

天麻素注射液细菌内毒素检查方法的标准化研究

张伶俐

重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

摘要: **目的** 建立天麻素注射液细菌内毒素的快速检查法, 并进行标准化研究, 以利于产品质量控制。**方法** 按《中国药典》2010年版(二部)附录收载的细菌内毒素检查方法进行。**结果** 不同生产厂家不同灵敏度的鲎试剂进行干扰试验, 提示供试品1:20稀释液无干扰作用。建立试验方法, 选取10批供试品进行检查, 并与家兔法对比, 二者结果一致。**结论** 该制剂以鲎试剂细菌内毒素检查法作为标准方法进行热原检查是可行的。细菌内毒素限值可定为0.1 EU/mg。

关键词: 天麻素注射液; 细菌内毒素; 鲎试剂

中图分类号: R927.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)03-0187-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.007

Standardization for bacterial endotoxins test of Gastrodin Injection

ZHANG Ling-li

Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: Objective To establish a rapid standardized bacterial endotoxin test method for the quality control of Gastrodin Injection (GI). **Methods** The tests were carried out according to the bacterial endotoxin test method in *Chinese Pharmacopoeia 2010*. **Results** The interferential test with tachypleus amebocyte lysate of different sensitivity and manufacturers was carried out for GI. The solution of GI (1:20) had no interference on the test. Furthermore, 10 batches of specimens were measured, and the results were coincident with those by rabbit pyrogen test. **Conclusion** The bacterial endotoxin test method for GI has been established and is feasible to use as a standard. The bacterial endotoxin limit could be 0.1 EU/mg.

Key words: Gastrodin Injection; bacterial endotoxin; tachypleus amebocyte lysate

天麻素注射液为中枢神经系统用药的中药制剂。中药制剂由于来源、工艺的原因, 可能存在的干扰因素变化较大, 故需要在产品的热原控制方面进行严格监控。家兔热原检查法不灵敏, 影响因素多, 对试验结果影响很大, 因此不利于药物的标准化控制^[1]。而鲎试剂(tachypleus amebocyte lysate, TAL)细菌内毒素检查法(bacterial endotoxin test, BET)具有快速、灵敏、简便、经济、可标准化等优点, 更适宜于生产和使用各阶段的质控, 更能适应现代制药工业的发展。天麻素注射液目前没有统一的内毒素检查法收入药典。国家食品药品监督管理局标准 YBH29342005(海南惠普森医药生物技术有限公司)规定:“每1 mL中含细菌内毒素的量应小于20 EU, 即0.2 EU/mg”;而 YBH38812005(济南利民制药有限责任公司)规定:“每1 mg天麻素中细菌内毒素的量应小于0.25 EU”。YBH06592006

(西南药业股份有限公司)规定了无菌和家兔热原检查法, 未收载 BET 法。为了加快天麻素注射液热原物质检测方法的标准化研究, 拟通过比较鲎试剂在已知含量的内毒素水溶液中的反应和在含有相同内毒素的天麻素注射液中的反应, 探讨用 TAL 检查天麻素注射液中细菌内毒素的可行性; 同时检验不同生产单位和不同批次的天麻素注射液, 并与家兔热原法进行平行比较, 研究其标准化检测方法, 为该品种 BET 法收载入药典提供依据。

1 材料

ZH—2 型自动旋涡混合器(上海); TAL—40D 型试管恒温仪(湛江安度斯生物有限公司); Binder 电热干燥箱(德国)。无热原加样枪头。其他玻璃、金属器皿均经 250 °C 烘烤 2 h。

细菌内毒素工作标准品(中国药品生物制品检定所, 规格 120 EU/支, 批号 150601-2010069)。

收稿日期: 2013-02-18

作者简介: 张伶俐, 女, 重庆人, 博士, 主管药师, 研究方向生物安全性评价和药物分析。Tel: (023)86072740 E-mail: zhanglingli@cqjdc.org.cn

TAL (湛江安度斯生物有限公司, 0.5 EU/mL, 批号 1009091; 0.25 EU/mL, 批号 1010091。湛江博康海洋生物有限公司, 0.5 EU/mL, 批号 0907070; 0.25 EU/mL, 批号 0911080)。

细菌内毒素检查用水 (BET 水, 湛江安度斯生物有限公司, 5 mL/支, 批号 1101170; 湛江海洋生物制品厂, 5 mL/支, 批号 0910190)。

天麻素注射液: 市售, 规格 2 mL: 0.2 g, 批号 100701、100702、100703、100801、100802、100803、100712、100101、100606、100810。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度 (λ) 复核

参照《中国药典》2010 年版附录^[2], 对两个厂家的 TAL 进行标示灵敏度复核, 结果与标示灵敏度相同。

2.2 细菌内毒素限值 (L) 确定

根据细菌内毒素限值公式 $L=K/M$, 其中 K 为细菌内毒素的致热阈, 《中国药典》2010 年版规定我国内毒素标准品对人或家兔的 K 为 5 EU/kg, M 值采用药品致热原检查的家兔注射剂量, 即 50 mg/kg (参照 YBH06592006: 取本品, 加注射用水制成含天麻素 50 mg/mL 的溶液, 每千克家兔体质量缓慢静脉注射 1 mL), 计算得内毒素限值为 0.1 EU/mg; 若 M 值采用人用最大注射剂量, 即 10 mg/kg, 计算得内毒素限值为 0.5 EU/mg。由于该品种临床上多采用与大输液混合方式给药, 发生输液不良反应的预期危害较大, 因此采用内毒素限值 0.1 EU/mg 进行试验。

2.3 最大有效稀释倍数 (MVD) 的计算

对于 λ 为 0.5、0.25、0.125、0.06 EU/mL 的 TAL, 按照公式 $MVD=CL/\lambda$ 计算, $C=100$ mg/mL, 供试品可以选择的稀释倍数分别为 20、40、80、160 倍。

2.4 干扰试验

2.4.1 预试验 用 BET 水将天麻素注射液 (批号 100810) 稀释成 1:20、1:40、1:80、1:160 系列浓度溶液, 以各稀释浓度供试品将细菌内毒素工作标准品稀释成 2.0 λ 和 0.25 λ , 与灵敏度为 0.5、0.25 EU/mL 的 TAL 混合进行干扰预试验, 另取细菌内毒素检查用水和含 2.0 λ 的内毒素溶液各做 2 支阴性对照 (NC) 管和阳性对照 (PC) 管, 结果见表 1。结果显示, NC 管均为阴性, PC 管均为阳性。表明天麻素注射液 1:20 稀释后对两个厂家的 2 个批号的 TAL 均无干扰作用, 且 TAL 灵敏度为

0.5、0.25 EU/mL 时, 供试品对细菌内毒素检查无干扰作用, 可选用灵敏度为 0.5 EU/mL 的稀释 20 倍的 TAL 做细菌内毒素检查用。

表 1 干扰试验预试验结果

Table 1 Results of interfering pretest

厂家	批号	灵敏度	项目	样品稀释倍数			
				20	40	80	160
安度斯	1009091	0.5 EU·mL ⁻¹	PC	++	++	++	++
			NC	--	--	--	--
	1010091	0.25 EU·mL ⁻¹	PC	++	++	++	++
			NC	--	--	--	--
博康	0907070	0.5 EU·mL ⁻¹	PC	++	++	++	++
			NC	--	--	--	--
	0911080	0.25 EU·mL ⁻¹	PC	++	++	++	++
			NC	--	--	--	--

2.4.2 确证试验 取 3 批天麻素注射液 (批号 100606、100810、100712), 以 1:20 稀释倍数稀释样品, 分别对两个不同厂家的 TAL 作干扰试验。即以样品稀释溶液作为溶剂将细菌内毒素工作品稀释成 1.0、0.5、0.25、0.125 EU/mL, 同时用细菌内毒素检查用水将同一支细菌内毒素工作品以上法稀释, 依法^[2]操作 TAL (灵敏度为 0.5 EU/mL), 每一浓度平行做 4 管。另取样品溶液和细菌内毒素检查用水分别作 2 支阴性对照管。结果见表 2。

该试验提示天麻素注射液在 1:20 稀释倍数时, 3 批供试品的反应终点浓度的几何平均值 (E_s 或 E_t) 在 0.5 λ 和 2.0 λ , 且 E_s/E_t 值均在 0.5~2.0, 符合《中国药典》对细菌内毒素检查有效性的规定; 天麻素注射液 20 倍稀释后对 TAL 既无抑制作用也无增强作用, 亦即无干扰作用。采用两个不同厂家的 TAL 作干扰试验, 结果相同。

2.5 样品的测定

取市售 10 批天麻素注射液, 依法^[2]进行细菌内毒素检查, 同时进行家兔热原法检查, 结果见表 3。待测样品中, 6 批不符合规定, 4 批符合规定, 均为两种方法所证实。

3 讨论

实验结果表明, 将天麻素注射液用细菌内毒素检查用水 1:20 稀释, 对标示灵敏度为 0.5 EU/mL 的两批不同厂家生产的鲎试剂均无干扰作用, 说明天麻素注射液可用细菌内毒素检测法来监控热原质。

同时对 10 批天麻素注射液进行了家兔热原法

表2 干扰试验验证试验结果(灵敏度 0.5 EU/mL)

Table 2 Results of verifying interfering test (sensitivity 0.5 EU/mL)

鲎试剂	样品 批号	内毒素含量/(EU·mL ⁻¹)				阴性对照	E_s 或 E_t / (EU·mL ⁻¹)	E_s/E_t
		1.0	0.5	0.25	0.125			
湛江安度斯生物有限公司 (1009091)	100101	++++	++++	+---	----	--	0.42	1.2
	100606	++++	++++	+---	----	--	0.35	1.4
	100810	++++	++++	----	----	--	0.5	1.0
	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5	/
湛江博康海洋生物有限公司 (0907070)	100101	++++	++++	+---	----	--	0.42	1.2
	100606	++++	++++	+---	----	--	0.42	1.2
	100810	++++	++++	----	----	--	0.5	1.0
	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5	/

表3 样品检查结果

Table 3 Results of sample test

样品 批号	鲎试剂检查		阴性 对照	阳性 对照	家兔热原 法检测
	样品管	样品阳性管			
100701	++	+	-	+	+
100702	++	+	-	+	+
100703	++	+	-	+	+
100801	++	+	-	+	+
100802	++	+	-	+	+
100803	++	+	-	+	+
100712	—	+	-	+	-
100101	—	+	-	+	-
100606	—	+	-	+	-
100810	—	+	-	+	-

检测,二者结果一致。而前者具有操作简便、迅速、检测灵敏度高等优点,适合于生产、流通、使用各个环节中的质控,尤其避免了由于家兔个体差异及人为主观判断误差所造成的假阳性或假阴性。因此,用细菌内毒素法检查天麻素注射液内热原质是可行的,值得探讨和推广。研究确定检查方法如下:取本品,依法检查(中国药典2010年版二部附录XIE),每1 mg 天麻素含内毒素量应小于0.1 EU。

最近几年,热原反应信号传导的研究为热原检测方法提供了新的思路,由此提出一种新的热原检

测方法——体外热原检测法(*in vitro* pyrogen test, IPT)。即用免疫化学方法如ELISA法检测内源性致热性细胞因子的释放,来反映样品中的外源性致热原。欧洲体外方法评价中心(ECVAM)、日本研究机构等均参与IPT法的研究、评价工作并取得一定进展^[3-4]。但是由于它是个新兴的方法,一些技术上的问题尚待进一步标准化和统一。如合适的细胞来源尚未明确,检测指标还没有完全统一等。并且此方法和鲎试剂热原检查法相比,价格昂贵、仪器设备要求条件高、操作较复杂,在现阶段尚不能如鲎试剂热原检查法一样能够应用于产品的各个质控环节,并受到各国药典的重视。

参考文献

- [1] 黄清泉,刘文英,丁黎. 热原及其检查方法的研究进展[J]. 中国新医药, 2004, 3(2): 1-4.
- [2] 中国药典[S]. 二部. 2010.
- [3] Hartung T, Aaberge I, Berthold S, *et al.* Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM Workshop 43 [J]. *Altern Lab Anim*, 2001, 29(2): 99-123.
- [4] Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, *et al.* International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 316(1/2): 42-51.