

基因重组人白细胞介素- II 中氨苄青霉素残留量的测定

魏立平 姜雄平(北京 100071 总后勤部卫生部药品仪器检验所)

摘要 目的:测定基因重组人白细胞介素- II 中氨苄青霉素残留量。方法:采用抗生素微生物学测定法测定基因重组人白细胞介素- II 中氨苄青霉素残留量,在测定结果为阳性时用 HPLC 法作氨苄青霉素鉴定。结果:微生物学测定法最低检出量为 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$, HPLC 法最低检出量为 0.002 μg 。结论:本法灵敏度高,简便可行。

关键词 基因重组人白细胞介素- II ;抗生素微生物学测定法;HPLC

The detection of ampicillin residue in rhIL-2

Wei Liping(Wei LP) ,Jiang Xiongping(Jiang XP) (Institute for Drug Control of PLA, Beijing 100071)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To detect the residue of ampicillin in the preparation of rhIL-2. **METHOD:**The antibiotics-microbial assay is used to detect the residue of ampicillin in the preparation of rhIL-2. If the result is positive, ampicillin is identified by HPLC. **RESULTS:**The lowest detection limit of the antibiotics-microbial assay and the HPLC method are 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.002 μg respectively. **CONCLUSION:**This method shows high sensitivity, simplicity, and is easy to be executed.

KEY WORDS rhIL-2, antibiotics-microbial assay, HPLC

白细胞介素- II (Interleukin 2; IL-2) 是 T 淋巴细胞抗原或有丝分裂原刺激后产生的一种非特异性淋巴因子。目前已用基因工程的方法大量制备,并在临床中广泛用于治疗恶性肿瘤等疾病。在基因重组人白细胞介素- II 的发酵制备过程中,为抑制杂菌生长,有时在培养基中加入抗生素氨苄青霉素。按有关标准规定基因重组人白细胞介素- II 的半成品及成品中不得检出有氨苄青霉素残留。本文介绍了有效测定基因重组人白细胞介素- II 中氨苄青霉素的残留量的方法。

1 材料

1.1 仪器

ZY-300A 抑菌圈面积测量仪; Waters 401 型高效液相色谱仪; 510 型泵, 481 型紫外可见光检测器, CDMC-5 型积分仪; Novapak C₁₈ 色谱柱(150 × 3.9 mm, 4 μm), Sep Pak C₁₈ 预处理小柱。

1.2 试剂

重组人白细胞介素- II (中化合通药业有限公司); 氨苄青霉素三水物对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 4109402); 乙腈(色谱纯); 超纯水; 磷酸二氢钾(分析纯); 磷酸(优级纯)。

2 实验方法

取基因重组人白细胞介素- II 样品先按 2.1 法测定, 如果结果呈阴性便可直接判为未检出氨苄青霉素, 如果结果呈阳性则再按 2.2 法作氨苄青霉素的 HPLC 鉴别。

2.1 氨苄青霉素残留量微生物测定法

参照中国药典 1977 年版附录抗生素微生物学检定法一剂量法测定。培养基: 中国药典 1995 年版附录 XI A 抗生素微生物学检定法培养基 II 号 pH6.5; 菌悬液: 藤黄微球菌, 加入量 0.8%; 双碟底层 15 ml; 灭菌缓冲液: 磷酸盐缓冲液(pH6.0); 样品液配制: 取样品每瓶加灭菌缓冲液 4 ml 溶解; 标准液配制: 取氨苄青霉素三水物对照品以灭菌缓冲液溶解并稀释成 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 和 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 培养温度: 37 $^{\circ}\text{C}$; 培养时间: 16h; 测量抑菌圈直径或面积, 计算。

2.2 氨苄青霉素的 HPLC 鉴别

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Novapak C₁₈, 流动相: 乙腈 0.05 mol/L 磷酸二氢钾(以磷酸调 pH 至 4.0)(8:92), 检测波长: 190nm, 流速: 0.8 ml/min, 灵敏度: AUFS 0.10。

2.2.2 溶液的制备 样品溶液的制备: 取样品 10 瓶

用 5 ml 水溶解,取 SePr Pak C_{18} 小柱,用甲醇 5 ml 通过小柱以活化 SePr Pak C_{18} 柱,用水 2 ml 洗去甲醇,取上述样品溶液 5 ml 以 1 ml/min 流速注入柱中,以水 2 ml 洗涤除去大部分赋形剂及干扰物质,再以 1:1 甲醇 3 ml 洗脱,收集洗脱液,吹干,加水 0.3 ml 溶解,进样 100 μl 。

对照品溶液的制备:取氨苄青霉素三水物对照品以水配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,进样 20 μl 。

3 结果

3.1 微生物测定法实验结果

3.1.1 微生物测定法线性范围与最低检出限 取氨苄青霉素标准品溶液按抗生素微生物法一剂量法试验,在浓度 0.005 ~ 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,对数剂量与抑菌圈的直径呈良好的线性关系,相关系数 $r = 0.999$,回归方程为: $D = 60.6 + 21.85 \log C$ (D 为抑菌圈的直径 mm, C 为氨苄青霉素的浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。最低检出限度为 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3.1.2 回收率试验 取经检测不含氨苄青霉素的供试品,加入不同浓度的标准品溶液溶解,按上述方法测定,计算加样回收率,测得回收率为 104.2%, $RSD = 2.9\%$ ($n = 3$)。

3.2 HPLC 法实验结果

3.2.1 选择性 取不含氨苄青霉素的样品,加水 0.5 ml 溶解,作为空白溶液。另取 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素对照品溶液,分别进样 20 μl ,由色谱图可见空白溶液中氨苄青霉素峰处无干扰峰。

3.2.2 线性 分别取 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 对照品溶液,进样 20 μl ,记录峰面积,计算得回归方程 $A = 11487 C - 343.4$, A 为峰面积, C 为氨苄青霉素浓度,相关系数为 $r = 0.9997$ 。

3.2.3 最低检出限度 在上述色谱条件下,取不同体积的 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素对照品溶液进样,在信噪比大于等于 2 时,测得最低检出量为 0.002 μg 。

3.2.4 回收率 取不含氨苄青霉素的样品 10 瓶,分别加入 0.5, 1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素对照品溶液 250 μl ,挥干,用 5 ml 水溶解,按 2.2.2 操作进样。重复三次,测得平均回收率为 82.6%。

3.2.5 重现性 取 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素对照品溶液进样 20 μl ,重复进样 6 次,记录峰面积,计算重复进样的 RSD 为 2.4%。

3.3 样品测定

共测定基因重组人白细胞介素- II 样品 14 批,其中,半成品 6 批,成品 8 批。有 1 批样品微生物法测定显示含抑菌物质,经高效液相色谱法鉴别为非氨苄青霉素,推测可能为样品中残留具轻微抗菌作用的十二烷基磺酸钠所致。

4 讨论

4.1 在微生物学测定法中,为提高检测灵敏度,本文选用了对氨苄青霉素较敏感的藤黄微球菌,并且双碟底层用 15 ml 培养基。

4.2 因氨苄青霉素在紫外区无特征吸收峰,我们选择了 190 nm 作为检测波长以提高检测灵敏度。所用的流动相在此波长下吸收不强,不影响测定。此检测波长虽然为末端吸收,但实验结果仍较为满意。

4.3 为了提高 HPLC 法鉴别氨苄青霉素的灵敏度,我们用 SePr Pak C_{18} 小柱将样品浓缩。不仅大大提高了检测灵敏度,而且可以同时除去大量甘露醇等赋形剂的干扰,效果显著。

4.4 在高效液相色谱法中,制备供试品溶液时,会有部分样品损失,且检测波长为 190 nm,不宜用于定量。而微生物学测定法灵敏度高,线性关系好,定量较准确,所以我们首先用微生物测定法定量测定氨苄青霉素残留量,结果为阳性时再用 HPLC 法作进一步鉴定。

收稿日期:1998-12-25