

显色基质法定量检测盐酸多沙普仑注射液的细菌内毒素

彭燕*,张玲莉,王宗春(武汉大学人民医院,武汉 430060)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3909-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.23

摘要 目的:建立定量检测盐酸多沙普仑注射液中细菌内毒素的方法。方法:采用显色基质法,按照《中国药典》相关方法对不同批号的盐酸多沙普仑注射液分别进行干扰试验,确立其不干扰质量浓度。结果:盐酸多沙普仑注射液稀释至5 mg/ml时无干扰作用,回收率为50%~100%。结论:显色基质法可用于盐酸多沙普仑注射液中细菌内毒素含量的定量检测。

关键词 盐酸多沙普仑注射液;显色基质法;细菌内毒素;干扰试验

Quantitative Determination of Bacterial Endotoxin in Doxapram Hydrochloride Injection by Chromogenic Substrate Method

PENG Yan, ZHANG Ling-li, WANG Zong-chun (Renming Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To set up a method for quantitative determination of bacterial endotoxin in Doxapram hydrochloride injection. METHODS: The interference test of different batches of Doxapram hydrochloride injection was conducted according to *Chinese Pharmacopeia*, so as to determine the noninterference concentration by chromogenic substrate method. RESULTS: The interference between the sample and the relative chromogenic substrate was eliminable when the sample was diluted to 5 mg/ml. Recovery rates were 50%-100%. CONCLUSIONS: The chromogenic substrate method is suitable for quantitative detection of bacterial endotoxin content in Doxapram hydrochloride injection.

KEYWORDS Doxapram hydrochloride injection; Chromogenic substrate method; Bacterial endotoxin; Interference test

盐酸多沙普仑是一种呼吸兴奋剂,其注射液为无色澄明液体,小剂量时通过颈动脉体化学感受器反射性兴奋呼吸中枢,大剂量时直接兴奋延髓呼吸中枢,使潮气量加大、呼吸频率加快,临床用于治疗呼吸衰竭^[1]。鲎试剂凝胶法检测注射液细菌内毒素具有灵敏、简便、可靠等优点,但由于许多药物本身对凝集反应存在干扰作用,如抑肽酶、乳酸环丙沙星注射液等^[2],故凝胶法并不适用于所有注射液。目前尚未见盐酸多沙普仑注射液细菌内毒素检测的文献报道,本文参照相关标准^[3-4],研究采用鲎试剂方法检测其细菌内毒素的可行性,并建立了显色基质法检测该制剂中细菌内毒素的方法,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

XW-80A 涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);HHS精密恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂);UV-2800紫外-可见分光光度计(尤尼科上海仪器公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸多沙普仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司,批号:20120815、20121021、20121202,规格:5 ml:100 mg);显色基质鲎试剂盒包括:鲎试剂(批号:120402,灵敏度:0.01 EU/ml)1.7 ml、显色基质(批号:120403)1.7 ml、内毒素标准品(CSE,批号:120401,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检测用水(BET水,批号:120418,规格:每支50 ml)、偶氮化试剂1(批号:120326)10 ml、偶氮化试剂2(批号:120327)10 ml、偶氮化试剂3(批号:120328)10 ml、HCl反应终止剂(批号:120329)50 ml,均为厦门

鲎试剂厂产品。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的计算

$L=K/M$, 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,注射剂 $K=5.0$ EU/(kg·h)。由于该药需加入葡萄糖氯化钠注射液稀释后静脉滴注,所以需去除葡萄糖氯化钠注射液最大允许内毒素含量: $0.5 \times 500/60=4.17$ EU/(kg·h)(《中国药典》规定葡萄糖氯化钠注射液内毒素限量为0.5 EU/ml,每小时静脉滴注的输液体积按500 ml计算,人均体质量按60 kg计算)^[3],由此计算供试品的细菌内毒素限值 $K=5-4.17=0.83$ EU/(kg·h)。 M 为人用最大供试品剂量,按照盐酸多沙普仑注射液说明书^[5],每小时最大用量为300 mg,即 $M=300/(60 \times 1)=5.0$ mg/(kg·h)。因此本品的细菌内毒素限值 $L=0.83/5.0=0.166$ EU/mg。考虑到实际检验中的换算方便和“就严不就松”的原则,初步将本品的细菌内毒素限值 L 定为0.1 EU/mg。本品质量浓度为20 mg/ml,即内毒素限值应为2.0 EU/ml。

2.2 标准曲线可靠性试验

取CSE 1支,加入1 ml BET水复溶,放置涡旋混合仪上旋涡混合15 min,得到10 EU/ml溶液,然后用BET水将其稀释至1 EU/ml,再分别取2 ml反应试管15支,分别加入细菌内毒素母液1 EU/ml(0.8、0.6、0.4、0.2、0 ml)和BET水(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml)制成不同浓度的细菌内毒素标准溶液(0.8、0.6、0.4、0.2、0 EU/ml),每个浓度平行配制3管,每步稀释内毒素过程均需振荡30 s。各取标准溶液0.1 ml分别加到预先加有0.1 ml鲎试剂的反应试管中(冰浴),振荡10 s,然后置于37℃水浴箱中10 min,取出置于冰浴中,加入显色基质0.1 ml,再置于

*主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:027-88041919-88898。E-mail:smileto_cn@sina.com

37 ℃水浴箱中6 min,取出置于冰浴中。每平行管中均依次加入偶氮化试剂1、偶氮化试剂2、偶氮化试剂3各0.5 ml(其中鲎试剂和显色基质用除热原水预溶至1.7 ml,偶氮化试剂1用反应终止试剂除热原盐酸预溶至10 ml,偶氮化试剂2、偶氮化试剂3使用除热原水预溶至10 ml)振荡5 s后静置5 min,在紫外-可见分光光度计中于545 nm波长处检测吸光度。以含细菌内毒素0 EU/ml的样品为阴性管,并以阴性管的吸光度作为空白对照,样品吸光度减去空白对照即为平均吸光度。

结果,平均吸光度测定值依次为0.04、0.155、0.312、0.458、0.643。以平均吸光度(y)对内毒素浓度(x)作线性回归,得标准曲线方程 $y=0.8304x-0.0064$ ($r=0.9913 \geq 0.980$),表明试验方法有效。

2.3 样品的干扰试验

取3批样品加入BET水,稀释倍数为1:2、1:4、1:8、1:16共4个稀释级(称为NPC溶液),分别用4个不同稀释级供试品溶液加入与供试品等体积的0.5 EU/ml的CSE,配制浓度为0.25 EU/ml内毒素溶液(称为PPC溶液)。每种溶液中均依次加入鲎试剂0.1 ml,振荡10 s,然后置于37 ℃水浴箱中10 min,取出置于冰浴中,加入显色基质0.1 ml,再置于37 ℃水浴箱中6 min,取出置于冰浴中。每管中均依次加入偶氮化试剂1、偶氮化试剂2、偶氮化试剂3各0.5 ml(同“2.2”项)。测量出PPC系列和NPC系列吸光度,用标准曲线计算内毒素浓度、加入外源内毒素的供试品溶液内毒素浓度(c_s)、未加外源内毒素的相同稀释倍数供试品溶液内毒素浓度(c_c)。按公式计算该条件下的回收率= $(c_s-c_c)/0.5 \times 100\%$,不同稀释倍数样品细菌内毒素检测值及回收率结果见表1。

表1 细菌内毒素干扰试验结果

Tab 1 Result of interference test of bacterial endotoxin

样品批号	稀释倍数	稀释质量浓度,mg/ml	回收率,%	结论	内毒素值,EU/ml
20120815	1:2	10	45.4	干扰	<0.01
	1:4	5	60.4	不干扰	<0.01
	1:8	2.5	56.6	不干扰	<0.01
	1:16	1.25	87.4	不干扰	<0.01
	原液	20	16.5	干扰	<0.01
20121021	1:2	10	40.6	干扰	<0.01
	1:4	5	67.8	不干扰	<0.01
	1:8	2.5	77.6	不干扰	<0.01
	1:16	1.25	95.5	不干扰	<0.01
	原液	20	14.7	干扰	<0.01
20121202	1:2	10	35.7	干扰	<0.01
	1:4	5	55.4	不干扰	<0.01
	1:8	2.5	88.5	不干扰	<0.01
	1:16	1.25	90.8	不干扰	<0.01
	原液	20	27.8	干扰	<0.01

结果显示,1:2倍稀释级样品溶液有一定干扰作用,1:4、1:8、1:16倍稀释级样品溶液均未见有干扰作用,回收率均在50%~100%。5 mg/ml及以下质量浓度的样品稀释溶液对显色基质鲎试验法未见干扰。

2.4 样品中细菌内毒素的测定

选择样品稀释液1:4作为供试品溶液检测各批样品中细菌内毒素含量。每种供试品溶液中均依次加入鲎试剂0.1 ml,振荡10 s,然后置于37 ℃水浴箱中10 min,取出置于冰浴中,加入显色基质0.1 ml,再置于37 ℃水浴箱中6 min,取出置于

冰浴中。每管中均依次加入偶氮化试剂1、偶氮化试剂2、偶氮化试剂3各0.5 ml(同“2.2”项),测定吸光度,计算供试品细菌内毒素含量,结果见表2。

表2 样品细菌内毒素检测结果

Tab 2 Determination result of bacterial endotoxin in samples

样品批号	内毒素值,EU/ml	结果
20120815	<0.01	合格
20121021	<0.01	合格
20121202	<0.01	合格

3 讨论

(1)显色基质法是继家兔法、凝胶法后被纳入2005年版《中国药典》的法定细菌内毒素检测法。此法是鲎试剂检查法经进一步发展和提高后的一种方法,由于具有快速、灵敏度高、可定量、重复性好的特点,已被广泛应用于样品内毒素含量检测中。

与凝胶法相比,用于该法的样品抗干扰能力加强,比如有文献^[6-7]显示,凝胶法测定盐酸多沙普仑注射液必须稀释1:8或1:16以后才能排除干扰进行半定量检测。而显色基质法抗干扰能力好,能够定量测定样品中的细菌内毒素含量,比凝胶法试验结果更准确、科学。

(2)现行《中国药典》规定,细菌内毒素含量定量方法主要有动态浊度法^[3]、终点浊度法、动态显色基质法和终点显色基质法。相比其他测定细菌内毒素含量的方法,终点显色基质法采用混合物中细菌内毒素浓度和其在孵育终点时释放出成色团的数量之间存在量化关系的原理来测定细菌内毒素的含量,即通过检验特定波长中吸光度大小来定量,因此具有更好的重复性和可操作性。且该方法所需试验条件简单易行,仅需要可见分光光度计和玻璃比色皿,不需要特别的实验仪器,在实验条件比较简单的实验室或生产厂家均可开展,其他的检验方法则通常需要酶标仪或者特定的细菌内毒素检测仪等设备^[8],因此在实际工作中该方法具有更好的推广应用前景。

(3)显色基质法除了对试验用品和稀释液要求无热原外,对鲎试剂灵敏度、内毒素标准曲线、试验样品的干扰试验也有明确的规定和要求^[3],其中样品的干扰试验是保证试验结果准确性的关键因素。用供试品溶液配制内毒素,回收率应在规定的范围内,试验方有效。目前,排除干扰通常采用样品稀释法和其他一些适宜的方法(比如调节pH,超声或加热使样品溶解等)^[9]。通过本次试验证明,如果用盐酸多沙普仑注射液1:4稀释液进行内毒素含量检查,可以达到较好的回收率。

综上,本文建立了定量检测盐酸多沙普仑注射液中细菌内毒素含量的方法。

参考文献

- [1] 郭涛,陈佳,夏东亚,等.盐酸多沙普仑在中国蒙古族和汉族健康人体内的药动学特征[J].中国临床药理学杂志,2011,20(1):5.
- [2] 蔡彤,张国来,李波,等.84种注射用药品细菌内毒素检查法的方法学研究[J].中国药理学杂志,2010,45(2):150.
- [3] 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88-91.
- [4] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[S].北京:中国医药科技出版社,2005:287-302.
- [5] 江苏恩华药业集团有限公司.盐酸多沙普仑注射液说明

复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊中盐酸异丙嗪和氯氮草的有关物质分析

陈晓英*(福建生物工程职业技术学院,福州 350002)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3911-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.24

摘要 目的:建立测定复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊中盐酸异丙嗪和氯氮草产生的有关物质。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为ZORBAX SB-C₈,流动相为0.05 mol/L磷酸二氢铵(pH 3.2)-甲醇(梯度洗脱),检测波长为254 nm;按照对照品保留时间归属各杂质及采用液质联用法确定氯氮草中的杂质,面积归一化法计算51批10个企业样品中有关物质的量。结果:主成分与有关物质能有效分离,且空白辅料和其他组分对检测成分未见干扰,盐酸异丙嗪和氯氮草中杂质检测限分别为2.5、2 ng;51批次样品检查结果显示盐酸异丙嗪的杂质质量较低(均低于1%),而氯氮草的杂质质量普遍较高(大多在2%~5%),且后者中的主要杂质为7-氯-5-苯基-1,3-二氢-1,4-苯并二氮杂革-2-酮(4-氧化物)。结论:本方法可用于分析复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊中盐酸异丙嗪和氯氮草产生的有关物质。

关键词 复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊;盐酸异丙嗪;氯氮草;有关物质;高效液相色谱法

Analysis of Related Substances Produced by Promethazine Hydrochloride and Chlordiazepoxide in Compound Bendazol and Hydrochlorothiazide Capsules

CHEN Xiao-ying(Fujian Vocational College of Bio-engineering, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the detection of related substance produced by promethazine hydrochloride and chlordiazepoxide in Compound bendazol and hydrochlorothiazide capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on ZORBAX SB-C₈ column with mobile phase consisted of 0.05 mol/L ammonium dihydrogen phosphate (pH 3.2)-methanol (gradient elution). The detection wavelength was set at 254 nm. According to the retention time of substance control, LC-MS method was adopted to determine the impurity of chlordiazepoxide, and the amount of related substance in 51 batches of samples from 10 manufacturers were calculated by normalization method of peak area. RESULTS: Main component was separated from related substance, and test component didn't suffered from the interference from blank excipients and other component. The detection limits of impurity in promethazine hydrochloride and chlordiazepoxide were 2.5 ng and 2 ng. 51 batches of samples showed that the amount of impurities by promethazine hydrochloride was in low level (less than 1%), and that of chlordiazepoxide was generally high (mostly between 2%-5%). The impurity of the latter was 7-chloro-5-phenyl-1,3,2 hydro-1,4 benzodiazepine-2-ketone (4-oxide). CONCLUSIONS: This method could be used for detecting the related substances produced by promethazine hydrochloride and chlordiazepoxide in Compound bendazol and hydrochlorothiazide capsules.

KEYWORDS Compound bendazol and hydrochlorothiazide capsules; Promethazine hydrochloride; Chlordiazepoxide; Related substances; HPLC

复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊为复方降压药,是多组分复方制剂,其主要成分为:地巴唑、盐酸异丙嗪、磷酸氯喹、硫酸胍生、维生素B₆、氯化钾、利血平、氯氮草、氢氯噻嗪、乳酸钙、维生素B₁、三硅酸镁。国内文献多见其各主成分的含量测定^[1-5],而未见对其有关物质的分析。笔者对该制剂的有关物质进行了初步研究,结果发现与高慧钦^[6]报道相似,盐酸异丙嗪和氯

氮草性质不太稳定。为此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法对该制剂中盐酸异丙嗪和氯氮草产生的杂质进行了分析,并对市售的不同企业的51批产品进行了分析检测,为其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

书[S].2010-08-20.

[6] 彭燕,张玲莉,刘红.鲎试剂法检测盐酸多普沙仑注射液中细菌内毒素的可行性[J].中国药师,2013,16(11):1743.

*讲师,工程师,硕士。研究方向:高职药理学课程教学、药物合成、分离纯化、药品质量控制。E-mail:80597194@qq.com

[7] 曹春雨,刘婷,郭静,等.显色基质法检测6种中药注射液内毒素含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):88.

[8] 李荣,吴玲.动态浊度法检测乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的细菌内毒素[J].中国药房,2012,23(9):837.

(收稿日期:2014-01-13 修回日期:2014-03-06)