doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.21.019

长春西汀注射剂细菌内毒素检查法研究

贾首前,王莉芳,冯润东,张　丽

(陕西省食品药品监督检验研究院,陕西 西安　710065)

摘要:目的　建立测定长春西汀注射剂中热原物质的细菌内毒素检查法。**方法**　参照 2015 年版《中国药典(四部)》中细菌内毒素检查法,测定长春西汀注射剂中的热原物质。**结果**　使用细菌内毒素检查用水和 0.75 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至长春西汀注射剂的(质量浓度为 5 mg/mL)50 倍及以上时,不干扰细菌内毒素的检查结果。**结论**　细菌内毒素检查法可替代热原检查法,用以测定长春西汀注射剂中的热原物质,细菌内毒素检查法的限值可统一为 0.5 EU/mg。

关键词:长春西汀;细菌内毒素;干扰试验;热原检查法

中图分类号:R972⁺.4;R917　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1006－4931(2021)21－0069－04

Bacterial Endotoxin Test for Vinpocetine Injection

JIA Shouqian, WANG Lifang, FENG Rundong, ZHANG Li

(*Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China　710065*)

Abstract: Objective　To establish a bacterial endotoxin test for the determination of pyrogen in Vinpocetine Injection. **Methods**　The pyrogen in Vinpocetine Injection was determined according to the bacterial endotoxin test method in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition, Volume Ⅳ). **Results**　Vinpocetine Injection (5 mg/mL) did no interfere with the results of bacterial endotoxin test when diluted to 50 times or more with water for bacterial endotoxin test and 0.75 mol/L Sodium Hydroxide Solution. **Conclusion**　Bacterial endotoxin test can replace pyrogen test to determine the pyrogen in Vinpocetine Injection. The limit value of Vinpocetine Injection in the bacterial endotoxin test can be unified as 0.5 EU/mg.

Key words: vinpocetine; bacterial endotoxin; interfering test; pyrogen test

长春西汀由小蔓长春花中分离得到的一种吲哚类生物碱长春胺结构改造而来,生物活性更高,毒副作用更小。其最早由匈牙利的 Gedeon Richter 药物公司研发,并于 1978 年以商品名 Cavinton 上市,脂溶性高,呈现 pH 酸性依赖,易透过血脑屏障[1],用于治疗脑血管相关疾病认知障碍[2]。目前,长春西汀注射剂的批准文号共 59 个,其中注射用长春西汀 37 个,长春西汀注射液 22 个。2020 年,国家抽验评价该品种现行标准中既采用家兔热原法,又采用细菌内毒素法检查热原物质,发现热原限值相差 5 倍,细菌内毒素限值相差 8 倍,且在热原检查过程中出现家兔体温降低,易出现假阴性结果。长春西汀注射液/注射用长春西汀(以下称为长春西汀注射剂)制备过程中使用了枸橼酸、维生素 C、甘露醇/山梨醇、*L*－酒石酸等多种辅料,辅料内毒素的控制情

第一作者:贾首前,男,大学本科,药师,研究方向为药品检验及安全性评价,(电子信箱)2956347148@qq.com。

铅元素的含量[J]. 黑龙江医药,2009,22(2):114－115.
[2] 夏小叶,冯秀珍. 原子吸收分光光度法测定香丹注射液中铅和镉的含量[J]. 中国现代药物应用,2013,7(16):3－4.
[3] 杨云芬,李文芳,李济超. 铅的中枢神经毒性机制研究进展[J]. 中国工业医学杂志,2012,25(4):274－276.
[4] CNAS－GL06－2006,化学分析中不确定度的评估指南[S].
[5] ISO/IEC. 17025－2017,检测和校准实验室能力的通则要求[S].
[6] 王世亮,何志侠,陈殿良,等. 生物样品中游离铂与总铂浓度的石墨炉 AAS 测定[J]. 中国新药杂志,2014,23(22):2681－2686.
[7] 卢　姗,陈　中,程仕群,等. 石墨炉原子吸收法测定食品中铅含量的不确定度分析[J]. 生物化工,2015,1(1):56－59.
[8] 刘全德,刘恩岐,唐仕荣,等. 直接进样石墨炉原子吸收测定双黄连口服液中铅的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(2):292－295.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:205.
[10] JJF1059,1－2012,测量不确定度评定与表示[S].
[11] JJG196,常用玻璃容器检定规程[S].
[12] 郭　雷,周长明,宋　宇,等. 电感耦合等离子体质谱法测定人血白蛋白中铝含量的不确定度评定[J]. 中国新药杂志,2018,27(24):2944－2948.
[13] 宋　宇,邵天舒,周长明,等. 原子吸收光谱法测定整蛋白型肠内营养剂中 4 种元素含量的不确定度[J]. 华西药学杂志,2018,33(6):557－560.
[14] 赵一霖,李　姗,何　霜,等. 电感耦合等离子体质谱法测定水产品中 16 种元素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(10):4156－4162.

(收稿日期:2021－05－12)

况直接影响长春西汀注射剂的热原物质。为评估各厂家热原物质的整体控制情况，参照2015年版《中国药典（四部）》中细菌内毒素检查凝胶法[3]及文献[4－9]开展长春西汀注射剂细菌内毒素检查法的研究，评估内毒素检查法替代热原检查法的可行性，同时建立细菌内毒素的质量控制标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TAL－40D型试管恒温仪（湛江安度斯生物有限公司）；DHG－9245A型电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；ZH－2型混旋仪（天津药典标准仪器厂）；微量移液枪（Eppendorf公司）；细菌内毒素检查用具（试验所用玻璃仪器均经250 ℃干烤30 min）。

1.2 试药

鲎试剂（湛江博康海洋生物有限公司，批号为2004012；湛江安度斯生物有限公司，批号为1908192；灵敏度均为0.25 EU/mL，规格均为每支0.1 mL）；细菌内毒素工作标准品（CSE，中国食品药品检定研究院，批号为150601－201784，规格为每支80 EU；细菌内毒素检查用水（BET用水，批号为1907020，规格为每支5 mL），碱性调节剂（批号为1903080，规格为每支2 mL），均购自湛江博康海洋生物有限公司；镁离子缓冲液（湛江安度斯生物有限公司，批号为2002270，规格为每支4.0 mL）；氢氧化钠（国药集团化学试剂有限公司，批号为20170105）；长春西汀注射液（遂成药业股份有限公司，批号分别为11904042，11908151，11904041；注射用长春西汀（海南通用康力制药有限公司，批号分别为11911014，11904011，11904021；云南盟生药业有限公司，批号分别为20190201，20190303，20190301；开封康诺药业有限公司，批号分别为D190263，D191091，D191083；山西普德药业有限公司，批号分别为11190502，09190302，09190601）。

2 方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素限值确定

2015年版《中国药典（四部）》中细菌内毒素限值（L）计算公式为 $L = K/M$。式中，K 为按规定给药途径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 $K = 5$ Eu/（kg·h）；M 为人用每千克体质量每小时最大剂量，体质量按60 kg计。参照长春西汀注射剂药品说明书，本品成人1次最大给药剂量为30 mg，则 $L = 10.0$ EU/mg。由于本品属急症心脑血管疾病用药，临床用量大，故将限值确定为计算值的1/2，即5.0 EU/mg。

2.2 供试品最大有效稀释倍数（*MVD*）确定

目前，市售鲎试剂灵敏度为0.50～0.03 EU/mL，按2015年版《中国药典（四部）》通则1143细菌内毒素检查法计算公式 $MVD = CL/\lambda$，$C = 5$ mg/mL，$L = 5.0$ EU/mg，则 $MVD_{0.50\sim0.03}$ 为50～833倍（0.010～0.006 mg/mL）。

2.3 鲎试剂灵敏度复核

按2015年版《中国药典（四部）》通则1143检查2个厂家灵敏度为0.5 EU/mL的鲎试剂，复核结果λc均在0.5λ～2.0λ之间，符合细菌内毒素检查要求。详见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果（EU/mL）

Tab. 1 Recheck results of sensitivity of limulus amebocyte lysate (EU/mL)

批号	标示值	细菌内毒素浓度					λ_C
		1.0	0.5	0.25	0.125	NC	
1908192	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5
2004012	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5

注：+为反应阳性，－为反应阴性；NC为阴性对照。下表同。

Note: + means positive reaction, − means negative reaction, and NC means negative control, as well as the following tables.

2.4 供试品干扰试验预试验

先将样品用BET用水溶解成5 mg/mL的样品溶液，再用BET用水和镁离子缓冲液或0.75 mol/L氢氧化钠溶液稀释成50，100，200，400，800倍的供试品溶液，记为供试品阴性对照（NPC）管，样品稀释前后的pH见表2。另制备同样稀释浓度的系列稀释液，并使每个稀释浓度的稀释液均含1.0 EU/mL（2λ）的内毒素，记为供试品阳性对照（PPC）管，使用2个厂家λ均为0.5 EU/mL的鲎试剂，每个浓度分别取0.1 mL，加入用BET用水复溶的鲎试剂管中，每个浓度做2管，同时设NC管、阳性对照（PC）管，轻轻混匀，封口，放置在（37±1）℃试管恒温仪中保温（60±2）min。结果见表3至表4。可见，使用标示灵敏度为0.5 EU/mL的2个厂

表2 长春西汀注射剂稀释前后的pH值

Tab. 2 The pH value of Vinpocetine Injection before and after the dilution

样品批号	稀释前	调节后		样品批号	稀释前	调节后	
		镁离子缓冲液	0.75 mol/L氢氧化钠溶液			镁离子缓冲液	0.75 mol/L氢氧化钠溶液
11904042	3.2	6.5～7.0	7.0～7.5	20190301	4.0	7.0～7.5	7.0～7.5
11908151	3.3	6.5～7.0	7.0～7.5	D190263	4.5	7.0～7.5	7.0～7.5
11904041	3.3	6.5～7.0	7.0～7.5	D191091	4.7	7.0～7.5	7.0～7.5
11911014	3.3	6.5～7.0	7.0～7.5	D191083	4.7	7.0～7.5	7.0～7.5
11904011	3.3	6.5～7.0	7.0～7.5	11190502	3.0	5.5～6.0	7.0～7.5
11904021	3.3	6.5～7.0	7.0～7.5	09190302	2.9	5.5～6.0	7.0～7.5
20190201	4.0	7.0～7.5	7.0～7.5	09190601	2.9	5.5～6.0	7.0～7.5
20190303	4.4	7.0～7.5	7.0～7.5				

表 3 长春西汀注射剂细菌内毒素干扰试验预试验结果(镁离子缓冲液,鲎试剂批号为 1908192)

Tab. 3 Pre-test results of bacterial endotoxin interfering test of Vinpocetine Injection(magnesium ion buffer, the batch number of limulus amebocyte lysate is 1908192)

样品批号	组别	供试品溶液稀释倍数					NC	PC
		50	100	200	400	800		
11904042	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
11911014	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
20190201	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
D190263	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -	+ +
11190502	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		
09190302	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		
09190601	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		

表 4 长春西汀注射液剂细菌内毒素干扰试验预试验结果(镁离子缓冲液,鲎试剂批号为 2004012)

Tab. 4 Pre-test results of bacterial endotoxin interfering test of Vinpocetine Injection (magnesium ion buffer, the batch number of limulus amebocyte lysate is 2004012)

样品批号	组别	供试品溶液稀释倍数					NC	PC
		50	100	200	400	800		
11904042	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
11911014	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
20190201	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +		
D190263	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	- -	+ +
11190502	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		
09190302	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		
09190601	NPC	- -	- -	- -	- -	- -		
	PPC	- -	- -	- -	- -	- -		

家的鲎试剂,采用镁离子缓冲液调节 pH 后,3 批(批号分别为 11190502,09190302,09190601)样品在系列稀释倍数下均对细菌内毒素的试验结果存在干扰作用。由于样品均存在干扰作用,所有样品使用 0.75 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 后进行预试验。结果,所有样品均对细菌内毒素的预试验结果无干扰作用,故最终选择 0.75 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH。

表 5 长春西汀注射剂细菌内毒素干扰试验正式试验结果(EU/mL)

Tab. 5 Results of bacterial endotoxin interfereing test of Vinpocetine Injection(EU/mL)

鲎试剂批号	BET 用水/样品批号	细菌内毒素浓度					结果
		1.0	0.5	0.25	0.125	NC	
1908192	BET 用水	+ + + +	+ + + -	- - - -	- - - -	- -	0.59*
	11904042	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	11908151	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	11904041	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	11911014	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	11904011	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	11904021	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	20190201	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	20190303	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	20190301	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	D190263	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	D191091	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	D191083	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	11190502	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	09190302	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	09190601	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
2004012	BET 用水	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.50
	11904042	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	11908151	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	11904041	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	0.71
	11911014	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.50
	11904011	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.50
	11904021	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.50
	20190201	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	0.84
	20190303	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	0.84
	20190301	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	0.84
	D190263	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	D191091	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	D191083	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	11190502	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	09190302	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00
	09190601	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	1.00

注:* 为 E_s,其余为 E_t。

Note: * refers E_s and the rest is E_t.

2.5 干扰试验正式试验

按 2.3 项下方法配制标准品系列溶液,按 2.4 项下方法将 5 mg/mL 长春西汀注射剂使用 BET 用水和 0.75 mol/L 氢氧化钠溶液制成 1∶50(*V*/*V*)的溶液,同时配制 1∶50(*V*/*V*)样品溶液含细菌内毒素浓度分别为 2 λ,1 λ,0.5 λ,0.25 λ 的系列溶液,每个浓度分别平行做 2 管和 4 管,按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 进行干扰试验。结果见表 5。可见,细菌内毒素工作

标准品的反应终浓度(标准品系列溶液内毒素反应终浓度 E_s)均在0.5 λ～2.0 λ之间,细菌内毒素工作标准品在长春西汀注射剂1∶50(*V*/*V*)稀释溶液中的反应终浓度(供试品含标准品系列溶液反应终浓度 E_t)均在0.5～2.0 E_s之间,符合2015年版《中国药典(四部)》对细菌内毒素检查有效性的规定。

2.6 供试品细菌内毒素检查

根据干扰试验结果,取上述15批供试品,先用BET用水制成质量浓度为5 mg/mL的溶液,再用BET用水和0.75 mol/L氢氧化钠溶液稀释成1∶50(*V*/*V*)的供试品溶液,使用2个厂家的鲎试剂(λ为0.5 EU/mL),按2015年版《中国药典(四部)》通则1143项下方法进行细菌内毒素检查,每1 mg长春西汀注射剂中含细菌内毒素的量应小于5.0 mg。结果15批供试品均为阴性,PPC管均为阳性,NC管均为阴性,PC管均为阳性,检查结果均符合规定。

3 讨论

长春西汀注射液处方工艺中均含有维生素C、甘露醇/山梨醇、*L*-酒石酸;注射用长春西汀处方工艺中均含有枸橼酸、甘露醇/山梨醇等多种辅料。《美国药典(42版)》[10]和《欧洲药典10.0》[11]中均未收载长春西汀注射剂的质量标准,仅有长春西汀原料药的质量标准,标准中均未涉及长春西汀的热原或细菌内毒素检查法。研究发现,高浓度的甘露醇对细菌内毒素检查存在干扰作用[12-13],参照2018年版《英国药典》[14]中枸橼酸细菌内毒素限值(0.5 EU/mg),本试验室采用0.25 EU/mL的鲎试剂确定了枸橼酸的最大不受干扰浓度为0.5 mg/mL,表明样品中高浓度的枸橼酸对细菌内毒素检查有抑制作用。镁离子缓冲液作为细菌内毒素检查的辅助剂,可消除枸橼酸盐类抗凝剂,部分会导致鲎试验反应中二价离子缺失的样品的干扰作用,在使用镁离子缓冲液和碱性调节剂调节pH过程中高浓度的样品会产生沉淀。故在开始稀释样品时使用BET用水,在最后一步使用镁离子缓冲液进行等比稀释,即可调整到合适的pH值,且无沉淀产生,与文献[8]报道一致。文献[5]报道了采用除热原处理的0.75 mol/L氢氧化钠溶液调整pH来排除干扰作用。若样品pH值过小(pH≤3.0),采用镁离子缓冲剂不能达到适宜的pH值(pH<6.0)时,宜采用0.75 mol/L氢氧化钠溶液调整到合适的pH值再进行试验;若样品pH>3.0,可考虑使用镁离子缓冲剂调节pH。

本栏目由
重庆药友制药有限责任公司
协办

鲎试剂反应最适pH值为6.0～8.0,过低或过高均会干扰试验结果[6,15]。用注射用长春西汀溶解后pH值偏低,本研究中采用稀释法和中和法对长春西汀注射剂进行了细菌内毒素方法学验证,中和法建议采用0.75 mol/L氢氧化钠溶液。结果表明,长春西汀注射剂(5 mg/mL)使用2个厂家灵敏度为0.5 EU/mL的鲎试剂,并采用细菌内毒素检查法来控制其细菌内毒素含量可行。

综上所述,本研究中建立的长春西汀注射剂细菌内毒素检查法合理、可行,可替代热原检查法,消除热原检查中家兔体温降低出现的假阴性结果。建议将细菌内毒素限值统一为5.0 EU/mg。

参考文献

[1] 徐 斌,崔 萍,丁逸梅,等. 长春西汀注射液的制备[J]. 中医药导报,2015,21(17):36-38.
[2] 陆靖鹏,郑玉林,孟艳秋. 长春西汀制剂的研究进展[J]. 中国新药杂志,2019,28(12):1472-1476.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:154.
[4] 王 冲,刘 柳. 注射用长春西汀细菌内毒素检查法研究[J]. 中国当代医药,2009,16(18):113.
[5] 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):47-48.
[6] 胡 佳. 长春西汀注射液中细菌内毒素检查方法的建立[J]. 黑龙江医药,2016,29(1):47-49.
[7] 贾 丛,宋翠玲,曹婉茹,等. 注射用长春西汀细菌内毒素检查法研究[J]. 饮食保健,2018,5(52):318-319.
[8] 刘建辉,唐先明,宋丽阳,等. 长春西汀注射液细菌内毒素检查法的改进[J]. 黑龙江医药,2019,32(4):763-765.
[9] 周继春. 长春西汀原料药细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药房,2015,26(21):2999-3000
[10] The United States Pharmacopieial Convention. USP 42-NF37[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2019: 5276-5277.
[11] European Pharmacopoeia Commission. EP 10.0[M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medcines and Healthcare, 2020:4188-4189.
[12] 刘惠萍. 注射用药用辅料甘露醇细菌内毒素检查方法研究[J]. 淮海工学院学报(自然科学版),2013,22(4):59-62.
[13] 邓 莎,罗 洁,张德波,等. 注射制剂辅料甘露醇细菌内毒素检查法研究[J]. 健康必读,2020(21):2-3.
[14] British Pharmacopoeia Commission. BP 2018[M]. London: The Stationery Office, 2018:594-595.
[15] 贾首前,呼延婷婷,焦 洁,等. 依达拉奉细菌内毒素检查法的研究[J]. 中国药品标准,2019,20(3):251-254.

(收稿日期:2020-08-18;修回日期:2021-04-23)