

复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液细菌内毒素检查方法研究

祝清芬^{1*},冯巧巧²,肖英¹,魏霞¹(1.山东省食品药品检验研究院,济南 250101;2.山东省食品药品监督管理局审评认证中心,济南 250013)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4742-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.45

摘要 目的:为建立复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液细菌内毒素检查的标准方法提供参考。方法:按2015年版《中国药典》(四部)要求确定复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液的细菌内毒素限值,并分别采用凝胶法与动态浊度法考察样品对细菌内毒素检查的干扰情况。结果:样品调节pH近中性后,采用上述两种方法在4倍稀释时对细菌内毒素检查均无干扰作用。结论:凝胶法与动态浊度法均可用于复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液的细菌内毒素检查。由于动态浊度法回收率波动大,建议采用凝胶法。**关键词** 复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液;细菌内毒素检查;干扰试验;凝胶法;动态浊度法

Study on the Test Method for Bacterial Endotoxin in Compound Amino Acids (15AA) and Dipeptide (2) Injection

ZHU Qingfen¹, FENG Qiaoqiao², XIAO Ying¹, WEI Xia¹(1.Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101; 2.Center for Drug Evaluation & Certification of Shandong FDA, Jinan 250013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for establishing the standard method for the bacterial endotoxin test in Compound amino acids (15AA) and dipeptide (2) injection. METHODS: The limit for bacterial endotoxin in Compound amino acids (15AA) and dipeptide (2) injection was designed according to Chinese Pharmacopoeia 2015 edition (four), and both gel-clot method and kinetic turbidimetric limulus test were conducted for detecting the samples' interference to bacterial endotoxin test. RESULTS: After being adjusted to a near neutral pH, samples showed no interfered to bacterial endotoxin in both methods when the sample was diluted to 4 times. CONCLUSIONS: Both gel-clot method and kinetic turbidimetric limulus test can be used for the bacterial endotoxin test in Compound amino acids (15AA) and dipeptide (2) injection. Gel-clot method is recommended due to the large fluctuations of recovery rate in kinetic turbidimetric limulus test.

KEYWORDS Compound amino acids (15AA) and dipeptide (2) injection; Bacterial endotoxin test; Interference test; Gel-clot method; Kinetic turbidimetric limulus test

复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液是一种肠外营养药,适用于不能口服或经肠道补给营养以及通过这些途径补给营养不能满足需要的患者^[1]。该药临床上为静脉给药,需对其细菌内毒素进行检查,而以往的该药细菌内毒素检查方法研究尚存在不完善之处。故本试验参照2015年版《中国药典》(四部)^[2]采用凝胶法与动态浊度法对复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液进行了细菌内毒素检查方法研究。

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型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液[青岛华仁药业股份有限公司,批号:B1406001、B1406002、B1406003,规格:500 ml:67 g(氨基酸/双肽)];凝胶法检查用鲎试剂(湛江安度斯生

Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER).Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms[S]. 1997.

- [4] 谢沐风.评日本“药品品质再评价”工程有感[C]//中国药理学杂志岛津杯全国药物分析优秀论文评选交流会议论文集.北京:中国药学会药物分析专业委员会,2005.
- [5] 国家食品药品监督管理总局.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[S].2014.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年

版.北京:中国医药科技出版社,2015:121.

- [7] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志,2009,40(12):946.
- [8] 金丽,古卓良,周国华.运用光纤药物溶出度实时测定仪评价缙沙坦胶囊的溶出行为[J].中国药房,2012,23(45):4278.
- [9] 方继辉,陈英.光纤药物溶出仪在线考察和评价头孢克洛颗粒溶出度[J].广东药学院学报,2012,28(4):375.

(收稿日期:2015-12-03 修回日期:2016-10-08)

(编辑:周 菁)

*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。Email:zhuqingfen73@163.com

物有限公司,批号:1403052,灵敏度:0.06 EU/ml;湛江博康海洋生物有限公司,批号:1301310,灵敏度:0.06 EU/ml);动态浊度法检查用鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1307110,灵敏度范围:10~0.01 EU/ml);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201377,规格:70 EU/支);细菌内毒素检查用水(BET水,湛江安度斯生物有限公司,批号:1406160,规格:5 ml/支)。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素限值(L)确定

该样品为大容量注射剂,按2015年版《中国药典》(四部)^[2]规定及委托方的要求,其L确定为0.50 EU/ml。

2.2 凝胶法^[2-3]

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核 按2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”项下对于鲎试剂灵敏度复核的要求,分别对两批鲎试剂进行灵敏度复核。结果,鲎试剂(1403052)的复核灵敏度 $\lambda_c=0.03$ EU/ml,鲎试剂(1301310)的复核灵敏度 $\lambda_c=0.125$ EU/ml,两批鲎试剂 λ_c 均在 $0.5\lambda\sim 2.0\lambda$ 之间,说明两批鲎试剂均可用于试验。

2.2.2 干扰预试验 目前市售鲎试剂灵敏度一般在 $0.5\sim 0.03$ EU/ml之间,根据最大有效稀释倍数(MVD)= L/λ (λ 指鲎试剂灵敏度),该样品可采用原液至16倍稀释液进行试验。采用批号为B1406001的样品进行预试验,结果见表1(注:“-”指凝胶形成阴性,“+”指凝胶形成阳性;“样品+2 λ ”指样品中加入2 λ 浓度的细菌内毒素标准品)。预试验结果说明样品对细菌内毒素检查具有明显抑制作用。考虑到其pH呈酸性,故采用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至近中性后重新进行预试验。结果显示,样品调节pH近中性后,在2倍稀释时对试验存在干扰作用,而在4倍稀释时即对试验无干扰作用。

表1 凝胶法细菌内毒素检查干扰预试验结果

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

是否调节pH	鲎试剂批号	管号	样品稀释倍数			
			2	4	8	16
不调节pH	1403052	样品	--	--	--	--
		样品+2 λ	--	--	--	--
		1301310	样品	--	--	--
调节pH近中性	1403052	样品+2 λ	--	--	--	--
		样品	--	--	--	--
		1301310	样品	--	--	--
		样品+2 λ	--	++	++	++

2.2.3 干扰试验 根据预试验结果,用1 mol/L氢氧化钠溶液将样品调节pH近中性后,采用两批鲎试剂进行干扰试验,考察4倍稀释液对细菌内毒素检查的干扰情况。用BET水将细菌内毒素标准品复溶,并稀释制成含细菌内毒素2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4种浓度的细菌内毒素溶液,即浓度分别为0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 6 EU/ml(C液);并制备含有上述4种浓度细菌内毒素的样品4倍稀释液(B液)。分别采用上述两批鲎试剂考察样品对细菌内毒素检查的干扰情况,每一浓度平行做4管,同时取BET水(D液)和样品4倍稀释液(A液)各做2支阴性对照管。分别计算系列溶液C和B的反应浓度的几何平均值 E_s 和 E_t ,判断样品对细菌内毒素检查有无干扰作用,结果见表2。试验结果表明, E_s 均在 $0.5\lambda\sim 2.0\lambda$ 之间,3批样品 E_t 均在 $0.5 E_s\sim 2.0 E_s$ 之间,即调节pH近中性后样品4倍稀释液对凝胶法细菌内毒素检查无干扰作用。

2.3 动态浊度法^[2-4]

表2 凝胶法细菌内毒素检查干扰试验结果

Tab 2 Results of the interference test for bacterial endotoxin test by gel-clot method

鲎试剂	E_s ,EU/ml	E_t ,EU/ml		
		B1406001	B1406002	B1406003
1403052	0.03	0.03	0.03	0.03
1301310	0.125	0.125	0.125	0.125

2.3.1 制备标准曲线 用BET水将细菌内毒素标准品进行倍比稀释,使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,分别加入预先加有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进行检测(检测波长为405 nm),每一浓度重复4管,同时做阴性对照2管。以细菌内毒素浓度的对数(LgC)为横坐标、平均反应时间的对数(lgT)为纵坐标,绘制标准曲线(详见表3)。标准曲线回归方程为 $LgT=2.841 71-0.234 17LgC$ ($r=-0.992 1$,其绝对值应 > 0.980),平行管之间的RSD均 $< 10\%$,阴性对照的反应时间超过标准曲线最低浓度的反应时间,故该标准曲线符合规定。

表3 细菌内毒素标准曲线及可靠性(n=4)

Tab 3 Standard curve and reliability of bacterial endotoxin (n=4)

内毒素浓度,EU/ml	平均反应时间,s	RSD,%
2.0	616.50	1.50
0.5	786.25	1.57
0.125	1 072.25	1.92
0.031 25	1 640.50	3.56
0(阴性对照)	$> 3 600$	

2.3.2 干扰试验 根据标准曲线细菌内毒素浓度的设置,选择0.25 EU/ml作为靠近标准曲线中点的内毒素浓度(λ_m),取批号为B1406001的样品,调节pH近中性后,分别用BET水将样品稀释2、4、8倍,作为供试品溶液(A液);并分别用上述浓度的供试品溶液制备含细菌内毒素浓度为 λ_m (0.25 EU/ml)的溶液(B液)。分别取A、B溶液各0.1 ml,加入预先加有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A液和B液的细菌内毒素含量,并计算该试验条件下的回收率,结果见表4。结果表明,样品稀释2倍时,平均回收率在50%以下,说明在此稀释倍数下样品对细菌内毒素测定有抑制作用。而样品稀释4倍及以上时,平均回收率均在50%~200%,符合要求。说明干扰试验中可选择样品4倍稀释液。另取B1406002、B1406003两批样品,调节pH近中性后,分别制备A液和B液(4倍稀释),依法检查,平均回收率均在50%~200%,亦符合要求(见表4)。由此表明,样品在4倍稀释时对动态浊度法细菌内毒素测定无干扰作用。

表4 动态浊度法干扰试验及样品细菌内毒素测定结果(n=2)

Tab 4 Result of interference test and bacterial endotoxin test in samples by kinetic turbidimetric limulus test (n=2)

样品批号	稀释倍数	A液平均测定值,EU/ml	B液平均回收率,%	样品测定结果,EU/ml
B1406001	2	低于检测限	48	0.011 2
	4	0.099 8	191	0.399 2
	8	低于检测限	164	0.114 4
B1406002	4	0.206 9	180	0.827 6
B1406003	4	0.153 0	186	0.612 0

3 讨论

细菌内毒素检查方法包括凝胶法和光度测定法(定量

HPLC-ELSD法测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素的含量

李志得*,张彩云,汪霞(鄂州市食品药品检验检测中心,湖北鄂州 436099)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4744-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.46

摘要 目的:建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素含量的方法。方法:色谱柱为Dikma-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%二乙胺(70:30, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,进样量为10 μl。结果:琥乙红霉素检测进样量线性范围为1.216~7.296 μg($r=0.999\ 2$);定量限为0.304 μg,检测限为0.076 μg;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为97.59%~104.19%(RSD=1.71%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素的含量。

关键词 琥乙红霉素片;高效液相色谱法;琥乙红霉素;含量测定

Content Determination of Erythromycin Ethylsuccinate in Erythromycin Ethylsuccinate Tablet by HPLC-ELSD

LI Zhide, ZHANG Caiyun, WANG Xia(Ezhou Center for Food and Drug Control, Hubei Ezhou 436099, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of erythromycin ethylsuccinate in Erythromycin ethylsuccinate tablet. METHODS: The column of Dikma-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.05% diethylamine(70:30, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, column temperature was 30℃, and the sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of erythromycin ethylsuccinate was 1.216-7.296 μg ($r=0.999\ 2$); limit of quantitation was 0.304 μg, the limits of detection was 0.076 μg, respectively; the RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.0%, the average recoveries was 97.59%-104.19%(RSD=1.71%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with high sensitivity and reproducibility, and can be used for the content determination of Erythromycin ethylsuccinate tablet.

KEYWORDS Erythromycin ethylsuccinate tablet; HPLC; Erythromycin ethylsuccinate; Content determination

法),目前后者在检验、科研等领域得到了越来越多的应用^[5]。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细菌内毒素含量。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,以样品中加入细菌内毒素的回收率进行判断,若回收率在50%~200%之间,可认为样品对细菌内毒素测定无干扰^[6]。

凝胶法试验结果表明,复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液样品对细菌内毒素检查有干扰作用,这与相关文献报道一致^[7]。通过进一步探讨干扰作用的原因发现,主要与样品的酸碱性相关。将样品调节pH近中性后可基本排除干扰,但其2倍稀释液仍存在干扰,说明这种干扰作用也有其他因素参与。

在动态浊度法试验中,干扰情况与凝胶法基本相同,复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液样品调节pH近中性后,在4倍稀释时对细菌内毒素测定无干扰作用。但该试验中发现一个很奇怪的现象,在2倍稀释时样品仍存在明显的抑制作用,但样品在4倍稀释时对细菌内毒素测定有一定的增强作用。而试验过程中也出现过回收率超过200%的情况。同时,样品中测得的内毒素含量远远超出实际值,甚至出现样品不合格的情况。但通过进一步验证,采用2015年版《中国药典》(四部)规定的仲裁法凝胶法进行检验,样品中实际内毒素含量<0.25 EU/ml。出现这种现象的原因仍有待于进一步研究。鉴

于此,目前在样品实际检验过程中建议采用凝胶法。

本试验建立的复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液细菌内毒素检查方法如下:取本品,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH近中性,然后用BET水稀释至少4倍后,依照2015年版《中国药典》(四部)通则1143进行检查,本品每1 ml中含内毒素的量应<0.50 EU。

参考文献

- [1] 解晓帅,褚燕琦,白向荣,等.复方氨基酸(15)双肽(2)注射液临床应用药调查研究[J].药学实践杂志,2014,32(5):58.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:154-157,400-402.
- [3] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[M].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:310-321.
- [4] 魏霞,韩梅,韩瑶,等.血液滤过置换液的细菌内毒素检查法研究[J].中国药房,2013,24(29):2752.
- [5] 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.
- [6] 张娟,祝清芬,范治云.动态浊度法测定人參多糖注射液中细菌内毒素的含量[J].药学研究,2014,33(6):334.
- [7] 陈友爱,李鸣.复方氨基酸(15)双肽(2)注射液细菌内毒素检查法建立及方法学研究[J].海峡药学,2007,19(8):71.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-09-14)

(编辑:周 箐)

*副主任技师。研究方向:抗菌药物及中药检验。电话:0711-3863027。E-mail:Lzd-5@163.com