

4 讨论

近年来由于部分中药注射剂出现严重不良反应,国家越来越重视对上市后产品的安全性进行再评价和质量标准提高工作,以提高中药注射剂的临床使用安全性和药品质量可控性。要提高中药注射剂的安全性和质量可控性,完善质量标准,提高检验方法的准确性、客观性是关键。

中药注射剂由于成分比较复杂,有些注射剂本身就含有溶血成分(如皂苷),为保障临床用药安全必须进行溶血与凝聚的检查。目前,中成药的质量标准主要有中国药典 2010 年版、卫生部中药成方制剂第 1~20 册、国家食品药品监督管理局地方标准上升国家标准系列。在这些标准中,溶血与凝聚试验作为安全性检查项目,所采用的方法均为体外试管法(肉眼观察法),即通过药物与红细胞直接接触,用肉眼来观察判断溶血情况。这也是新药研究中最常用的方法。但本法结果判断受主观影响,特别是有色泽中药注射剂,容易引起纠纷,且不能具体测出溶血红细胞的数量。用分

光光度法测定样品溶血率代替肉眼观察,消除结果判断的主观影响,能有效的规避这些问题。但分光光度法测定样品溶血率也存在许多影响因素,在使用方法、使用范围等方面需要进一步加以研究、完善,本实验对样品溶血率测定方法的改进,有助于扩大溶血率测定方法在药品安全性再评价和质量标准提高中的应用。

REFERENCES

- [1] ZHU S M, KUANG R, YAO Z, et al. Application of the mensuration of hemolysis ratio to the safety re-evaluation of Yuxingcao injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2008, 25(3): 233-235.
- [2] LÜ Y T, DING X S, SUN L, et al. Study on the optimal centrifugal velocity and time in evaluation of hemolysis *in vitro* [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2012, 16(10): 1402-1405.
- [3] KE Z F. The comparison of two hemolysis test methods of traditional Chinese medicine injections [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2011, 12(3): 216-219.
- [4] ZHU S M, KANG H, WANG D, et al. Re-evaluation on security of Guanxinning injection(II) [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2012, 35(1): 18-21.

收稿日期: 2013-03-13

药用辅料山梨醇(供注射用)的细菌内毒素检查法

秦美蓉, 王平*, 陈润桦, 王晓炜(深圳市药品检验所, 广东 深圳 518057)

摘要: 目的 建立药用辅料山梨醇(供注射用)的细菌内毒素检查法。方法 按中国药典 2010 年版细菌内毒素检查法相关规定进行试验。结果 本品在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下对细菌内毒素检查无干扰作用。结论 所建立的药用辅料山梨醇(供注射用)的细菌内毒素检查方法具有可行性, 其内毒素限值可定为 $2.5 \text{ EU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

关键词: 药用辅料山梨醇(供注射用); 细菌内毒素检查; 干扰试验

中图分类号: R927.33

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)02-0207-03

Bacterial Endotoxin Test for Excipients Sorbitol for Injection Preparations

QIN Meirong, WANG Ping*, CHEN Runhua, WANG Xiaowei(Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a bacterial endotoxin method for excipients sorbitol for injection preparations. **METHODS** According to the method in the appendix of the Chinese Pharmacopoeia(2010), the bacterial endotoxin test was carried out. **RESULTS** The preparation did not interfere with endotoxin test below the concentration of $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The method of bacterial endotoxin test is feasible with the limit of $2.5 \text{ EU} \cdot \text{g}^{-1}$ for excipients sorbitol for injection preparations.

KEY WORDS: excipients sorbitol for injection preparations; bacterial endotoxin test; interference test

作者简介: 秦美蓉, 女, 主管药师 Tel: (0755)26031746
师 Tel: (0755)26031749 E-mail: wangping662@sina.com.cn

E-mail: szqinmeirong@sina.com

*通信作者: 王平, 女, 博士, 副主任药

山梨醇(Sorbitol)是一种 D-葡萄糖醇, 作为等渗调节剂、助溶剂或稳定剂广泛应用于注射剂中。注射剂属于高风险剂型, 其所用辅料也必须符合药用要求。中国药典 2010 年版收载了山梨醇原料药及山梨醇注射液 2 个品种, 均无细菌内毒素检查项目, 其中山梨醇注射液使用热原检查法; 中国药典 2010 年版目前尚未将山梨醇作为药用辅料收载。美国药典^[1]、英国药典^[2]及欧洲药典^[3]对用于注射剂的山梨醇均有细菌内毒素检查项目。本研究旨在建立药用辅料山梨醇(供注射用)的细菌内毒素检查方法, 以完善对注射剂的质量控制。

1 仪器与试剂

ED115 型恒温干燥箱(德国 BINDER); IKAMS3 型旋涡混合器(德国 IKA); OLS200 型振摇水浴(英国 GRANT 公司)。试验所用玻璃器皿均经 250 °C 烘烤 2.5 h 去除外源性细菌内毒素。

细菌内毒素工作标准品(control standard of endotoxin, CSE, 中国药品生物制品检定所, 规格: 1 mL, 效价: 120 EU·支⁻¹, 批号: 150601-201072); 鲎试剂(tachypleus ameobocyte lysate, TAL, 湛江安度斯生物有限公司, 灵敏度 λ 分别为: 0.5, 0.25, 0.06 EU·mL⁻¹, 批号分别为: 1009162、1012211 和 1205111; 厦门市鲎试剂实验厂有限公司, 灵敏度 λ 为 0.25 EU·mL⁻¹, 批号: 110603); 细菌内毒素检查用水(BET 水, 湛江安度斯生物有限公司, 规格: 50 mL, 批号: 1006130); 山梨醇(药用辅料, 华北制药华盈有限公司, 批号: 1206087; 广西南宁化学制药有限责任公司, 批号: F335F; 石家庄瑞雪制药有限公司, 批号: 120703)。

2 方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素理论限值(L)的确定

根据美国药典^[1]、英国药典^[2]及欧洲药典^[3]的规定, 供注射用山梨醇细菌内毒素限值如下: 浓度 $<100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 限值应 $<4 \text{ EU}\cdot\text{g}^{-1}$; 浓度 $\geq 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 限值应 $<2.5 \text{ EU}\cdot\text{g}^{-1}$, 按从严原则, 取 $L=2.5 \text{ EU}\cdot\text{g}^{-1}$ 进行细菌内毒素方法学研究。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

按中国药典 2010 年版二部附录细菌内毒素检查法^[4], 进行灵敏度复核实验^[5]。将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解, 稀释成 2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 系列浓度, 依法进行试验, 结果表明所用 TAL 灵敏度均在 0.5 λ ~2 λ 内, 符合规定。

2.3 供试品最小有效稀释浓度(MVC)

根据药典规定, 供试品 $MVC=\lambda/L$, 其中 λ 为鲎试剂标示灵敏度, L 为细菌内毒素限值。若取 λ 为 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 EU·mL⁻¹, 则山梨醇对应的有效稀释浓度分别为: 0.2, 0.1, 0.05, 0.024, 0.012 g·mL⁻¹。

2.3.1 干扰预试验 称取 3 个不同厂家的山梨醇, 分别用细菌内毒素检查用水配制成浓度为 0.4, 0.2, 0.1, 0.048, 0.024 g·mL⁻¹ 系列溶液。分别加入等量的细菌内毒素检查用水制成 0.2, 0.1, 0.05, 0.024, 0.012 g·mL⁻¹ 系列溶液, 记此系列浓度溶液为 NPC; 分别加入等量的 4 λ 浓度的细菌内毒素标准溶液, 使每一浓度的试验液中均含有 2 λ 浓度的细菌内毒素, 记此系列浓度溶液记为 PPC。

取来自 2 个厂家的灵敏度分别为 0.5, 0.25 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂, 分别与上述 NPC 和 PPC 进行反应, 每一浓度重复 2 管, 并设阴性和阳性对照, 进行干扰预试验, 结果见表 1, 初步确定本品最大不干扰浓度为 0.2 g·mL⁻¹。

2.3.2 正式干扰试验 将山梨醇用细菌内毒素检查用水配制成 0.4 g·mL⁻¹, 分别与 4 λ , 2 λ , λ , 0.5 λ 的内毒素标准品溶液等体积混合, 配制成含 2 λ , λ , 0.5 λ , 0.25 λ 的内毒素的供试品溶液。取灵敏度为 0.25 EU·mL⁻¹ 的 2 个厂家的鲎试剂, 分别加入 2 λ , λ , 0.5 λ , 0.25 λ 的内毒素标准溶液和含 2 λ , λ , 0.5 λ , 0.25 λ 的内毒素的供试品溶液进行反应, 每一浓度重复 4 管, 并设分别加入检查用水和供试品溶液的阴性对照和样品阴性对照, 各重复 2 管。正式干扰试验结果见表 2, 试验结果表明, E_s/E_t 比值均在 0.5~2.0 内, 本供试品浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 时不干扰鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应, 可按等于或低于此浓度进行细菌内毒素检查。

2.3.3 细菌内毒素检查 用 0.06 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂对 3 批样品进行细菌内毒素检查, 结果见表 3。

3 讨论

注射剂是高风险的药物剂型, 近年来频频出现鱼腥草注射液、硫酸鱼精蛋白注射液等药品的严重不良反应事件, 原因很多与药用辅料有关, 因而注射剂辅料的安全性问题值得高度关注。由于注射剂在上市前均要进行细菌内毒素检查, 是否需要所有的注射用辅料进行细菌内毒素检查, 尚无充分的依据, 建议参照国外药典, 对于已经收载细菌内毒素检查项目的品种, 比如山梨醇^[1-3]、二甲硅油^[6]、羟丙纤维素- β -环糊精^[6]等,

表 1 干扰预试验结果

Tab 1 Results of pre-interference test of bacterial endotoxin for excipients sorbitol for injection preparations

TAL 批号	供试品	样品浓度/g·mL ⁻¹							
		系列溶液	0.2	0.1	0.05	0.024	0.012	NC	PC
1009162(湛江安度斯生物有限公司)	1206087	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	F335F	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	120703	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
110603(厦门市鲨试剂实验厂有限公司)	1206087	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	F335F	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	120703	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		

表 2 正式干扰试验结果

Tab 2 Results of interference test of bacterial endotoxin for excipients sorbitol for injection preparations

TAL 批号	供试品	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹				NC	供试品阴性对照	E_S /EU·mL ⁻¹	E_I /EU·mL ⁻¹
		0.5	0.25	0.125	0.06				
1012211(湛江安度斯生物有限公司)	水溶液	++++	++++	-----	-----	--	/	0.25	
	1206087	++++	++++	++++	-----	/	--		0.125
	F335F	++++	++++	+++	-----	/	--		0.15
	120703	++++	++++	----+	-----	/	--		0.21
110603(厦门市鲨试剂实验厂有限公司)	水溶液	++++	++++	-----	-----	--	/	0.25	
	1206087	++++	++++	-----	-----	/	--		0.25
	F335F	++++	++++	-----	-----	/	--		0.25
	120703	++++	++++	-----	-----	/	--		0.25

表 3 供试品细菌内毒素检查结果

Tab 3 Results of bacterial endotoxin test for sample

供试品批号	NPC	PPC	阳性对照	阴性对照
1206087	--	++	++	--
F335F	--	++	++	--
120703	--	++	++	--

注：鲨试剂来源为湛江安度斯生物有限公司，λ=0.06 EU·mL⁻¹，批号：1205111
Note: TAL is from Zhanjiang A&C Biological Ltd., λ=0.06 EU·mL⁻¹, Lot: 1205111

这些辅料品种或用量较大，或本身易被细菌污染，需要进行更加严格的质量控制，建议先对这些品

种建立细菌内毒素检查项目，逐步提高供注射用药用辅料标准。

REFERENCES

[1] USP(35)/NF(30) Vol 1 [S]. 2012: 1965-1966.
[2] BP(2012) Vol II [S]. 2012: 2020-2021.
[3] EP(7.0) Vol 2 [S]. 2011: 2963-2965.
[4] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix: 99-102.
[5] ZHANG D B. Study on testing for bacterial endotoxin in ibuprofen [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(3): 261-264.
[6] USP(35)/NF(30) Vol 1 [S]. 2012: 1786-1787, 1818-1819.

收稿日期：2013-03-13