

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.019

长春西汀原料药细菌内毒素检查方法学研究*

陈晨,裴宇盛,杜颖,蔡彤[△],高华

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

摘要:目的 建立长春西汀原料药细菌内毒素的检查方法。方法 依据2020年版《中国药典(四部)》附录1143建立长春西汀原料药细菌内毒素的检测限;分别以盐酸和酒石酸作溶解剂,并优化稀释步骤,防止稀释过程中样品析出,采用光度测定法干扰试验对溶解剂和稀释步骤进行方法学验证,并用试验确定的条件,采用凝胶法对不同批号的样品进行干扰试验和细菌内毒素检查。结果 用细菌内毒素检查用水溶解长春西汀和酒石酸,并稀释120倍,再用Tris缓冲液将样品溶液稀释至480倍,凝胶法和光度测定法干扰试验均符合规定,可排除干扰,且3批供试品内毒素含量均小于1.67 EU/mg。结论 所建立的方法可用于长春西汀原料药细菌内毒素检查。

关键词:长春西汀;难溶性药物;细菌内毒素;检查方法

中图分类号:R917;R972

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)22-0078-04

Bacterial Endotoxin Test Methodology of Vinpocetine Active Pharmaceutical Ingredients

CHEN Chen, PEI Yusheng, DU Ying, CAI Tong, GAO Hua

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 102629)

Abstract: **Objective** To establish a method for bacterial endotoxin test of vinpocetine active pharmaceutical ingredients (API). **Methods** According to appendix 1143 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition), the limit of detection (LOD) of bacterial endotoxin in vinpocetine API was established. Hydrochloric acid and tartaric acid were selected as the dissolving agent respectively, and the dilution steps were optimized to prevent the precipitation of the samples during dilution. The photometric interference test was used to verify the dissolving agent and dilution steps. The interference test and bacterial endotoxin test of different batches of samples were carried out by gel method through the conditions determined in this test. **Results** The vinpocetine and tartaric acid were dissolved with bacterial endotoxin test water, and diluted by 120 times, and then the sample solution was diluted to 480 times by Tris buffer solution, in which the gel method and photometric interference test both met the requirements, which could eliminate the interference. The content of endotoxin in the three batches of test products was less than 1.67 EU/mg. **Conclusion** The established method can be used for bacterial endotoxin test of vinpocetine API.

Key words: vinpocetine; poorly water-soluble drug; bacterial endotoxin; test method

长春西汀为长春花中提取的一种生物碱,临床用于改善脑梗死后遗症、脑出血后遗症、脑动脉硬化症等诱

发的各种症状,具有起效快、耐受性好、不良反应小等特点,在脑血管疾病的治疗中占有重要地位^[1-2]。为避免

*基金项目:国家科技重大专项(民口)课题[2018ZX09101-001]。

第一作者:陈晨,女,汉族,硕士研究生,助理研究员,研究方向为药检药理,(电子信箱)candychen0110@163.com。

[△]通信作者:蔡彤,女,满族,硕士研究生,主管药师,研究方向为药检药理,(电子信箱)teddyct@163.com。

中,部分企业存在批间与批内差异较大的问题。同时,盐酸地巴唑片的现行质量标准制定于1989年,在项目设置等方面存在不足,已不能满足现阶段对产品质量有效控制的基本要求。

综上所述,盐酸地巴唑片总体质量水平一般,建议相关企业改进和完善生产工艺,提高产品质量。同时,由于现行质量标准不完善,有效性和安全性指标设立不足,不能完全有效控制药品质量,需尽快提高质量标准。

参考文献

- [1] 戴自英. 实用内科学(下册)[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社, 1995:2101-2103.
- [2] GURKOVSKAYA AN, GOKINA NI, SHUBA MF, et al. Mechanism of the effect of dibazol on the contractile and electric activities of

the smooth muscle of the portal vein[J]. Fiziol Zh, 1989, 35(6): 50-53.

- [3] 王泽民. 当代结构药物全集[M]. 2版. 北京:北京科学技术出版社, 1996:1359-1360.
- [4] WS₁-24(B)-89, 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S].
- [5] 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, 2020:61-65.
- [6] 张肖宁, 刘云飞, 杨丽红. HPLC-TOF-MS分析盐酸羟苄唑原料有关物质[J]. 中国药品标准, 2016, 17(3):189-193.
- [7] 胡德福, 谭会洁, 蒋慧. HPLC法测定地巴唑片含量及其有关物质[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(4):430-431.
- [8] 陈宇堃, 梁蔚阳. 盐酸地巴唑原料药和片剂中有关物质的测定及最大未知杂质结构的推测[J]. 中国药房, 2020, 31(6):696-702.

(收稿日期:2020-12-10;修回日期:2021-04-02)

长春西汀注射液在生产过程中带来的质量风险,保证用药安全,有必要严格控制其原料的细菌内毒素含量。长春西汀原料药为白色晶状粉末且几乎不溶于水,需使其溶解至澄清溶液后再进行细菌内毒素检验,否则不溶性微粒中可能包裹细菌内毒素导致假阴性结果^[3]。受企业委托,根据2015年版《中国药典(四部)》附录1143细菌内毒素检查法的要求,对其原料药细菌内毒素的测定进行方法学研究,为该类产品的质量控制在提供新的解决思路。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AE240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Vortex-Genie2型涡旋混合器(美国Scientific Industries公司);ELX-808型细菌内毒素测定仪(美国BioTek仪器公司);WNE45型恒温水浴锅(德国Mettmert公司)。

1.2 试剂

长春西汀原料药(河南润弘制药股份有限公司,批号代号分别为A,B,C);0.1 mol/L盐酸标准滴定溶液(中国食品药品检定研究院);酒石酸(湖南尔康制药股份有限公司,批号为102620180401);鲎试剂(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,批号为171211,检测限为0.005~50 EU/mL;湛江安度斯生物有限公司,批号为1802052,灵敏度为0.03 EU/mL;厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,批号为18011001,灵敏度为0.03 EU/mL);细菌内毒素国家标准品(中国食品药品检定研究院,批号为150800-201601,单支效价为9 000 EU);细菌内毒素检查用水(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,批号为171211;湛江安度斯生物有限公司,批号为1810260);Tris缓冲液(湛江安度斯生物有限公司,批号为1808240)。

2 方法与结果^[4-5]

2.1 限值确定

药品的细菌内毒素限值(L)= K/M ,式中, K 为人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量,以EU/(kg·h)表示, M 为人用每1 kg体质量每1 h的最大供试品剂量,以mL/(kg·h)、mg/(kg·h)或U/(kg·h)表示,长春西汀原料药供生产注射剂使用,以注射剂的 K 值为5 EU/(kg·h)计算,人均体质量按60 kg计算,则成人每1 h最大可接受的内毒素剂量为300 EU;依据长春西汀注射液说明书要求,成人一次最大给药剂量为30 mg,溶入500 mL 0.9%氯化钠注射液或5%葡萄糖注射液缓慢滴注(<80滴/分),则样品内毒素限值为 $(300 \text{ EU}-0.5 \text{ EU/mL} \times 500 \text{ mL}) \div (30 \text{ mg} \div 3) =$

5 EU/mg;为严格控制成品质量,依据从严原则,企业期望将长春西汀原料细菌内毒素的 L 拟订为每1 mg长春西汀原料药中含内毒素的量应小于1.67 EU。

2.2 光度测定法

2.2.1 标准曲线可靠性验证试验

按药典细菌内毒素检查法规定,进行鲎试剂的标准曲线可靠性试验,动态显色法鲎试剂经细菌内毒素国家标准品检查,结果均符合规定。

2.2.2 干扰试验及供试品内毒素含量检测

1) 样品溶液制备

取长春西汀原料药适量,精密称定,加入细菌内毒素检查用水溶解,制成含长春西汀20 mg/mL的样品溶液。若长春西汀溶解性差,可置37℃恒温水浴中加热助溶,或加入适量助溶剂。

2) 有效稀释倍数(MVD)计算

公式为 $MVD = L \times C / \lambda$ 。式中, L 为长春西汀的细菌内毒素限值(1.67 EU/mg), C 为样品溶液质量浓度(20 mg/mL), λ 为鲎试剂标示灵敏度(0.005 EU/mL)。则长春西汀的对应最大有效稀释倍数为, $MVD_{0.005} = 1.67(\text{EU/mg}) \times 20(\text{mg/mL}) / 0.005(\text{EU/mL}) = 6680$ 倍。本试验中选择稀释1 000倍进行检测。

3) 试验操作

标准曲线:取细菌内毒素国家标准品,用细菌内毒素检查用水50,5,0.5,0.05,0.005 EU/mL系列标准品溶液,每个浓度做2个平行孔检测。使用0.1 mL标准内毒素+0.1 mL动态显色法鲎试剂进行检测。以细菌内毒素浓度(C)对数值($\lg C$)为横坐标,达预设吸光度(OD)值反应时间(T)对数值 $\lg T$ 为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $\lg T = 6.18 - 0.225 \lg C$ 。

样品溶液:取2.2项下3批次的样品溶液,加适量0.1 mol/L盐酸溶液,使样品溶液呈澄清液体,以稀释剂(如Tris缓冲液)调pH为6.0~8.0,先使用细菌内毒素检查用水将长春西汀稀释100倍后,再用Tris缓冲液稀释10倍。样品溶液做2个平行孔,使用0.1 mL样品溶液及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。取3个批次的长春西汀原料药,分别与酒石酸铵1:0.5(m/m)取样,用细菌内毒素检查用水溶解,制成含长春西汀20 mg/mL的样品溶液,置37℃恒温水浴中加热助溶并振荡,同法加入Tris缓冲液稀释并调pH为6.0~8.0。样品溶液做2个平行孔,使用0.1 mL样品溶液及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。

样品回收溶液:采用预先添加标准内毒素的方法,取2种助溶剂配制的含20 mg/mL的长春西汀溶液0.1 mL,分别加入10 μL 5 000 EU/mL细菌内毒素标准溶液,用细菌内毒素检查用水溶解,置37℃恒温水浴中加热助

溶并振荡,用细菌内毒素检查用水稀释100倍,然后再用Tris缓冲液稀释10倍。使细菌内毒素的最终含量为0.5 EU/mL,再加入0.1 mL鲎试剂,做回收率检测,每个稀释度的样品回收溶液做2个平行孔,使用0.1 mL样品回收溶液及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。

阴性对照:以细菌内毒素检查用水作阴性对照,做2个平行孔,使用0.1 mL阴性对照及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。

4) 试验结果

结果见表1。使用盐酸为助溶剂的样品回收率不在50%~200%间,认为在此试验条件下样品溶液存在干扰;使用酒石酸为助溶剂的样品回收率符合规定,且内毒素含量小于限值要求,3批样品均符合规定。

表1 长春西汀内毒素检测结果

Tab. 1 Results of the endotoxin test of vinpocetine

样品 批号	样品稀 释倍数	盐酸助溶剂			酒石酸助溶剂		
		回收率 (%)	样品内毒素 浓度(EU/mL)	内毒素含量 (EU/mL)	回收率 (%)	样品内毒素 浓度(EU/mL)	内毒素含量 (EU/mg)
A	1 000	7.5			185.4	<5	<0.25
B	1 000	8.6			142.1	<5	<0.25
C	1 000	15.3			158.2	<5	<0.25

2.2.3 高酸度对细菌内毒素的影响

上述试验未考察高酸度对样品本身所含内毒素的影响,故模拟预先添加内毒素的方法,验证在添加2种助溶剂时的酸度(0.1 mol/L的盐酸和10 mg/mL的酒石酸)是否会破坏细菌内毒素,对试验造成干扰,从而影响结果。

1) 试验操作

标准曲线:同2.2.2试验操作项下方法,得回归方程 $\lg T = 6.05 - 0.228 \lg C$ ($r = 0.999$)。

样品溶液:取0.1 mol/L的盐酸和10 mg/mL的酒石酸溶液先用细菌内毒素检查用水稀释1 000倍,作为样品溶液,样品溶液做2个平行孔,使用0.1 mL样品溶液及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。

样品回收溶液:取0.1 mol/L的盐酸和10 mg/mL的酒石酸溶液各0.1 mL,分别加入10 μ L 5 000 EU/mL的细菌内毒素标准溶液,用细菌内毒素检查用水溶解,用细菌内毒素检查用水稀释1 000倍,使最终细菌内毒素含量为0.5 EU/mL,再加入0.1 mL鲎试剂,做回收率检测,每个稀释度的样品回收溶液做2个平行孔,使用0.1 mL样品回收溶液及0.1 mL动态显色法鲎试剂检测。

阴性对照:同2.2.2项下方法进行试验。

2) 试验结果

盐酸助溶剂回收率(8.90%)不在50%~200%间,认为0.1 mol/L的盐酸可能会破坏细菌内毒素,对检测结

果有影响,而10 mg/mL的酒石酸(回收率132.9%)则对细菌内毒素无破坏作用,样品内毒素浓度<5 EU/mL。

2.3 凝胶法

2.3.1 鲎试剂灵敏度复核试验

按药典细菌内毒素检查法规定,进行鲎试剂的标示灵敏度复核,结果见表2。2批鲎试剂经细菌内毒素国家标准品检查, λ_c 结果均符合规定。

表2 鲎试剂灵敏度复核

Tab. 2 Recheck results of the sensitivity of tachypleus amebocyte lysate

TAL批号	标示灵敏度 (λ , EU/mL)	内毒素灵敏度(EU/mL)					灵敏度 (λ_c , EU/mL)
		2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ	NC	
18011001	0.03	++++	++++	++++	----	--	0.015
1802052	0.03	++++	++++	----	----	--	0.03

注: - 为阴性反应, + 为阳性反应。表3至表5。

Note: - refers the negative reactions, + refers the positive reactions, as well as Tab. 3 to Tab. 5.

2.3.2 干扰预试验

样品溶液配制:将长春西汀和酒石酸按1:0.5(m/m)称定质量,用细菌内毒素检查用水溶解,制备成含长春西汀20 mg/mL、酒石酸10 mg/mL的样品溶液。若长春西汀溶解性差,可置37 $^{\circ}$ C恒温水浴中加热助溶。

MVD计算:公式为 $MVD = L \times C / \lambda$ 。式中, L , C , λ 均同2.2.2项下公式,目前市售产品通常为0.03~0.5 EU/mL。样品溶液的对应最大有效稀释倍数为, $MVD_{0.5} = 1.67$ (EU/mg) $\times 20$ (mg/mL) / 0.5 (EU/mL) = 66.8倍,同法计算, $MVD_{0.25}$, $MVD_{0.125}$, $MVD_{0.06}$, $MVD_{0.03}$ 分别为133.6, 267.2, 534.4, 1068.8倍,选用120, 240, 480, 960倍4个稀释倍数进行试验。

试验操作:取2.2.2项下样品溶液,用细菌内毒素检查用水稀释至120倍,再使用Tris缓冲液将样品溶液分别稀释240, 480, 960倍,将该系列浓度溶液记为NPC。同时加入细菌内毒素标准溶液,使其均含有2 λ 的细菌内毒素,记该系列溶液为PPC。取2个不同厂家的鲎试剂(批号分别为1802052, 1801011),分别与上述PPC和NPC进行反应,每个浓度重复2管,并设阳性对照(PC)和阴性对照(NC)。

试验结果:结果见表3。3批长春西汀原料至少需稀释至480倍(即长春西汀质量浓度为0.042 mg/mL)对2个厂家的鲎试剂均无干扰作用。

2.3.3 干扰试验

取2.2.2项下样品溶液,用细菌内毒素检查用水稀释120倍,然后再用Tris缓冲液稀释480倍,按药典中的“细菌内毒素检查法 凝胶法干扰实验”项,使用灵敏度为0.03 EU/mL的鲎试剂进行试验,结果见表4。表中 E_s 和 E_i 分别为系列标准溶液、样品溶液反应终点浓

表 3 长春西汀干扰预试验结果

Tab. 3 Results of the interference pre-test of vinpocetine

样品批号	样品稀释倍数(TAL 批号 1802052)						样品稀释倍数(TAL 批号 18011001)					
	120	240	480	960	PC	NC	120	240	480	960	PC	NC
A 样品/PPC	--/--	--/++	--/++	--/++			--/--	--/++	--/++	--/++		
B 样品/PPC	--/--	--/--	--/++	--/++	++	--	--/--	--/++	--/++	--/++	++	--
C 样品/PPC	--/--	--/--	--/++	--/++			--/++	--/++	--/++	--/++		

表 4 样品溶液的干扰试验结果(EU/mL)

Tab. 4 Results of the interference test of sample solution(EU/mL)

样品批号	内毒素灵敏度(TAL 批号 1802052)						内毒素灵敏度(TAL 批号 18011001)					
	0.06	0.03	0.015	0.0075	NC	E _s	0.06	0.03	0.015	0.0075	NC	E _s
标准系列	++++	++++	++++	----	--	0.015	++++	++++	++--	----	--	0.022
A	++++	++++	++++	----	--	0.015	++++	++++	++--	----	--	0.026
B	++++	++++	++++	----	--	0.015	++++	++++	++--	----	--	0.037
C	++++	++++	++++	----	--	0.015	++++	++++	++--	----	--	0.022

度的几何平均值。正式干扰试验结果表明,3 批样品对 2 个厂家鲎试剂的 E_s 和 E_t 均在 0.5 λ~2.0 λ 范围内,均符合鲎试剂灵敏度复核的要求,确认在 480 倍(质量浓度为 0.042 mg/mL)稀释下无干扰作用。且内毒素含量均小于 1.67 EU/mg,符合企业期望的质量标准。

2.3.4 细菌内毒素检查

分别选择上述 2 个厂家灵敏度为 0.03 EU/mL 的鲎试剂,样品稀释 480 倍,按小于 1.67 EU/mg 为判定标准,对上述 3 批长春西汀原料药细菌内毒素进行检查,结果见表 5。结果,3 批样品均符合规定。

表 5 样品溶液的细菌内毒素检查结果

Tab. 5 Results of the bacterial endotoxin test of sample solution

TAL 批号	样品批号	NC	PC	NPC	PPC
1802052	A/B/C	--/--/--	+/+/+/+	--/--/--	+/+/+/+
18011001	A/B/C	--/--/--	+/+/+/+	--/--/--	+/+/+/+

3 讨论

长春西汀原料药几乎不溶于水,酸性助溶剂能增加其溶解性,预试验中以盐酸作助溶剂使其成为澄清溶液,但动态显色法试验结果表明回收率低于 50%,对试验造成干扰,发现是由于盐酸的酸性太强,使用 Tris 缓冲液稀释后无法将其 pH 调至内毒素试验要求范围内,因此不能作为该样品的助溶剂。

通过研究长春西汀注射液的工艺发现,其采用酒石酸作为助溶剂,因此本试验中以酒石酸溶解长春西汀原料药,试验结果未受干扰,符合细菌内毒素光度测定法的要求,且样品内毒素含量远低于企业期望限值。考虑到全国对细菌内毒素检测方法的使用现状,又进行了凝胶法研究,结果表明,在酒石酸的助溶下,长春西汀原料需稀释至 480 倍时(长春西汀质量浓度为 0.042 mg/mL),对 2 个厂家的鲎试剂均无干扰作用,使用 0.03 EU/mL 的

鲎试剂所建立的方法可用于长春西汀原料药的细菌内毒素检查,故长春西汀原料药采用细菌内毒素检查是可行的,可采用细菌内毒素检查法进行质量控制,确定其质量标准限值为应低于 1.67 EU/mg。

对于难溶样品,为准确检测出细菌内毒素含量,需寻找一种能完全溶解样品的方法,从而进行后续研究,因此溶解样品的方法尤为重要。目前溶解难溶性样品的方法包括加热、乳化、萃取、离心,以及加入适合的助溶剂等,需根据样品本身的特性,尽量寻找不对试验产生干扰的方法,如需选择助溶剂溶解,应首选制剂辅料相关的试剂。此外,还应注意药典中相关规定,为了确保溶解样品的方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性,应预先添加标准内毒素再稀释样品进行干扰试验,在确定无干扰后,再进行细菌内毒素检查,为了方便试验,在未改变试验条件的情况下,也可使用后加标准内毒素的方法制备阳性对照。本研究中对长春西汀原料药细菌内毒素测定进行方法学研究,为进一步对难溶性药物的细菌内毒素方法学研究提供了参考。

参考文献

- [1] 张兰华,曹文强,刘贺之. 近年来长春西汀临床研究及应用进展[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12):2071-2075.
- [2] 任 露,张 杰. 长春西汀药理作用机制研究进展[J]. 中草药,2013,44(11):1517-1520.
- [3] 晏成倩,黄梅梅,王红平,等. 一种难溶性原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师,2018,21(2):365-368.
- [4] 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,2015:154-156.
- [5] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:287.

(收稿日期:2020-12-16;修回日期:2021-06-11)