

血液滤过置换液的细菌内毒素检查法研究

魏霞^{1*}, 韩梅², 韩瑶³, 祝清芬^{1#} (1.山东省食品药品检验所, 济南 250101; 2.济南市中心医院急诊科, 济南 250013; 3.青岛华仁药业股份有限公司, 山东青岛 266101)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2752-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.23

摘要 目的:建立血液滤过置换液的细菌内毒素检查法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法项下方法确定本品细菌内毒素限值,采用凝胶法和动态浊度法研究样品对细菌内毒素检查的干扰情况。结果:凝胶法结果表明供试品原液对试验无干扰;动态浊度法标准曲线方程相关系数绝对值为0.984 8(>0.980),标准曲线成立。供试品原液细菌内毒素回收率在50%~200%范围内,表明供试品原液对细菌内毒素检查法无干扰作用。3批供试品细菌内毒素含量均<0.03 EU/ml,均符合拟定的标准,且2种方法结果一致。结论:本品可采用细菌内毒素检查法替代热原检查法,确定标准为每1 ml中含内毒素量应<0.03 EU。

关键词 血液滤过置换液;细菌内毒素检查;干扰试验;凝胶法;动态浊度法;定量测定

Study on Bacterial Endotoxin Test for Hemofiltration Replacement Fluid

WEI Xia¹, HAN Mei², HAN Yao³, ZHU Qing-fen¹ (1.Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2.Emergency Department, Jinan Municipal Central Hospital, Jinan 250013, China; 3. Qingdao Huaren Pharmaceutical Co., Ltd., Shandong Qingdao 266101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish bacterial endotoxin test for hemofiltration replacement fluid. METHODS: The limit for bacterial endotoxin in this product was designed according to *Chinese Pharmacopoeia* II (2010 edition). The disturbance to bacterial endotoxins test from the samples was investigated by both gel-clot method and kinetic turbidimetric limulus test. RESULTS: Gel-clot method showed that this product neither inhibited nor enhanced the test. For kinetic turbidimetric limulus test, the absolute value of correlation was 0.984 8 (>0.980), and the standard curve was valid. The recovery rates of bacterial endotoxin the sample solution were 50%-200%, which indicated that the sample solution neither inhibited nor enhanced the test. The contents of bacterial endotoxin in 3 batches of sample were lower than 0.03 EU/ml and all met the requirements for bacterial endotoxin test. Moreover, results of 2 methods were same to each other. CONCLUSIONS: Bacterial endotoxins test is suitable for this product instead of pyrogen test. The contents of bacterial endotoxin should be lower than 0.03 EU in 1 ml sample solution in quality criterion.

KEY WORDS Hemofiltration replacement fluid; Bacterial endotoxin test; Interference test; Gel-clot method; Kinetic turbidimetric limulus test; Quantitative determination

血液滤过置换液为含有氯化钠、氯化钙、氯化镁、氯化钾、乳酸钠与葡萄糖的灭菌水溶液,临床用于血液滤过治疗时静脉补液。本品原质量标准即国家食品药品监督管理局标准YBH05522008中采用热原检查法检查其热原,按家兔体质量每1 kg注射10 ml进行试验^[1]。因细菌内毒素检查法具有操作简便、快捷、灵敏度高、重现性好等优点,且不需建设运行成本较高的动物室,故目前越来越多的品种以细菌内毒素检查法取代热原检查法进行致热物质的检查。本试验对血液滤过置换液的细菌内毒素检查法进行了方法学研究,以确定该品种采用细菌内毒素检查法替代热原检查法的可行性。

细菌内毒素检查法包括凝胶法和光度测定法,其中凝胶法为仲裁方法。由于本品细菌内毒素限值(L)较低,凝胶法可供选择的鲎试剂产品很少,故本文对血液滤过置换液同时进

行了凝胶法和光度测定法中动态浊度法的方法学研究。

1 材料

1.1 仪器

ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂); TAL-40A型试管恒温仪(湛江安度斯生物有限公司); BET-48G细菌内毒素测定仪(天津天大天发科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

血液滤过置换液(青岛华仁药业股份有限公司提供,非聚氯乙烯共挤膜塑料软袋装,批号:C1206102、C1206103、C1206104,规格:每袋2 000 ml);鲎试剂1[湛江博康海洋生物有限公司,批号:1202080,标示灵敏度(λ):0.03 EU/ml];鲎试剂2(批号:1204140, λ :0.03 EU/ml)、动态浊度法鲎试剂(批号:1106161, λ :0.01~10 EU/ml)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:1111070,规格:每支5 ml)均为湛江安度斯生物有限公司产品;细菌内毒素工作标准品(CSE,中国食品药品检定研究院,批号:150601-201174,效价:每支160 EU)。

2 方法与结果

2.1 L的确定

* 主管药师,硕士。研究方向:药物安全性评价、药品检验。电话:0531-81216532。E-mail:myweixia@sohu.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:药理学、毒理学、药物安全性评价、药品检验。电话:0531-81216599。E-mail:qingfenzhu@yahoo.cn

本品临床用于血液滤过治疗时静脉补液用,临床每次用量较大(每次4~5 h,18~25 L),本品成人(体质量60 kg)每1 h可能最大用量为6 250 ml。根据药品的 L 的计算公式^[2], $L=K/M$,注射剂的 $K=5 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,计算限值 $L=5\times 60/6\ 250=0.048 \text{ EU}/\text{ml}$ 。参考《血液净化标准操作规程》^[3]中血液滤过置换液细菌内毒素含量小于0.03 EU/ml的要求,将本品 L 定为0.03 EU/ml。

2.2 凝胶法^[3-4]

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核。按2010年版《中国药典》(二部)附录XIE细菌内毒素检查法项下鲎试剂灵敏度复核的要求^[2],分别对2批鲎试剂进行灵敏度复核。结果鲎试剂1、2的灵敏度测定值(λ_c)分别为0.04、0.02 EU/ml,均在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间,表明2批鲎试剂均可用于试验。

2.2.2 干扰试验。目前市售鲎试剂灵敏度一般为0.5~0.03 EU/ml,本品 L 为0.03 EU/ml。根据最大有效稀释倍数(MVD)= L/λ ,本品只能以供试品原液进行试验。按规定,采用2个生产厂家的鲎试剂考察了3批样品对试验有无干扰作用。

用BET水将CSE复溶,并稀释制成含内毒素2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4种浓度的内毒素溶液,即0.062 5、0.031 25、0.015 6、0.007 8 EU/ml(C液);同时制备含上述浓度的内毒素和供试品原液的内毒素溶液(以供试品原液稀释上述系列浓度内毒素,得B液)。分别采用2个生产厂家的鲎试剂考察供试品原液对试验的干扰情况,每一浓度平行做4管。同时另取BET水(D液)和供试品原液(A液)各做2支阴性对照管。分别计算 E_s 和 E_t ^[2],判断供试品原液对试验有无干扰作用。结果, E_s 均在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间,3批供试品 E_t 均在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$ 之间,表明供试品原液对试验无干扰作用,详见表1。

表1 凝胶法细菌内毒素检查干扰试验结果

Tab 1 Results of interference test of bacterial endotoxin test for gel-clot method

鲎试剂批号	$E_s, \text{EU}/\text{ml}$	$E_t, \text{EU}/\text{ml}$		
		C1206102批	C1206103批	C1206104批
1202080	0.04	0.04	0.04	0.04
1204140	0.03	0.03	0.02	0.03

2.2.3 凝胶法细菌内毒素检查。取3批供试品,按2010年版《中国药典》(二部)附录XIE细菌内毒素检查法^[3],采用鲎试剂2对供试品进行检查。结果3批供试品内毒素含量均 $<0.03 \text{ EU}/\text{ml}$,符合拟订的质量标准。

2.3 动态浊度法^[2,4-5]

2.3.1 制备标准曲线。用BET水将CSE进行稀释,使其最终细菌内毒素浓度分别为1.0、0.25、0.062 5、0.015 6 EU/ml,各取0.1 ml,分别加到预先加有0.1 ml鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入细菌内毒素测定仪内进行检测,每一浓度重复3管,同时做阴性对照(NC);检测波长为405 nm。以平均反应时间的对数值($\lg T$)为纵坐标、内毒素浓度的对数值($\lg c$)为横坐标,绘制标准曲线,结果见表2。

由表2计算得标准曲线方程 $\lg T=2.686\ 42-0.360\ 22 \lg c$ ($r=-0.984\ 8$)(绝对值应 >0.980),平行管之间的RSD均小于10%,阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,表明标准曲线符合规定。

2.3.2 干扰试验及供试品测定结果。取CSE复溶,根据标准

表2 细菌内毒素标准曲线及可靠性分析($n=3$)

Tab 2 Standard curves of bacterial endotoxin and analysis of reliability($n=3$)

内毒素浓度,EU/ml	平均反应时间,s	RSD,%
1.0	526	0.67
0.25	759	3.49
0.062 5	1 153	2.13
0.015 6	2 419	3.25
0(NC)	$>3\ 600$	

曲线内毒素浓度的设置,0.125 EU/ml接近标准曲线中点设其为 λ_m 。以供试品原液作为供试品溶液(A液),同时以供试品原液稀释至含内毒素0.125 EU/ml(B液)。分别取上述各液0.1 ml,加到预先加有0.1 ml鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入仪器内进行测定,每个浓度重复2管。测定结束后,按标准曲线方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素 λ_m 的供试品溶液的内毒素含量,并计算该试验条件下的回收率。

结果表明,3批供试品标准内毒素回收率在50%~200%,内毒素含量均 $<0.03 \text{ EU}/\text{ml}$,实际含量低于标准曲线检测限0.015 6 EU/ml,检查结果见表3。

表3 动态浊度法干扰试验及供试品细菌内毒素含量测定结果($n=2$)

Tab 3 Results of interference test of kinetic turbidimetric limulus test and content determination of bacterial endotoxin($n=2$)

供试品批号	A液测定值,EU/ml	B液回收率,%	供试品内毒素含量检测结果,EU/ml
C1206102	低于检测限	103	$<0.015\ 6$
C1206103	低于检测限	105	$<0.015\ 6$
C1206104	低于检测限	111	$<0.015\ 6$

3 讨论

热原检查法和细菌内毒素检查法均是检测各种注射用药物含致热物质的常用检查方法。由于家兔耐受性等原因,热原检查时供试品注射体积每1 kg体质量一般不少于0.5 ml,不超过10 ml^[2]。血液滤过置换液临床用量较大,原标准采用热原检查法,注射体积采用每1 kg体质量注射10 ml,仅相当于临床可能的每1 h最大用量的1/10,可能会给临床应用带来一定的安全隐患。改用细菌内毒素检查法后,限值定为0.03 EU/ml,可以对药品质量从严控制,保障临床用药安全。

我国目前细菌内毒素检查所使用的方法多为凝胶限值法,其检验结果只能判断产品的内毒素含量是否超标,而无法给出准确的含量。随着鲎试验方法的测定仪器的不断完善,内毒素测定已向微量定量方向发展。定量测定应用于常规药品检查、生产过程质控、各种除热原方法的评价、特殊样品的检查(如血液、尿液、脑脊液)等方面,与凝胶法相比具有灵敏、快捷、准确的特点。目前欧美等国家内毒素检测多数已经采用了定量方法^[6]。动态浊度法是最常用的定量测定方法之一,通过测定反应溶液达到规定浊度所需时间或测定溶液自身的浊度变化率定量测定样品中内毒素含量。该法操作简单、快速、灵敏度高、检测范围宽。动态浊度法的干扰试验,以样品中外加内毒素的回收率进行判断,若回收率在50%~200%,可认为样品溶液对试验无干扰^[7]。

本文分别采用凝胶法和动态浊度法对3个批号的供试品

RP-HPLC法同时测定苯甲酸原料药中有关物质苯甲醛和甲苯的含量

章家伟^{1,2*}, 王辉^{1,2}, 孙庆荣^{1,2}, 王向峰^{1,2}, 雷玉萍^{1,3}, 帅放文^{1,2#}(1.湖南尔康制药股份有限公司,长沙 410331; 2.湖南省药用辅料工程技术研究中心,长沙 410331; 3.湖南省食品药品检验研究院,长沙 410001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2754-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.24

摘要 目的:建立测定苯甲酸原料药中有关物质苯甲醛、甲苯含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Wondasil™-C₁₈,流动相为甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(pH 4.0)溶液(80:20),流速为0.5 ml/min,检测波长为254 nm。结果:在建立的色谱条件下,苯甲酸色谱峰能与苯甲醛、甲苯完全分离,苯甲醛及甲苯检测质量浓度线性范围分别为2.0~7.2($r=0.999\ 5$)、1.75~6.30 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.998\ 9$),检测限分别为0.05、0.2 $\mu\text{g/ml}$,平均加样回收率分别为100.57%($\text{RSD}=0.99\%$, $n=9$)、99.58%($\text{RSD}=0.86\%$, $n=9$)。结论:该方法灵敏、准确,可用于苯甲酸原料药中有关物质苯甲醛、甲苯的检查。

关键词 反相高效液相色谱法;苯甲酸;苯甲醛;甲苯;有关物质;含量测定;限度

Simultaneous Determination of Related Substances Benzaldehyde and Toluene in Benzoic Acid Crude Drug by RP-HPLC

ZHANG Jia-wei^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, SUN Qing-rong^{1,2}, WANG Xiang-feng^{1,2}, LEI Yu-ping^{1,3}, SHUAI Fang-wen^{1,2}(1. Hunan Er-Kang Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410331, China; 2. Hunan Engineering Technical Research Center of Pharmaceutical Excipients, Changsha 410331, China; 3. Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances benzaldehyde and toluene in benzoic acid crude drug. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Wondasil™-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.02 mol/L ammonium acetate (pH 4.0) (80:20) at the flow rate of 0.5 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: Benzoic acid, benzaldehyde and toluene could be separated completely. The linear range of benzaldehyde and toluene were 2.0-7.2 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 5$) and 1.75-6.30 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.998\ 9$) respectively. The detection limits were 0.05 $\mu\text{g/ml}$ and 0.2 $\mu\text{g/ml}$. The average recoveries were 100.57% ($\text{RSD}=0.99\%$, $n=9$) and 99.58% ($\text{RSD}=0.86\%$, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: This method is sensitive and accurate, and it can be used for the simultaneous determination of related substances benzaldehyde and toluene in benzoic acid crude drug.

KEY WORDS RP-HPLC; Benzoic acid; Benzaldehyde; Toluene; Related substances; Content determination; Limit

进行了干扰试验,结果表明,供试品原液对试验无干扰作用,本品可采用细菌内毒素检查法替代热原检查法。由于本品限值较低,凝胶法可供选择的鲎试剂灵敏度范围很窄,采用动态浊度法,可以通过设定标准曲线的范围,提高样品检测的浓度选择,也体现了动态浊度法的优越性。

进行细菌内毒素检查时,含内毒素的供试品溶液的配制,一般采用2倍浓度的供试品溶液和细菌内毒素溶液等比混合的方法。但由于本品限值小,需采用供试品原液进行试验,只能采用供试品原液稀释内毒素的方法。为保证干扰试验时B液和C液采用同一支内毒素标准品,可采用供试品原液对高浓度的内毒素水溶液进行稀释的方法。

最终确定本品细菌内毒素检查法标准为:“【检查】细菌内毒素 取本品,依法检查(2010年版《中国药典》二部附录XI E),每1 ml中含内毒素量应 $<0.03\ \text{EU}$ ”。

*高级工程师,博士。研究方向:药品研发。电话:0731-84659105。E-mail: hnerkangyf@126.com

#通信作者:教授,博士。研究方向:药品研发。电话:0731-84659105

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.YBH05522008 血液滤过置换液[S].2008-05-22.
- [2] 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、附录213.
- [3] 陈香美.血液净化标准操作规程[M].2010年版.北京:人民军医出版社,2010:73.
- [4] 中国食品药品检定研究院.中国药品检验标准操作规范[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:310-321.
- [5] 祝清芬,魏霞.动态浊度法定量测定多西他赛注射液细菌内毒素的含量[J].中国药房,2011,22(1):54.
- [6] 郭萌,李冠民,黄清泉.细菌内毒素研究进展[J].中国实验动物学报,2009,17(5):397.
- [7] 王莉蓓,陈华龙,姜丽君.动态浊度法定量检测血栓通注射液中细菌内毒素[J].齐鲁药事,2011,30(1):27.

(收稿日期:2012-10-29 修回日期:2012-12-11)