

氢溴酸山莨菪碱注射液细菌内毒素检查法的建立

张娟*, 祝清芬, 范治云, 史国生(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4285-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.19

摘要 目的:建立氢溴酸山莨菪碱注射液的细菌内毒素检查方法。方法:按《中国药典》2010年版(二部)附录相关方法确定本品细菌内毒素限值,分别进行细菌内毒素检查凝胶法和动态浊度法的干扰试验。结果:凝胶法结果表明,样品稀释2倍(5 mg/ml)时对试验无干扰作用;动态浊度法结果表明,本品稀释2倍(5 mg/ml)时外加内毒素的回收率在50%~200%之间。每1 mg氢溴酸山莨菪碱中含内毒素应小于0.35 EU。结论:本文初步建立的氢溴酸山莨菪碱注射液细菌内毒素检查方法,可为《中国药典》增订该制剂的细菌内毒素检查项提供参考。

关键词 氢溴酸山莨菪碱注射液;细菌内毒素检查;干扰试验;凝胶法;动态浊度法

Establishment of Bacterial Endotoxin Test Method for Anisodamine Hydrobromide Injection

ZHANG Juan, ZHU Qing-fen, FAN Zhi-yun, SHI Guo-sheng (Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the bacterial endotoxin test method of Anisodamine hydrobromide injection. METHODS: The limit of bacterial endotoxin for this product was determined according to the appendix of second part of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). The interference test of bacterial endotoxin examination was studied respectively by gel-clot test and kinetic turbidimetric test. RESULTS: Results of gel-clot method showed the sample had no interference effect on the test after diluted to 2 times (5 mg/ml) of its original volume. Results of kinetic turbidimetric test showed that the recovery of the added endotoxin in the sample solution was 50%-200% when the sample was diluted to 2 times (5 mg/ml) of its original volume. The content of endotoxin should be lower than 0.35 EU in each 1 mg anisodamine. CONCLUSIONS: The established bacterial endotoxin test method of Anisodamine hydrobromide injection can provide a reference for revising and adding bacterial endotoxin inspection item of *Chinese Pharmacopoeia*.

KEYWORDS Anisodamine hydrobromide injection; Bacterial endotoxins test; Interference test; Gel-clot test; Kinetic turbidimetric test

氢溴酸山莨菪碱是一种抗胆碱药,是从茄科植物山莨菪根中提取到的一种生物碱的氢溴酸盐,能解除平滑肌痉挛、抑制腺体分泌、扩大瞳孔、改善微循环^[1-2]。同时,氢溴酸山莨菪碱还有利于增强巨嗜细胞的功能、促进巨嗜细胞系统清除内毒素、减轻炎症介质反应、提高细胞免疫功能、增加补体含量,有利于炎症消退^[3]。氢溴酸山莨菪碱注射液已被2010年版《中国药典》记载,但未见其细菌内毒素的检测质量标准。为此,笔者按照2010年版《中国药典》(二部)附录收录的方法^[4],分别采用凝胶法和动态浊度法进行干扰试验,初步建立了氢溴酸山莨菪碱注射液的细菌内毒素检查法。

1 材料

1.1 仪器

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(天津大学天发科技有限公司); ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂)。

1.2 药品与试剂

氢溴酸山莨菪碱注射液(国内某公司,批号:120602,规格:1 ml:10 mg);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201174,规格:每支160 EU);鲎试剂a(湛江博康海洋生物有限公司,批号:1206092,灵敏度:0.125

EU/ml);鲎试剂b(批号:1211201,灵敏度:0.25 EU/ml)、细菌内毒素检查用水(简称BET水,批号:1209030,规格:每支5 ml)、动态浊度法鲎试剂(批号:1301212,可测内毒素范围:0.01~10 EU/ml,规格:每支1.25 ml),均为湛江安度斯生物有限公司产品。

2 方法^[4-5]与结果

2.1 细菌内毒素检查限值(L)的计算

根据公式 $L=K/M^0.75$,注射剂 $K=5\text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, M 为人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量。根据氢溴酸山莨菪碱注射液说明书^[6],本品静脉滴注成人每次10~40 mg,小儿每千克体质量0.3~2 mg,每隔10~30 min重复给药,也可将本品5~10 mg加于5%葡萄糖注射液200 ml中静脉滴注,随病情好转可延长给药间隔,直至停药,情况无好转可酌情加量。 $M=7\times 2\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})=14\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,即为0.35 EU/mg。本品的限值设为每1 mg氢溴酸山莨菪碱含内毒素应小于0.35 EU。

2.2 凝胶法

2.2.1 干扰预试验。2批鲎试剂灵敏度经复核均符合规定。目前市售鲎试剂灵敏度一般在0.5~0.03 EU/ml,根据最大有效稀释倍数(MVD)= cL/λ ,供试品有效稀释倍数范围为7~116倍。在进行方法学验证时采用从较高浓度开始的方法,先用BET水将其依次稀释为2、4、8、16、32倍系列浓度的溶液,将此系列浓度的溶液记为NPC;用上述稀释液作为溶剂,分别制

*药师,硕士。研究方向:药品检验、药理学、药物安全性评价。电话:0531-81216519。E-mail:zhangjuan1357@163.com

得每个稀释液中细菌内毒素含量均为 2.0λ (0.25 EU/ml 适用于鲎试剂 a, 0.5 EU/ml 适用于鲎试剂 b) 的含样品内毒素溶液, 记为 PPC; 分别用上述 2 个厂家的鲎试剂考察上述浓度稀释液的干扰情况, 每一浓度做 2 管, 同时做阴性对照 (NC) 和阳性对照 (PC)。结果表明, 氢溴酸山莨菪碱注射液稀释 2、4、8、16、32 倍浓度下对反应均无干扰作用, 结果见表 1 (表 1 中“-”表示阴性, “+”表示阳性, 其余表同)。

表 1 凝胶法干扰预试验结果

Tab 1 Results of preliminary interference test of gel-colt method

批号	系列	供试品稀释倍数					PC	NC
		2	4	8	16	32		
1206092	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++	++	++		
1211201	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++	++	++		

2.2.2 干扰试验。根据预试验结果, 采用 2 倍供试品稀释液进行干扰试验。用 BET 水和供试品原液将同一支细菌内毒素工作标准品分别制成含细菌内毒素 2.0λ 、 1.0λ 、 0.5λ 、 0.25λ 4 种浓度的内毒素溶液, 即 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 EU/ml (前 4 个浓度适于鲎试剂 b, 后 4 个浓度适于鲎试剂 a), 分别用上述 2 个厂家的鲎试剂观察供试品在稀释 2 倍时对试验的干扰情况, 每一浓度平行做 4 管, 同时另取 BET 水和供试品稀释液各做 2 支 NC 管, 结果见表 2 (表中 E_s 为用 BET 水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值, E_t 为用供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值)。

表 2 凝胶法细菌内毒素干扰试验结果

Tab 2 Results of interference test of gel-colt method

鲎试剂批号	水及供试品批号	内毒素浓度, EU/ml				NC	结果, EU/ml
		2.0λ	1.0λ	0.5λ	0.25λ		
1206092	BET 水	++++	++++	+++	----	--	$E_s=0.07$
	120602	++++	++++	---	----	--	$E_t=0.11$
1211201	BET 水	++++	++++	+++	----	--	$E_s=0.15$
	120602	++++	++++	---	----	--	$E_t=0.25$

表 2 结果表明, E_s 均在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间, 供试品 E_t 均在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$ 之间, 供试品 2 倍稀释液 (5 mg/ml) 对试验无干扰作用。

2.3 动态浊度法

2.3.1 细菌内毒素标准曲线的建立和可靠性分析。取细菌内毒素工作标准品 1 支, 用 BET 水溶解、稀释, 使其最终细菌内毒素浓度分别为 2.0、0.5、0.125、0.031 25 EU/ml。各取 0.1 ml, 分别加到预先加有 0.1 ml 动态浊度法鲎试剂的反应管内, 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 NC 管。将内毒素浓度 (c) 与反应时间 (t) 的 lg 值进行回归, 得回归方程为 $\lg t = -0.236 9 \lg c + 2.812 3$ ($r = -0.998 9$, 绝对值应大于 0.980)。平行管之间的 RSD 均小于 10%, NC 的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间, 细菌内毒素标准曲线成立, 结果详见表 3。

2.3.2 干扰试验。根据标准曲线内毒素浓度的设置, 选择 0.25 EU/ml 作为靠近曲线中点的内毒素浓度 (λ_m)。用 BET 水将供试品分别稀释为 2、4、8、16 倍, 作为供试品溶液 (A 液), 同时制备含上述供试品浓度并含内毒素浓度为 λ_m (0.25 EU/ml)

表 3 动态浊度法细菌内毒素标准曲线及可靠性分析 ($n=3$)

Tab 3 Standards curves of bacterial endotoxin and reliability analysis of kinetic turbidimetric test ($n=3$)

内毒素浓度, EU/ml	平均反应时间, s	RSD, %
2.0	829.67	2.24
0.5	928.67	3.15
0.125	2 859.67	5.66
0.031 25	3 197.67	6.57
0 (NC)	> 5 270	

的溶液 (B 液)。分别取上述各液 0.1 ml, 加至预先加有 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, 按标准曲线回归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。结果回收率均在 50%~200%, 表明供试品对试验无干扰作用, 详见表 4。

表 4 动态浊度法干扰试验结果 ($n=2$)

Tab 4 Results of interference test of kinetic turbidimetric method ($n=2$)

稀释倍数	A 液测定值, EU/ml	B 液测定值, EU/ml	回收率, %
2	<0.03	0.16	62
4	<0.03	0.15	60
8	<0.03	0.19	77
16	<0.03	0.21	85
BET 水	<0.03	0.19	76

3 讨论

细菌内毒素检查法因其具有简便、灵敏、快速、准确等优点, 已被广泛用于检查药品注射剂及其原料药和临床医疗器械中的致热物质, 并逐步替代传统的家兔法检查热原^[7]。凝胶法具有操作简单、对仪器要求低、经济实用性强等优点, 而动态浊度法的分析技术可最大限度地消除内毒素标准品对试验结果的影响^[8-9]。本试验中分别采用了凝胶法和动态浊度法对氢溴酸山莨菪碱注射液进行了干扰试验, 结果一致。

目前国家食品药品监督管理总局只批准了两个厂家生产氢溴酸山莨菪碱注射液, 其中有一个厂家已停止生产, 故本文只选取了一个厂家的样品进行试验。

根据试验结果, 可初步建立氢溴酸山莨菪碱注射液细菌内毒素检查标准: 取本品, 依法检查 [2010 年版《中国药典》(二部) 附录 XIE], 每 1 mg 氢溴酸山莨菪碱中含内毒素应小于 0.35 EU。

参考文献

- [1] 王伟, 孙为德. 电感耦合等离子体-原子发射光谱法间接测定氢溴酸山莨菪碱注射液 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 24(4): 183.
- [2] 殷立新, 亢泽坤, 张玉茹. 妊娠高血压综合症的药物治疗 [J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(2): 113.
- [3] 张玉. 氢溴酸山莨菪碱外敷治疗糖尿病足溃疡 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17(6): 615.
- [4] 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: 557, 附录 99-102.
- [5] 中国药品生物制品检定所. 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-

RP-HPLC法检查丁酸氯维地平原料药中的有关物质

熊野娟^{1*}, 陈秋芬², 姜玲², 沈国兵², 张军东^{2#} (1.上海医药高等专科学校, 上海 201318; 2.上海信谊药厂有限公司药物研究所, 上海 201206)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4287-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.20

摘要 目的:建立检查丁酸氯维地平原料药中有关物质含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry Shield™, 流动相为磷酸二氢钠水溶液与乙腈, 采用梯度洗脱, 流速为 1.2 ml/min, 检测波长为 220 nm, 进样量为 20 μl, 柱温为 35 ℃。分别采用不加及加校正因子的主成分自身对照法计算 3 批样品中 6 种及 1 种已知杂质(杂质 B、C、D、E、F、G 及 H)的量。结果:7 种杂质在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好(r 为 0.997~1.000); 回收率为 94.96%~97.79% (RSD 小于 4.7%, $n=3$); 丁酸氯维地平检测限为 5 ng, 杂质 B~H 的定量限依次为 4、4、8、8、4、8、8 和 8 ng; 3 批样品中均未检出杂质 B、C、D, 总杂质量小于 0.12%。结论:建立的方法简便、灵敏、准确, 可用于丁酸氯维地平原料药中有关物质的检查。

关键词 丁酸氯维地平; 有关物质; 反相高效液相色谱法

Determination of Related Substances in Clevidipine Butyrate Drug Substance by RP-HPLC

XIONG Ye-juan¹, CHEN Qiu-fen², JIANG Ling², SHEN Guo-bing², ZHANG Jun-dong² (1.Shanghai Institute of Health Sciences, Shanghai 201318, China; 2.Institute of Materia Medica, Shanghai Sine Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201206, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the content determination of related substances in clevidipine butyrate drug substance. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Symmetry Shield™ column with mobile phase consisted of sodium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.2 ml/min. The determination wavelength was set at 220 nm, and sample size was 20 μl. The column temperature was 35 ℃. The contents of 6 and 1 kinds of known impurities (impurity B, C, D, E, F, G and H) in 3 batches of samples were calculated by main component self-compare without or with calibration factor. RESULTS: 7 kinds of impurity from clevidipine butyrate revealed good linearity ($r=0.997-1.000$); average recoveries were 94.96%-97.79% (RSD<4.7%, $n=3$). The lowest detection limit of clevidipine butyrate was 5 ng, and the limits of quantity of impurities B-H were 4, 4, 8, 8, 4, 8 and 8 ng, respectively. Impurities B, C and D were not found in 3 batches of samples, and total amount of impurity was lower than 0.12%. CONCLUSIONS: Established method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the determination of related substances in clevidipine butyrate.

KEYWORDS Clevidipine butyrate; Related substance; RP-HPLC

丁酸氯维地平(Clevidipine butyrate)系第3代新型短效二氢吡啶类注射用钙通道拮抗剂,治疗不宜口服或口服无效的高血压患者,尤其是对手术期间血压急性升高的降压效果明显。地平类降压药是降压药中市场占有率最大、应用最广泛的药物^[1-2],由于丁酸氯维地平受到专利限制(商品名 Clevidiprex,注射乳剂,上市时间为2008年8月,临床用于降血压,尤其适用心脏手术期间的血压急性升高),国内外相关文献资料

极少,国内外药典也均未收载丁酸氯维地平原料药有关物质分析方法。随着其专利期临近,国内外会有更多关于丁酸氯维地平的研究陆续开展。为规范丁酸氯维地平原料药的合成与使用^[3-5],提高其相关制剂的安全性和有效性^[6-7],笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法检查丁酸氯维地平原料药中的有关物质,对丁酸氯维地平工艺中可能产生的工艺杂质和降解杂质等进行研究,并计算已知杂质相对于主成分的校正因

325.

[6] 成都第一药业有限公司. 氢溴酸山莨菪碱注射液说明书[S]. 2010-12-31.

* 讲师, 硕士。研究方向: 药物制剂与质量控制。E-mail: dai-syxyj@163.com

通信作者: 教授, 高级工程师, 博士。研究方向: 药学。E-mail: zhangjd534@163.com

[7] 周筱莉. 我国细菌内毒素检查法的应用进展[J]. 中国医药导报, 2010, 7(23): 14.

[8] 范治云, 王春芳, 张娟. 注射用雷贝拉唑钠细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药业, 2013, 22(15): 47.

[9] 范治云, 国明. 眼用平衡盐溶液细菌内毒素检查标准的制订[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(8): 454.

(收稿日期: 2014-02-13 修回日期: 2014-04-17)