

· 药剂学 ·

脑精素注射液细菌内毒素检查法的研究

张 旭, 佟志清, 姜铁夫, 曹炳星(中国人民解放军第 463 医院药剂科, 辽宁 沈阳 110042)

摘要 目的:建立脑精素注射液的细菌内毒素检查法。方法:根据中国药典 2000 年版二部收载的细菌内毒素检查法的要求进行实验。结果:将脑精素注射液稀释 30 倍,以标示灵敏度为 $0.5\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂检查是有效的。结论:鲎试验法取代家兔法对脑精素注射液进行热原检查是可行的。

关键词 脑精素注射液;细菌内毒素检查;干扰试验

中图分类号:R954 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2003)02-0082-02

The discussion on the endotoxin inspection method of cerebrolysin injection

ZHANG Xu, TONG Zhi-qing, JIANG Tie-fu, CAO Bing-xing (The 463rd Hospital of PLA, Shenyang 110042, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the inspection method of endotoxin in cerebrolysin injection. **METHODS:** The experiment is implemented according to the request of endotoxin inspection method collected in China Pharmacopoeia (II, 2000Ed). **RESULTS:** The experiment showed that the interference elements can be excluded by diluting cerebrolysin injection 30 times, and it is effective that endotoxin can be tested by amoebocyte lysate with accuracy of $0.5\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION:** For daily pyrogen test of cerebrolysin injection, endotoxin inspection method can be used instead of domestic rabbit method.

KEY WORDS Cerebrolysin injection; endotoxin experiment; interference experiment

本院研制的脑精素注射液是从健康乳牛脑组织中提取的具有生物活性的多肽类物质制成的生物灭菌制剂。具有改善神经系统营养,增强脑细胞活性,促进脑细胞再生等作用。临床上用于各类脑血管疾病。生产中我们采用常用的家兔法检查热原,操作繁琐费时,结果客观性较差,因此改用细菌内毒素检查法即采用鲎试剂与细菌内毒素(即热原)产生凝集反应的机理,判断供试品细菌内毒素限量是否符合规定。为验证本法的可行性及可靠性,确定具体操作方法,特作此研究。

1 实验材料

脑精素注射液(20010701、20010904、20010929、20011014)本院生化制剂室生产。东方鲎试剂(TAL)0103291,标示灵敏度 $\lambda = 0.5\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。细菌内毒素工作标准品(CSE)为 10EU/支。细菌内毒素检查用水(TALW)0105220 2mL/瓶。均由湛江安度斯生物有限公司生产。主要仪器为单人无菌净化台、蜗旋混合器、电热恒温水浴箱等,移液设备均确证无干扰细菌内毒素。

2 实验方法与结果^[1,2]

2.1 鲎试剂(以下简称 TAL)灵敏度复核实验

将细菌内毒素工作标准品(以下简称 CSE)用细菌内毒素检查用水(以下简称 TALW)稀释制成 1.0、0.5、0.25、0.125 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度备用,每稀释一步均在蜗旋混合器上混合 15min,依法测定,结果见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核结果

标示灵敏度 ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细菌内毒素浓度					复核灵敏度 ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	1.0	0.5	0.25	0.125	NC	
$\lambda = 0.5$	+	+	-	-	-	$\lambda_c = 0.5$
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	

灵敏度复核结果 $\lambda_c = \lambda$, 符合使用规定。

2.2 干扰初筛试验

2.2.1 脑精素注射内毒素限值(L)的确定。

本品的人用最大剂量(M)为 $0.333\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 细菌内毒素阈值(K)注射剂为 $5.0\text{EU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

细菌内毒素限值(L)为:

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5.0 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1}}{0.333 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}} = 15 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.2.2 脑精素注射液的稀释

以鲎试剂 $1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为基准,计算出相应的最大有效稀释(MVD),并以此为样品的基准稀释倍数:

$$\text{MVD} = \frac{L}{\lambda} = \frac{15 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}}{1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}} = 15 \text{ 倍}$$

等倍稀释下列浓度的样品溶液,即 1:15, 1:30, 1:60, 1:120 记为 S_{NPC} 系列。

分别制备一同样浓度系列的样品溶液,但在制备过程中加入细菌内毒素,使每一浓度的样品溶液均含有 $1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (2λ) 的 CSE, 记为 S_{PPC} 系列。

2.2.3 初筛试验

选灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TAL, 分别与 S_{NPC} 和 S_{PPC} 系列溶液反应, 试验重复两管, 结果见表 2。

表 2 脑精素注射液干扰初筛试验结果

项 目	样品稀释倍数			
	15	30	60	120
S_{NPC}	--	--	--	--
S_{PPC}	--	++	++	++

结果表明,当供试品溶液较高时(15 倍稀释以内),PPC 为阴性(PPC 为产品阳性对照),表明对 TAL 有干扰,产生假阴性反应。因此至少要将脑精素注射液稀释 30 倍,使用某一灵敏的鲎试剂检查才能清除干扰。此时鲎试剂灵敏度应为:

$$\lambda = \frac{L}{\text{MVD}_{30}} = \frac{15 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}}{30} = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.3 干扰试验

取 3 批经热原检查合格的产品,分别作 30 倍稀释,用这些样品分别复溶 TAL 与配制的 $1.0, 0.5, 0.25, 0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细菌内毒素系列溶液反应;另作以 TALW 复溶的 TAL 与细菌内毒素系列溶液反应作比较。试验各重复两管,结果见表 3。

表 3 脑精素注射液样品 30 倍稀释液干扰试验结果

TAL	TAL 复溶液	内毒素溶液 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$				NC	λ_c ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
		1.0	0.5	0.25	0.125		
$\lambda = 0.5 (\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1})$	脑精素 20010701	++	++	--	--	--	0.5
	20010904	++	++	--	--	--	
	20010929	++	++	--	--	--	
	TALW 0105220	++	++	--	--	--	

测定值 $\lambda_c =$ 标示值 λ , 证明样品在该浓度下不干扰检查, 实验结果可信。

2.4 脑精素注射液细菌内毒素检查与热原检查比较

取 4 批脑精素注射液分别作 30 倍稀释,使用 λ

$= 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂作检查,同时增加一支产品阳性对照管(PPC)^[3]。并对这 4 批样品用家兔法检查进行比较。结果见表 4。

表 4 4 批脑精素注射液的细菌内毒素与热原检查结果

TAL	脑精素注射液	S1	S2	PC	PPC	NC	结果	热原检查
$\lambda = 0.5 (\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1})$	20010701	-	-	+	+	-	合格	合格
	20010904	-	-	+	+	-	合格	合格
	20010929	-	-	+	+	-	合格	合格
	20011014	+	+	+	+	-	不合格	不合格

结果表明细菌内毒素检查法与家兔法检查结果一致。

3 讨论

药品采用细菌内毒素检查的先决条件是证明药品在满足限量检查要求的浓度下对细菌内毒素试验不产生干扰作用。如果药品在高浓度时对细菌内毒素试验无干扰,则在更低浓度时也不会产生干扰^[4]。脑精素注射液在稀释 30 倍以上用适当灵敏度的鲎试剂检查,可以排除干扰。在实际生产检查过程中,我们采用将样品稀释 30 倍,用灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂进行检查,结果可靠,方法可行。我院使用本院生产的脑精素注射液 5 万余人

次,无一例因该药热原不合格发生输液反应,这更加证明用细菌内毒素检查法控制脑精素注射液的热原是可行的。

参考文献:

[1] 中国药典 2000 年版. 二部[S]. 2000;附录 86.
 [2] 隋妍蕾,张建国,于秀芬,等. 氧氟沙星注射液细菌内毒素检查法的研究[J]. 中国现代应用药学,2001,18(1):62.
 [3] 陈邦树. 血检通注射液细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药学杂志,1997,32(增刊):153.
 [4] 黄清泉,夏振民. 药品细菌内毒素检查的实验设计[J]. 中国药学杂志,1997,32(2):72.