

型生物细菌培养箱(浙江绍兴柯桥医疗器械厂);颠茄酊(广州星群药业公司,批号 0011001);羟苯乙酯(扬州星斗药业有限公司,批号 000322);氯仿(浙江迪耳药业有限公司,批号 980119);蒸馏水(本院自制);100mL 口服液塑料瓶(浙江台州新利达包装有限公司,批号 010803)。

1.2 实验方法

按表 1 处方 I、处方 II、处方 III(处方自拟)三种具体处方每次分别配制 1 000mL 并分装在 100mL 塑料瓶中,同时以单独灌装配制用蒸馏水作空白对照,根据国家标准^[3]分别检查微生物限度,结果见表 2。

表 1 三种不同颠茄合剂的处方组成

处方名称	颠茄酊 (mL)	防腐 剂			蒸馏水 (mL)
		氯仿 (mL)	羟苯乙酯 (g)	5% 羟苯乙酯 溶液 (mL)	
I	50	3mL	0.3g		加至 1 000
II	50			6	加至 1 000
III	50			10	加至 1 000

表 2 三种颠茄合剂处方微生物限度检查结果

实验日期	微生物限度检查结果(个/mL)			
	处方 I	处方 II	处方 III	空白对照
2002.5.25	<10	47	37	<10
2002.5.26	<10	43	30	<10
2002.5.27	10	53	33	<10
2002.5.28	13	50	37	<10
2002.5.29	<10	40	27	<10
2002.5.30	<10	50	40	<10

注:国家标准为“<100 个/mL”;统计处理时:<10 个/mL,以 10 个/mL 计。

1.3 结果处理

处方 I、处方 II、处方 III 的三组结果数据分别以 VAR0001、VAR0002、VAR0003 经 SPSS 统计软件作配对样本 T 检验,处理结果显示:处方 I 与处方 II 有极显著性差异($P < 0.01$),处方 II 与处方 III 有显著性差异($P < 0.05$),处方 I 与处方 III 有极显著性差异($P < 0.01$)。

2 讨论

水性液体药剂易被微生物所污染,特别是中草药的液体制剂更易生霉。即使是抗生素和一些化学合成的消毒防腐药的液体制剂,有时也会染菌生霉^[4]。为确保液体药剂质量,中国药典已规定了微生物限度标准,即在每克或每毫升液体药剂内细菌、霉菌、酵母菌数不超过 100 个,不得检出大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等控制菌^[3]。

本实验中,处方 I 与处方 II 相比,每 1 000mL 药液中另加了 3mL 氯仿作为防腐剂,微生物限度检查显示两者有极显著性差异;处方 III 与处方 II 相比,每 1 000mL 药液中防腐剂 5% 羟苯乙酯溶液由 6mL 增加至 10mL,微生物限度检查具有显著性差异;处方 III 中防腐剂羟苯乙酯的浓度虽比处方 I 中有所增加,但两者微生物限度检查仍有极显著性差异。结果显示,三种处方中,处方 I 防腐剂防腐作用最强,处方 III 次之,处方 II 防腐作用最弱。提示:0.3% 的氯仿伍用 0.03% 的羟苯乙酯有很强的防腐作用;羟苯乙酯在一定范围内浓度增加也能增强其防腐作用。

氯仿具有防腐和矫味作用,作为防腐剂,常用浓度为 0.3% ~ 0.5%,近来在内服液体药剂中已不多用,5% 羟苯乙酯溶液为一优良防腐剂,常用量为每 1 000mL 药液中 6 ~ 10mL(相当于羟苯乙酯 0.03% ~ 0.05%)^[2],为进一步确保颠茄合剂质量,是否可考虑增至 0.05%。

参考文献:

[1] 浙江省卫生厅. 浙江省医院制剂规范[S]. 浙江:浙江科学技术出版社,1998:54.
 [2] 中华人民共和国卫生部药政局. 中国医院制剂规范(西药制剂). 第 2 版[S]. 北京:中国医药科技出版社,1995:60,26.
 [3] 中国药典 2000 年版二部[S]. 2000:附录 92.
 [4] 奚念朱,顾学裘. 药剂学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1990:67.

收稿日期:2002-02-15

萃取除扰鲨试验检查盐酸普鲁卡因注射液细菌内毒素

张铭穷, 郑宏辉(中国人民解放军第 175 医院, 福建 漳州 363000)

摘要 目的:建立盐酸普鲁卡因注射液的细菌内毒素检查法,探讨萃取法排除鲨试剂与细菌内毒素凝集反应干扰因素的可行性。方法:利用普鲁卡因的脂溶性将普鲁卡因排除后行细菌内毒素检查法。结果:15 批盐酸普鲁卡因注射液中细菌内毒素均低于 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,真实地反映普鲁卡因注射液中细菌内毒素的污染程

度。结论:萃取法去除鲎试验干扰因素可扩大细菌内毒素检查法的应用范围。

关键词 盐酸普鲁卡因注射液;细菌内毒素;鲎试验;萃取法

中图分类号:R927.12 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2003)03-0153-04

Detecting bacterial endotoxin in procaine hydrochloride injection by limulus test after excluding interferential factor by extraction

ZHANG Ming-qiong, ZHEN Hong-hui(The 175th hospital of PLA, Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of detecting bacterial endotoxin (BET) in procaine hydrochloride injection, and to explore the feasibility of excluding interferential factor of limulus test by extraction. **METHODS:** After sodium hydroxide changed procaine hydrochloride into procaine, and chloroform extracted procaine, limulus test was performed. **RESULTS:** 15 batches of procaine hydrochloride injection were detected. The quantity of BET in each batch was less than $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, and their BET pollution degree were described truly. **CONCLUSION:** Extraction excluding the interferential factors of limulus test could widen range of application of BET examination.

KEY WORDS procaine hydrochloride injection; bacterial endotoxin; limulus test; extraction

盐酸普鲁卡因注射液是临床上常用药品,规格多种多样,浓度高达 $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高浓度的盐酸普鲁卡因可抑制鲎试剂与细菌内毒素凝集反应^[1], USP XXIII规定其细菌内毒素限值为 $0.6 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。张美丽^[2]等通过最大稀释倍数法排除干扰后采用灵敏度 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂进行检测(限值为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$)。笔者尝试萃取除扰鲎试验检测盐酸普鲁卡因注射液中细菌内毒素,以反映其实际水平。

1 仪器与试剂

XW-80A型旋涡振荡仪(上海医科大学仪器厂),恒温水浴箱(北京医疗设备厂)。鲎试剂(以下简称 TAL, 厦门鲎试剂厂,规格:0.1 mL,灵敏度: $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:011203、020810-5;灵敏度: $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:020105、020813); TAL(福州东方鲎试剂厂,规格:0.1 mL,灵敏度: $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:20 020103、20020811;灵敏度: $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:20011103、20020705),细菌

内毒素检查用水(以下简称 WB, 厦门鲎试剂厂,规格:2 mL,批号:20001205、20020115),细菌内毒素工作标准品(以下简称 BET, 厦门鲎试剂厂,规格:10 EU/支,批号:20010910)。注射用盐酸普鲁卡因(南京制药厂,批号:990501),活性炭(杭州木材总厂活性炭分厂,注射用,批号:20011110)。盐酸普鲁卡因注射液(规格:10 mL:100 mg, 15批,解放军第175医院制剂中心提供)。氢氧化钠、氯仿及其它试剂均为分析纯。试验所用器具和氢氧化钠均经 250°C , 1h 烘烤。

2 方法和结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

用 WB 将 BET 溶解并稀释成 2.0λ , 1.0λ , 0.5λ , 0.25λ 4 个浓度等级,按细菌内毒素检查法^[3]行灵敏度复核试验,复核灵敏度(λ_c)(见表1)均在 $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ 之间。

表1 鲎试剂灵敏度复核试验

TAL(λ) ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TAL 批号	WB 批号	BET 稀释级				阴性对照	λ_c ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
			2.0λ	1.0λ	0.5λ	0.25λ		
0.25	011203	20001205	++++	++++	----	----	--	0.25
	020810-5	20020115	++++	++++	----	----	--	0.25
	20020103	20020115	++++	++++	----	----	--	0.25
	20020811	20020115	++++	++++	----	----	--	0.25
0.125	020105	20020115	++++	++++	----	----	--	0.125
	020813	20020115	++++	+++	----	----	--	0.149
	20011103	20001205	++++	++++	----	----	--	0.125
	20020705	20020115	++++	++++	+-	----	--	0.105

2.2 样品的预处理

2.2.1 去热原氢氧化钠试液的制备 取去热原氢

氧化钠 0.05g,加 WB 溶解成 25mL,备用。

2.2.2 去热原盐酸普鲁卡因溶液的制备 将注射用盐酸普鲁卡因加入 0.1% 活性炭重结晶 2 次,105℃ 干燥,用 WB 制成 1% 溶液,灭菌后备用。

2.2.3 等当点的确定 精密量取去热原盐酸普鲁卡因溶液 5.0mL,加入氯仿 5mL 和酚酞指示液 2 滴,用去热原氢氧化钠试液滴定至水层微红色,读取氢氧化钠消耗量。

2.2.4 供试液的制备 精密量取去热原盐酸普鲁卡因溶液 5.0mL,加入 2.2.3 项下确定的去热原氢氧化钠试液的量和适量的 WB 使溶液成 10mL,再加入氯仿 5mL,旋涡振荡 2min,静置分层。取水层,40℃ 水浴以挥发微量氯仿,冷却作供试液。

2.3 干扰试验

分别用 WB 和供试液将同一支 BET 溶解并稀释成 2.0λ,1.0λ,0.5λ,0.25λ 等 4 个浓度溶液,按细菌内毒素检查法行干扰试验^[3]。结果表明(见表 2),供试液对凝集反应无干扰作用。

表 2 干扰试验结果

TAL	WB	Es (EU·mL ⁻¹)	Et (EU·mL ⁻¹)	阴性对照	结论
011203	20001205	0.25	0.21	--	无干扰
020810-5	20020115	0.25	0.25	--	无干扰
20020103	20020115	0.25	0.25	--	无干扰
20020811	20020115	0.25	0.25	--	无干扰
020105	20020115	0.149	0.125	--	无干扰
020813	20020115	0.125	0.125	--	无干扰
20011103	20001205	0.125	0.125	--	无干扰
20020705	20020115	0.125	0.105	--	无干扰

2.4 细菌内毒素回收试验

用 WB 将 BET 溶解并稀释成 2.0λ,1.0λ,0.5λ,0.25λ 4 个浓度等级;用去热原盐酸普鲁卡因溶液将同一支 BET 稀释成 4.0λ,2.0λ,1.0λ,0.5λ 4 个浓度等级,再按 2.2.4 项下制备回收液。分别取回收液和 BET 稀释液各 0.1mL 加入复溶后的鲎试剂原安瓿,每一浓度平行做 4 支。结果表明(见表 3),氯仿萃取过程中对药品的细菌内毒素浓度影响甚小。

表 3 细菌内毒素回收试验结果

TAL	WB	Es (EU·mL ⁻¹)	Et (EU·mL ⁻¹)	阴性对照
011203	20001205	0.25	0.25	--
020810-5	20020115	0.25	0.25	--
20020103	20020115	0.25	0.25	--
20020811	20020115	0.25	0.25	--
020105	20020115	0.125	0.125	--
020813	20020115	0.125	0.149	--
20011103	20001205	0.125	0.125	--
20020705	20020115	0.125	0.125	--

2.5 样品测试

精密量取盐酸普鲁卡因注射液 5.0mL,按 2.2.3 方法确定等当点后按 2.2.4 行样品预处理,并照中国药典(2000 年版二部)附录作细菌内毒素检查法检查^[3]。15 批经家兔法热原检查(10mg·kg⁻¹)合格的盐酸普鲁卡因注射液分别经灵敏度为 0.25EU·mL⁻¹ 和 0.125EU·mL⁻¹ 的鲎试剂检查,结果供试品均呈阴性,供试品阳性对照均呈阳性,盐酸普鲁卡因注射液中内毒素的污染量低于 0.25 EU·mL⁻¹。临床应用均未发生热原反应。

3 讨论

3.1 细菌内毒素对人体危害极大,药品生产应尽量避免其污染。但生产过程各个环节中均可发生污染。随着《药品生产质量管理规范》的实施,其污染程度可控制在较低水平。盐酸普鲁卡因注射液的制备工艺中,无论是原料,还是制剂,各环节污染细菌内毒素均可控。采用最大稀释倍数法虽能在高限值下控制细菌内毒素含量,但此标准一方面同与实际污染水平相差数倍,失去对生产过程中污染程度控制意义;另一方面高水平污染在临床合并用药^[4]或者用于诸如具有血浆内毒素水平较高的创伤性、感染性疾病患者^[5,6]时,有引起热原反应的危险。

3.2 细菌内毒素具吸附性。生产中常利用活性炭去除原辅料引入的细菌内毒素^[7],药品中细菌内毒素的污染主要与制剂生产操作有关。

3.3 萃取法消除鲎试验凝集反应的干扰因素尚未见报道。通过近等当量的氢氧化钠一面将普鲁卡因从盐酸普鲁卡因注射液中游离出来,一面调节供试液的 pH 7~8 适于鲎试验^[8]。细菌内毒素几不溶于氯仿,萃取不影响供试液中细菌内毒素的含量。盐酸普鲁卡因转化成氯化钠,可参照氯化钠注射液在较低限值行细菌内毒素检查法。

3.4 细菌内毒素检查中应注意操作和试剂污染。本实验中使用的氢氧化钠采用高温烘烤法破坏细菌内毒素;氯仿常用于血浆中细菌内毒素的测定^[9]。

参考文献:

[1] 何瑞卿,陈文声. 鲎试剂法检测盐酸普鲁卡因注射液中细菌内毒素含量[J]. 广东药学院学报,2001,17(2):117.
 [2] 张美丽,常美华. 盐酸普鲁卡因注射液的细菌内毒素干扰试验[J]. 天津药学,2001,13(1):54.
 [3] 中国药典 2000 年版(二部)[S],北京:化学工业出版社,2000,909.
 [4] 吴凌溪,李欣荣,楚敏,等. 鲎试剂检测减少临床热原反应的试验研究[J]. 中国海洋药物,1997,16(2):53.
 [5] 林洪远,姚咏明. 创伤早期内毒素血症[J]. 中国危重病急救医学,1998,10(12):719.

(下转第 170 页)

品相应位置上无斑点。结果见图1。

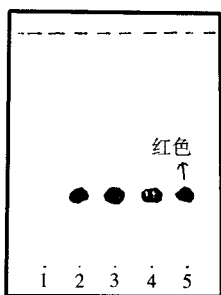


图1 麻黄 TLC 图

1-阴性 2,3,4-供试品 5-盐酸麻黄碱 茚三酮试液显色

2.2 黄芩薄层层析

取本品1包,加50%乙醇3mL,超声15min,静置,取上清液作为供试品溶液;另取黄芩苷对照品,加50%乙醇制成 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。按处方比例除去黄芩的其它药材,同法制成阴性对照溶液。分别吸取上述溶液各4mL,点样于同一硅胶G薄层板上,以乙醇乙酯-丁酮-醋酸-水(10:7:5:3)为展开剂,展开、取出、晾干,喷以10% FeCl_3 乙醇溶液,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位上均显相同色斑点;黄芩苷对照品在相应位上则无斑点,结果见图2。

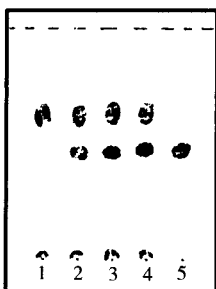


图2 黄芩 TLC 图

1-黄芩阴性 2,3,4-供试品
5-黄芩苷对照品 FeCl_3 乙醇液显色

2.3 牛蒡子、甘草薄层层析

取本品2包,加乙醇30mL,超声提取30min,滤过、蒸干、残渣加乙醇2mL溶解,作为供试品溶液。

分别取牛蒡子对照药材1g,甘草对照药材1g,各加水适量煎煮30min,滤过,滤液蒸至近干,加硅藻土3g,拌匀,按供试品制备方法,分别制得牛蒡子和甘草对照药材溶液。另按处方比例,分别取不含

牛蒡子或甘草的其它药材,同对照药材溶液的制备方法,分别制成牛蒡子阴性对照溶液和甘草阴性对照溶液。分别吸取上述溶液各5mL,点样于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-浓 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (14:4:2:0.3)为展开剂,展开、取出、晾干。紫外灯光(365nm)下检视,供试品色谱中,在与甘草对照药材色谱相应位置上,显相同色荧光斑点;甘草阴性对照则不显斑点。再喷以10% H_2SO_4 乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与牛蒡子和甘草对照药材色谱相应位上,分别显相同色斑点,而各自的阴性对照在相应位上均不显斑点。结果见图3、图4。

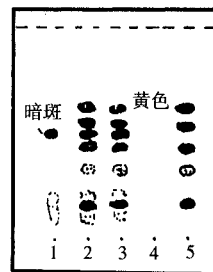


图3 牛蒡子、甘草 TLC 图

1-牛蒡子阴性 2-甘草阴性 3-供试品
4-牛蒡子对照药材 5-甘草对照药材

紫外灯光(365nm)下检视

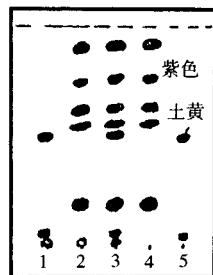


图4 牛蒡子甘草 TLC 图

1-牛蒡子阴性 2-甘草阴性 3-供试品
4-牛蒡子对照药材 5-甘草对照药材 10% H_2SO_4 乙醇显色

3 讨论

用薄层层析法对复方的中药制剂进行定性鉴别,适用于生产单位的质量鉴别对照,由于中药复方制剂的化学成分比较复杂,所以做层析之前,应根据所测药物的化学特点来选择恰当的有机溶剂,只有这样才能得到最佳的层析结果。

收稿日期:2002-12-26

(上接第155页)

[6] 杨磊,周一平,陈惠英. 烧伤病人痂下水肿液内毒素的变化及临床意义[J]. 中国现代医学杂志,1999,9(增刊):99.
[7] 唐明清,李家琪,章激,等. 用二次活性炭吸附消除20%甘露醇注射液对鲎试验法干扰的研究[J]. 中国药业,2001,10(8):10.

[8] 高国政,颜锦. pH值影响细菌内毒素测定的实验室研究[J]. 中国药学杂志,1998,33(3):162.
[9] Roth RI, Levin FC, Levin J. Optimization of detection of bacterial endotoxin in plasma with the limulus test[J]. J Lab Clin Med, 1990, 116(2):153.
收稿日期:2002-11-25