

布洛芬氯化钠注射液细菌内毒素检查方法的建立

詹晓亮^{1*}, 郭健², 苑新星¹, 马军芳¹(1.沈阳格仕特医药科技有限公司, 辽宁本溪 117004; 2.沈阳兴齐眼药股份有限公司, 沈阳 110163)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0419-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.37

摘要 目的:建立布洛芬氯化钠注射液细菌内毒素的检查方法。方法:按2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”项下凝胶法的要求,通过干扰试验确定样品主成分最大无干扰质量浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至含布洛芬质量浓度为1 mg/mL及以下时对细菌内毒素检查无干扰作用。结论:所建立的方法可用于布洛芬氯化钠注射液的细菌内毒素检查,其细菌内毒素限值确定为0.5 EU/mL。

关键词 布洛芬氯化钠注射液;细菌内毒素检查;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test Method of Ibuprofen Sodium Chloride Injection

ZHAN Xiaoliang¹, GUO Jian², YUAN Xinxing¹, MA Junfang¹(1.Shenyang Greatest Pharmaceutical Tech. Co., Ltd., Liaoning Benxi 117004, China; 2.Shenyang Sinqi Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110163, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the bacterial endotoxin test of Ibuprofen sodium chloride injection. METHODS: Maximum noninterference concentration of sample was determined by interference test according to bacterial endotoxins gel-clot test stated in the general principles 1143 of *Chinese Pharmacopoeia* 2015 edition (four). And then methodology validation was conducted. RESULTS: Samples were diluted to 1 mg/mL, which did not interfere with bacterial endotoxin test. CONCLUSIONS: The established method can be used for the bacterial endotoxin test of Ibuprofen sodium chloride injection, and the limitation of bacterial endotoxin was 0.5 EU/mL.

KEYWORDS Ibuprofen sodium chloride injection; Bacterial endotoxin test; Interference test

布洛芬为非甾体类解热镇痛抗炎药,具有较强的抗炎、抗风湿及解热镇痛作用,且胃肠道不良反应较轻,耐受性好,目前在临床中被广泛使用,主要应用的是其口服制剂。布洛芬氯化钠注射液是新近开发的注射制剂,能够进一步扩大该药的临床应用范围,更好地满足患者的治疗需求^[1]。本研究参考2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”项下凝胶法的要求^[2],建立了布洛芬氯化钠注射液细菌内毒素的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

BET-32型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);XK96型快速混匀器(江苏新康医疗器械有限公司)。试验用试管、刻度吸管等玻璃器材按规定清洗,于250℃干烤1h除去外源性内毒素。

1.2 药品与试剂

布洛芬氯化钠注射液(浙江省某制药企业,批号:13122321、13122421、13122422,规格:每100 mL含布洛芬0.4 g和氯化钠0.8 g);鲎试剂[TAL,福州新北生化工业有限公司,批号:13090812,标示灵敏度(λ):0.125 EU/mL;湛江安度斯生物有限公司,批号:1202171, λ :0.125 EU/mL,规格均为每支0.1 mL];细菌内毒素工作标准品

* 中级工程师。研究方向:药物制剂。电话:024-45595201。
E-mail:zhanxiaoliang@gmail.com

(CSE,批号:130531,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:13091402,规格:每支2 mL)均购自福州新北生化工业有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素限值(L)的确定

L按2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”规定的公式 $L=K/M$ 计算。式中, K 为人每1 kg体质量每1 h最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K=5$ EU/(kg·h)。 M 为人用每1 kg体质量每1 h的最大样品剂量,我国人均体质量按60 kg计算,该制剂用于镇痛时每次给药400~800 mg,每6 h一次,每次输注时间不少于30 min;用于发烧时每次给药400 mg,每4~6 h一次,或每次给药100~200 mg,每4 h一次,每次输注时间不少于30 min,即该制剂临床最大剂量为1 h使用800 mg(200 mL),故 $M=200$ mL/(60 kg·1 h)=3.33 mL/(kg·h)。则 $L=K/M=5$ EU/(kg·h)/3.33 mL/(kg·h)=1.5 EU/mL。

按照2015年版《中国药典》(四部)通则9301“注射剂安全性检查法应用指导原则”中的建议^[3],限值要求可适当严格,提高至计算值的1/3~1/2,以保证用药安全。本试验安全系数定为3,故 $L=1.5$ (EU/mL)/3=0.5 EU/mL。

2.2 TAL灵敏度复核

按照2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”规定,进行TAL的灵敏度复核。根据TAL的 $\lambda=0.125$ EU/mL,用BET水溶解CSE,并配制成含细菌内毒素 2.0λ 、 1.0λ 、 0.5λ 、 0.25λ (0.25、0.125、0.0625、0.03125 EU/mL)的系列浓度溶液。取复溶后的规格为每支0.1 mL的TAL原安瓿18管,其中16管分别加入0.1 mL不同浓度的细菌内毒素标准溶液,每个浓度平行4管;另外2管加入0.1 mL BET水作为阴性对照。取2批不同厂家的TAL分别进行试验,结果TAL灵敏度测试值(λ_c)均在 $0.5\lambda\sim 2.0\lambda$ 之间,表明2批TAL的灵敏度均与 λ 相符,可以用于细菌内毒素检查试验,结果见表1(注:“+”表示试剂形成凝胶且倒转不变形或滑落,即反应呈阳性;“-”表示未形成凝胶或凝胶不结实、变形并脱落,即反应呈阴性。以下各表同)。

表1 TAL的灵敏度复核试验结果

Tab 1 Results of TAL sensitivity recheck

TAL批号	λ , EU/mL	细菌内毒素浓度, EU/mL				阴性对照	λ_c , EU/mL
		0.25	0.125	0.0625	0.03125		
13090812	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
1202171	0.125	++++	++++	----	----	--	0.149

2.3 干扰预试验

目前市售TAL的 λ 通常为 $0.5\sim 0.03$ EU/mL,根据公式 $MVD=cL/\lambda$ 计算,则供试品最终对应有效稀释倍数范围为1~16倍。取样品(批号:13122321)适量,使用BET水稀释制成布洛芬质量浓度分别为4、2、1、0.5、0.25 mg/mL的系列溶液,标记为供试品阴性对照系列溶液(NPC系列,各2管);用上述系列溶液作为溶剂,分别溶解并稀释CSE,制得细菌内毒素含量均为 2.0λ 的供试品阳性对照系列溶液(PPC系列,各2管);同时做细菌内毒素阳性对照溶液(PC)和BET水阴性对照溶液(NC)各2管,然后按“细菌内毒素检查法”操作,进行干扰预试验,结果见表2。由表2可知,样品在稀释4倍及以上,即布洛芬质量浓度为1 mg/mL及以下时,2批TAL对细菌内毒素检查试验均没有干扰作用。

表2 样品干扰预试验结果

Tab 2 Results of preliminary interference test

TAL批号	系列溶液	稀释倍数					PC	NC
		1	2	4	8	16		
13090812	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	+	++	++	++	++	--
1202171	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	+	++	++	++	++	--

2.4 干扰试验

根据干扰预试验结果,将3批样品均照干扰预试验稀释方法制成含布洛芬质量浓度为1 mg/mL的供试品溶液,将CSE稀释制成含细菌内毒素 2.0λ 、 1.0λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的系列溶液,每个浓度平行4管,然后分别用 $\lambda=0.125$ EU/mL的2个厂家的TAL,按2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”项下的规定进行干扰试验。结果显示,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(E_s)均在 $0.5\lambda\sim 2.0\lambda$ 之间,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(E_t)均在 $0.5E_s\sim 2.0E_s$ 之间^[2-3]。表明在此试验条件下,样品对TAL与细菌内毒素的凝集反应无干扰作用,详见表3。

表3 样品干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test

TAL批号	样品批号	细菌内毒素浓度, EU/mL				NC	E_s , EU/mL	E_t , EU/mL
		0.25	0.125	0.0625	0.03125			
13090812	BET水	++++	+++	----	----	--	0.149	
	13122321	++++	+++	----	----	--		0.149
	13122421	++++	+++	----	----	--		0.177
	13122422	++++	++++	----	----	--		0.125
1202171	BET水	++++	+++	----	----	--	0.149	
	13122321	++++	+++	----	----	--		0.149
	13122421	++++	+++	----	----	--		0.177
	13122422	++++	+++	----	----	--		0.125

2.5 样品细菌内毒素检查

取3批样品各适量,照干扰预试验稀释方法制成含布洛芬质量浓度为1 mg/mL的供试品溶液,分别用 $\lambda=0.125$ EU/mL的TAL(批号:13090812),按照2015年版《中国药典》(四部)通则1143“细菌内毒素检查法”进行操作和结果判断,结果3批样品每1 mL中含细菌内毒素的量均小于0.5 EU,详见表4。

表4 样品细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test of sample

样品批号	NPC	PPC	PC	NC
13122321	--	++	++	--
13122421	--	++	++	--
13122422	--	++	++	--

3 讨论

布洛芬氯化钠注射液作为静脉用注射制剂,应设立细菌内毒素或热原检查项。一般利用TAL法或家兔法检查样品所含的细菌内毒素或热原是否符合限量规定,如果不合格,在临床应用时可能产生热原反应而造成严重的不良后果。鉴于布洛芬氯化钠注射液具有解热镇痛作用,若采用家兔热原检查法可能会因其药效学作用而出现假阴性结果^[4];而TAL细菌内毒素检查法具有方法简单、结果准确、成本低等优点,适用于该制剂的细菌内毒素检查,并且该方法已被广泛用于具有解热作用的注射剂及其原料药和临床医疗器械中的致热物质的检查^[5-7]。本试验初步建立了布洛芬氯化钠注射液的细菌内毒素检查法,并将其细菌内毒素限值确定为:取本品,依法检查(2015年版《中国药典》四部通则1143),每1 mL中含细菌内毒素应小于0.5 EU。

参考文献

- [1] 李健和,曹俊华,易利丹,等.布洛芬静脉注射制剂的开发与临床应用[J].中国新药与临床杂志,2011,30(8):584-587.
- [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.

HPLC法同时测定注射用三重霉素中普鲁卡因、二苄基乙二胺和青霉素的含量

陈汝红^{1*}, 窦永海², 靳英会³(1.河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2.天津市永久医院, 天津 300450; 3.石药集团中诺药业有限公司, 石家庄 050051)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0421-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.38

摘要 目的:建立同时测定注射用三重霉素中普鲁卡因、二苄基乙二胺、青霉素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为SinoChrom C₁₈,流动相为0.21 mol/L磷酸二氢钾溶液(含0.16%的三乙胺,氢氧化钾溶液调pH至5.6)-乙腈(81:19, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为215 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:普鲁卡因、二苄基乙二胺、青霉素检测质量浓度线性范围分别为0.011~0.64 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.013~0.80 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.075~4.50 mg/mL($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<0.70%;加样回收率分别为98.42%~101.51%(RSD=0.90%, $n=9$)、98.28%~101.50%(RSD=0.90%, $n=9$)、99.03%~101.11%(RSD=0.66%, $n=9$)。结论:该方法简便、准确,可用于注射用三重霉素中普鲁卡因、二苄基乙二胺和青霉素含量的同时测定。

关键词 注射用三重霉素;普鲁卡因;二苄基乙二胺;青霉素;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Procaine, Benzathine and Penicillin in Triple Penicillin for Injection by HPLC

CHEN Ruhong¹, DOU Yonghai², JIN Yinghui³ (1.Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.Tianjin Permanent Hospital, Tianjin 300450, China; 3.Zhongnuo Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang Pharmacy Group, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of procaine, benzathine and penicillin in Triple penicillin for injection. METHODS: HPLC was performed on the column of SinoChrom C₁₈ with mobile phase of 0.21 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (containing 0.16% triethylamine, adjusted pH to 5.6 by potassium hydroxide)-acetonitril (81:19, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 215 nm, column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear range was 0.011-0.64 mg/mL for procaine ($r=0.999\ 9$), 0.013-0.80 mg/mL for benzathine ($r=0.999\ 9$) and 0.075-4.50 mg/mL for penicillin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.70%; recoveries were 98.42%-101.51% (RSD=0.90%, $n=9$), 98.28%-101.50% (RSD=0.90%, $n=9$) and 99.03%-101.11% (RSD=0.66%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, and can be used for the simultaneous determination of procaine, benzathine and penicillin in Triple penicillin for injection.

KEYWORDS Triple penicillin for injection; Procaine; Benzathine; Penicillin; Content determination; HPLC

注射用三重霉素,又名强化苄星青霉素,为苄星青霉素、普鲁卡因青霉素、青霉素钠按国际单位比6:3:3混合的注射用无菌粉末。苄星青霉素为青霉素的二苄基乙二胺盐,普鲁卡因青霉素为青霉素的普鲁卡因盐,二者抗菌活性成分均为青霉素,肌肉注射后青霉素缓慢

释放并被吸收^[1]。苄星青霉素、普鲁卡因青霉素、青霉素钠血药浓度达峰时间分别为24 h、1~4 h、15~30 min^[2],三者混合使其具有长期、中期和即时起效的优势,可以维持1~4周血液中的有效浓度。《美国药典》^[3]分别采用碘量法和分光光度法测定苄星青霉素和普鲁卡因青霉

[3] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范:2010年版[M].北京:中国医药科技出版社,2010:310-321.

[4] 程春雷,高天勤,曹珍艳.注射用盐酸丙帕他莫的细菌内毒素检查[J].中国医药工业杂志,2011,42(3):219-221.

[5] 施敬云.对乙酰氨基酚注射液细菌内毒素检查法建立及

方法学研究[J].海峡药学,2009,21(10):35-37.

[6] 周继春.双氯芬酸钠注射液细菌内毒素检查法的建立[J].医药论坛杂志,2015,36(4):44-49.

[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):14-16.

(收稿日期:2016-01-31 修回日期:2016-12-14)

(编辑:周 箐)

*主任药师,硕士。研究方向:药品检验。电话:0311-85212007。E-mail:crh030227@sohu.com