

# 注射用盐酸溴己新原料中 细菌内毒素的检测\*

林金海 陈晓佳 丁友玲\*\*

(福州新北生化工业有限公司 福州 350101)

**摘要** 目的: 建立注射用盐酸溴己新原料中细菌内毒素的检测方法。方法: 对盐酸溴己新原料预处理后再进行细菌内毒素检测, 并依据《中华人民共和国药典》2015年版细菌内毒素检查法中的干扰实验对预处理方法进行验证。结果: 预处理并稀释160倍后的盐酸溴己新原料对鲎试剂( $\lambda=0.06$  EU/ml)无干扰作用。结论: 所建立的注射用盐酸溴己新原料中细菌内毒素检测方法是可行的。

**关键词** 细菌内毒素 盐酸溴己新 干扰实验

**中图分类号**: R927.12; R974.1

**文献标志码**: A

**文章编号**: 1006-1533(2020)07-0075-03

## Study on the bacterial endotoxin test in the raw material of bromhexine hydrochloride for injection\*

LIN Jinhai, CHEN Xiaojia, DING Youling\*\*

(Fuzhou Xinbei Biochemical Industrial Co., Ltd., Fuzhou 350101, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a method for the bacterial endotoxin test in the raw material of bromhexine hydrochloride for injection. **Methods:** The raw material of bromhexine hydrochloride for injection was pretreated and then bacterial endotoxin test was performed. The method was verified based on the interference experiment in the bacterial endotoxin test section of Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition. **Results:** There was no interference on tachypleus ameobocyte lysate ( $\lambda=0.06$  EU/ml) after it was pretreated and diluted by 160 times. **Conclusion:** The established method can be used for the bacterial endotoxin test in the raw material of bromhexine hydrochloride for injection.

**KEY WORDS** bacterial endotoxin; bromhexine hydrochloride; interference experiment

细菌内毒素检查法要求实验样品溶液 pH 控制在 6~8<sup>[1]</sup>。盐酸溴己新 (bromhexine hydrochloride) 在乙醇中微溶, 在水中极微溶解<sup>[2]</sup>。乙醇助溶后的盐酸溴己新溶液 (1 mg/ml) pH < 4, 为了检测盐酸溴己新原料中的细菌内毒素, 笔者采用加碱性调节剂 (pH=7.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液) 调节 pH 至 7.5 左右, 再稀释至 160 倍, 使之适用于细菌内毒素检查法。根据《中华人民共和国药典》四部通则“1143 细菌内毒素检查法”中“干扰实验”的要求, 对本预处理进行了验证。

\* 基金项目: 国家“十三五”海洋经济创新发展示范项目 (FZHJ10)

\*\* 通信作者: 丁友玲, 高级工程师。主要从事细菌内毒素检测等临床诊断试剂的研究。E-mail: xb838888@163.com

## 1 材料及仪器

### 1.1 材料和试剂

鲎试剂 (TAL) (批号: 18051312, 规格: 0.1 ml/支, 标示灵敏度: 0.06 EU/ml), 细菌内毒素检查用水 (批号: 18033121, 规格: 100 ml/瓶), pH 调节剂 (碱性) (批号: 180301, pH 为 7.8~8.2, 规格: 2 ml/支), 以上试剂均为福州新北生化工业有限公司生产。

细菌内毒素国家标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 150800-201601, 规格: 1 ml/支, 效价: 9 000 EU/支)。无水乙醇 (西陇科学股份有限公司, 批号: 17120102, 分析纯)。注射用盐酸溴己新原料 (江西亿友药业有限公司, 细菌内毒素限值 < 10 EU/mg)。

# · 药物研发 ·

## 1.2 仪器

FA2204B 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); XMTD-7000 电热恒温水浴箱 (上海科恒实业发展有限公司); ZH-2 混合器 (天津药典标准仪器厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 预实验

#### 2.1.1 鲎试剂灵敏度 ( $\lambda$ ) 的复核

依照《中华人民共和国药典》四部通则 1143 “细菌内毒素检查法”, 对选用的鲎试剂进行灵敏度复核试验, 实测灵敏度 ( $\lambda_c$ ) =  $\text{antilg}(\sum X/4)$ , 式中 X 为反应终点浓度的对数值 ( $\lg$ ), 结果见表 1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果/(EU·ml<sup>-1</sup>)

样品	细菌内毒素检查用水	细菌内毒素浓度				$\lambda_c$
		0.125	0.06	0.03	0.015	
鲎试剂 (批号: 18051312, $\lambda=0.06$ )	++	++	--	--		0.06
阴性对照	--					

注: “+”表示阳性结果, “-”表示阴性结果

由表 1 可见, 鲎试剂 (批号: 18051312) 的实测灵敏度 ( $\lambda_c$ ) 为 0.06 EU/ml, 符合在 0.5~2 $\lambda$  范围内的要求。

#### 2.1.2 盐酸溴己新原料预处理

盐酸溴己新原料于 100~105 °C<sup>[3]</sup> 下干燥 5 h, 取出置干燥器中降温 30 min, 获得盐酸溴己新原料干燥品。精密称定盐酸溴己新原料干燥品, 加无水乙醇溶解, 在漩涡混合器中混合 9 min, 制成 1 mg/ml 的盐酸溴己新溶液, 即为供试品原液, 备用。

#### 2.1.3 盐酸溴己新溶液干扰预实验

供试品阴性对照 (NPC): 供试品原液加等体积细菌内毒素检查用水, 稀释至 2 倍, 再加入等体积的碱性调节剂 (pH=7.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液), 稀释至 4 倍。用细菌内毒素检查用水进一步稀释, 制成稀释 20 倍、40 倍、80 倍、160 倍、320 倍这 5 个连续稀释倍数的溶液, 作为 NPC。

供试品阳性对照 (PPC): 在上述 5 个 NPC 中加入细菌内毒素标准溶液, 使每个均含有 2 $\lambda$  的细菌内毒素, 作为 PPC。

阳性对照 (PC): 细菌内毒素浓度为 0.125 EU/ml 的细菌内毒素检查用水。

阴性对照 (NC): 细菌内毒素检查用水。

选用鲎试剂 (批号: 18051312,  $\lambda=0.06$  EU/ml) 进

表2 盐酸溴己新溶液干扰预实验结果

样品	细菌内毒素检查用水	供试品原液稀释倍数 / 倍				
		20	40	80	160	320
NPC		--	--	--	--	--
PPC		--	--	++	++	++
NC	--					
PC	++					

注: “+”表示阳性结果, “-”表示阴性结果

行干扰预实验, 结果见表 2。

由表 2 可见, 1 mg/ml 的盐酸溴己新溶液稀释  $\geq 80$  倍时, 对细菌内毒素检查实验无干扰。为了有效避免干扰, 本研究选用供试品原液稀释 160 倍进行干扰实验。

### 2.2 盐酸溴己新溶液干扰实验

取供试品原液 (1 mg/ml) 按干扰预实验处理方法稀释 160 倍, 选用鲎试剂 (批号 18051312,  $\lambda=0.06$  EU/ml), 依据《中华人民共和国药典》四部通则 “1143 细菌内毒

表3 盐酸溴己新溶液干扰实验结果/(EU·ml<sup>-1</sup>)

样品	细菌内毒素浓度					Es	Et
	0	0.125	0.06	0.03	0.015		
细菌内毒素检查用水		++	++	--	--	0.06	
供试品原液稀释 160 倍		++	++	--	--		0.06
阴性对照	--						
供试品阴性对照	--						

注: “+”表示阳性结果, “-”表示阴性结果; Es 为含细菌内毒素标准品的细菌内毒素检查用水反应终点浓度的几何平均值, Et 为含细菌内毒素标准品的供试品稀释液反应终点浓度的几何平均值

素检查法”进行干扰实验, 结果见表 3。

由表 3 可见, Es/Et 在 0.5~2.0 间, 表明 1 mg/ml 盐酸溴己新乙醇溶液按预实验处理 (稀释 160 倍) 对鲎试剂 ( $\lambda=0.06$  EU/ml) 无干扰作用。

### 2.3 注射用盐酸溴己新原料的细菌内毒素检查

1 mg/ml 的盐酸溴己新乙醇溶液调节 pH 后, 用细菌

内毒素检查用水稀释 160 倍。按照《中华人民共和国药典》四部通则 1143 “细菌内毒素检查法”进行细菌内毒素检查（鲎试剂  $\lambda=0.06$  EU/ml）。实验结果为：阳性对照、供试品阳性对照均为阳性；阴性对照、供试品阴性对照均为阴性。说明该批次注射用盐酸溴己新原料（细菌内毒素限值  $< 10$  EU/mg）稀释 160 倍，选用鲎试剂（ $\lambda=0.06$  EU/ml）进行细菌内毒素检查，原料细菌内毒素含量符合要求。

### 3 结论

《中华人民共和国药典》中“细菌内毒素检查法”代替兔法已应用于 500 多种药品或原料药细菌内毒素的检测。但是，对某些注射用药品及原料在进行细菌内毒素检查时，需要排除干扰因素，以适应鲎试剂检测细菌内毒素时所需的基本条件<sup>[4]</sup>。往往在样品检测前需加入二价阳离子调节剂、碱性或酸性调节剂，或者采用稀释法来消除样品对鲎试剂的干扰<sup>[5-9]</sup>。由于注射用盐酸溴己新原料是难溶物质，本研究采用乙醇溶解盐酸溴己新原料，再加碱性调节剂（pH=7.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液）调节 pH 的预处理方法，再根据它的内毒素限值选用鲎试剂（ $\lambda=0.06$  EU/ml）、稀释倍数 160 倍，证明对检测盐酸

溴己新原料中的细菌内毒素实验无干扰。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 154-157.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1107.
- [3] 何燕, 陈炜, 罗峰. 盐酸川芎嗪细菌内毒素检查方法学研究 [J]. 中国药品标准, 2019, 20(5): 427-432.
- [4] 王娅宁, 高龙. 细菌内毒素检查法研究进展 [J]. 现代盐化工, 2019(5): 59-60.
- [5] 雷小平, 陈青连. 雷贝拉唑钠细菌内毒素检验方法的建立 [J]. 上海医药, 2019, 40(21): 75-79.
- [6] 周勤兰, 徐远清, 吴爱莉. 依地酸二钠细菌内毒素检查法研究 [J]. 化工时刊, 2019, 33(7): 22-26.
- [7] 郝翔. 富马酸伊布利特注射液细菌内毒素检查法研究 [J]. 中国药品标准, 2019, 20(04): 356-359.
- [8] 刘建辉, 唐先明, 宋丽阳, 等. 盐酸克林霉素注射液细菌内毒素检查法的改进 [J]. 哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2019, 35(4): 388-391.
- [9] 杨晨, 谢益晖, 王贺, 等. 磷酸左奥硝唑酯二钠细菌内毒素检测方法验证 [J]. 中国药事, 2019, 33(8): 944-948.

(收稿日期: 2019-10-19)

(上接第 64 页)

除的结果。从而大大减少副反应和水解、降解反应的发生，降低产品杂质，提高产品质量和收率，且产品质量稳定，工艺操作简单，更适宜于工业化生产。

#### 参考文献

- [1] 尹伟成, 彭东明, 周汨, 等. 头孢西丁钠的合成进展 [J]. 精细化工中间体, 2014, 44(4): 17-22.
- [2] 王英杰, 秦荣, 赵义林. 头孢西丁钠的合成 [J]. 大家健康 (下旬版), 2013, 7(14): 82.
- [3] Falciani M, Broggi R. Process for the production of 6-D- $\alpha$ -amino-*p*-hydroxy-phenylacetamino penicillanic acid: US 4310460[P]. 1982-01-12.
- [4] 谭端明, 张黎辉, 叶澄海. 抗菌药物头孢西丁的制备工艺: CN 101007812[P]. 2007-08-01.
- [5] Christensen BG, Cama LD, Karady S, *et al.* 7- $\alpha$ -Methoxy cephalosporins: US 4297488[P]. 1981-10-27.
- [6] Weinstock LM. Preparation of 7-acylamino cephalosporin derivatives: GB 1480757[P]. 1977-07-27.
- [7] 卢红代, 王超, 魏曾光, 等. 头孢西丁钠的制备方法: CN101235045 A[P]. 2008-08-06.
- [8] 钟建西, 祁振海, 张晓光, 等. 头孢西丁酸的制备方法: CN 2009100749599[P]. 2009-11-23.
- [9] 赵振华, 杜海生, 汤沸, 等. 头孢西丁钠的合成 [J]. 山东化工, 2008, 37(12): 18-19.
- [10] A. 曼卡, R. 蒙古齐, M. 泽诺尼, 等. 制备头孢西丁钠的方法: CN1903861[P]. 2007-01-31.
- [11] Deshpande PB, Khadangale BP. Process for the preparation of cefoxitin: US 20060252928A1[P]. 2006-11-09.
- [12] Manca A, Monguzzi, Zenoni M, *et al.* Process for preparing cefoxitin: EP 1748049[P]. 2006-06-21.
- [13] 袁付红. 头孢西丁钠反应及溶析结晶过程研究 [D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [14] Oberholtzer ER, Brenner GS. Cefoxitin sodium: solution and solid-state chemical stability studies [J]. J Pharm Sci, 1979, 68(7): 863-866.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 250.

(收稿日期: 2019-04-11)