2 药品与试剂

盐酸左布比卡因原料药（瑞阳制药有限公司，批号：20131001、20131002、20131003，按干燥品计算，纯度＞99.4%）；盐酸左布比卡因注射液（瑞阳制药有限公司，批号：20140601、20140603、20140603，规格：5 ml∶37.5 mg）；鲎试剂[TAL，湛江安度斯生物有限公司，批号：1302021（标示灵敏度：0.25 EU/ml），批号：1301172（标示灵敏度：0.125 EU/ml）；福州新北生化工业有限公司，批号：12090312（标示灵敏度：0.25 EU/ml），批号：13051112（标示灵敏度：0.125 EU/ml）]；细菌内毒素检查用水（BET水，湛江安度斯生物有限公司，批号：1211200，规格：50 ml/瓶）；细菌内毒素工作标准品（中国食品药品检定研究院，批号：150601-201176，规格：100 EU/ml）。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素限值（*L*）的确定

根据公式$L=K/M$计算，式中M为人用每千克体质量每小时最大剂量，盐酸左布比卡因1次最大剂量是150 mg[12]；K为人每千克体质量每小时最大可接受的细菌内毒素剂量，一般注射剂K=EU/(kg·h)，鞘内用药为K=0.2 EU/(kg·h)。中国人平均体质量按60 kg计，内毒素限值为：每1 mg盐酸左布比卡因含内毒素的量应＜2 EU（一般注射）或0.08 EU（鞘内用药）。因此，拟定盐酸左布比卡因注射液的细菌内毒素限量为：每1 mg盐酸左布比卡因中含内毒素的量应＜0.08 EU。为严格控制盐酸左布比卡因的质量，保证制剂临床用药的安全性，本研究规定盐酸左布比卡因的细菌内毒素限量与盐酸左布比卡因注射液一致。

2.2 样品最小有效稀释浓度（*c*）的确定

根据公式$c=\lambda/L$计算，式中L为0.08 EU/ml，λ为TAL灵敏度。目前，市售TAL的λ常为0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 EU/ml，对应的c为6.25、3.12、1.56、0.75、0.375 mg/ml。

2.3 TAL灵敏度复核试验[13]

根据2010年版《中国药典》（二部）附录Ⅺ E“细菌内毒素检查法TAL灵敏度复核试验”项下方法进行操作，将细菌内毒素工作标准品用BET水溶解，配制成2.0 λ、1.0 λ、0.5 λ、0.25 λ的溶液，每个浓度平行做4管，并同时以BET水做2管阴性对照（NC）。TAL灵敏度复核结果见表1[表中“+”表示凝胶形成（阳性），“－”表示凝胶未形成（阴性）；下表同]。结果表明，4个批号的TAL灵敏度测定值λ_c均在0.5λ～2.0 λ之间，符合规定，可用于试验。

表1 TAL灵敏度复核结果

Tab 1 Results of TAL sensitivity checking

TAL批号	λ,EU/ml	细菌内毒素浓度				NC	λ_c,EU/ml
		2.0 λ	1.0 λ	0.5 λ	0.25 λ		
1302021	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
12090312	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
1301172	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
13051112	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125

2.4 预干扰试验

用BET水将盐酸左布比卡因（批号：20131001）和盐酸左布比卡因注射液（批号：20140601）分别稀释成质量浓度为6.25、3.12、1.56、0.75、0.375 mg/ml的系列溶液，作为供试品阴性对照（NPC）溶液。另制备相同浓度的系列供试品溶液，使每一浓度下的供试品溶液中都含有2 λ（λ=0.25 EU/ml）细菌内毒素，作为阳性对照溶液（PPC）。设立细菌内毒素工作标准品的阳性对照管（PC）和BET水阴性对照管（NC）各2管，然后按细菌内毒素检查法操作，进行预干扰试验，结果见表2。

表2 样品预干扰试验结果（λ=0.25，EU/ml）

Tab 2 Results of interference pretest of samples（λ=0.25，EU/ml）

TAL批号	样品批号	系列	样品质量浓度,mg/ml					PC	NC
			6.25	3.12	1.56	0.75	0.375		
1302021	20140601	PPC	--	--	++	++	++	++	--
	20140601	NPC	--	--	--	--	--		
	20131001	PPC	--	+-	++	++	++		
	20131001	NPC	--	--	--	--	--		
12090312	20140601	PPC	--	++	++	++	++	++	--
	20140601	NPC	--	--	--	--	--		
	20131001	PPC	--	++	++	++	++		
	20131001	NPC	--	--	--	--	--		

由表2可知，湛江安度斯生物有限公司生产的TAL（批号：1302021）最大不干扰浓度为1.56 mg/ml，而福州新北生化工业有限公司生产的TAL（批号：12090312）最大不干扰浓度为3.12 mg/ml。为确保所建立的检查方法准确、合理，本研究选择质量浓度为1.56 mg/ml的样品溶液进行干扰试验；根据拟定的内毒素限值，进行样品检验时对应的TAL最低灵敏度为0.125 EU/ml，因此选择浓度为0.125 EU/ml的TAL行干扰试验。

2.5 干扰试验

根据预干扰试验结果，用质量浓度为1.56 mg/ml的供试品溶液及BET水分别稀释细菌内毒素工作标准品，制成细菌内毒素浓度为0.25、0.125、0.06、0.03 EU/ml的系列溶液。取系列溶液与0.1 ml，加入到已复溶的2个厂家生产的TAL管内，每个浓度平行做4管，另取供试品溶液做2支NC管，按2010年版《中国药典》的细菌内毒素检查法进行干扰试验，结果见表3（表中E_s为用BET水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值；E_i为用供试品溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值）。

由表3可见，E_i/E_s均在0.5～2.0之间，按照2010年版《中国药典》（二部）的判断标准，质量浓度为1.56 mg/ml的供试品溶液对TAL（λ=0.125 EU/ml）与细菌内毒素之间的凝集反应无

干扰，可用于细菌内毒素检查。

表3　样品干扰试验结果

Tab 3　Results of interference test of samples

TAL批号	样品批号	细菌内毒素浓度，EU/ml				NC	E_s	E_t	E_t/E_s
		0.5	0.25	0.125	0.06				
1301172	BET水	++++	++++	----	----	--	0.125		
	20140601	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20140602	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20140603	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131001	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131002	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131003	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
13051112	BET水	++++	++++	----	----	--	0.125		
	20140601	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20140602	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20140603	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131001	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131002	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0
	20131003	++++	++++	----	----	--		0.125	1.0

2.6　样品细菌内毒素检查

取盐酸左布比卡因和盐酸左布比卡因注射液各3批，用BET水制成质量浓度为1.56 mg/ml的溶液，按2010年版《中国药典》(二部)中的方法进行细菌内毒素检查，结果6批样品细菌内毒素均符合规定，详见表4。

表4　样品细菌内毒素检查结果

Tab 4　Results of bacterial endotoxins test of samples

TAL批号	样品批号	样品质量浓度，mg/ml	NPC	PPC	NC	PC
1301172	20140601	1.56	--	++	--	++
	20140602	1.56	--	++	--	++
	20140603	1.56	--	++	--	++
	20131001	1.56	--	++	--	++
	20131002	1.56	--	++	--	++
	20130603	1.56	--	++	--	++
13051112	20140601	1.56	--	++	--	++
	20140602	1.56	--	++	--	++
	20140603	1.56	--	++	--	++
	20131001	1.56	--	++	--	++
	20131002	1.56	--	++	--	++
	20130603	1.56	--	++	--	++

3　讨论

细菌内毒素检查法作为热原检查的替代方法已经被各国药典所采纳，其具有灵敏度高、快速、准确等特点，主要用于检测和量化由革兰阴性菌产生的内毒素。在建立内毒素检查法时进行干扰试验，目的是评价样品质量浓度对TAL与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质，筛选出对细菌内毒素检查无干扰的样品质量浓度范围。不同厂家生产的TAL由于生产工艺、质量参数等方面存在一定的不同，其抗干扰能力存在差异。本次预干扰试验发现：λ同为0.25 EU/ml的TAL，湛江安度斯生物有限公司生产的TAL最大不干扰样品质量浓度为1.56 mg/ml，而福州新北生化工业有限公司生产的TAL最大不干扰样品质量浓度为3.12 mg/ml。为确保所建立的检查方法准确、合理，在建立细菌内毒素检查方法时，有必要选择多个厂家的TAL和多批样品进行验证。

干扰试验结果显示，6批样品稀释至质量浓度为1.56 mg/ml时，分别使用2个不同厂家生产的TAL（λ=0.125 EU/ml）进行干扰试验，其E_t/E_s均在0.5～2.0范围内，表明样品在该质量浓度下不干扰细菌内毒素检查。

在细菌内毒素检查中，过酸、过碱的供试品溶液容易干扰结果，一般要求供试溶液的pH值在6.0～8.0范围内，否则应调节待测溶液的pH值。本研究采用精密pH计测定了质量浓度为1.56 mg/ml的6批样品溶液的pH值，结果均在6.0～8.0之间，表明样品溶液的pH值不需要调节，可直接用于细菌内毒素检查。

综上所述，本研究拟确定的盐酸左布比卡因和盐酸左布比卡因注射液细菌内毒素检查标准操作方法如下：取本品适量，用BET水稀释制成每1 ml含盐酸左布比卡因1.56 mg的溶液，采用λ≥0.125 EU/ml的TAL，依据2010年版《中国药典》(二部)附录Ⅺ E法测定，每1 mg盐酸左布比卡因中含内毒素的量应＜0.08 EU。

参考文献

[1] 宗在伟，胡文波，陈林，等.盐酸左布比卡因的合成[J].齐鲁药事，2011，31(9)：501.

[2] 王向兵，曾因明.左布比卡因的药代学、药效学特性及其毒性[J].国外医学麻醉学与复苏分册，2004，25(4)：223.

[3] 刘晓东.左布比卡因的药动学特性、临床应用及其毒性[J].中国新药杂志，2006，15(1)：68.

[4] 周乐顺，李军，刘合年，等.左布比卡因硬膜外麻醉对腹部手术病人心肌酶的影响[J].中国新药与临床杂志，2005，24(2)：119.

[5] 王毅，孙晓梅，晓琴，等.盐酸左旋布比卡因与盐酸布比卡因在腰麻手术中应用研究[J].中国初级卫生保健，2013，27(4)：122.

[6] 徐慧.不同比重左旋布比卡因在高龄患者腰麻-硬膜外联合麻醉中的比较研究[J].中国药房，2009，20(17)：1 326.

[7] 檀文好.左旋布比卡因在神经阻滞与麻醉中的应用[J].中国药房，2010，21(36)：3 455.

[8] 代秀梅，于风平.氟马西尼注射液细菌内毒素检查方法的建立[J].中国药房，2014，25(2)：2 003.

[9] 郑霞，赵毓梅.细菌内毒素检查法的应用进展[J].中国热带医学，2009，9(1)：170.

[10] 王宗春，罗丽萍，黄砚青.马来酸桂哌齐特注射液细菌内毒素检查方法的建立[J].中国药房，2011，22(21)：1 998.

[11] 周梅，武谷.注射用盐酸吉西他滨细菌内毒素检查方法的研究[J].中国药房，2013，24(1)：76.

[12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：临床用药须知：化学药和生物制品卷[S].2005年版.北京：人民卫生出版社，2005：73.

[13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：二部[S].2010年版.北京：中国医药科技出版社，2010：附录99.

（收稿日期：2014-08-07　修回日期：2014-10-09）

（编辑：孙　冰）