

注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸内毒素检查方法的建立

厉青*, 陈娟红, 陆金花(武警浙江总队医院, 浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R927.12;R975.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2375-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.26

摘要 目的:建立注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸的细菌内毒素检查方法。方法:按2010年版《中国药典》附录细菌内毒素凝胶检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大无干扰浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至2.5 mg/ml及以下时,对细菌内毒素检查法无干扰作用。结论:所建立的方法可用于检查注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸的细菌内毒素。

关键词 注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test Method of Ademetionine 1,4-butanedisulfonate for Injection

LI Qing, CHEN Juan-hong, LU Jin-hua (Zhejiang Corps Hospital of Armed Police, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Ademetionine 1,4-butanedisulfonate for injection. METHODS: Maximum non-interference concentration of sample was determined by interference test according to endotoxin gel determination stated in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 2.5 mg/ml. CONCLUSIONS: Established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Ademetionine 1,4-butanedisulfonate for injection.

KEY WORDS Ademetionine 1,4-butanedisulfonate for injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot; Interference test

腺苷蛋氨酸是人体组织和体液中普遍存在的一种生理活性分子,其作为甲基供体(转甲基作用)和生理性巯基化合物(如半胱氨酸、牛磺酸、谷胱甘肽和辅酶A等)的前体(转巯基作用)参与了体内重要的生化反应。其在肝内通过使质膜磷脂甲基化而调节肝脏细胞膜的流动性,而且通过转巯基反应可以促进解毒过程中硫化产物的合成。只要肝内腺苷蛋氨酸的生物利用度在正常范围内,这些反应就有助于防止肝内胆汁淤积。因此,腺苷蛋氨酸适用于肝硬化前和肝硬化所致肝内胆汁淤积以及妊娠期肝内胆汁淤积的治疗。其静脉注射剂需进行热原限度的检查,一般采用家兔法检查,但该方法操作烦琐且受众多因素的干扰。而细菌内毒素检查法因操作简单、灵敏度高且经济适用,已广泛应用于静脉注射剂的热原检查。由于目前尚未见注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸细菌内毒素检查法的文献报道,故笔者通过试验探讨采用细菌内毒素凝胶检查法检测注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸中细菌内毒素的可行性,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

BET-32细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);BS-1300U型超净工作台(苏州净化设备有限公司);SC-101型鼓风电热恒温干燥箱(浙江嘉兴新腾电器设备有限公司);微量取液器(100~250 μ l,上海求精生化试剂仪器有限公司);玻璃器材包括试管、刻度吸管等均经250 $^{\circ}$ C干烤1 h除细菌内毒素处理。

1.2 药品与试剂

注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸(浙江海正药业股份有限公

司,批号:20120401、20120322、20120113,规格:每支500 mg);鲎试剂(TAL,湛江安度斯生物有限公司,批号:1010211,标示灵敏度 $\lambda=0.25$ EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1007121,标示灵敏度 $\lambda=0.25$ EU/ml);细菌内毒素工作标准品(CSE,批号:1010150,效价:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:0912150,每支:5 ml)均为湛江安度斯生物有限公司产品。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

根据2批鲎试剂灵敏度的标示值,将CSE用BET水溶解,置于漩涡混合器混合15 min,然后制成浓度为2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ (0.50、0.25、0.125、0.062 5 EU/ml)的CSE溶液。按2010年版《中国药典》附录鲎试剂灵敏度复核试验的方法操作^[1],结果2批鲎试剂灵敏度 λ 均在0.5 λ ~2.0 λ 范围内,均符合《中国药典》规定,详见表1(表中“+”表示反应为阳性,“-”表示反应为阴性,以下同)。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Recheck results of TAL sensitivity test

批号	内毒素浓度, EU/ml				λ , EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.062 5	
1010211	++++	++++	----	----	0.25
1007121	++++	++++	----	----	0.25

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定

根据2010年版《中国药典》细菌内毒素限值的确定可知: $L=K/M$ 。K为按规定的给药途径人用每kg体质量每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K=5$ EU/(kg·h);M为人用每kg体质量每小时的最高供试品剂量,从注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸的产品使用说明书可知其静脉注射最大用药剂量为1 000 mg,每天1次。以人均体质量按60 kg、静脉注射时间按1 h计算, $L=K/M=0.3$ EU/mg。根据《化学药品注射剂安全性检查

*药师。研究方向:医院药学。电话:0573-83600280。E-mail: zjjxliq@gmail.com

法应用指导原则》的要求^[1],本品安全系数定为2^[2],故 $L=0.15$ EU/mg。

2.3 供试品最小有效稀释浓度(c)的确定

目前用于药品检验的市售鲎试剂灵敏度一般为0.50~0.03 EU/ml。按2010年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定,最大有效稀释倍数(MVD)= cL/λ 。本品为注射用无菌粉末,MVD=1,则 $c=\lambda/L$, $L=0.15$ EU/mg。因此注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸进行细菌内毒素检测时,0.50~0.03 EU/ml的鲎试剂相对应的最小稀释浓度为3.33、1.67、0.83、0.42、0.20 mg/ml。本试验选用灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂,对应本品5 ml容量,则MVD为60倍。

2.4 供试品预干扰试验^[2-3]

取3批注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸各2瓶,均分2组,平行加BET水5 ml或注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸专用溶剂溶解,制成100 mg/ml的2组供试品原液,用BET水将供试品原液按10、20、30、40、50、60倍进行倍比稀释,制得10.0、5.0、3.3、2.5、2.0、1.67 mg/ml共6个质量浓度梯度的溶液,将此系列样品溶液记为NPC;用上述稀释液作为溶剂,分别溶解并稀释CSE,制得每个稀释度中细菌内毒素含量均为2.0 λ(0.50 EU/ml)的注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸溶液,含供试品溶液内毒素记为PPC;同时平行做阳性对照管PC及阴性对照管NC各2管,结果见表2、表3。

表2 样品干扰预试验结果(BET水)

Tab 2 Results of preliminary interference test of samples (BET water)

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC	
		10.0	5.0	3.3	2.5	2.0	1.67			
1010211	20120401	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--
	20120322	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--
	20120113	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--
1007121	20120401	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--
	20120322	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--
	20120113	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	--	--	--	--	--

表3 样品干扰预试验结果(专用溶剂)

Tab 3 Results of preliminary interference test of samples (special solvent)

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC	
		10.0	5.0	3.3	2.5	2.0	1.67			
1010211	20120401	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--
	20120322	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--
	20120113	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--
1007121	20120401	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--
	20120322	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--
	20120113	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--	--

由表2结果可知,完全用BET水溶解、稀释的供试品溶液对2个厂家的鲎试剂与细菌内毒素均会产生干扰作用。表3结果可知,3批供试品先用专用溶剂溶解,而后用BET水稀释到2.5 mg/ml或以下时,对2个厂家的鲎试剂与细菌内毒素反应无干扰作用。

2.5 供试品干扰试验

根据预干扰试验结果,取3个批号的注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸,先用专用溶剂溶解,制成100 mg/ml的供试品原液,而后用BET水稀释成2.5 mg/ml(40倍)的样品溶液;将CSE分别稀释成2 λ、1 λ、0.5 λ、0.25 λ,与2个厂家鲎试剂(λ为0.25 EU/ml)反应,按2010年版《中国药典》(二部)附录的细菌内毒素检查法进行干扰试验。通过试验结果计算 E_s (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)和 E_t (用供试品溶液制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值),计算公式^[1]分别为 $E_s=\lg^{-1}(\sum X_s/4)$ 和 $E_t=\lg^{-1}(\sum X_t/4)$,结果见表4。

表4 样品干扰试验结果

样品批号		内毒素浓度,EU/ml				NC	E_s 或 E_t , EU/ml	E_t/E_s
鲎试剂	供试品	0.5	0.25	0.125	0.0625			
1010211	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	20120401	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	20120322	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.2
1007121	BET水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	20120401	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	20120322	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.2
	20120113	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0

由表4结果可知, E_s 在2 λ~0.5 λ之间,且 E_t 在2 E_s ~0.5 E_s 之间,说明2.5 mg/ml的样品溶液对鲎试剂无干扰作用,可用于细菌内毒素检查。

2.6 样品细菌内毒素检查

取3个批号的注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸,先用专用溶剂溶解,制成100 mg/ml的供试品原液,而后用BET水稀释成2.5 mg/ml(40倍)质量浓度的样品溶液;使用λ=0.25 EU/ml的2个厂家的鲎试剂,按文献^[1]方法进行细菌内毒素检查,并按要求做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照,结果见表5。

表5 样品细菌内毒素检查结果

批号		供试品质量浓度,mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
鲎试剂	供试品					
1010211	20120401	2.50	--	++	++	--
	20120322	2.50	--	++	++	--
	20120113	2.50	--	++	++	--
1007121	20120401	2.50	--	++	++	--
	20120322	2.50	--	++	++	--
	20120113	2.50	--	++	++	--

由表5结果可知,供试品(NPC)和BET水(NC)阴性对照管均为阴性,表明样品中未检出细菌内毒素;供试品(PPC)和BET水(PC)阳性对照管均为阳性,表明试验有效。试验表明3个批次注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸的细菌内毒素检查均符合规定。

3 讨论

细菌内毒素检查法由于样品稀释浓度、鲎试剂生产工艺、

柱后衍生 HPLC 法测定血液制品中甘氨酸的含量

张彤^{1*}, 武晗燕¹, 张伟¹, 韩南银^{2#} (1.北京市药品检验所, 北京 100035; 2.北京大学医学部, 北京 100091)

中图分类号 R927.2; R977.4; R977.8 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2377-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.27

摘要 目的: 建立测定血液制品中甘氨酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。以邻苯二甲醛(OPA)为柱后衍生剂, 测定4种血液制品中的氨基酸与衍生剂衍生后所得衍生生产物的含量, 并与2010年版《中国药典》标准方法(柱前衍生法)比较。色谱柱为Thermo C₁₈, 流动相为柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0), 流速为1.0 ml/min, 柱温为60 ℃, 检测波长为336 nm, 内标(正缬氨酸)法定量。结果: 甘氨酸检测质量浓度线性范围为2~200 mg/L ($r=0.999\ 9$), 4种血液制品中甘氨酸的平均回收率分别为99.6%、98.5%、100.2%、98.6%, RSD分别为2.5%、0.3%、1.6%、2.2%, 定量限为20 ng。该法与标准方法测定含量结果基本一致。结论: 该方法灵敏度高, 结果准确可靠。

关键词 高效液相色谱法; 柱后衍生法; 血液制品; 甘氨酸; 邻苯二甲醛; 含量测定

Content Determination of Glycine in the Blood Products by HPLC with Post-column Derivatization

ZHANG Tong¹, WU Han-yan¹, ZHANG Wei¹, HAN Nan-yin² (1.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China; 2.Peking University Health Science Center, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of glycine in the blood products. METHODS: Using *O*-phthalaldehyde (OPA) as post-column derivating agent, the derivant content of derivating agent and amino acid of 4 blood products were determined by HPLC. It was compared with the pre-column derivatization stated in *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). The determination was performed on Thermo C₁₈ column with mobile phase composed of sodium citrate buffer (pH=4.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 60 ℃ and detection wavelength was 336 nm. The quantitative method was carried out by internal standard (norvaline). RESULTS: The linear range of glycine was 2-200 mg/L ($r=0.999\ 9$), and the recovery rates of 4 blood products were 99.6% (RSD=2.5%), 98.5% (RSD=0.3%), 100.2% (RSD=1.6%), 98.6% (RSD=2.2%). The limit of quantitation was 20 ng. The method was found to be basically in line with standard method. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and reliable.

KEY WORDS HPLC; Post-column derivatization; Blood products; Glycine; *O*-phthalaldehyde; Content determination

血液制品是在临床输血的基础上发展起来的一种药品, 其通过将血浆中的有效成分分离出来并用于治疗。2010年版《中国药典》(三部)中对血液制品的定义是^[1]: 由健康人血浆或经特异性免疫的人血浆, 经分离、提纯或由重组DNA技术制成的血浆蛋白组分, 以及血液细胞有形成分统称为血液制品, 如人血白蛋白、人免疫球蛋白、特异性免疫球蛋白、人凝血因子(天然或重组的), 用于治疗 and 被动免疫预防。血液制品

试验环境等各种因素的影响, 试验的结果会有所不同, 因此需要做干扰试验以排除各种因素的影响。在进行预干扰试验时, 单用BET水溶解、稀释会产生干扰, 而先用专用溶剂溶解后再用BET水稀释到2.5 mg/ml或以下时则无干扰。究其原因, 丁二磺酸腺苷蛋氨酸为酸性物质, 用BET水溶解后测得pH值约为3, 对鲎试剂和内毒素可产生干扰抑制作用^[1]; 丁二磺酸腺苷蛋氨酸专用溶剂的主要成分为氢氧化钠, 溶解后的pH值约为7, 对丁二磺酸腺苷蛋氨酸的pH值进行调节, 由此较好地排除了干扰^[1]。本试验采用2个不同厂家的鲎试剂($\lambda=$

* 副主任药师。研究方向: 药物分析。电话: 010-83222411。E-mail: zhangtong74@gmail.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 010-82801590。E-mail: nanyin.han@pku.edu.cn

的生产工艺从盐析法、利凡诺法发展到目前大多数企业采用的低温乙醇法或N-K(Nitschmann-Kistler)法^[2]。根据生产工艺和产品的稳定性等特性, 除人血白蛋白外, 多数血液制品如凝血因子类、人免疫球蛋白和特异性免疫球蛋白会添加一定量的氨基酸和/或糖类作为稳定剂。不同企业根据不同产品选择不同氨基酸作为稳定剂, 一般包括甘氨酸、精氨酸、盐酸赖氨酸和组氨酸, 其中最常用的是甘氨酸。甘氨酸作为目前药

0.25 EU/ml)对3个批号的样品进行试验, 将样品稀释至2.5 mg/ml及以下时, 不干扰细菌内毒素检查。因此, 注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

参考文献

- [1] 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99-102、212-213.
- [2] 吴寒寅, 孟德胜. 多种微量元素注射剂(II)细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药房, 2011, 22(5): 440.
- [3] 王贵英. 氯解磷定注射液细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药房, 2011, 22(45): 4 287.

(收稿日期: 2012-09-03 修回日期: 2012-11-10)