注射用维生素 B₆ 细菌内毒素检查法的研究

刘 骅(安徽省食品药品检验所, 合肥 230051)

摘要: 目的 建立注射用维生素 B₆ 的细菌内毒素检查方法。方法 根据中国药典 2010 年版二部附录细菌内毒素检查法, 采用 2 个不同厂家的鲎试剂对注射用维生素 B₆ 进行研究。结果 注射用维生素 B₆ 细菌内毒素检查限值为 0.30 EU·mg⁻¹, 其最大不干扰浓度为 0.208 mg·mL⁻¹, 用灵敏度为 0.06 EU·mL⁻¹ 或更高灵敏度的鲎试剂可进行检验。结论 细菌内毒素检查法可用于注射用维生素 B₆ 中内毒素的检查。

关键词: 注射用维生素 B₆; 细菌内毒素检查法; 干扰试验

中图分类号: R927.11 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2012)03-0267-05

Bacteria Endotoxin Test of Vitamin B₆ for Injection

LIU Hua(*Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the bacterial endotoxin test of vitamin B₆ for injection. **METHODS** The experiment was carried out according to the appendix of ChP 2010 Vol II. tachypleus amabocyte lysate from two manufacturers were used to test the bacterial endotoxin. **RESULTS** The endotoxin limit of vitamin B₆ for injection was 0.30 EU·mg⁻¹. The reactions were not disturbed in 0.208 mg·mL⁻¹ for vitamin B₆, which was the maximum nondisturbing

作者简介: 刘骅, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 18655162566 E-mail: ahmulh@163.com

concentration. It was effective that endotoxin was tested by amebocyte lysate agent with the sensitivity of 0.06 EU·mL⁻¹ or much higher. **CONCLUSION** It is feasible to control quality of vitamin B₆ for injection by bacterial endotoxin test.

KEY WORDS: vitamin B₆ for injection; bacterial endotoxin test; interference test

注射用维生素B₆为白色或类白色的疏松块状物或粉末, 主要适用于维生素B₆缺乏的预防和治疗, 异烟肼中毒的防治, 妊娠、放射病及抗癌药物所致的呕吐, 脂溢性皮炎等。临床上一般用注射用水溶解后, 皮下、肌肉或静脉注射, 50~100 mg·d⁻¹。目前, 关于注射用维生素B₆的内毒素检查法(热原)的标准不统一, 如: 国家食品药品监督管理局标准(试行)YBH10022005中为细菌内毒素检查法, 其限值为: 每1 mg维生素B₆中含细菌内毒素不得过1.0 EU; 国家食品药品监督管理局标准(试行)YBH20342005中为细菌内毒素检查法, 其限值为: 每1 mg维生素B₆中含内毒素的量应小于0.4 EU; 海南惠普森和浙江浙北制药生产的注射用维生素B₆, 其标准规定为细菌内毒素检查法, 其限值为: 每1 mg维生素B₆中含内毒素的量应小于0.3 EU; 广东阳江制药厂生产的注射用维生素B₆, 其标准为热原法: 加氯化钠注射液制成20 mg·mL⁻¹的溶液, 按家兔体质量缓缓注射3 mL·kg⁻¹。本实验参照中国药典2010年版细菌内毒素检查法及《细菌内毒素检查法应用指导原则》, 考察了5个厂家的产品, 对该药的细菌内毒素检查方法进行方法学研究, 为统一注射用维生素B₆的质量标准提供参考。

1 试验材料

1.1 供试品

注射用维生素 B₆(浙江浙北药业有限公司 批号: 20100401, 规格: 0.2 g, 批号: 20100825, 规格: 0.1 g; 海南卫康药业股份有限公司, 批号: 20100312, 20100313, 规格: 0.1 g; 海南惠普森药业股份有限公司, 批号: 0905011, 0908032,

1009072, 规格: 0.1 g; 广东阳江制药厂有限公司, 批号: 1009013, 规格: 0.1 g; 马鞍山丰原制药有限公司, 批号: 100605-1, 100605-2, 规格: 0.1 g)。

1.2 试剂

细菌内毒素工作标准品(中国药品生物制品检定所, 批号: 150601-200966, 规格: 120 EU·mL⁻¹); 鲎试剂(湛江博康海洋生物有限公司, 批号: 1011170, 灵敏度: 0.25 EU·mL⁻¹; 批号: 1010180, 灵敏度: 0.06 EU·mL⁻¹。福州新北生化工业有限公司, 批号: 10020112, 灵敏度: 0.25 EU·mL⁻¹; 批号: 10051112, 灵敏度: 0.06 EU·mL⁻¹。规格均为: 0.1 mL·支⁻¹); 细菌内毒素检查用水(福州新北生化工业有限公司, 批号: 09092821, 规格: 100 mL·瓶⁻¹)。

1.3 仪器

S648 恒温水浴锅(上海医疗器械七厂); XW-80A 漩涡混旋器(上海沪西分析仪器厂有限公司); 微量取液器(50~250 μL, 上海金林生化试剂仪器厂); 无热原吸咀(250 μL, 湛江博康海洋生物有限公司); 试验所用玻璃仪器均经 250 °C 干烤 2 h。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核^[1]

用细菌内毒素检查用水(BET 水)将内毒素工作标准品溶解, 依据中国药典 2010 年版二部附录 XIE 对所使用的鲎试剂进行复核试验。试管从恒温水浴锅中取出, 缓缓倒转 180°, 若管内形成凝胶, 且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性, 未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。各批鲎试剂灵敏度标示符合规定, 结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of tachypleus amebocyte lysate sensitivity test

鲎试剂 批号	标示灵敏度/ EU·mL ⁻¹	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹							灵敏度/ EU·mL ⁻¹
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	阴性	
10020112	0.25	++++	++++	----	----			--	0.25
1011170	0.25	++++	++++	----	----			--	0.25
10051112	0.06			++++	++++	----	----	--	0.06
1010180	0.06			++++	++++	----	----	--	0.06

注: + + / - -: 平行两个管数反应阳性/阴性; + + + + / - - - -: 平行四个管数反应阳性/阴性

Note: + + / - -: Positive/negative result is found for two replicate tubes; + + + + / - - - -: Positive/negative result is found for four replicate tubes

2.2 细菌内毒素限量值(L)的确定^[1-3]

参考注射用维生素 B₆ 使用说明书, 临床上一般用注射用水溶解后, 皮下注射、肌肉或静脉注射, 每日 50~100 mg, 1 日 1 次。用于环丝氨酸中毒解毒时, 每日 300 mg 或 300 mg 以上。用于异烟肼中毒解毒时, 每 1 g 异烟肼给 1 g 维生素 B₆ 静注。根据公式: $L=K/M$, 式中 K 值为 $5.0 \text{ EU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, M 为每 60 kg 体质量每小时的最大剂量, 则 $M=1000 \text{ mg}\div 60 \text{ kg}\div 1 \text{ h}=16.667 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 计算 $L=5\div 16.667=0.3 \text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。中国药典 2010 年版对维生素 B₆ 收录了片剂和注射液两种剂型, 药典对维生素 B₆ 注射液的内毒素检查限值规定为每 1 mg 维生素 B₆ 中含内毒素的量应小于 0.3 EU。结合上述 5 个企业的标准, 笔者将注射用维生素 B₆ 细菌内毒素检查限值定为: 每 1 mg 维生素 B₆ 中含内毒素的量应小于 0.3 EU。

2.3 供试品最大稀释倍数(MVD)的计算

根据公式 $MVD=CL/\lambda$ (C : 供试品溶液的浓度; L : 细菌内毒素的限值; λ : 使用鲎试剂的标示灵敏度), 并考虑到目前市售鲎试剂有 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.03 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5 个灵敏度, 取规格

为 $0.1 \text{ g}\cdot\text{支}^{-1}$ 的样品进行预实验, 则 $MVD_{0.5-0.03}=60\sim 1\ 000$ 倍, 即对应浓度为 $1.667\sim 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4 内毒素标准品的稀释

用 BET 水将细菌内毒素工作标准品稀释成 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.03, 0.015 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度内毒素溶液备用。

2.5 供试品的干扰预试验

取规格为 0.1 g 样品, 每个厂家各取一批, 用 BET 水依次溶解稀释成浓度为: 1.667, 0.833, 0.416, 0.208, 0.104 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即 NPC 溶液; 另再分别制备一份同样浓度的样品溶液, 在制备中加入内毒素, 使每一浓度的样品溶液中含 $2\lambda c$ 浓度的内毒素, 即为 PPC 溶液, 选用灵敏度 λc 为 $0.25 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 2 个不同厂家的鲎试剂分别与 NPC 和 PPC 反应, 每一稀释浓度平行做 2 管, 并设阴性对照组(NC)和阳性对照组(PC)。结果见表 2。在药物浓度为 $0.833 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上时, 5 个厂家的样品均有干扰作用; 在稀释浓度为 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 5 个厂家的样品均没有干扰作用, 故选择 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (灵敏度为 $0.06 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鲎试剂的最小有效稀释浓度)做正式干扰试验。

表 2 干扰预试验结果

Tab 2 Results of interference preparatory test

鲎试剂 批号	供试品 批号	供试液名称	供试品浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$					NC	PC
			1.667	0.833	0.416	0.208	0.104		
10020112	20100825	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	--	--
	20100312	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	--
	1009072	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	--	--
	1009013	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	--	--
	1006051	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	--
1011170	20100825	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	--
	20100312	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	--
	1009072	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	--
	1009013	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	--	--
	1006051	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	--	--

注: ++/--: 平行两个管数反应阳性/阴性

Note: ++/--: Positive/negative result is found for two replicate tubes

2.6 干扰试验

为最终确认是否存在干扰因素的影响,进行正式干扰实验。取预实验中的5批样品用细菌内毒素检查用水稀释至 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按中国药典2010年版二部附录中的“细菌内毒素检查供试品

干扰试验项”,使用灵敏度为 $0.06 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂进行实验,结果见表3。表3中 $E_s=\lg^{-1}(\sum X_s/4)$ (X_s :细菌内毒素检查用水反应终点浓度的对数值); $E_t=\lg^{-1}(\sum X_t/4)$ (X_t :供试品溶液反应终点浓度的对数值)。

表3 干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test

鲎试剂	供试品批号	内毒素的浓度/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$						
		2λ	λ	$1/2\lambda$	$1/4\lambda$	阴性	E_t	E_t/E_s
10051112	20100825	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	20100312	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	1009072	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	1009013	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	100605-1	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	E_s 系列	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.06$	
1010180	20100825	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	20100312	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	1009072	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	1009013	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	100605-1	++++	++++	----	----	--	0.06	1
	E_s 系列	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.06$	

注: +/+ -: 平行两个管数反应阳性/阴性; ++++/- -: 平行四个管数反应阳性/阴性

Note: +/+ -: Positive/negative result is found for two replicate tubes; ++++/- -: Positive/negative result is found for four replicate tubes

从干扰试验结果可知,上述5批供试品的 E_t/E_s 均为1,在0.5~2.0之间,即供试品在 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对细菌内毒素检查法均无干扰。

2.7 供试品的细菌内毒素检查试验

取5个厂家的10批样品,BET水稀释为 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,以 $0.3 \text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 为细菌内毒素限值,用灵敏度为 $0.06 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鲎试剂检查,结果10批样品均符合规定,结果见表4。

3 讨论

由干扰预实验结果可以发现注射用维生素 B_6 需稀释至浓度为 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 才能排除干扰作用。正式干扰试验证明 $0.208 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对细菌内毒素检查法无干扰, E_t/E_s 均为1,在0.5~2.0之间。用两个厂家的鲎试剂对注射用维生素 B_6 5个厂家共10个批号的样品进行检查,实验结果表明:限值定为 $0.3 \text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$,注射用维生素 B_6 可进行细菌内毒素检查,但必须采用灵敏度为 $0.06 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或更高灵敏度的鲎试剂进行检验。

结合临床用药途径,本实验确定的注射用维生素 B_6 细菌内毒素检查方法如下:取本品,用BET水稀释至 $0.20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或以下浓度,依法检查^[1],每 1 mg 维生素 B_6 中含内毒素的量应 $<0.3 \text{ EU}$ 。

表4 注射用维生素 B_6 细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test of vitamin B_6 for injection

鲎试剂批号	供试品批号	稀释倍数	NPC	PPC	阴性	阳性
10051112	20100401	1000	--	++		
	20100825	500	--	++		
	20100312	500	--	++		
	20100313	500	--	++		
	0905011	500	--	++	--	++
	0908032	500	--	++		
	1009072	500	--	++		
	1009013	500	--	++		
	100605-1	500	--	++		
	100605-2	500	--	++		
1010180	20100401	1000	--	++		
	20100825	500	--	++		
	20100312	500	--	++		
	20100313	500	--	++		
	0905011	500	--	++	--	++
	0908032	500	--	++		
	1009072	500	--	++		
	1009013	500	--	++		
	100605-1	500	--	++		
	100605-2	500	--	++		

注: +/+ -: 平行两个管数反应阳性/阴性

Note: +/+ -: Positive/negative result is found for two replicate tubes

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 99-101.
- [2] CHEN X B. Bacterial endotoxin test for vitamin B₆ injection [J]. Her Med(医药导报), 2005, 10(24): 948-949.
- [3] WANG G Y, TANG J K, PAN Z X. Study on bacterial endotoxins test of disodium canthariodinate and vitamin B₆ injection [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析), 2009, 29(11): 1950-1952.

收稿日期: 2011-06-22