

苯磺顺阿曲库铵注射液细菌内毒素检查法研究

陈青连, 姚 振, 冯 雅

(杭州澳亚生物技术有限公司, 浙江 杭州 310018)

摘要:目的 建立苯磺顺阿曲库铵注射液的细菌内毒素检查方法。方法 参考2015年版《中国药典(四部)》细菌内毒素检查方法,通过试验验证苯磺顺阿曲库铵注射液对细菌内毒素检查的抑制作用,用稀释剂I代替细菌内毒素检查用水(WBET)稀释供试品能消除苯磺顺阿曲库铵注射液对内毒素检查的抑制作用。结果 补充适量的二价离子可有效消除苯磺顺阿曲库铵注射液对细菌内毒素检查的抑制。结论 该品最大不干扰浓度为0.02 g/L,可采用凝胶法对苯磺顺阿曲库铵注射液细菌内毒素进行控制。

关键词:苯磺顺阿曲库铵;注射液;细菌内毒素;凝胶法;干扰试验

中图分类号:R927.11;R971+.8

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)09-0042-05

Bacterial Endotoxin Test for Cisatracurium Besilate Injection

CHEN Qinglian, YAO Zhen, FENG Ya

(Hangzhou Ausia Biological Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China 310018)

Abstract: Objective To establish a bacterial endotoxin test(BET) for Cisatracurium Besilate Injection. **Methods** According to the method of BET in *Chinese Pharmacopoeia* (Volume IV, 2015 edition), a test was conducted to verify the inhibitory effect of Cisatracurium Besilate Injection on BET. The inhibitory effect of Cisatracurium Besilate Injection on endotoxin test could be eliminated by replacing WBET diluted sample with diluent I. **Results** The inhibitory effect of Cisatracurium Besilate Injection on BET could be effectively eliminated by supplementing the right amount of divalent ions. **Conclusion** The maximum non-interference concentration of Cisatracurium Besilate Injection is 0.02 g/L, and the bacterial endotoxin of Cisatracurium Besilate Injection can be controlled by gel method.

Key words: cisatracurium besilate; injection; bacterial endotoxin; gel method; interference test

第一作者:陈青连,女,工程师,研究方向为药品注册和药品研发,(电话)0571-86878309(电子信箱)183883896@qq.com。

由于大枣中主要含有多糖^[3]等成分,对供试品的提取方法进行了更换溶剂及水解^[4-7]等多次试验,发现供试品溶液不稳定且阴性对照仍有干扰。大枣中含有齐墩果酸等多种有机酸与多种氨基酸类成分^[3],结合本制剂的工艺,经过多方试验,最终选用正丁醇-醋酸-水系统^[8]作为展开剂,茚三酮试液为显色剂,显色斑点清晰,稳定性与重复性均良好,阴性无干扰。本研究中对方法的耐用性进行了考察,在上述3种不同硅胶板展开后,供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,说明方法专属性、耐用性好。

3.3 6-姜辣素含量测定条件选择

干姜中最主要的辛辣成分为姜辣素,以6-姜辣素含量最大^[9]。参考2015年版《中国药典(一部)》干姜项下的含量测定项,对方中干姜的6-姜辣素的含量采用HPLC法进行考察。本研究中对提取溶剂和提取时间进行了考察,试验结果表明,70%乙醇超声提取20 min即可完全提取;并考察了甲醇-水(62:38)^[10]、甲醇-水(55:45)^[11]和乙腈-甲醇-水(40:5:55)3种流动相,结果发现,6-姜辣素的峰型有拖尾现象,对流动性稍加改进,采用乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(40:5:55)流动相,峰型较好,拖尾因子为1.0。

参考文献:

- [1] WS₃-B-0361-90,中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第二册)[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 张 采,李 佳,张永清. 大枣化学成分研究概况[J]. 中国现代中药,2016,13(11):49.
- [4] 王蓉珍,赵子青,林勤保,等. 大枣功效成分检测的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(4):423-426.
- [5] 赵 伟,王凤礼. 藿香正气丸的薄层色谱检测[J]. 黑龙江医药,2003,16(1):18-19.
- [6] 安 毅,周思丽,尤丽莎,等. 神怡颗粒的质量标准研究[J]. 中成药,2008,30(12):1781-1785.
- [7] 章春宇,庄 程,商 量. 养血饮口服液的质量标准[J]. 中国药师,2015,18(3):506-507.
- [8] 吕武清,龙新华. 中成药中的药材薄层色谱鉴别[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:44.
- [9] 钮翠然,陆 娟,宋丽丽,等. RP-HPLC法测定干姜中3种姜酚的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):2008-2010.
- [10] 陈 艳,周冬翠,张 梅. 三种方法提取生姜有效部位群并测定6-姜辣素含量[J]. 中国药师,2014,17(7):1099-1102.
- [11] 孟喜成,杨 青,王青兰. 高效液相色谱法测定十滴水中的6-姜辣素的含量[J]. 中国药物与临床,2012,12(2):188-189.

(收稿日期:2018-10-08)

苯磺顺阿曲库铵为神经肌肉阻滞剂,可在运动终板上与胆碱能受体结合,拮抗乙酰胆碱,从而产生竞争性的神经肌肉传导阻滞作用。本品由 GaxoWellcome 公司(葛兰素)于 1996 年首次在英国上市,商品名为赛机宁(Nimbex)。根据《注射剂安全性检查法应用指导原则》,静脉用注射剂均应设立细菌内毒素(或热原)检查项^[1],该品种及其注射剂已收载于 2015 年版《中国药典(四部)》。国内常采用凝胶法对注射用苯磺顺阿曲库铵进行细菌内毒素检查研究,国际通行光度法,而我国凝胶法使用较普遍,且 2015 年版《中国药典》也以凝胶法结果为准^[2]。本研究中采用凝胶法对苯磺顺阿曲库铵注射液进行了细菌内毒素方法学研究。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

XH-D 型涡旋混合器(上海允延仪器有限公司);N10 型试管恒温仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 试药

苯磺顺阿曲库铵(TEVA,批号为 4014A000117R,规格为原料);苯磺酸(Sigma-Aldrich,批号为 BCBR4713V,规格为辅料);苯磺顺阿曲库铵注射液(杭州澳亚生物技术有限公司,批号为分别 17121311,17121411,17121511,规格为每支 5 mL:10 mg)。细菌内毒素工作标准品(WSE,湛江安度斯生物有限公司,批号为 1708160,规格为 10 EU);鲎试剂(TAL;批号分别为 1607291 和 1704072、灵敏度为 0.25 EU/mL,批号分别为 1705243 和 1612283、灵敏度为 0.125 EU/mL,批号为 1712252、灵敏度为 0.06 EU/mL,湛江安度斯生物有限公司;批号为 17031712、灵敏度为 0.25 EU/mL,批号为 17060412、灵敏度为 0.125 EU/mL,批号为 17070112,灵敏度为 0.06 EU/mL;福州新北生化工业有限公司);细菌内毒素检查用水(WBET,批号为 1608010,规格为 5 mL),稀释剂 I(Buffer I,批号为 1702210,规格为 4.0 mL),均购于湛江安度斯生物有限公司。

2 方法与结果

2.1 预试验

苯磺顺阿曲库铵注射液由苯磺顺阿曲库铵、苯磺酸、注射用水组成。为苯磺顺阿曲库铵注射液细菌内毒素检查鲎试剂灵敏度的选择提供参考,分别采用不同厂家灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂对苯磺顺阿曲库铵及苯磺酸进行细菌内毒素检查,其中苯磺顺阿曲库铵细菌内毒素限值参考原料厂家(TEVA)为 4.94 EU/mg,苯磺酸细菌内毒素限值暂定为 10 EU/mg。采用不同厂家

灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂对苯磺酸细菌内毒素进行检查,结果均符合规定;采用湛江安度斯生物有限公司 0.25 EU/mL 的鲎试剂对苯磺顺阿曲库铵细菌内毒素进行检查,供试品阳性对照平行管均呈阴性,结果不符合规定。改用灵敏度为 0.125 EU/mL 的鲎试剂进行检查,试验结果均符合规定。

根据细菌内毒素验证方法学指导原则,注射用药品、生物制品建立细菌内毒素检查方法时,为验证不同样品和不同鲎试剂反应的一致性,要求同时使用 2 个厂家的鲎试剂对每个品种至少 3 批样品进行干扰试验,以确定该品种是否对内毒素和鲎试剂的反应存在干扰作用,以及能否使用内毒素检查法进行检验。综合考虑,拟采用灵敏度为 0.125 EU/mL 的鲎试剂对苯磺顺阿曲库铵注射液进行细菌内毒素干扰试验。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验 I

根据 2015 年版《中国药典(四部)》相关规定,当使用新批号的鲎试剂时,应进行鲎试剂的灵敏度复核试验。用 WBET 将 WSE 稀释成 2.0,1.0,0.5,0.25 λ 系列浓度后进行试验。结果表明,所用各批鲎试剂的复核灵敏度(λ_c)为 0.5~2.0 λ,可用于细菌内毒素检查。详见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验结果 I

鲎试剂 批号	标示 λ (EU/mL)	内毒素浓度(EU/mL)				NC	λ_c (EU/mL)
		0.25 (2.0 λ)	0.125 (1.0 λ)	0.0625 (0.5 λ)	0.03125 (0.25 λ)		
1705243	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
17060412	0.125	++++	++++	----	----	--	0.105

2.3 细菌内毒素限值(L)的确定

公式为 $L = K/M$,其中 L 为供试品的细菌内毒素限值,一般以 EU/mg 表示; K 为人每 1 kg 体质量每 1 h 最大可接受的内毒素剂量,以 EU/(kg·h)表示,注射剂 $K = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$; M 为人用每 1 kg 体质量每 1 h 的最大供试品剂量,以 mg/(kg·h)表示。根据苯磺顺阿曲库铵注射液原研药品说明书中的用法用量“按静脉输注给药,2 g/L 的顺阿曲库铵最大剂量为 9.0 μg/(kg·min),即 0.54 mg/(kg·h)。”计算确定 $L = 9.26 \text{ EU}/\text{mg}$ 。为保证药品质量及用药安全,应不高于临床用药计算的最大限制(9.26 EU/mg),故确定苯磺顺阿曲库铵注射液 L 值与 2015 年版《中国药典(二部)》注射用苯磺顺阿曲库铵质量标准中细菌内毒素的限值一致,即为 3.0 EU/mg。

2.4 干扰预试验 I

供试品最小有效稀释浓度计算:根据 L 值确定最小有效稀释浓度(C)公式为 $C = \lambda/L$ 。其中, C 为最小

有效稀释浓度; λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度。本验证方案拟采用标示灵敏度为0.125 EU/mL的鲎试剂, L 为3.0 EU/mg, $C=\lambda/L=0.042$ g/L。

试验方法:将供试品用WBET稀释至质量浓度为0.680,0.340,0.170,0.085,0.042 g/L,此系列质量浓度溶液记为NPC。同时在上述试验液中加入细菌内毒素标准溶液,使每个质量浓度的试验液中均含2 λ 浓度的细菌内毒素,此系列溶液记为PPC。取2.2项下2个厂家灵敏度为0.125 EU/mL的鲎试剂各64支,分别与上述2个系列溶液反应,每个浓度重复2管。每批鲎试剂作阴性对照(NC)和阳性对照(PC)。干扰预试验I结果见表2。可见,苯磺顺阿曲库铵注射液质量浓度为0.042 g/L时,对2个厂家的鲎试剂均无干扰作用,因此,正式干扰试验时,采用供试品质量浓度为0.042 g/L的溶液。

表2 干扰预试验I结果

鲎试剂 批号	供试品 批号	项目	供试品质量浓度(g/L)					NC	PC
			0.68	0.34	0.17	0.085	0.042		
1705243	17121311	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	--	++		
	17121411	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	--	++		
	17121511	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	--	++		
17060412	17121311	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	+	++		
	17121411	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	+	++		
	17121511	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		

2.5 正式干扰试验I

结果见表3。可见,WBET配制的内毒素溶液反应

表3 正式干扰试验I结果

鲎试剂 批号	供试品 批号	细菌内毒素浓度(EU/mL)				NC	E_s 或 E_t (EU/mL)	结果
		0.25 (2.0 λ)	0.125 (1.0 λ)	0.0625 (0.5 λ)	0.03125 (0.25 λ)			
1705243	17121311	----	----	----	----	--	—	有干扰
	17121411	----	----	----	----	--	—	有干扰
	17121511	----	----	----	----	--	—	有干扰
	WBET	++++	----	----	----	--	0.149	有干扰
17060412	17121311	++++	----	----	----	--	0.25	有干扰
	17121411	++++	----	----	----	--	0.25	有干扰
	17121511	++++	----	----	----	--	0.25	有干扰
	WBET	++++	++++	++++	----	--	0.063	有干扰

注: E_t 为以样品稀释液配制的细菌内毒素溶液反应终点浓度的几何均值。

终点浓度的几何平均值(E_s)在0.5~2.0 λ (包括0.5 λ 和2.0 λ)时,0.042 g/L的供试品溶液3批供试品的 E_t 值均不在0.5~2.0 E_s (包括0.5 E_s 和2.0 E_s)范围内,表明供试品在此质量浓度下有较强的干扰作用。当供试品对鲎试剂凝胶形成有影响时,为减少假阴性结果,可采用灵敏度小于0.125 EU/mL的鲎试剂^[3]。

2.6 鲎试剂灵敏度复核试验II

对标示灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂进行复核,结果表明所用各批鲎试剂的复核灵敏度 λ_c 均为0.5~2.0 λ ,可用于细菌内毒素检查。详见表4。

表4 鲎试剂灵敏度复核试验结果II

鲎试剂 批号	标示 λ (EU/mL)	内毒素浓度(EU/mL)				NC	λ_c (EU/mL)
		0.125 (2.0 λ)	0.0625 (1.0 λ)	0.03125 (0.5 λ)	0.015625 (0.25 λ)		
1712252	0.06	++++	++++	+++	----	--	0.05
17070112	0.06	++++	+++	----	----	--	0.07

2.7 干扰预试验II

采用标示灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂,最小有效稀释质量浓度 $C=0.02$ g/L。将供试品用WBET稀释至质量浓度为0.32,0.16,0.08,0.04,0.02 g/L,同2.4项下方法操作,取2.2项下2个厂家灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂各64支,分别与上述2个系列溶液反应,每个浓度重复2管,每批鲎试剂作NC和PC。干扰预试验结果符合标准规定。采用灵敏度0.06 EU/mL的鲎试剂对苯磺顺阿曲库铵注射液进行细菌内毒素方法学验证,干扰预试验结果表明,供试品对鲎试剂与内毒素的反应有较强的抑制作用。补充适量的二价离子可有效消除苯磺顺阿曲库铵对细菌内毒素检查的抑制作用^[4]。采用稀释剂I替代WBET制备供试品,预试验结果符合标准规定。

2.8 干扰预试验III

以稀释剂I替代WBET制备供试品,按2.6项下方法对供试品进行梯度稀释,采用灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂对3批苯磺顺阿曲库铵注射液进行干扰预试验,结果见表5。可见,供试品溶液质量浓度为0.02 g/L时对2个厂家的鲎试剂均无干扰。

2.9 正式干扰试验II

结果见表6。可见, E_s 在0.5~2.0 λ (包括0.5 λ 和2.0 λ)时,质量浓度为0.02 g/L的供试品溶液3批供试品的 E_t 值在0.5~2.0 E_s (包括0.5 E_s 和2.0 E_s)范围内,确认供试品在此浓度下无干扰作用。

2.10 供试品检验

取3批供试品各1瓶,用稀释剂I按上述方法分别

表5 干扰预试验Ⅲ结果

鲎试剂 批号	供试品 批号	项目	供试品溶液(g/L)					NC	PC
			0.32	0.16	0.08	0.04	0.02		
1712252	17121311	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++	--	++
	17121411	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		
	17121511	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		
17070112	17121311	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	--	++	--	++
	17121411	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		
	17121511	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	--	++		

表6 正式干扰试验Ⅱ结果

鲎试剂 批号	供试品 批号	细菌内毒素浓度/(EU/mL)				NC	Es或Et (EU/mL)	结果
		0.12	0.06	0.03	0.015			
1712252	17121311	++++	++++	----	----	--	0.06	无干扰
	17121411	++++	++++	----	----	--	0.06	无干扰
	17121511	++++	++++	----	----	--	0.06	无干扰
	WBET	++++	++++	++-	----	--	0.04	无干扰
17070112	17121311	++++	----	----	----	--	0.12	无干扰
	17121411	++++	----	----	----	--	0.12	无干扰
	17121511	++++	----	----	----	--	0.12	无干扰
	WBET	++++	++++	----	----	--	0.06	无干扰

表7 供试品检验结果

鲎试剂批号	供试品批号	供试品	供试品阳性	NC	PC	试验结果
1712252	17121311	--	++	--	++	符合规定
	17121411	--	++	--	++	符合规定
	17121511	--	++	--	++	符合规定
17070112	17121311	--	++	--	++	符合规定
	17121411	--	++	--	++	符合规定
	17121511	--	++	--	++	符合规定

配制成质量浓度为0.02 g/L的供试品溶液,以灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂依法检查。结果见表7。

3 讨论

2015年版《中国药典》热原物质检查有家兔检查法与细菌内毒素检查法^[5-6],前者试验灵敏度低、周期长、重复性差、检测成本高。与家兔检查法相比,细菌内毒素检查法具有检测灵敏度高、重复性好、检测成本低、结果准确等优点^[7-8]。用细菌内毒素检查法代替热原法也符合动物试验学的3R原则,故今后会得到广泛应用^[9]。

目前,细菌内毒素检查法使用较多的是凝胶限度法与动态浊度法。凝胶限度法无法对细菌内毒素进行定

量,仅根据是否超过限值作出判断。动态浊度法可通过反应曲线来获得细菌内毒素的量。随着国内外药品质量及安全性的提高,内毒素定量检测是大势所趋^[10-11]。

苯磺顺阿曲库铵注射液的细菌内毒素理论限值为9.26 EU/mg,《化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则》要求限值可适当严格至理论限值的1/3~1/2^[12],参考2015年版《中国药典》注射用苯磺顺阿曲库铵质量标准“每1 mg顺阿曲库铵含内毒素的量应小于3.0 EU”,因此采用内毒素限值L为3.0 EU/mg进行研究。2015年版《中国药典》要求供试品pH为6.0~8.0。且有学者认为,鲎试剂对供试品有一定的缓冲能力^[13]。苯磺顺阿曲库铵注射液的pH为3.0~3.8,经WBET稀释后,pH约为6.0,故本试验无须使用辅助试剂(如稀释剂Ⅱ)对供试品pH进行调节。

稀释剂Ⅰ是一种辅助剂,含有一定浓度的二价离子,可饱和枸橼酸盐的螯合反应,维持鲎试剂的正常灵敏度,并具有较强的pH缓冲能力,使反应介质保持反应所需的最佳pH。有研究中使用稀释剂Ⅰ制备供试品溶液,有效地消除了其对鲎试剂与内毒素的抑制作用^[14-15]。在以WBET制备苯磺顺阿曲库铵注射液供试品溶液时,正式干扰试验结果表明,苯磺顺阿曲库铵对鲎试剂与内毒素的凝集反应有较强的抑制作用。由表5可见,以稀释剂Ⅰ代替WBET,供试品溶液在0.02 g/L时对2个厂家的鲎试剂均无干扰作用。正式干扰试验用0.02 g/L供试品稀释液及2个厂家的鲎试剂,结果Es均为0.5~2.0 λ(包括0.5 λ和2.0 λ),Et为0.5~2.0 Es(包括0.5 Es和2.0 Es),说明苯磺顺阿曲库铵注射液在该浓度下无干扰作用。因此,可用凝胶法对苯磺顺阿曲库铵注射液进行细菌内毒素检查。

参考文献:

- [1] 祝清芬,魏霞.药品细菌内毒素检查法质量标准研究存在问题及对策[J].食品与药品,2017,19(4):287-289.
- [2] 唐先明,刘建辉,宋丽阳等.喘可治注射液细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2018,19(1):64-65.
- [3] 曾晓红.盐酸吡硫醇注射液pH值对细菌内毒素检查方法影响实验研究[J].海峡药学,2018,30(6):73-74.
- [4] 李树徐.注射用顺苯磺阿曲库铵细菌内毒素检测动态浊度法的研究[J].药物分析杂质,2014,34(2):340-341.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:154-157.
- [6] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[M].北京:中国医药科技出版社,2010:310-318.
- [7] 王婷婷,李豆,周瑞.盐酸伊立替康注射液的细菌内毒素检查方法研究[J].中国药业,2016,25(22):70-71.