

· 药剂学 ·

长春西汀葡萄糖注射液细菌内毒素检查的实验研究

黄循明, 王敏, 黄良敏(解放军第 187 医院天涯制药厂, 海口 571159)

摘要 目的:建立用鲎试剂检查长春西汀葡萄糖注射液细菌内毒素的方法。方法:对用家兔法热原检查合格的长春西汀葡萄糖注射液作细菌内毒素检查的干扰试验。结果:长春西汀葡萄糖注射液对鲎试剂的细菌内毒素检查无干扰。结论:凝胶法鲎试验可用于长春西汀葡萄糖注射液的细菌内毒素检查。

关键词 长春西汀葡萄糖注射液;凝胶法;细菌内毒素;干扰试验;鲎试剂

中图分类号:R927.12 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2002)06-0341-03

Study on bacterial endotoxin inspection methods of vinpocetine and glucose injection

HUANG Xun-ming, WANG Min, HUANG Liang-min (Hainan Tianya Pharmaceutical Factory, 187 hospital, PLA, Haikou 571159, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish method for monitoring bacterial endotoxin of vinpocetine and glucose injection. **METHODS:** The interference function of vinpocetine and glucose injection to bacterial endotoxin was determined with tachypleus amebocyte lysate (TAL), which determined well by pyrogen test method. **RESULTS:** Vinpocetine and glucose injection has not interference function on bacterial endotoxin inspection. **CONCLUSION:** Method of gelation assay can determine bacterial endotoxin in vinpocetine and glucose injection.

KEY WORDS vinpocetine and glucose injection; gelation assay; bacterial endotoxin; interference test; tachypleus amebocyte lysate

长春西汀(vinpocetine)是 20 世纪 70 年代匈牙利 Gedeon Richter 公司开发的脑循环代谢改善剂,目前已在许多国家上市。现我国生产的小针剂长春西汀注射液热原检查采用家兔法。最近在研制新药长春西汀葡萄糖注射液的过程中,我们根据中国药典 2000 年版二部附录细菌内毒素检查法进行了用鲎试剂(TAL)检查长春西汀葡萄糖注射液中细菌内毒素的实验研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

电子恒温水浴箱(北京医疗设备厂制造);旋涡混合器(江苏泰县仪器厂制造);无热原试管、吸嘴等试验所用器具均经 250℃ 干烤 1h 去除外源性内毒素。

1.2 试剂与药品

TAL₁ [规格:0.1ml/支,标示灵敏度(λ):0.125EU·ml⁻¹,批号:0011022,湛江安度斯生物有限公司生产]; TAL₂ (规格:0.1ml/支, λ :

0.25EU·ml⁻¹,批号:000718,湛江海洋生物制品厂生产);细菌内毒素工作标准品(CSE,规格:每支效价 70EU,批号:2001-3,中国药品生物制品检定所提供);细菌内毒素检查用水(BET水,规格:5ml/支,批号:0104040,内毒素含量 ≤ 0.015 EU·ml⁻¹,湛江安度斯生物有限公司生产);长春西汀葡萄糖注射液(供试品,规格:200ml:10mg,批号:001001,001103,011204,011205,011206,天涯制药厂生产,家兔法热原检查均符合规定)。

2 实验方法与结果

2.1 供试品的细菌内毒素限值(L)确定^[1]

细菌内毒素限值公式: $L = K/M$,式中, K 为按规定的给药途径,即人用每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂为 5.0EU·kg⁻¹·h⁻¹; M 为人用每千克体重每小时最大给药剂量,因供试品长春西汀葡萄糖注射液属小针剂经改剂型为大输液品种,临床应用为静脉滴注给药,按给药剂量的一致性,参照小针剂长春西汀注射液质量标准^[2], $M =$

$30\text{mg}\cdot 60\text{kg}^{-1}\cdot \text{h}^{-1} = 600\text{ml}\cdot 60\text{kg}^{-1}\cdot \text{h}^{-1}$, 计算细菌内毒素限值 $L = 5.0\cdot 600^{-1}\cdot 60^{-1} = 0.5\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.2 TAL 灵敏度的复核^[3]

按照中国药典 2000 版二部附录细菌内毒素检查法规定进行标示灵敏度复核, 结果见表 1, 二批号 TAL 灵敏度均在 $0.5 \sim 2\lambda$ 之间, 符合规定, 可用于细菌内毒素的检查。

表 1 TAL 灵敏度的复核

| 内毒素浓度 ($\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | TAL ₁ ($0.125\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | TAL ₂ ($0.25\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) |
|--|--|---|
| 0.5 | ++++ | |
| 0.25 | ++++ | ++++ |
| 0.125 | ---- | ++++ |
| 0.06 | ---- | ---- |
| 0.03 | | ---- |
| 阴性对照(NC) | -- | -- |
| 终点($\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | 0.125 | 0.25 |

2.3 供试品的最大有效稀释倍数(MVD)

根据目前市售 TAL 最高灵敏度 λ 为 $0.03\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$, 按样品最大有效稀释倍数公式 $MVD = L/\lambda$, 其中 L 为长春西汀葡萄糖注射液的细菌内毒素限值 $0.5\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$, 可计算出 MVD 为 16 倍, 则干扰试验时药液稀释倍数不得超过所对应 TAL 的 MVD 。

2.4 供试品的干扰初筛试验

2.4.1 内毒素及供试品的稀释 用 BET 水将 CSE 稀释成 $0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 系列内毒素浓度备用; 按最大有效稀释倍数 $MVD = L/\lambda$, 对应于 $\lambda: 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 的 TAL, 长春西汀葡萄糖注射液选择稀释倍数分别为 1, 2, 4, 8, 16 倍, 用 BET 水将 1 批供试品(批号: 001103) 稀释成以上 5 个浓度备用。

2.4.2 供试品的干扰初筛试验 在 TAL 灵敏度为 $0.03 \sim 0.5\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 内, 灵敏度在任意选取的情况下, 取 20 支灵敏度为 $0.125\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 的 TAL, 其中 10 支分别用 0.1ml 上述稀释的 5 个浓度供试品复溶,

再各加 BET 水 0.1ml , 做为供试品阴性对照, 记为 NPC 液, 每一浓度供试品 2 支反应管; 另 10 支分别用 0.1ml 上述稀释的 5 个浓度供试品复溶, 再各加 2λ 的内毒素溶液 0.1ml , 做为供试品阳性对照, 记为 PPC 液, 每一浓度供试品 2 支反应管。试验结果见表 2, NPC 液系列反应全为阴性, PPC 液系列反应全为阳性, 表明供试品稀释倍数不超过所对应灵敏度的 TAL 的 MVD , 则无干扰作用。

表 2 供试品(批号: 001103) 干扰初筛试验结果

| 反应管 | 干扰初筛试验溶液稀释倍数 | | | | |
|--------------|--------------|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 |
| 供试品阴性对照(NPC) | -- | -- | -- | -- | -- |
| 供试品阳性对照(PPC) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

2.5 供试品的干扰试验

由干扰初筛试验可知, 如选择灵敏度为 $0.125\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $0.25\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 的 TAL, 则其对应的 MVD 分别为 4 倍和 2 倍, 因此以上 TAL 均可用 BET 水将供试品 4 倍稀释进行干扰试验。取灵敏度为 $0.125\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $0.25\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$ 的 TAL 各 72 支, 其中各 18 支做内毒素水溶液系列反应, 即用 0.1ml BET 水复溶, 再分别加已制备的 $2\lambda, \lambda, 0.5\lambda, 0.25\lambda$ 四种浓度内毒素溶液 0.1ml , 每一浓度内毒素各 4 支反应管, 水溶液阴性对照(NC) 各 2 支反应管; 另各 54 支分 3 组, 每组各 18 支做内毒素供试品(批号: 001001, 001103, 011204) 溶液系列反应, 即用 0.1ml 2 倍稀释液复溶, 再分别加已制备的上述系列内毒素溶液 0.1ml , 每一浓度内毒素各 4 支反应管, 供试品阴性对照(NPC) 各 2 支反应管。结果见表 3, 标准内毒素反应终点在 $2\lambda \sim 0.5\lambda$ 之间, 说明干扰试验有效, 供试品稀释所得内毒素溶液的反应终点均在 $2\lambda \sim 0.5\lambda$ 之间, 且不同厂家、不同规格 TAL 反应结果一致, 表明供试品对 TAL 既无抑制作用, 也无增强作用, 即无干扰作用^[4], 进一步验证了初筛试验的结果。

表 3 供试品(1→4) 干扰试验结果

| TAL | 样品 | 细菌内毒素浓度($\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | | | | | NC | NPC | 终点(λ_1) ($\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) |
|--|--------|--|------|-------|------|------|----|-----|--|
| | | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | | | |
| TAL ₁ ($0.125\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | BET 水 | | ++++ | ---- | ---- | ---- | -- | | 0.25 |
| | 001001 | | ++++ | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.25 |
| | 001103 | | ++++ | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.25 |
| | 011204 | | ++++ | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.25 |
| TAL ₂ ($0.25\text{EU}\cdot \text{ml}^{-1}$) | BET 水 | ++++ | ---- | ---- | ---- | ---- | -- | | 0.5 |
| | 001001 | ++++ | ---- | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.5 |
| | 001103 | ++++ | ---- | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.5 |
| | 011204 | ++++ | ---- | ---- | ---- | ---- | | -- | 0.5 |

2.6 细菌内毒素检查

选用经灵敏度复核合格的 λ 为 $0.125\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$ TAL,对 5 批经家兔法热原检查均合格的长春西汀葡萄糖注射液作细菌内毒素检查,每批设 5 支反应管,其中供试品管 ($MVD = 4$ 倍)2 支,阴性、阳性、供试品阳性对照管各 1 支,在规定条件下与 TAL 反应。结果供试品管、阴性对照管均为阴性,阳性对照管、供试品阳性对照管均为阳性。

3 讨论

通过实验表明,长春西汀葡萄糖注射液热原检查可用细菌内毒素检查法,检查时只要选相应灵敏

度的 TAL,对供试品稀释时不超过所对应灵敏度的 TAL 的 MVD 即可进行,具有准确、经济、操作简便等优点。

参考文献:

- [1] 夏振民. 药品细菌内毒素的限值[J]. 药物分析杂志,1995,15(3):54.
- [2] WS-292(X-266)-2001. 长春西汀注射液[S].
- [3] 中国药典 2000 年版. 二部[S]. 2000;附录 86.
- [4] 黄清泉,夏振民. 药品细菌内毒素检查的试验设计[J]. 中国药理学杂志,1997,32(2):74.

收稿日期:2002-08-05

肌苷氯化钠注射液的细菌内毒素检查法探讨

黄荣富, 茅志安(武警浙江省总队医院, 嘉兴 314000)

摘要 目的:探讨肌苷氯化钠注射液细菌内毒素检查法的可行性。方法:按中国药典细菌内毒素检查法及应用指导原则进行实验。结果:肌苷氯化钠注射液原液对鲎试剂的凝聚反应有一定的抑制作用,而 1:2 稀释液则无干扰作用。结论:采用灵敏度为 $0.25\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 或灵敏度更高的鲎试剂对肌苷氯化钠注射液进行细菌内毒素检查是可行的。

关键词 肌苷氯化钠注射液;细菌内毒素;鲎试剂

中图分类号:R954 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2002)06-0343-02

鲎试剂用于细菌内毒素的检测,具有灵敏度高、重现性好、快速、简便和经济等优点,已日益被广泛使用。卫生部药品标准采用家兔法对肌苷注射液进行热原检查,本文按中国药典 2000 年版二部“细菌内毒素检查法及应用指导原则”,对肌苷氯化钠注射液的细菌内毒素检查法进行了可行性探讨,现报道如下:

1 实验材料

鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号 0110241,灵敏度(λ) $0.25\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.5\text{ml}/\text{支}$;湛江海洋生物制品厂,批号 010811,灵敏度 $0.25\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.1\text{ml}/\text{支}$);细菌内毒素工作标准品

(中国药品生物制品检定所,批号 2001-4,160EU/支);细菌内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司,批号 0102050, $2\text{ml}/\text{支}$);肌苷氯化钠注射液(本院自制,批号 020405,020410,020422,规格: 250ml :肌苷 $0.5\text{g} +$ 氯化钠 2.25g ,兔法热原检查均合格)。

2 方法和结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核

按中国药典 2000 年版“细菌内毒素检查法”进行灵敏度复核,结果见表 1。结果显示,所用两个批号的鲎试剂灵敏度均在 $0.5 \sim 2\lambda$ 之间,符合规定,可用于细菌内毒素检查。

表 1 鲎试剂灵敏度复核

| 鲎试剂 | 细菌内毒素浓度($\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$) | | | | 阴性对照 | 灵敏度(λ) ($\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$) |
|---------|---|------|-------|--------|------|--|
| | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.0625 | | |
| 0110241 | ++++ | ---- | ---- | ---- | -- | 0.5 |
| 010811 | ++++ | +++- | ---- | ---- | -- | 0.3 |

2.2 细菌内毒素限值(L)的确定

按公式 $L = K/M$,内毒素致热阈 K 为 $5.0\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$,肌苷氯化钠注射液热原检查剂量 M 以 $10\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ 计,则 $L = 0.5\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.3 样品最大有效稀释倍数(MVD)

$MVD = L/\lambda = 0.5/0.25 = 2$ 。

2.4 供试品干扰试验

按鲎试剂灵敏度复核试验项下,参照灵敏度复