

红花黄素注射液细菌内毒素检测方法的实验研究

王著宇¹, 李冬生¹, 钱进^{2*}

(1. 郑州化学药业有限公司, 河南 郑州 450052; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要: 目的 建立测定红花黄素注射液细菌内毒素的方法。方法 通过进行红花黄素注射液的干扰试验考察, 对 30 批红花黄素注射液进行了热原检查和细菌内毒素检查的对比试验。结果 红花黄素注射液对细菌内毒素检查法鲎试剂反应没有干扰作用, 可以用鲎试剂法作内毒素检查。且本法的结果与家兔法检查热原的结果比较, 符合率为 100%。结论 方法简便、快速、准确。用本方法检测红花黄素注射液中的细菌内毒素是可行的。

关键词: 细菌内毒素试验; 干扰试验; 红花黄素注射液

中图分类号: R954 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)06-0508-02

Experimental studies on bacterial endotoxin test of SAFFLOR INJECTION

WANG Zhu-yu¹, LI Dong-sheng¹, QIAN Jin²

(1. Zhengzhou Chemical Medicine Co. Ltd., Zhengzhou Henan 450053, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract **Object** To establish a method for the determination of bacterial endotoxin in SAFFLOR INJECTION*. **Methods** Thirty batches of SAFFLOR INJECTION were subjected to Limulus lysate test in comparison with pyrogen test to ascertain whether there are any interference between the lysate and SAFFLOR INJECTION. **Results** SAFFLOR INJECTION showed no inhibition or enhancement actions in bacterial endotoxin test with Limulus lysate, while showed a 100% coincidental rate with pyrogen test. **Conclusion** This method was found to be simple, quick, accurate and is suitable for the determination of bacterial endotoxin in SAFFLOR INJECTION.

Key words bacterial endotoxin test; interfering test; SAFFLOR INJECTION

* SAFFLOR INJECTION is an injectable extract of *Carthamus tinctorius* L. used for the treatment of coronary heart disease, angina pectoris and acute myocardial infarction.

红花黄素注射液是从菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花中提取分离得到的有效组分配制成的注射剂, 主要成分为红花黄素 A (safflonyellow-A), 具有活血祛瘀, 通经止痛之功效, 主治冠心病、心绞痛和急性心肌梗死。为有效控制产品质量, 保证临床用药安全有效, 参考文献报道^[1~4], 研究建立了红花黄素注射液细菌内毒素检测方法。

1 仪器、试剂和试药

微量取液器 QYQ-200 (航空工业部青云仪器厂), ZH-2 型涡漩混合器 (天津药典标准仪器厂)。

鲎试剂 (湛江海洋生物制品厂, 批号: 990903, 规格: 0.25 EU/mL, 0.1 mL/皮)。

细菌内毒素工作标准品 (批号: 990924, 规格: 5 EU/皮), 为湛江海洋生物制品厂提供。

细菌内毒素检查用水: 批号: 991217, 规格: 2 mL/皮, 为湛江海洋生物制品厂提供。

测试样品: 红花黄素注射液 (规格: 100 mL: 175

mg, 批号: 20000401, 2000402, 20000403) 均为郑州化学药业有限公司研制产品。

2 方法及结果

2.1 细菌内毒素限值 (L) 的确定: 参照 USPXXIII 版 (1995) 规定, 红花黄素注射液的热原试验家兔注射剂量 (M) 为 6 mL/kg 和我国细菌内毒素标准品的致热阈 (K) 5 EU/kg^[3], 计算出红花黄素注射液理论限值 (L)。

$$L = K / M = 5 / 6 = 0.833 \text{ EU/mL}$$

或根据文献, M 按人每公斤每小时输注该制品的最大剂量计算, 即 $M = 10$, $L = K / M = 0.5 \text{ EU/mL}$ 。综合两者, 取限值 (L) 为 0.5 EU/mL。

2.2 干扰试验有效浓度 (C) 的计算: 参考文献^[4]报道, 根据公式:

$$C_{min} = C_{原} \lambda_{min} / L \text{ 和 } C_{max} = C_{原} \lambda_{max} / L$$

$$\text{故: } C_{min} = C_{原} \cdot 0.03 / 0.5 = 0.06 C_{原}$$

$$C_{max} = C_{原} \cdot 1 / 0.5 = 2 C_{原}, \text{ 由此确定样品稀释倍}$$

* 收稿日期: 2000-11-27

作者简介: 王著宇 (1965-), 男, 河南省获加县人, 1986年毕业于中山大学化学系, 工程师, 主要从事药品质量控制工作。

Tel 0371-7987789

数。当选用 0.25 EU/mL 鲎试剂时,样品稀释倍数 $E = L \lambda = 0.5 / 0.25 = 2$ 倍。

2.3 鲎试剂灵敏度复核:以细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品稀释成 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 EU/mL。取 20 支小试管,每支加入 0.1 mL 待复核鲎试剂溶液并排列 5 列,每列 4 支,其中 4 列分别加入不同浓度的细菌内毒素标准品溶液 0.1 mL,另一列为阴性对照,每支加入细菌内毒素检查用水 0.1 mL。轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入 (37 ± 1) °C 水浴中,保温 (60 ± 2) min 观察结果,并计算鲎试剂实测 λ 值,确认其符合药典规定可用于实验。结果

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

样品	批号	鲎试剂标示 λ (EU/mL)	管号	细菌内毒素标准品溶液 (EU/mL)					阴性对照	实测 λ (EU/mL)
				0.5	0.25	0.125	0.06	0.03		
无热源水	991217	0.25	1	+	+	+	-	-	-	0.18
			2	+	+	+	-	-	-	
			3	+	+	+	-	-	-	
			4	+	+	+	-	-	-	

表 2 红花黄素注射液干扰试验结果

样品批号	细菌内毒素浓度 (EU/mL)					阴性对照	实测 λ 值 (EU/mL)
	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06		
20000401	++++	++++	++++	----	----	----	0.21
20000402	++++	++++	++++	----	----	----	0.18
20000403	++++	++++	++++	----	----	----	0.20
水溶液	++++	++++	++++	----	----	----	0.25

3.1 供试品的内毒素检查法:取红花黄素注射液,用细菌内毒素检查用水稀释成 1:1 的溶液作为供试液。吸取内毒素检查用水 0.1 mL,加入 0.1 mL/支 0.25 EU/mL 鲎试剂中使试剂溶解,再加入上述供试液 0.1 mL,于涡旋混合器上混和 30 s 后,封闭管口。同时做阳性对照、样品阳性对照及阴性对照,每项做 4 管,照药典方法测定。

3.2 细菌内毒素检查法与热原检查法对比试验:取红花黄素注射液 30 批 (经免法热原检查合格),按 3.1 方法操作,结果均为阴性。

4 讨论

4.1 红花黄素注射液属中药注射剂,由于天然药物中大分子物质较难去除,常易引起热原问题,而免法热原检查费时,操作繁琐,影响因素多,给研制工作带来不少麻烦。由于细菌内毒素法有灵敏、快速、操

见表 1。

2.4 红花黄素注射液干扰试验:将样品以细菌内毒素检查用水 1:1 稀释作为供试溶液,再用此溶液及细菌内毒素检查用水分别将细菌内毒素工作标准品稀释成 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 EU/mL 不同浓度的溶液,按 2.3 的方法进行实验。结果见表 2。根据用供试品及水制得的内毒素测得的鲎试剂 λ 值在 50% ~ 200% 以内^[4],结果表明,样品稀释 2 倍时对灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试反应无干扰作用,可用鲎试法作内毒素检查。

3 供试品的内毒素检查

作简便、重现性强等优点,作为确定该药物的热原反应的方法是可行的。

4.2 本实验将 L 值定为 0.5 EU/mL,当使用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂检测时,样品可进行 2 倍稀释。这比按热原检查法注射剂量 6 mL/kg 计算出的 L 值小,要求更严格,用于控制热源反应更加准确、可靠。同时细菌内毒素检查与热原检查两法比较试验,符合率为 100%,亦说明此 L 值是合理的。

参考文献:

- [1] 中国药典 [S]. 1995. 二部. 98 年增补本: 附录 4
- [2] USPXXIII. & NFXVIII. 1995: 483
- [3] 夏振民. 药品细菌内毒素检查的限值 [J]. 药物分析杂志, 1995, 15(3): 54-55.
- [4] 曲道杰, 芮跃伍, 黄清泉, 等. 20%、25%、50% 葡萄糖注射液细菌内毒素检测方法的实验研究 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 305-308.

· 书讯 ·

欢迎邮购《中国中西医结合内科学》(6折优惠)

《中国中西医结合内科学》由王清贵博士主编,全国 80 多位教授、博士研究生参与编写,是广大医务工作者、高等医药院校师生参考工具书。每种疾病均包括概述、中医病因、病机及病理、临床表现、辅助检查、诊断与鉴别诊断、西医最新治疗、中医辨证论治、中医单方、秘方、验方治疗、针灸推拿治疗等。陈灏珠教授为本书题词作序。本书已由黑龙江科学技术出版社出版发行,每册定价原 100 元,现 60 元;王清贵博士主编的《现代家庭医疗与保健指南》,每册 16 元 (含邮资包装费),欢迎订购,款到即寄。联系人,黑龙江抚远:黑龙江省前哨医院王清贵博士。邮编: 156511,电话: 0454-2162403 (晚)。