

甲磺酸酚妥拉明注射液的细菌内毒素检查方法*

高锦¹, 付聪², 嵇扬¹, 聂渝琼¹, 胡丹¹, 徐江¹

(1. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 2. 解放军第 307 医院药学部, 北京 100071)

[摘要] 目的 建立甲磺酸酚妥拉明注射液细菌内毒素的检查方法。方法 采用 2005 年版《中华人民共和国药典》附录细菌内毒素检查法。结果 甲磺酸酚妥拉明注射液浓度 $\leq 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 用灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂检测细菌内毒素, 无干扰因素影响。结论 甲磺酸酚妥拉明注射液细菌内毒素限值确定为 $5.8 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 可应用鲎试剂进行细菌内毒素法检查。

[关键词] 酚妥拉明注射液; 甲磺酸; 细菌内毒素; 干扰实验

[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1004-0781(2009)01-0103-03

Method for Testing Bacterial Endotoxin in Phentolamine Mesilate Injection

GAO Jin¹, FU Cong², JI Yang¹, NIE Yu-qiong¹, HU Dan¹, XU Jiang¹ (1. Institute for Drug and Instrument Control of Health Department GLD of PLA, Beijing 100071, China; 2. Department of Pharmacology, the 307 Hospital of PLA, Beijing 100071, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for testing bacterial endotoxin in phentolamine mesilate injection.

Methods The method was set up accorded with the Chinese pharmacopoeia 2005 for bacterial endotoxin test. **Results** It was showed that the maximum noninterference concentration of phentolamine mesilate injection was $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the sensitivity of TAL was $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion** The results suggested that the bacterial endotoxin test is suitable for the detection of endotoxin in phentolamine mesilate injection and the limit for bacterial endotoxin is $5.8 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$.

KEY WORDS Phentolamine mesilate injection; Bacterial endotoxin test; Interfere factors test

甲磺酸酚妥拉明注射液是临床常用药, 为 α -受体阻滞药, 有血管舒张作用, 临床上用于血管痉挛性疾病^[1]。该药是 2005 年版《中华人民共和国药典》收录的品种, 原质量标准中无热原检查项, 对甲磺酸酚妥拉明注射液细菌内毒素检查方法的研究, 作者未见国内文献报道。为了更好的对该注射剂进行质量控制, 本研究参照 2005 年版《中华人民共和国药典》^[2] 附录细菌内毒素检查法, 对甲磺酸酚妥拉明注射液应用鲎试剂进行细菌内毒素检查的可行性做了研究。

1 药品与试剂

甲磺酸酚妥拉明注射液(上海旭东海普药业有限公司, 规格: 1 mL : 10 mg, 批号: 060201, 070101), 鲎试剂(简称 TAL, 厦门鲎试剂实验厂有限公司, 规格: 0.1 mL, 批号: 051033, 灵敏度: $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 湛江博康海洋生物有限公司, 规格: 0.1 mL, 批号: 0602240, 灵敏度: $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$); 细菌内毒素工作标准品(简称 WSE, 中国药品生物制品检定所, 效价: 每支 150 EU, 批号: 2003-3); 细菌内毒素检查用水(简称 BET 水, 中

66949079, E-mail: angelgaojin@163.com。

国药品生物制品检定所, 规格: 10 mL, 批号: 20060012)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定 根据本品说明书得知甲磺酸酚妥拉明注射液最大用法用量是用于防止皮肤坏死, 在每 1 000 mL 含去甲肾上腺素溶液中加入本品 10 mg 作静脉滴注。根据公式: $L = K/M$, 其中 M 为人用每千克体质量每小时最大供试品剂量, 即 $10 \text{ mg} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1})$; K 为人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量, $K = 5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 则限值 $L = 30 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 考虑到联合用药, 最终确定限值为 $5.8 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2 鲎试剂灵敏度复核 按照 2005 年版《中华人民共和国药典》^[2] 细菌内毒素检查法规定, 进行鲎试剂的标示灵敏度复核, 结果见表 1。2 批鲎试剂经检查 λ_c 与 λ 一致, 结果均符合规定。

2.3 干扰预实验

2.3.1 甲磺酸酚妥拉明注射液有效稀释浓度(maximum valid concentration, MVC)的计算 计算公式为 $MVC = \lambda/L$, 其中 L 为甲磺酸酚妥拉明注射液的细菌内毒素限值 $5.8 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, λ 为鲎试剂标示灵敏度, 目前市售鲎试剂灵敏度 λ 通常在 $0.03 \sim 0.50$

[收稿日期] 2008-03-04

[基金项目] * 国家药典委员会“注射剂标准提高计划”资助项目(基金编号: [2006]621)

[作者简介] 高锦(1972-), 女, 辽宁人, 副主任药师, 硕士, 研究方向: 药物分析与药检药理工作。电话: 010-

EU · mL⁻¹, 则甲磺酸酚妥拉明注射液的对应有效稀释

表 1 鲎试剂灵敏度复核

鲎试剂批号	标示灵敏度(λ)/ (EU · mL ⁻¹)	内毒素浓度				阴性对照(NC)	灵敏度(λc)/ (EU · mL ⁻¹)
		0.500 EU · mL ⁻¹	0.250 EU · mL ⁻¹	0.125 EU · mL ⁻¹	0.06 EU · mL ⁻¹		
051033	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
0602240	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25

“+”表示阳性,“-”表示阴性

浓度为: C_{0.5} = 0.086 mg · mL⁻¹; C_{0.25} = 0.043 mg · mL⁻¹; C_{0.125} = 0.022 mg · mL⁻¹; C_{0.06} = 0.011 mg · mL⁻¹; C_{0.03} = 0.005 4 mg · mL⁻¹。

2.3.2 实验操作 将甲磺酸酚妥拉明注射液样品(060201,070101)用 BET 水稀释至 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5, 0.156 mg · mL⁻¹ 的溶液, 将此系列浓度溶液记为 NPC (negative product control)。另制备同样系列浓度的供试液, 并使每一浓度的供试液中均含有 2λ(0.5 EU · mL⁻¹) 浓度的细菌内毒素, 记此系列溶液为 PPC (positive product control)。取灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂(批号:0602240), 分别与上述 PPC 和 NPC 进行反应, 每一浓度重复 2 管, 并设阳性对照记为 PC(positive control)和阴性对照记为 NC(negative control), 混匀后封口, 置 37 °C 恒温水浴 60 min, 结果见表 2。干扰预实验结果表明: 用灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂分别对 2 批甲磺酸酚妥拉明注射液进行细菌内毒素实验, 结果均在 ≤5 mg · mL⁻¹ 时无抑制干扰。

2.4 正式干扰实验 为了最终确认是否存在抑制因

素的影响, 进行正式干扰实验。取 2 批甲磺酸酚妥拉明注射液样品用 BET 水稀释至 0.5 mg · mL⁻¹, 用该浓度溶液和 BET 水分别将 WSE 稀释为含内毒素 0.5 (2λ), 0.25 (λ), 0.125 (0.5λ)、0.06 (0.25λ) EU · mL⁻¹ 的溶液, 与灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂反应, 每一浓度重复 4 管, 并设阴性对照, 按 2005 年版《中华人民共和国药典》^[2] 细菌内毒素检查供试品干扰实验项进行实验, 结果见表 3。正式干扰实验结果表明: 2 批甲磺酸酚妥拉明注射液浓度为 0.5 mg · mL⁻¹ 用 2 个厂家鲎试剂, 灵敏度均为 0.25 EU · mL⁻¹ 进行实验, 结果 E_s 均在 0.5 ~ 2.0 λ, E_t 均在 0.5 ~ 2.0 E_s 范围, 符合药典规定, 确认无干扰影响。

2.5 样品细菌内毒素检查 按 2005 年版《中华人民共和国药典》^[2] 细菌内毒素检查法, 将 2 批甲磺酸酚妥拉明注射液样品稀释至浓度为 0.5 mg · mL⁻¹, 用 2 个厂家灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂进行细菌内毒素检查, 结果见表 4。

3 讨论

由预干扰实验结果可知, 甲磺酸酚妥拉明注射液

表 2 甲磺酸酚妥拉明注射液干扰预实验

样品批号	样品浓度							NC	PC
	10 mg · mL ⁻¹	5 mg · mL ⁻¹	2.5 mg · mL ⁻¹	1.25 mg · mL ⁻¹	0.625 mg · mL ⁻¹	0.312 5 mg · mL ⁻¹	0.156 2 mg · mL ⁻¹		
060201								--	++
NPC	--	--	--	--	--	--	--		
PPC	--	++	++	++	++	++	++		
070101								--	++
NPC	--	--	--	--	--	--	--		
PPC	--	++	++	++	++	++	++		

“+”表示阳性,“-”表示阴性

表 3 甲磺酸酚妥拉明注射液的干扰实验

鲎试剂批号	样品	内毒素浓度				阴性对照 (NC)	E _s / (EU · mL ⁻¹)	E _t / (EU · mL ⁻¹)
		0.5 EU · mL ⁻¹	0.25 EU · mL ⁻¹	0.125 EU · mL ⁻¹	0.06 EU · mL ⁻¹			
0602240	水溶液	++++	++++	++++	----	--	0.125	
	060201	++++	++++	+++	----	--		0.18
	070101	++++	++++	+++	----	--		0.18
051033	水溶液	++++	++++	+++	----	--	0.15	
	060201	++++	++++	+++	----	--		0.21
	070101	++++	++++	+++	----	--		0.18

“+”表示阳性,“-”表示阴性

表 4 甲磺酸酚妥拉明注射液细菌内毒素检查

鲎试剂	样品	供试品 (NPC)	供试品阳性 对照(PPC)	阳性对照 (PC)	阴性对照 (NC)	结果
0602240	060201	--	++	++	--	符合规定
	070101	--	++	++	--	符合规定
051033	060201	--	++	++	--	符合规定
	070101	--	++	++	--	符合规定

“+”表示阳性,“-”表示阴性

浓度 $\leq 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂反应无抑制性干扰。正式干扰实验用浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品,2个厂家灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂,结果 E_s/E_t 均在 $0.5 \sim 2.0$ 范围内,确认无干扰影响。对2批甲磺酸酚妥拉明注射液依法检验,结果

均符合2005年版《中华人民共和国药典》^[2]规定。

实验结果证实,甲磺酸酚妥拉明注射液细菌内毒素限值确定为 $5.8 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,可应用鲎试剂进行细菌内毒素法检查。为提高药品标准,更有效的控制该药品质量,建议甲磺酸酚妥拉明注射液增加细菌内毒素检查项。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.01.040

[参考文献]

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].第16版.北京:人民卫生出版社,2007:342.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[Z].北京:化学工业出版社,2005:附录85-87.

高效液相色谱法测定咽舒饮合剂中绿原酸的含量*

程璐,徐宏峰,张耕

(武汉市第一医院制剂中心,武汉 430022)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定咽舒饮合剂中绿原酸的含量。方法 色谱柱为 Hypersil ODS 柱(4.6 mm×200 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.4%磷酸(9:91);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:327 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;灵敏度:0.10 AUFS。结果 绿原酸在 7.28~232.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好, $r=0.9999$,平均回收率为 98.6% ($RSD=1.31\%$),97.8% ($RSD=1.25\%$),99.5% ($RSD=0.96\%$)。结论 该方法操作简便,快捷,可靠性高,准确性和重复性好,其他组分对测定无干扰,可作为咽舒饮合剂的质量控制方法。

[关键词] 咽舒饮合剂;绿原酸;色谱法,高效液相

[中图分类号] R286;R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)01-0105-03

Determination of Chlorogenic Acid in *Yanshuyin* Mistura with HPLC

CHENG Lu, XU Hong-feng, ZHANG Geng (Center of Preparations, the First Hospital of Wuhan City, 430022, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for detecting chlorogenic acid in *yanshuyin* mistura with HPLC.

Methods Chlorogenic acid was assayed with Hypersil ODS column(4.6 mm×200 mm,5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid aqueous solution (9:91), The detective wavelength was 327nm, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. **Results** The calibration curve was linear in the range of 7.28-232.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with good linearity ($r=0.9999$). The average recovery ($n=3$) were 98.6% ($RSD=1.31\%$), 97.8% ($RSD=1.25\%$), 99.5% ($RSD=0.96\%$). **Conclusion** The method is convenient, accurate and reproducible, which can be used in quality control of *yanshuyin* mistura.

KEY WORDS *Yanshuyin* mistura; Chlorogenic acid; HPLC

咽舒饮合剂由金银花、麦冬、石斛、玄参、淡竹叶等9味药材组成,主要功效为清热解毒,利咽润喉,临床上用于治疗急慢性咽炎、干燥性咽炎。笔者以金银花中的抗菌活性成分绿原酸为指标,建立咽舒饮合剂的含量控制方法,为合理评价制剂质量提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津 LC-10AT,检测器 SPD-10A,浙大 N2000 色谱工作站);分析天平(Sartorius ME215S,d=0.01 mg);绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,含量测定用,批号:110753-200212);咽舒饮合剂(武汉市第一医院生产,批号:071120,071218,080130);乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均