

枸橼酸阿奇霉素注射液细菌内毒素检测法探讨

王艳萍,严晓鹏,薛万俐,赵立波(中国人民解放军第208医院,吉林 长春 130062)

摘要 目的:建立枸橼酸阿奇霉素注射液细菌内毒素的检测方法。方法:参照《中国药典》2000版细菌内毒素检查法进行干扰试验。结果:枸橼酸阿奇霉素注射液经1倍稀释后对细菌内毒素检查法无干扰作用。结论:对枸橼酸阿奇霉素注射液进行热源检查及细菌内毒素检查对比试验,两法符合率均为100%,细菌内毒素法可用于该制剂。

关键词 枸橼酸阿奇霉素注射液;细菌内毒素;干扰试验

中图分类号:R927.12 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2005)06-0362-03

Detection of bacterial endotoxin in azithromycin citrate injection

WANG Yan-ping, YAN Xiao-peng, XUE Wan-li, ZHAO Li-bo(208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

ABSTRACT Objective: To establish a detecting method for the bacterial endotoxin in the azithromycin citrate injection. **Methods:** The interference test was conducted with reference to Chinese Pharmacopoeia(2000ed) on BET. **Results:** There was no interfere effect in the detection for bacterial endotoxin in the azithromycin citrate injection which was dilated one time. **Conclusion:** The according rate is 100%, which make the pyrogen detection to the azithromycin citrate injection and experimentize contrast to the bacterial endotoxin.

KEY WORDS azithromycin citrate injection; bacterial endotoxin; interfer experiment.

阿奇霉素(azithromycin, AZM)为大环内酯类抗生素,广泛应用于呼吸道感染、皮肤及软组织感染和性传播疾病。鲎试剂用于内毒素的检测,具有操作简便,灵敏度高,重现性好,实用性强等优点。本文参照中国药典2000年版二部附录XI细菌内毒素检查法应用指导原则^[1],对枸橼酸阿奇霉素注射液进行了细菌内毒素检测法的探讨,并与热源检查法进行了对比研究。

1 实验材料

鲎试剂(福建省东方鲎试剂厂,规格0.1mL/支,灵敏度0.5EU/mL,批号:040316;厦门鲎试剂厂,规格0.1mL/支,灵敏度0.5EU/mL,批号:030625),细菌内毒素检查用水(简称BET水,福建省东方鲎试剂厂,批号:20031102,2mL/支),细菌内毒素国家标准品(中国药品生物制品检定所,规格9000EU/支,批号:981),枸橼酸阿奇霉素注射液(本院自制,批号:040309,040310,040311;规格:100mL:0.2g)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核 按中国药典细菌内毒素

检查法,以细菌内毒素检查用水将细菌内毒素国家标准品稀释成1.0、0.5、0.25、0.125EU/mL。将每支加入0.1mL待复核鲎试剂,每一浓度平行做4管,同时用细菌内毒素检查用水做2支阴性对照,结果与标示灵敏度相符,符合药典规定。

2.2 细菌内毒素限值(L)的确定 根据细菌内毒素限值公式 $L = K/M$, K (热原反应阈值)一般静脉注射剂为5EU/kg, M 为药品热源检查剂量,枸橼酸阿奇霉素注射液热源检查剂量为10mL/kg,则 $L = K/M = 5/10.0 = 0.5\text{EU/mL}$ 。

2.3 样品最大有效稀释倍数 根据样品最大稀释倍数 $MVD = L/\lambda$,其中 L 以EU/mL表示, λ 为鲎试剂灵敏度标示值,本试验使用鲎试剂灵敏度标示值为0.5EU/mL求得最大有效稀释倍数 $MVD = 0.5/0.5 = 1$ 。

2.4 干扰实验

2.4.1 预试验 取供试品(批号:040309)用细菌内毒素检查用水稀释成1、2、3、4、5倍稀释液。再用细菌内毒素检查用水将同一支细菌内毒素国家标准品分别稀释成1.0、0.5、0.25、0.125EU/mL的浓度,按鲎试剂灵敏度复核方法进行样品干扰预试验,结果见表1。从表中可看出稀释液浓度为1:1、1:2时均无干扰作用,1:1为最大不干扰浓度,测得鲎试剂 E_s 均在 $0.5 \sim 2.0\lambda$,且 E_i 在 $0.5 \sim 2.0E_s$ 。

表 1 供试品干扰预试验结果

稀释倍数	细菌内毒素浓度 (EU/mL)				阴性对照	供试品 阴性对照	E ¹³ 值 (EU/mL)
	1.0	0.5	0.25	0.125			
原液	----	----	----	----	----	----	>1.0 (E ₁ ²³)
1	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₁)
2	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₁)
3	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₁)
4	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₁)
5	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₁)
BET 水	++++	++++	----	----	----	----	0.5 (E ₂ ³¹)

注: ¹⁾ 细菌内毒素的含量, 用内毒素单位 (EU) 表示; ²⁾ 用供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点的几何平均值; ³⁾ 用 BET 水 (细菌内毒素检查用水) 制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值

2.4.2 干扰试验 选用 0.5EU/mL 灵敏度的鲎试剂, 将供试品稀释 1 倍后, 用两个厂家的鲎试剂分别对 3 批样品进行干扰试验, 结果见表 2。从表 2 可看出, 对供试品进行 1 倍稀释后可消除干扰。

表 2 干扰试验结果

鲎试剂来源	供试品	细菌内毒素浓度 (EU/mL)				阴性对照	E _i 值 (EU/mL)
		1.0	0.5	0.25	0.125		
厦门鲎试剂厂 (批号 030625)	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5 (E ₁)
	040309	++++	++++	----	----	--	0.5
	040310	++++	++++	----	----	--	0.5
	040311	++++	++++	----	----	--	0.5
福建省东方鲎试剂厂 (批号 040316)	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5 (E ₁)
	040309	++++	++++	----	----	--	0.5
	040310	++++	++++	----	----	--	0.5
	040311	++++	++++	----	----	--	0.5

2.4.3 正式试验 按照中国药典 2000 年版二部附录进行干扰试验, 取 3 个批号的样品, 用细菌内毒素检查用水稀释 1 倍, 再用细菌内毒素检查用水和上述稀释液将一支细菌内毒素国家标准品分别稀释成 1.0、0.5、0.25、0.125EU/mL 的浓度, 另取细菌内毒素检查用水和供试品做阴性对照, 按鲎试剂灵敏度复核方法进行试验。结果见表 3。

表 3 供试品干扰试验结果

供试品批号	细菌内毒素浓度 (EU/mL)				阴性对照	供试品 阴性对照	K ¹³ 值 (EU/mL)
	1.0	0.5	0.25	0.125			
040309	++++	++++	----	----	--	--	0.5 (E ₁)
040310	++++	++++	----	----	--	--	0.5 (E ₁)
040311	++++	++++	----	----	--	--	0.5 (E ₁)
BET 水	++++	++++	----	----	--	--	0.5 (E ₁)

注: ¹⁾ K 为每人每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量。

2.4.4 样品的细菌内毒素检测 将样品 1:1 稀释后, 用鲎试剂进行检查, 结果见表 4。典规定, 与鲎试剂法比较符合率 100%。

表 4 样品细菌内毒素检查结果

样品批号	样品	阳性对照	样品阳性对照	阴性对照
040309	--	++	++	--
040310	--	++	++	--
040311	--	++	++	--

2.5 家兔热源检查法 按《中国药典》2000 年版二部操作, 3 批样品进行热源检查, 结果均符合中国药

3 结论

本文按照《中国药典》2000 年版二部附录 XI 下细菌内毒素检查法应用指导原则的规定, 用两个厂家的鲎试剂进行了 3 个批号的供试品干扰试验, 结果表明, 枸橼酸阿奇霉素注射液内毒素限值为 0.5 EU/mL, 最大无干扰浓度为 1 倍稀释液, 即将检品稀释 1 倍后测定, 无干扰作用, 此法可替代热源检查。

参考文献:

- [1] 中国药典2000版. 二部[S]. 附录2000:85.
[2] 中华人民共和国国家药品监督管理局标准(试行), WS-509

- (X-434)-2001 阿奇霉素注射液
[3] 中国药品检验标准操作规范[S]. 2000:389.

收稿日期:2004-09-13

高效液相色谱法测定脑脉通口服液中的黄芪甲苷

王建核(浙江省余姚市人民医院,浙江 余姚 315400)

摘要 目的: 建立脑脉通口服液中黄芪甲苷的含量测定方法。**方法:** 采用高效液相色谱方法,以 YWG-C₁₈ 色谱柱为固定相;乙腈-0.15%磷酸(1:2)为流动相;UV 检测,检测波长为 205nm;流速为 1.0mL/min。**结果:** 回收率分别为 92.4%~97.3%。RSD 为 1.5%,能满足质量标准的控制要求。**结论:** 该方法简便可行,准确可靠

关键词 脑脉通口服液;黄芪甲苷;高效液相色谱法

中图分类号:R927.2 文献标识码:B 文章编号:1006-0111(2005)06-0364-02

Determination of astragaloside in Naomaitong oral liquid by HPLC

WANG Jian-he(People's Hospital of Yuyao, Yuyao 315400, China)

ABSTRACT Objective: To establish a HPLC method for determination of astragaloside in Naomaitong oral liquid. **Methods:** Astragaloside can be determined on YWG-C₁₈ with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.15% H₃PO₄ (1:2) and detected by UV at 205nm. **Results:** The average recovery was 92.4%~97.3%, RSD was 1.5%. **Conclusions:** The method is accurate and simple.

KEY WORDS Naomaitong oral liquid; Astragaloside; HPLC

脑脉通口服液是由生黄芪、红花、桃仁等多种中药材组方炮制而成的中药口服液。临床药理证明具有益气扶正;活血化瘀,改善脑微循环等作用,现在主要用于治疗脑梗塞等疾病。黄芪为组方中的主药,黄芪甲苷为其主要成分,药理试验证明^[1] 黄芪甲苷具有抗炎、降压、镇痛、镇静等作用,因此,黄芪甲苷作为脑脉通口服液主要功效成分,其含量的高低直接影响脑脉通口服液的质量。测定黄芪甲苷的方法有很多^[2],有薄层法和高效液相色谱法。但基本都是测定单味药材中的黄芪甲苷,复方中用高效液相色谱法测定黄芪甲苷未见报道。为有效控制脑脉通口服液的质量,对脑脉通口服液中黄芪甲苷进行了定性定量的研究,建立了高效液相色谱法鉴定黄芪质量及测定黄芪甲苷的方法

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪;配有 Waters-486 紫外可调波长检测器和 746 型数据处理系统。黄芪甲苷标准品(中国药品生物制品检定所),脑脉通口服

液(上海实业联合集团药业有限公司),乙腈(高效液相色谱级,上海国药集团化学试剂有限公司),乙醇(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司),磷酸(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司),D₁₀₁ 大孔树脂(天津市制胶厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters spherical C₁₈ 分析柱(5μm;150×3.9mm);流动相:乙腈-0.15%磷酸(1:2);流速:1.0mL/min;紫外检测波长 205nm

2.2 样品的制备 准确量取脑脉通口服液 200mL,将其加热浓缩至 5mL 左右,移至 25mL 量瓶中,用水定容到刻度,准确量取 5.0mL 加在 D₁₀₁ 大孔树脂柱(30×15mm),先用 50mL 水洗脱,再用 40% 的 50mL 乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸去溶剂,残渣用 5mL 流动相溶解,以备用。

2.3 流动相的选择 黄芪甲苷在紫外区吸收低(200.8nm),流动相只能选择乙腈系统。根据文献^[3] 所述,流动相中乙腈和水的比例为 2:1,因此流动相系统难以将黄芪甲苷与样品中的杂峰分离到基线,如减少乙腈的比例,保留时间增长,黄芪甲苷