

中图分类号: R917; R972 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)01-0073-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.01.015



盐酸维拉帕米(注射用)细菌内毒素检查方法建立

黄 宪, 莫玉焕[△]

(广西壮族自治区药品检验研究院, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立盐酸维拉帕米(注射用)细菌内毒素的检查方法。方法 按2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法及指导原则9251 细菌内毒素检查法应用指导原则,分别采用凝胶法、动态浊度法、动态显色法对3批样品中细菌内毒素的检测方法进行干扰试验,确定不干扰浓度,对盐酸维拉帕米(注射用)进行细菌内毒素检测。结果 凝胶法稀释40倍可去除干扰,动态浊度法稀释400倍的细菌内毒素回收率为122.15%~141.76%,动态显色法稀释400倍的细菌内毒素回收率为83.25%~95.02%,3批样品的细菌内毒素检测结果均符合规定。结论 凝胶法、动态浊度法、动态显色法均可用于盐酸维拉帕米(注射用)的细菌内毒素检查。

关键词:盐酸维拉帕米(注射用);细菌内毒素;凝胶法;动态浊度法;动态显色法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test Method for Verapamil Hydrochloride (for Injection)

HUANG Xian, MO Yuhuan

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish a bacterial endotoxin test method for Verapamil Hydrochloride (for Injection). **Methods** According to the bacterial endotoxin test in the general rules 1143 and the application guiding principle of bacterial endotoxin test in the Guiding Principle 9251 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), interference tests were carried out for the bacterial endotoxin test in three batches of samples by the gel-clot assay, kinetic-turbidimetric assay, kinetic-chromogenic assay to determine the noninterference concentration, and the bacterial endotoxin test was carried out for Verapamil Hydrochloride (for Injection). **Results** The interference could be removed when diluted 40 times by the gel-clot assay. The recovery rate of bacterial endotoxin diluted 400 times by the kinetic-turbidimetric assay was in the range of 122.15% - 141.76%, and the recovery rate of bacterial endotoxin diluted 400 times by the kinetic-chromogenic assay was in the range of 83.25% - 95.02%. The bacterial endotoxin test results of three batches of samples were in line with the requirements. **Conclusion** Gel-clot assay, kinetic-turbidimetric assay, kinetic-chromogenic assay can be used for the bacterial endotoxin test of Verapamil Hydrochloride (for Injection).

Key words: Verapamil Hydrochloride (for Injection); bacterial endotoxins; gel-clot assay; kinetic-turbidimetric assay; kinetic-chromogenic assay; interference test

盐酸维拉帕米为钙通道阻滞剂,临床主要用于原发性高血压和心绞痛的治疗。目前临床应用的剂型有片剂和注射剂,其原料药、片剂和注射剂在2020年版《中国药典(二部)》中均有收载,且仅注射剂设有细菌内毒素检验项目,原料药无此检验项目。为避免生产盐酸维拉帕米注射液和注射用盐酸维拉帕米过程中的质量风险,有必要严格控制盐酸维拉帕米原料药中的细菌内毒素含量。目前,尚未见盐酸维拉帕米原料药中细菌内毒素检查方法学研究的相关报道。为此,本研究中参考国内其他药物的相应研究^[1-5],并依据2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法和指导原则9251 细菌内毒素检查法应用指导原则的要求,建立了盐酸维拉帕米(注射用)细菌内毒素的检查方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

VORTEX-5型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Multiskan ET型酶标仪(定量内毒素专用,美国Thermo Fisher公司);XRS304型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为万分之一);DKB-8A型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药

盐酸维拉帕米(注射用)(Aurore Pharmaceuticals Private Limited,批号分别为VPMF210001,VPMF210002,VPMF210003);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为150601-202191,规格为每支90 EU);鲎试剂1(TAL-1,批号为22121049,灵敏度为0.5 EU/mL,规格为每支0.1 mL);动态浊度法鲎试剂

第一作者:黄宪,女,硕士研究生,工程师,研究方向为药包材、药品检验检测,(电子信箱)123329512@qq.com。

[△]通信作者:莫玉焕,女,硕士研究生,工程师,研究方向为药品检验与药理毒理学,(电子信箱)1449173541@qq.com。

(KTA TAL, 批号为 23060184, 可测内毒素范围为 0.01 ~ 10 EU / mL, 规格为每支 1.7 mL), 均购自厦门鲎试剂生物科技股份有限公司; 动态显色法鲎试剂(KCA TAL, 湛江安度斯生物有限公司, 批号为 2302070, 可测内毒素范围为 0.005 ~ 50 EU / mL, 规格为每支 1.25 mL); 鲎试剂 2(TAL-2, 批号为 2209131, 灵敏度为 0.5 EU / mL, 规格为每支 0.1 mL), 细菌内毒素检查用水(BET用水, 批号为 2208050, 规格为每瓶 50 mL), 均购自湛江博康海洋生物有限公司。

2 方法与结果^[6-7]

2.1 供试品细菌内毒素限值(L)确定

按公式 $L = K / M$ 计算。式中, 盐酸维拉帕米(注射用)为生产注射制剂的原料药, 故 $K = 5 \text{ EU} / (\text{kg} \cdot \text{h})$; M 为人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量, 人体体质量按 60 kg 计算, 根据盐酸维拉帕米注射液药品说明书, 静脉注射一般起始剂量为 5 ~ 10 mg, 稀释后缓慢静脉推注至少 2 min, 如初始反应欠佳, 给予首剂量 15 ~ 30 min 后再次给药 5 ~ 10 mg, 则盐酸维拉帕米注射液每小时最大用量按 20 mg 计, 故 $M = 20 / 60 = 0.333 \text{ mg} / (\text{kg} \cdot \text{h})$ 。盐酸维拉帕米(注射用)的内毒素限值为 $L = 5 / 0.333 = 15.02 \text{ EU} / \text{mg}$ 。由于本品为原料药且用于注射剂, 为严格控制细菌内毒素含量, 参考 2020 年版《中国药典(二部)》中盐酸维拉帕米注射液细菌内毒素的限值 7.5 EU / mg, 规定其内毒素限值为“每 1 mg 盐酸维拉帕米中含内毒素的量应小于 4 EU”。

2.2 凝胶法

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

TAL-1 和 TAL-2 的标示灵敏度(λ)均为 0.5 EU / mL, 将细菌内毒素工作标准品用 BET 用水溶解并稀释成浓度分别为 1 EU / mL(2.0 λ)、0.5 EU / mL(1.0 λ)、0.25 EU / mL(0.5 λ)、0.125 EU / mL(0.25 λ) 的溶液, 按规定进行灵敏度复核试验, 设置阴性对照管(NC)。结果 2 个厂家鲎试剂(批号分别为 2209131, 22121049)灵敏度的测定值均在 1.0 λ ~ 2.0 λ 范围内, 符合规定。故以标示灵敏度 0.5 EU / mL 为其灵敏度。详见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验结果

Tab. 1 Results of test for confirmation of the sensitivity of tachypleus amebocyte lysate

| 鲎试剂 批号 | 细菌内毒素浓度 | | | | NC | λ_c (EU/mL) |
|-----------|---------|-----------|------------|-------------|----|------------------------|
| | 1 EU/mL | 0.5 EU/mL | 0.25 EU/mL | 0.125 EU/mL | | |
| 2209131 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | 0.5 |
| 22121049 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | 0.5 |

注: + 为阳性结果, - 为阴性结果。表 2 至表 4 同。

Note: + refers to a positive reaction, and - refers to a negative reaction (for Tab. 1 - 4).

2.2.2 干扰预试验

盐酸维拉帕米最小有效稀释浓度记为 MVC, $C = \lambda / L$ 。常用凝胶法鲎试剂的 λ 一般为 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 EU / mL, 按 $L = 4 \text{ EU} / \text{mg}$ 计算, 则供试品在细菌内毒素检查时的质量浓度分别为 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007 5 mg / mL。选择最低灵敏度 0.5 EU / mL 的鲎试剂进行干扰预试验。

为考察最大不干扰浓度, 采用 0.007 5 ~ 0.125 mg / mL 浓度进行预试验。用 BET 用水将 3 批(批号分别为 VPMF210001, VPMF210002, VPMF210003)样品分别配制成系列浓度的样品溶液, 每个浓度的样品溶液各取 0.1 mL, 加 0.1 mL 鲎试剂, 将此系列浓度溶液标记为供试品管(NPC 系列); 用上述系列样品溶液 0.1 mL 分别复溶鲎试剂, 制成系列浓度鲎试剂样品溶液, 每个浓度的鲎试剂样品溶液加等体积 2 λ 浓度细菌内毒素, 作为 PPC 系列。同时设置阳性对照管(PC)和阴性对照管(NC), 各平行 2 管, 观察各管的凝胶反应。结果 3 批样品水溶液的质量浓度在 0.007 5 ~ 0.125 mg / mL 范围内, 即供试品稀释 40 倍及以上时无干扰抑制作用。详见表 2。

表 2 盐酸维拉帕米(注射用)凝胶法干扰预试验结果

Tab. 2 Results of the interference pre-test of Verapamil Hydrochloride (for Injection) by the gel-clot assay

| 鲎试剂 批号 | 样品批号 | 系列溶液 | 供试品水溶液质量浓度 | | | | | PC | NC |
|-----------|------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----|----|
| | | | 0.125 mg/mL | 0.062 mg/mL | 0.031 mg/mL | 0.015 mg/mL | 0.007 5 mg/mL | | |
| 2209131 | VPMF210001 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | | |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |
| | VPMF210002 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | ++ | -- |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |
| | VPMF210003 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | | |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |
| 22121049 | VPMF210001 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | | |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |
| | VPMF210002 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | ++ | -- |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |
| | VPMF210003 | NPC | -- | -- | -- | -- | -- | | |
| | | PPC | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | | |

2.2.3 干扰试验

选择质量浓度为 0.125 mg / mL 的供试品水溶液, 用上述 2 个厂家的鲎试剂(λ 均为 0.5 EU / mL)进行干扰试验。取 3 批盐酸维拉帕米(注射用), 分别用 BET 用水溶解成 0.125 mg / mL, 用 BET 用水和质量浓度为 0.125 mg / mL 的供试品水溶液将细菌内毒素工作标准品稀释成 2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4 种浓度的 BET 用水系列细菌内毒素溶液和供试品稀释液细菌内毒素溶液。在 0.1 mL TAL 水溶液中加入 0.1 mL 水作为 NC 管,

在0.1 mL TAL水溶液中加入0.1 mL质量浓度为0.125 mg/mL的供试品水溶液作为NPC管,按2020年版《中国药典(四部)》通则1143项下凝胶法干扰试验进行试验,其中 E_s 和 E_t 分别为系列标准溶液、样品反应终点浓度的几何平均值。结果当 E_s 和 E_t 均在 $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ 范围内时,表明在0.125 mg/mL质量浓度下,3批样品的水溶液对2个厂家的鲎试剂无干扰作用,凝胶法可用于内毒素含量检查。详见表3。

表3 盐酸维拉帕米(注射用)质量浓度为0.125 mg/mL时凝胶法干扰试验结果

Tab. 3 Results of the interference test of Verapamil Hydrochloride (for Injection) with 0.125 mg/mL by the gel-clot assay

| 鲎试剂批号 | 样品批号 | 细菌内毒素浓度 | | | | NC | NPC | 效价 (EU/mL) |
|----------|------------|---------|-----------|------------|-------------|----|-----|---------------|
| | | 1 EU/mL | 0.5 EU/mL | 0.25 EU/mL | 0.125 EU/mL | | | |
| 2209131 | 水 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210001 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210002 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210003 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| 22121049 | 水 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210001 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210002 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |
| | VPMF210003 | ++++ | ++++ | ---- | ---- | -- | -- | $E_t=0.5$ |

2.2.4 样品细菌内毒素检查

按2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法中的凝胶法,将上述3批样品稀释成质量浓度为0.125 mg/mL,并选择上述2个厂家灵敏度为0.5 EU/mL的鲎试剂进行细菌内毒检查。结果3批盐酸维拉帕米(注射用)细菌内毒素检查结果均合格。详见表4。

表4 凝胶法试验检查结果

Tab. 4 Results of the gel-clot assay

| 鲎试剂批号 | 样品批号 | 样品管 | PPC | PC | NC |
|----------|------------|-----|-----|----|----|
| 2209131 | VPMF210001 | -- | ++ | ++ | -- |
| | VPMF210002 | -- | ++ | ++ | -- |
| | VPMF210003 | -- | ++ | ++ | -- |
| 22121049 | VPMF210001 | -- | ++ | ++ | -- |
| | VPMF210002 | -- | ++ | ++ | -- |
| | VPMF210003 | -- | ++ | ++ | -- |

2.3 动态浊度法

2.3.1 标准曲线建立与可靠性分析

用BET用水溶解细菌内毒素工作标准品,并稀释成终浓度分别为10,1,0.1,0.01 EU/mL的细菌内毒素标准溶液,分别取4个浓度的标准溶液及BET用水(阴性对照溶液)各0.1 mL,分别加入预先加有0.1 mL动态浊度法鲎试剂的反应试管中,插入酶标仪进行Multiskan ET测定。标准溶液每个浓度平行3份,阴性对照平行2份。测定条件:温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,检测波长为405 nm,

反应时间为7 200 s,每隔10 s检测405 nm波长处的吸收度。当阴性对照管的反应时间在规定检测时间(7 200 s)外时结束反应。将全部数据进行线性回归分析,拟合方程为 $\lg T = -0.1768 \lg C + 2.9030$,相关系数 $(r) = -0.9979$ (绝对值大于0.98),平行管间的变异系数为0.70%~1.76%(均小于10%),表明细菌内毒素标准曲线成立。详见表5。

表5 动态浊度法标准曲线可靠性分析结果(n=3)

Tab. 5 Results of the reliability analysis for the standard curve of the kinetic-turbidimetric assay (n=3)

| 内毒素浓度 | 平均反应时间(s) | 变异系数(%) |
|------------|-----------|---------|
| 0.01 EU/mL | 1 749.7 | 1.76 |
| 0.1 EU/mL | 1 245.0 | 0.48 |
| 1 EU/mL | 818.7 | 0.51 |
| 10 EU/mL | 518.0 | 0.70 |

2.3.2 供试品最大稀释倍数(MVD)确定

按公式 $MVD = cL / \lambda$ 计算。式中, c 为配置供试液的初质量浓度(5 mg/mL), L 为盐酸维拉帕米拟订细菌内毒素限值(4 EU/mg), λ 为鲎试剂灵敏度(标准曲线细菌内毒素最低浓度为0.01 EU/mL),则 $MVD = 5 \times 4 / 0.01 = 2 000$ 倍。

2.3.3 预干扰试验

根据标准曲线选择0.1 EU/mL作为靠近标准曲线中点的内毒素浓度(λ_m)。称取批号为VPMF210001的样品0.05 g,用BET用水10 mL溶解成质量浓度为5 mg/mL的溶液,再用BET用水将上述溶液稀释至质量浓度分别为0.125,0.012 5,0.002 5 mg/mL(即分别稀释40倍、400倍、2 000倍),作为供试品溶液(A液);同时制备含0.1 EU/mL内毒素的上述相同稀释比例的供试品溶液,作为供试品阳性对照液(B液),每个稀释比例设置2个平行管。采用动态浊度法进行预干扰试验。将0.1 mL上述各液和0.1 mL复溶后动态浊度法鲎试剂分别加入光度法检测用试管中,混匀,插入酶标仪进行Multiskan ET测定。计算该试验条件下的回收率,回收率(%) = $(C_s - C_t) / \lambda_m \times 100\%$ 。式中, C_t 为供试品溶液中内毒素含量, C_s 为含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量, λ_m 为0.1 EU/mL。结果供试品稀释倍数为40倍、400倍、2 000倍时,其回收率分别为69.22%,98.97%,130.44%(2020年版《中国药典(四部)》要求为50%~200%),表明盐酸维拉帕米(注射用)在此稀释倍数范围内不干扰试验。当供试品稀释400倍时,回收率接近100%,故动态浊度法选择样品稀释400倍进行试验。详见表6。

2.3.4 干扰试验与样品中细菌内毒素含量测定

为最终确认是否存在干扰因素的影响,取3批(批号分别为VPMF210001,VPMF210002,VPMF210003)样

表6 动态浊度法预干扰试验结果

Tab. 6 Results of the interference pre - test of the kinetic - turbidimetric assay

| 稀释倍数 | 供试品质量浓度(mg/mL) | C_1 (EU/mL) | C_s (EU/mL) | 回收率(%) | 细菌内毒素含量(EU/mg) |
|-------|----------------|---------------|---------------|--------|----------------|
| 40倍 | 0.125 | 0.00479 | 0.07401 | 69.22 | <0.080 |
| 400倍 | 0.0125 | 0.00508 | 0.10405 | 98.97 | <0.800 |
| 2000倍 | 0.0025 | 0.00447 | 0.13491 | 130.44 | <4.000 |

品,稀释400倍,按2.3.3项下方法进行检测,计算供试品中细菌内毒素的含量及回收率。结果3批盐酸维拉帕米(注射用)的回收率均在50%~200%范围内,供试品的内毒素含量均小于规定的限值,符合规定。详见表7。

表7 盐酸维拉帕米(注射用)动态浊度法干扰试验与细菌内毒素检查结果

Tab. 7 Results of the interference test and the bacterial endotoxin test of Verapamil Hydrochloride (for Injection) by the kinetic - turbidimetric assay

| 样品批号 | 稀释倍数 | 供试品质量浓度(mg/mL) | C_1 (EU/mL) | C_s (EU/mL) | 回收率(%) | 细菌内毒素含量(EU/mg) |
|------------|------|----------------|---------------|---------------|--------|----------------|
| VPMF210001 | 400倍 | 0.0125 | 0.00771 | 0.14947 | 141.76 | <0.800 |
| VPMF210002 | 400倍 | 0.0125 | 0.00743 | 0.12958 | 122.15 | <0.800 |
| VPMF210003 | 400倍 | 0.0125 | 0.00745 | 0.13393 | 126.48 | <0.800 |

2.4 动态显色法

2.4.1 供试品 MVD 确定

按公式 $MVD = cL / \lambda$ 计算。式中, c 为配置供试液的初始质量浓度(5 mg/mL), L 为盐酸维拉帕米(注射用)拟订细菌内毒素限值(4 EU/mg), λ 为鲎试剂灵敏度(标准曲线细菌内毒素最低浓度为0.005 EU/mL), 则 $MVD = 5 \times 4 / 0.005 = 4000$ 倍。

2.4.2 标准曲线建立与可靠性分析

用BET用水溶解细菌内毒素工作标准品,并稀释成终浓度分别为5,0.5,0.05,0.005 EU/mL的细菌内毒素标准溶液,分别取4个浓度的标准品溶液及BET用水(阴性对照溶液)各0.1 mL,分别加入预先加有0.1 mL动态显色法鲎试剂的反应试管中,插入酶标仪进行Multiskan ET测定。标准溶液每个浓度平行3份,阴性对照平行2份。测定条件:温度为(37±0.5)°C,检测波长为405 nm,反应时间为7200 s,每隔10 s检测405 nm波长处的吸收度。当阴性对照管的反应时间在规定检测时间(7200 s)外时结束反应。将全部数据进行线性回归分析,拟合方程为 $\lg T = -0.2177 \lg C + 2.9128$, $r = -0.9964$ (绝对值大于0.98),平行管间的变异系数为1.88%~6.40% (均小于10%),表明细菌内毒素标准曲线成立。详见表8。

2.4.3 预干扰试验

根据标准曲线的设定情况,选择0.5 EU/mL作为靠近标准曲线中点的内毒素浓度(λ_m)。称取批号为

表8 动态显色法标准曲线可靠性试验结果(n=3)

Tab. 8 Results of the reliability analysis for the standard curve of the kinetic - chromogenic assay (n = 3)

| 内毒素浓度 | 平均反应时间(s) | 变异系数(%) |
|-------------|-----------|---------|
| 0.005 EU/mL | 2514.0 | 6.40 |
| 0.05 EU/mL | 1688.0 | 5.35 |
| 0.5 EU/mL | 902.3 | 1.23 |
| 5 EU/mL | 582.7 | 1.88 |

VPMF210001的样品0.05 g,加BET用水10 mL,充分振荡使溶解,制成初始质量浓度为5 mg/mL的溶液,用BET用水分别稀释至0.125,0.0125,0.0025 mg/mL(即分别稀释40倍、400倍、2000倍)作为供试品溶液(A液),同时制备含0.5 EU/mL内毒素的上述相同稀释比例的供试品溶液作为供试品阳性对照液(B液),每个稀释比例设置2个平行管。采用动态显色法进行预干扰试验。将0.1 mL上述各液和复溶后动态显色法鲎试剂分别加入光度法检测用试管中,混匀,采用酶标仪进行Multiskan ET测定,按公式计算回收率。回收率(%) = $(C_s - C_1) / \lambda_m \times 100\%$ 。式中, C_1 为供试品溶液中内毒素含量, C_s 为含标准内毒素供试品溶液中内毒素含量, λ_m 为0.5 EU/mL。结果供试品稀释40倍、400倍、2000倍时,其回收率为59.59%~112.17%(2020年版《中国药典(四部)》要求为50%~200%),表明盐酸维拉帕米(注射用)在此稀释倍数范围内不干扰试验。当供试品稀释400倍时,回收率接近100%,故动态显色法选择样品稀释400倍进行试验。详见表9。

表9 动态显色法鲎试剂预干扰试验结果

Tab. 9 Results of the interference pre - test of the kinetic - chromogenic assay

| 稀释倍数 | 供试品质量浓度(mg/mL) | C_1 (EU/mL) | C_s (EU/mL) | 回收率(%) | 细菌内毒素含量(EU/mg) |
|-------|----------------|---------------|---------------|--------|----------------|
| 40倍 | 0.1250 | 0.00126 | 0.29919 | 59.59 | <0.040 |
| 400倍 | 0.0125 | 0.00125 | 0.48428 | 96.61 | <0.400 |
| 2000倍 | 0.0025 | 0.00142 | 0.56225 | 112.17 | <2.000 |

2.4.4 干扰试验与样品中细菌内毒素含量测定

为确认盐酸维拉帕米(注射用)稀释400倍的有效性,将3批(批号分别为VPMF210001, VPMF210002, VPMF210003)样品稀释400倍,按2.4.3项下方法进行检测,计算供试品中细菌内毒素的含量及回收率。结果3批盐酸维拉帕米(注射用)的回收率在50%~200%范围内, L 以小于4 EU/mg为判定标准,3批样品均符合规定。详见表10。

3 讨论

3.1 动态浊度法与动态显色法检测细菌内毒素含量存在差异

本研究中动态浊度法和动态显色法定量检测供试

表10 盐酸维拉帕米(注射用)动态显色法干扰试验与细菌内毒素检查结果

Tab. 10 Results of the interference test and the bacterial endotoxin test of Verapamil Hydrochloride (for Injection) by the kinetic - chromogenic assay

| 批号 | 稀释倍数 | 供试品质量浓度 (mg/mL) | C_1 (EU/mL) | C_2 (EU/mL) | 回收率 (%) | 细菌内毒素含量 (EU/mg) |
|------------|------|--------------------|------------------|------------------|------------|--------------------|
| VPMF210001 | 400倍 | 0.0125 | 0.00172 | 0.44642 | 88.94 | <0.400 |
| VPMF210002 | 400倍 | 0.0125 | 0.00425 | 0.42052 | 83.25 | <0.400 |
| VPMF210003 | 400倍 | 0.0125 | 0.00174 | 0.47682 | 95.02 | <0.400 |

品溶液中内毒素含量值存在差异。分析原因,2种方法的检测原理不一样,动态浊度法是检测浊度变化而测定含量,动态显色法是检测显色团的多少而测定含量;所用鲎试剂为不同厂家生产,不同厂家的产品存在工艺差异。在本动态浊度法和动态显色法的研究中,供试品溶液实测细菌内毒素含量均低于标准曲线最低浓度,此时其内毒素含量为标准曲线最低浓度点数值乘以供试品稀释倍数,得XX EU/mg,结果表示为供试品细菌内毒素含量<XX EU/mg^[8]。

3.2 凝胶法、动态浊度法、动态显色法比较

我国细菌内毒素检测法主要有凝胶法、动态浊度法和动态显色法,动态浊度法和动态显色法均属光度测定法。光度测定法的检测范围较凝胶法宽,本研究中3种方法所用鲎试剂的灵敏度不同。凝胶法用0.5 EU/mL的鲎试剂,动态浊度法用0.01~10 EU/mL的鲎试剂,动态显色法用0.005~50 EU/mL的鲎试剂。动态法有更高的灵敏度,使有干扰的样品有更多的稀释空间,对部分使用凝胶法无法排除干扰的样品,可用动态法检测。

在进行上述3种方法的干扰试验时,凝胶法稀释40倍可消除干扰,动态浊度法和动态显色法稀释400倍的回收率接近100%。凝胶法和光度测定法的供试品稀释倍数不同,文献[9]也提及此情况。原因可能为3种方法判定方式不同,凝胶法以凝胶坚实、不变形为阳性判定;动态浊度法是内毒素与鲎试剂反应,形成凝固蛋白,在产生凝胶过程中发生浊度变化,通过测定反应溶液达到规定浊度所需时间测定样品中内毒素含量^[10];动态显色法是利用鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶特定底物释放的呈色团的光度变化,由呈色团的吸光度和内毒素浓度间的定量关系来检测内毒素^[11]。

3种方法均可用于盐酸维拉帕米(注射用)中细菌内毒素的检查。凝胶法操作步骤最少,所用鲎试剂价格较动态法便宜,当内毒素测定结果有争议时,可采用凝胶法作为仲裁法。目前,我国使用最多的方法为凝胶法,但该方法只是一种定性检测法,仅能判断细菌内毒

素含量是否超过限度,无法给出准确的含量。动态浊度法和动态显色法是定量检测法,采用专用细菌内毒素检测酶标仪,检测过程可实现完整追溯,且检测数据可保存,对于研究性质的样品(如新药)更有优势,也更有利于药品的质量控制^[1,12]。其中,动态浊度法对有些干扰凝胶形成或浊度测定的因素不会影响反应^[13-14],且该鲎试剂灵敏度更高,可更大倍数稀释样品,能更大幅度地满足供试品中内毒素检测的要求^[15]。相关人员可选用其中任何一种方法进行细菌内毒素检查。

参考文献

- [1] 裴宇盛,刘洋,蔡彤,等. 三种微球制剂的细菌内毒素质量控制方法研究[J]. 沈阳药科大学学报,2022,39(11):1327-1332.
- [2] 陈彤,刘书显,阮健,等. 动态浊度法定量检测醒脑静注射液中的细菌内毒素[J]. 中国药品标准,2022,23(4):409-413.
- [3] 王巨才,王雪. 动态显色法定量检测磺达肝癸钠注射液的细菌内毒素[J]. 药物分析杂志,2021,41(1):180-184.
- [4] 陈晨,裴宇盛,杜颖,等. 长春西汀原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药业,2021,30(22):78-81.
- [5] 张辉,黄有兴,王美娜,等. 泊沙康唑原料药细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国药业,2022,31(12):94-97.
- [6] 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,2020:178-181.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京:中国医药科技出版社,2017:614-620.
- [8] 杜颖,陈晨,蔡彤,等. 细菌内毒素光度法检测能力验证研究[J]. 中国药理学通报,2022,38(11):1717-1722.
- [9] 王超之,高新贞,王丽,等. 凝胶法与动态浊度法检测维生素B₆注射液细菌内毒素[J]. 食品与药品,2023,25(6):523-526.
- [10] 李展,张晗,周继春,等. 动态比浊法检测盐酸法舒地尔注射剂细菌内毒素的含量[J]. 中国药事,2015,29(7):742-744.
- [11] 谢美国,王尧尧,何跃芳. 动态显色法定量检测盐酸右美托咪啶中细菌内毒素的含量[J]. 药物分析杂志,2020,40(9):1619-1623.
- [12] 刘骅,李刚,黄莉娟,等. 动态浊度法定量检测磺达肝癸钠注射液细菌内毒素含量的研究[J]. 中国药品标准,2022,23(1):70-74.
- [13] 朱昱,郭姣梅,张军霞,等. 定量检测茵栀黄注射液细菌内毒素方法的建立及应用[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(5):525-528.
- [14] 裴宇盛,蔡彤,高华. 细菌内毒素检查新方法进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):392-395.
- [15] 白森,张灿,张明露,等. 动态显色法鲎试剂用于果汁细菌内毒素活性检测及干扰分析[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(10):3192-3196.

(收稿日期:2023-11-28;修回日期:2024-07-10)