

长春西汀原料药细菌内毒素检查法研究

周继春*(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2999-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.43

摘要 目的:建立长春西汀原料药细菌内毒素检查方法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录XI E细菌内毒素检查法,采用两个厂家的鲎试剂(TAL),对不同批号的样品进行了干扰试验和细菌内毒素检查。结果:高质量浓度长春西汀溶液对TAL与细菌内毒素的凝集反应有干扰作用,经稀释后可排除干扰。结论:本品不干扰质量浓度为0.25 mg/ml,可采用细菌内毒素检查法进行质量控制。
关键词 长春西汀原料药;细菌内毒素;鲎试剂;干扰试验

Study on Bacterial Endotoxin Test of Vinpocetine Raw Material ZHOU Ji-chun(Henna Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the bacterial endotoxin test of vinpocetine raw material. METHODS: According to the bacterial endotoxin test in the *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition, II) Appendix XI E, the samples with different batches were used for interference test and bacterial endotoxin test by tachypleus amebocyte lysate from 2 manufacturers. RESULTS: The vinpocetine solutions with high concentration have interference effect on the agglutination reaction of bacterial endotoxin and the interference can be eliminated by diluting. CONCLUSIONS: The non-interference concentration of vinpocetine solutions is 0.25 mg/ml. Bacterial endotoxin test can be used to control the quality.
KEYWORDS Vinpocetine raw material; Bacterial endotoxin; Tachypleus amebocyte lysate; Interference test

长春西汀(Vinpocetine)是从夹竹桃科小曼长春花中提取的一种吲哚类生物碱,为脑循环代谢改善剂,具有抑制磷酸二酯酶活性、增加血管平滑肌松弛使环磷酸鸟苷的作用,临床用于改善脑梗塞后遗症、脑出血后遗症、脑动脉硬化症等诱发的各种症状^[1-3]。本品收载于国家药品标准新药转正标准第78册,其中未对热原或细菌内毒素进行控制^[4]。因本品可供注射用,为保证临床用药安全,拟在标准中增加细菌内毒素检查项。按照2010年版《中国药典》(二部)XIE进行了细菌内毒素干扰试验,为建立该品种的细菌内毒素检查法提供依据。本试验选择了湛江安度斯生物有限公司和湛江博康海洋生物有限公司的鲎试剂分别进行,现报道如下。

1 材料

DC3A型干式恒温器(南京三爱斯技术开发有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司)。

长春西汀原料药(批号:20101001、20101002、20101003,商丘市龙兴制药有限公司提供);鲎试剂(TAL,批号:1005282,规格:0.5 ml/支,灵敏度:0.25 EU/ml,湛江安度斯生物有限公司;批号:1004172,规格:0.5 ml/支,灵敏度:0.25 EU/ml,湛江博康海洋生物有限公司);细菌内毒素工作标准品(WSE,规格:120 EU/支,批号:150601-201072,中国食品药品检定研究院);细菌内毒素检查(BET)用水(批号:W2010-1,规格:10 ml/支,中国食品药品检定研究院)。

2 方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素限值(L)的确定

根据公式 $L=K/M$ 计算。 K 为人用每千克体质量每小时最

大可接受的内毒素剂量,注射剂为5 EU/(kg·h); M 为人用每千克体质量每小时的最大剂量。长春西汀注射剂临床每次最大用量为30 mg^[5],加入500 ml氯化钠注射液或葡萄糖注射液中缓慢滴注,故 $L=[5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h}) \times 60 \text{ kg} - 500 \text{ ml} \times 0.5 \text{ EU/ml}] \div 30 \text{ mg} = 1.67 \text{ EU/mg}$ 。因此,拟定本品内毒素限值为:每1 mg长春西汀原料药中含内毒素的量应小于1.67 EU。

2.2 鲎试剂灵敏度的复核

按照2010年版《中国药典》(二部)附录的要求复核所用鲎试剂,结果均符合规定,见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of sensitivity recheck of tachypleus amebocyte lysate

TAL批号	标示灵敏度, EU/ml	复核灵敏度, EU/ml
1005282	0.25	0.25
1004172	0.25	0.25

2.3 干扰预试验

本品在水中不溶,但可溶于酸性溶液,取长春西汀原料药适量加0.1 mol/L盐酸溶液制成含长春西汀20 mg/ml的溶液,微热震荡溶解,然后以BET用水稀释至5.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/ml的溶液。将上述稀释溶液用湛江安度斯生物有限公司生产和湛江博康海洋生物有限公司的TAL(灵敏度均为0.25 EU/ml)依法进行干扰试验预试验^[6-9],结果见表2(表中,“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应)。

预试验结果表明,长春西汀稀释至1.0~0.5 mg/ml时即不再对试验产生干扰。

2.4 干扰试验

根据预试验结果,取长春西汀原料药适量,加0.1 mol/L盐酸溶液制成含长春西汀20 mg/ml的溶液,微热震荡溶解,用

* 副主任药师。研究方向:药检药理。电话:0371-63388238。
E-mail: hnzhoujc@126.com

表2 细菌内毒素干扰预试验结果

Tab 2 Results of preliminary interference test

TAL批号	供试品批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml					PC	NC
			5.0	1.0	0.5	0.25	0.125		
1005282	20101002	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++		
1004172	20101002	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		

BET用水稀释至所需质量浓度。用不同质量浓度的长春西汀溶液将同一支标准品制成2λ、1λ、0.5λ、0.25λ的供试品内毒素溶液。分别取上述两个厂家的鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司λ_{0.25},湛江博康海洋生物有限公司λ_{0.25})与上述内毒素溶液依法进行干扰试验,试验结果见表3(注:E_s为BET用水制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值,E_t为供试品溶液制成的内毒素溶液的反应终点浓度几何平均值;“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应)。

表3 细菌内毒素干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test

TAL批号	供试品批号	供试品质量浓度,mg/ml	内毒素浓度,EU/ml				阴性对照	测定浓度,EU/ml
			0.5	0.25	0.125	0.06		
1005282	20101001	1.0	+++	----			--	E _t >0.5
		0.5	++++	++++	----	----		E _t =0.25
	20101002	1.0	+++	----			--	E _t >0.5
		0.5	++++	++++	----	----		E _t =0.25
	20101003	1.0	+++	----			--	E _t >0.5
		0.5	++++	++++	----	----		E _t =0.25
1004172	BET用水		++++	++++	----	----	--	E _t =0.25
	20101001	0.5	+++	----	----	----	--	E _t >0.5
		0.25	++++	+++	----	----		E _t =0.3
	20101002	0.5	+++	----	----	----	--	E _t >0.5
		0.25	++++	+++	----	----		E _t =0.35
	20101003	0.5	+++	----	----	----	--	E _t >0.5
		0.25	++++	++++	----	----		E _t =0.25
	BET用水		++++	++++	----	----		E _t =0.25

试验结果表明,长春西汀溶液高质量浓度时对TAL与细菌内毒素的凝集反应有抑制作用,经稀释至0.25~0.5 mg/ml时即可排除干扰作用,其最大不干扰质量浓度为0.25 mg/ml。

2.5 细菌内毒素回收试验

精密称取长春西汀原料药适量,等量加入0.2 mol/L盐酸溶液和100 EU/ml细菌内毒素工作标准品溶液,制成含长春西汀20 mg/ml、细菌内毒素50 EU/ml的溶液,微热震荡溶解。然后以BET用水将其稀释成2λ、1λ、0.5λ、0.25λ的内毒素溶液。用两个厂家鲎试剂与上述内毒素溶液反应,结果见表4。

表4 细菌内毒素回收试验结果

Tab 4 Results of recovery test of bacterial endotoxin

TAL批号	供试品批号	供试品内毒素浓度,EU/ml				阴性对照	E _t
		0.5	0.25	0.125	0.06		
1005282	20101001	++++	++++	----	----	--	0.25
1004172	20101001	++++	+++	----	----	--	0.35

结果表明,用0.1 mol/L盐酸溶液微热震荡溶解样品,对细菌内毒素活性无明显影响。

2.6 细菌内毒素检查

分别选择两个厂家的鲎试剂(灵敏度为0.25 EU/ml),按拟

定的方法对3批样品进行细菌内毒素检查,结果均符合规定。见表5。

表5 细菌内毒素检查结果

Tab 5 Results of bacterial endotoxins test

TAL批号	供试品批号	阴性对照	阳性对照	供试品阳性对照	供试品
1005282	20101001	--	++	++	--
	20101002	--	++	++	--
	20101003	--	++	++	--
1004172	20101001	--	++	++	--
	20101002	--	++	++	--
	20101003	--	++	++	--

3 讨论

长春西汀在水中不溶,而细菌内毒素检查法通常要求供试品溶于BET用水后进行测定,因此寻找合适的溶剂是试验的首要因素。本品可溶于酸性溶液,故笔者取本品适量分别用1.0、0.5、0.1 mol/L盐酸溶液制成含长春西汀20 mg/ml的溶液,微热震荡后均可溶解。为避免酸度对细菌内毒素过多的影响,故选用0.1 mol/L盐酸溶液作溶剂。

样品溶解过程中使用的盐酸溶液或其他助溶剂可能对样品中的细菌内毒素造成破坏,为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性,要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验(即细菌内毒素回收试验),细菌内毒素回收率在50%~200%之间方可说明该溶解方法对细菌内毒素的活性无明显影响。

长春西汀注射剂临床每次最大用量为30 mg,加入500 ml氯化钠注射液或葡萄糖注射液中缓慢滴注,因此在确定供试品细菌内毒素限值(L)时,应减去输液中所含的内毒素,以确保临床用药安全。

参考文献

- [1] 刘国磊,王帅,王静,等.长春西汀聚乳酸-聚乙醇酸缓释微球的研制[J].中国药房,2012,23(13):1 203.
- [2] 王春富,汤新强.长春西汀的临床应用进展[J].大连医科大学学报,2009,31(3):364.
- [3] 陈鹰,杜蓉,刘宏,等.长春西汀固体过饱和自乳化释药系统的研制[J].中国药房,2010,21(29):2 750.
- [4] 国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准[S].北京:中国医药科技出版社,2010:166.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:化学药与生物制品卷[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:93.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XI E.
- [7] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范:2010年版[S].北京:中国医药科技出版社,2010:310.
- [8] 李逢春,周继春.长春西汀注射液细菌内毒素检查法的建立[J].中国药业,2011,20(24):47.
- [9] 祝清芬,国明,魏霞,等.米力农注射液细菌内毒素检查法标准修订[J].中国药事,2012,26(5):456.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2015-01-23)

(编辑:余庆华)