

柴胡注射液细菌内毒素检查法的探讨

李 姮 (江苏省连云港市药品检验所, 连云港 222006)

摘要 目的: 建立柴胡注射液细菌内毒素检查法。方法: 依据《中国药典》2010 年版附录中细菌内毒素检查法, 通过预干扰和干扰试验确定样品最大无干扰浓度, 并进行方法学验证。结果: 将柴胡注射液稀释 200 倍, 对细菌内毒素检查法无干扰作用。结论: 建立的方法用于检查柴胡注射液的细菌内毒素可行。

关键词: 柴胡注射液; 细菌内毒素检查; 凝胶法; 干扰试验

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)02-0174-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.011

Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Chaihu Injection

Li Heng (Lianyungang Institute for Drug Control, Lianyungang, 222006, China)

Abstract Objective: To establish a method for bacterial endotoxin test of Chaihu injection. **Method:** Maximal non-interference concentrations of samples were determined by pre-interference test according to the appendix of *Chinese Pharmacopiea* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. **Results:** The interference on bacterial endotoxin test could be excluded when the sample was diluted 200 times. **Conclusion:** The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Chaihu injection.

Keywords: Chaihu injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot; Interference test

柴胡注射液是柴胡经蒸馏制成的灭菌水溶液, 用于疏解退热、治疗感冒、流感等上呼吸道感染的病证。主要有解热、抗炎、增强免疫机能等作用。本文依据《中国药典》2010 年版(二部)附录 XI E 细菌内毒素检查法^[1], 并参考文献^[2-3], 对柴胡注射液的细菌内毒素检查法进行了研究。

1 材料

1.1 试药

柴胡注射液(规格: 2 mL, 开开援生制药股份有限公司提供, 批号: 1501291, 1507081, 1509241); 细菌内毒素工作标准品(规格: 60EU/支, 中国食品药品检验研究院, 批号: 150601-201478); 细菌内毒素检查用水(BET 水, 规格: 5 mL, 中国食品药品检验研究院, 批号: 160006-201401); 鲎试剂(湛江博康海洋生物有限公司, 标示灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹, 批号:

1501071, 标示灵敏度为 0.125 EU · mL⁻¹, 批号: 1503101; 湛江安度斯生物科技有限公司, 标示灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹, 批号 1502021, 标示灵敏度为 0.125 EU · mL⁻¹, 批号 1505041)。

1.2 仪器

MET-50 智能恒温加热仪(天大天发科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 TAL 灵敏度复核

用 BET 水溶解细菌内毒素工作标准品, 稀释成 2.0、1.0、0.5、0.25 λ 的溶液, 同时以 BET 水做阴性对照(NC), 按《中国药典》^[1]对鲎试剂进行标示灵敏度复核。结果见表 1(表中“+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应, 余表同), 2 个厂家 4 批鲎试剂灵敏度均在 0.5 ~ 2.0 λ 范围内, 灵敏度均符合规定。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

TAL批号	$\lambda /$ (EU · mL ⁻¹)	细菌内毒素浓度 / λ				NC	$\lambda /$ (EU · mL ⁻¹)
		2.0	1.0	0.5	0.25		
1501071	0.25	++++	++++	-----	-----	--	0.25
1502021	0.25	++++	++++	-----	-----	--	0.25
1503101	0.125	++++	++++	-----	-----	--	0.125
1505041	0.125	++++	++++	-----	-----	--	0.125

2.2 内毒素限值 (L) 的计算

根据公式 $L = K \cdot M^{-1[1]}$, 注射剂 $K = 5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 。M为人用每千克体质量每小时最大剂量, 根据说明书柴胡注射液最大剂量为4 mL, 中国人均体质量按60 kg计算 $M = 4 \text{ mL} \cdot (60 \text{ kg} \cdot 1\text{h})^{-1} = 0.0667 \text{ mL} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$, 则 $L = 75 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本品的限值设为每1 mL柴胡注射液中含内毒素应小于75 EU。

2.3 干扰试验最大有效稀释倍数 (MVD) 的确定

根据公式 $MVD = CL \cdot \lambda^{-1[1]}$, C为供试品溶液的浓度, L为供试品的内毒素限值,

$$MVD = CL \cdot \lambda^{-1} = (1.0 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1} \times 75 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}) /$$

$0.25 \text{ (EU} \cdot \text{mL}^{-1}) = 300$ 。

2.4 干扰试验预试验

将供试品用BET水分别稀释10、50、100、200、300倍作为供试品系列 (NPC), 同时每一稀释度下均制备含有2 λ 浓度细菌内毒素的溶液作为供试品阳性对照系列 (PPC)。用 λ 为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2个厂家的鲎试剂分别与2个系列溶液反应, 每一稀释度作2支。BET水作阴性对照 (NC), 加入2 λ 浓度的内毒素标准溶液作为阳性对照 (PC), 从表2可见柴胡注射液存在干扰作用, 稀释200倍时, 即不再对试验产生干扰。见表2。

表2 柴胡注射液干扰试验预实验结果

TAL批号, 0.25 / (EU · mL ⁻¹)	供试品批号	系列	稀释倍数					PC	NC
			10	50	100	200	300		
1501071	1501291	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
	1507081	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
	1509241	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
1502021	1501291	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
	1507081	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
	1509241	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		

2.5 正式干扰试验

根据预干扰试验结果,取3批柴胡注射液用BET水稀释200倍,用该稀释液和BET水分别稀释内毒素工作标准品,配制成细菌内毒素浓度为0.5、0.25、0.125、0.0625 EU·mL⁻¹的系列溶液。每个浓度平行测定4管,分别与鲎试剂反应,供试品溶液和BET水做阴性对照,进行干扰试验,按公式 $E_s = 1 \text{ g}^{-1}(\sum X_s/4)$ 和 $E_t = 1 \text{ g}^{-1}(\sum X_t/4)$

计算各系列反应终点内毒素浓度的绝对值。结果见表3(表中 E_s 、 E_t 分别为用BET水、供试品溶液制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值)。由表3可见, E_s 均在0.5~2.0 λ范围内,且 E_t 在0.5~2.0 E_s 范围内,按照《中国药典》^[1]的判断标准,柴胡注射液经200倍稀释后对TAL($\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰作用。

表3 柴胡注射液 200 倍稀释干扰试验

TAL 批号, 0.25/(EU·mL ⁻¹)	供试品批号	细菌内毒素工作标准品浓度/(EU·mL ⁻¹)				NC	E_s 或 E_t
		0.5	0.25	0.125	0.0625		
1501071	1501291	++++	+--+	----	----	--	0.30
	1509241	++++	+++-	----	----	--	0.30
	1507081	++++	++++	----	----	--	0.25
	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.25
1502021	1501291	++++	+--+	----	----	--	0.30
	1509241	++++	++-+	----	----	--	0.30
	1507081	++++	++++	----	----	--	0.25
	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.25

2.6 样品细菌内毒素检查法的验证

取3个批号的供试品,分别用BET水稀释200倍,使用 $\lambda=0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2个厂家的鲎试剂

进行内毒素检查,并按要求做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照,结果3批柴胡注射液的内毒素检查均符合规定,详见表4。

表4 样品细菌内毒素检查结果

鲎试剂批号 0.125/(EU·mL ⁻¹)	样品批号	NPC	PPC	NC	PC
1503101	1501291	--	++	--	++
	1509241	--	++	--	++
	1507081	--	++	--	++
1505041	1501291	--	++	--	++
	1509241	--	++	--	++
	1507081	--	++	--	++

3 讨论

本试验结果表明,柴胡注射液稀释 200 倍后对鲎试剂和细菌内毒素的凝聚反应无干扰作用,柴胡注射液采用限值 $75 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行细菌内毒素检查是可行的。本试验采用凝胶法检查柴胡注射液细菌内毒素,符合《中国药典》2010 年版(二部)的标准,操作简便,结果准确,可以用于质量控制。

参考文献:

- [1] 中国药典:二部[S]. 2010: 99-102.
- [2] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规程[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 310-325.
- [3] 刘风琴, 李秀珍, 吕光宇, 等. 柴胡注射液的细菌内毒素检查法的建立[J]. 药学研究, 2013, 32(5): 275-276.

(收稿日期 2016年9月13日 编辑 范玉明)