

· 研究报告 ·

高浓度维生素 B₆ 注射液细菌内毒素检查方法学验证

沈娟, 芦佳月, 罗晓茹, 王习文(中国人民解放军联勤保障部队药品仪器监督检验总站, 北京 100071)

[摘要] 目的 建立高浓度维生素 B₆ 注射液的细菌内毒素检查方法。方法 采用《中国药典》2015 年版四部通则 1143 细菌内毒素检查法进行检测。结果 用 pH6.5~7.5 的缓冲液将高浓度维生素 B₆ 注射液稀释至 1.04 mg/ml, 用 λ 为 0.06 EU/ml 的鲎试剂可以有效去除干扰。结论 该方法可行, 可用于高浓度维生素 B₆ 注射液的细菌内毒素检查。细菌内毒素的限值确定为 0.06 EU/mg。

[关键词] 高浓度维生素 B₆ 注射液; 细菌内毒素; 凝胶法; 干扰试验

[中图分类号] R927.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)01-0067-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201909108

Validation of endotoxin test for high concentration vitamin B₆ injection

SHEN Juan, LU Jiayue, LUO Xiaoru, WANG Xiwen (General Station for Drug & Instrument Supervision and Control, Joint Logistics Support Force, PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To establish a bacterial endotoxin test method for high concentration vitamin B₆ injection. **Method** The test was taken according to the bacterial endotoxin test in Chinese pharmacopoeia 2015 edition. **Result** By diluting the sample concentration to 1.04 mg/ml with the buffer of pH6.5-7.5, and using λ=0.06 EU/ml of TAL reagent, the interference could be effectively avoided. **Conclusion** The method was useful, which could be used to test the bacterial endotoxin in high concentration vitamin B₆ injection. The bacterial endotoxin limit was defined as 0.06 EU/mg.

[Key words] high concentration vitamin B₆ injection.; endotoxin; gel-clot test method; interference test

维生素 B₆ 是一种水溶性维生素, 遇光或碱易被破坏, 不耐高温; 是制造抗体和红细胞的必要物质^[1]; 对婴儿的大脑和神经系统发育亦至关重要^[2]。可用于治疗因大量或长期服用异烟肼等引起的周围神经炎、失眠、不安; 减轻抗癌药和放射治疗引起恶心、呕吐或妊娠呕吐等^[3]; 治疗或预防婴儿惊厥; 治疗白细胞减少症、痤疮、酒糟鼻、脂溢性湿疹等^[4-6]。注射用维生素 B₆ 其细菌内毒素检查已有报道^[7], 维生素 B₆ 注射液质量标准也已被载入《中华人民共和国药典(二部)》2015 年版^[8], 其中包括了细菌内毒素检查项, 但药典中该品种项下的药物浓度最高为 50 mg/ml, 而 125 mg/ml 高浓度维生素 B₆ 注射液其细菌内毒素的检查未见相关报道。为了更好地控制该注射剂的质量, 笔者参照《中国药典》2015 年版四部通则 1143 细菌内毒素检查凝胶法^[8], 对维生素 B₆ 注射液用鲎试剂进行细菌内毒素检查的可行性研究。

1 试验材料

1.1 供试品

维生素 B₆ 注射液由军事科学院放射与辐射医学研究所提供(批号: 1905131、1904261、1905132, 规格 20 ml: 2.5 g)。

1.2 试剂

鲎试剂(福州新北生化工业有限公司, 0.25 EU/ml, 批号: 19010812; 0.06 EU/ml, 批号: 19050112; 湛江安度斯生物有限公司, 0.06 EU/ml, 批号: 1903132); Tris 缓冲液(湛江安度斯生物有限公司, 批号: 1904230; 规格: 每支 4 ml); 镁离子缓冲液(湛江安度斯生物有限公司, 批号: 1901310; 规格: 每支 4 ml); 细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院, 批号: 150601-201886, 规格: 每支 80 EU); 细菌内毒素检查用水 (BET, bacterial endotoxin test 水, 中国食品药品检定研究院, 批号: 160006-201510; 规格: 每支 5 ml)。

1.3 仪器

SSW-600-2S 电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 其他器皿包括试管、微量移液

[作者简介] 沈娟, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药品安全性评价与质量标准, Tel: (010)66949078

器及无热原吸头。

2 方法与结果

2.1 限值的确定

本品为在研的维生素类制剂,其说明书用法用量为:“临用前以 250 ml 乳酸钠林格氏液稀释后静脉滴注。依病情,首次给予相当于维生素 B₆ 1~5 g 快速滴注。”得知本品的最大给药剂量为 5 g/(60 kg·h)。根据公式 $L=K/M$, K 为人每千克体重每小时最大

可接受的内毒素剂量,注射剂为 5 EU/(kg·h); M 为人用每千克体重每小时的最大供试品剂量,则限值 $L=0.06$ EU/mg。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验

按照《中国药典》2015 年版四部通则 1143^[9] 细菌内毒素检查法规定,对鲎试剂进行灵敏度 (λ_c) 复核。3 批鲎试剂灵敏度测定值 λ_c 均在 0.5 ~ 2.0 λ 之间,均符合规定,3 批鲎试剂灵敏度复核结果皆为标示灵敏度。详见表 1。

表 1 3 批鲎试剂灵敏度复核结果

批号	标示灵敏度(λ)	内毒素浓度(EU/ml)						
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	NC
19010812	0.25	++++	++++	++++	----	—	—	--
19050112	0.06	—	—	++++	+++—	----	----	--
1903132	0.06	—	—	++++	++++	----	----	--

注:“+”代表结果为阳性,“-”代表结果为阴性,每一个“+”或“-”代表一支反应管的结果;“—”表示未获得;NC代表阴性对照。

2.3 干扰试验预试验

2.3.1 维生素 B₆ 注射液最大有效稀释倍数(MVD)的计算

最大有效稀释倍数计算公式为: $MVD=cL/\lambda$, 式中: L 为供试品的细菌内毒素限值 0.06 EU/mg; c 为供试品溶液浓度; λ 为鲎试剂标示灵敏度(EU/ml)。

根据市售鲎试剂灵敏度 λ 范围 0.5 ~ 0.03 EU/ml, 对维生素 B₆ 注射液进行细菌内毒素检测时,用 0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 EU/ml 的鲎试剂分别对应有效稀释倍数: 15、30、60、120、240 倍, 分别对应有效稀释浓度: 8.33、4.17、2.08、1.04、0.52 mg/ml。

由于供试品 pH 偏酸性(pH2 ~ 3), 不在细菌内毒素测定的合适范围内, 因此需先调节 pH 至 6.0~8.0, 再进行测定。前期试验发现, 用 0.25 EU/ml 的鲎试剂, 以 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液作为 pH 调节剂进行内毒素试验, 结果存在一定程度的干扰。

目前市售的 pH 缓冲液有湛江安度斯生物有限

公司生产的镁离子缓冲液(pH6.5 ~ 7.5)和 Tris 缓冲液(pH6.5 ~ 7.5), 拟用市售的缓冲液代替 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液对供试品进行稀释和 pH 调节, 再进行干扰试验。

2.3.2 试验操作及结果

用其中一批供试品(批号: 1905132)进行细菌内毒素干扰预实验。将维生素 B₆ 注射液用镁离子缓冲液(以下简称“稀释剂 I”)分别稀释至 8.33、4.17、2.08、1.04、0.52 mg/ml, 此系列浓度溶液为不含内毒素的供试品溶液(NPC: negative product control), 另制备含有 2 λ (0.5 EU/ml)浓度细菌内毒素的相同系列浓度的供试液, 此系列溶液为含内毒素的供试品溶液(PPC: positive product control)。

取灵敏度为 0.25 EU/ml 的鲎试剂, 分别与 NPC 和 PPC 系列溶液反应, 每一浓度设 2 支复管, 同时设阳性对照(PC: positive control)、阴性对照(NC)、稀释剂 I 阴性对照(I NC)、稀释剂 I 阳性对照(I PC), 结果见表 2。

表 2 维生素 B₆ 注射液用稀释剂 I 稀释和 pH 调节后的干扰预试验结果

鲎试剂批号	供试品批号	组别	供试品浓度(mg/ml)									
			8.33	4.17	2.08	1.04	0.52	NC	PC	I NC	I PC	
19010812	1905132	NPC	--	--	--	--	--	--	--	++	--	++
		PPC	--	--	--	++	++	--	++	--	--	++

注:“+”代表结果为阳性,“-”代表结果为阴性,每一个“+”或“-”代表一支反应管的结果。

用 Tris 缓冲液(以下简称“稀释剂 II”)进行与稀释剂 I 同样的干扰预试验,结果见表 3。

表 3 维生素 B₆ 注射液用稀释剂 II 稀释和 pH 调节后的干扰预试验结果

鲎试剂批号	供试品批号	组别	供试品浓度(mg/ml)									
			8.33	4.17	2.08	1.04	0.52	NC	PC	II NC	II PC	
19010812	1905132	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	--	++	++	--	++	--	++	

注:“+”代表结果为阳性,“-”代表结果为阴性,每一个“+”或“-”代表一支反应管的结果。

结果表明:以稀释剂 I (或稀释剂 II)对供试品进行稀释和 pH 调节,供试品溶液浓度在 1.04 mg/ml 及以下对鲎试剂和内毒素的凝集反应无干扰。而 1.04 mg/ml 对应的鲎试剂灵敏度为 0.06 EU/ml,故宜选用 0.06 EU/ml 及 0.06 EU/ml 以上灵敏度的鲎试剂进行细菌内毒素检查。

2.4 正式干扰试验

采用两个厂家生产的鲎试剂对 3 批维生素 B₆ 注射液(批号:1905131、1904261、1905132)进行正式干扰试验。试验选择灵敏度为 0.06 EU/ml 的鲎试剂进行,对应最小有效稀释浓度为 1.04 mg/ml。

用稀释剂 I 和稀释剂 II 分别对供试品进行稀释和 pH 调节,再进行干扰试验研究。

制备含有 0.125(2 λ)、0.06(1 λ)、0.03(0.5 λ)和 0.015(0.25 λ)EU/ml 内毒素浓度的 1.04 mg/ml 的供试品溶液,每一浓度设 4 支复管;用 BET 水和稀释剂 I 分别制备 0.125(2 λ)、0.06(1 λ)、0.03(0.5 λ)和 0.015(0.25 λ)EU/ml 内毒素系列溶液,每一浓度设 2 支复管;并分别设 NC 2 支。与灵敏度为 0.06 EU/ml 的鲎试剂进行反应,按《中国药典》2015 版四部通则 1143 细菌内毒素检查凝胶法^[8]干扰试验规定进行试验,结果见表 4。

表 4 稀释剂 I 稀释维生素 B₆ 注射液干扰试验结果

鲎试剂批号	溶液名称	内毒素浓度(EU/ml)				NC	λ _c , E _t
		0.125	0.06	0.03	0.015		
19050112	BET水	++	++	--	--	--	λ _c =0.06
	稀释剂 I	++	--	--	--	--	λ _c =0.125
	1905131	++++	----	----	----	--	E _t =0.125
	1904261	++++	+-	----	----	--	E _t =0.09
	1905132	++++	+---	----	----	--	E _t =0.10
1903132	BET水	++	++	--	--	--	λ _c =0.06
	稀释剂 I	++	++	--	--	--	λ _c =0.06
	1905131	++++	++++	----	----	--	E _t =0.06
	1904261	++++	++++	----	----	--	E _t =0.06
	1905132	++++	++++	----	----	--	E _t =0.06

注:λ_c=log⁻¹(ΣX_s/2), E_t=log⁻¹(ΣX_t/4)。其中:X_s为BET水、稀释剂 I 的反应终点浓度的对数值;X_t为干扰试验溶液(即稀释剂 I 稀释的3批供试品)的反应终点浓度的对数值。

按照上述(用稀释剂 I 稀释)方法,用稀释剂 II 进行干扰试验,结果见表 5。

由表 4 和表 5 可知:平行 3 批次干扰试验中阴性对照溶液 NC、稀释剂对照溶液 I NC(或 II NC)、供试品溶液 NPC 的所有平行管均为阴性,两个厂家鲎试剂标示灵敏度对照系列的结果 λ_c 在 0.5 ~ 2 λ 之间(包括 0.5 λ 和 2 λ),符合灵敏度复核要求,试验有效。两个厂家鲎试剂干扰试验系列的

结果(E_t)为 0.5 ~ 2 λ(包括 0.5 λ 和 2 λ),符合规定。表明供试品稀释至 1.04 mg/ml 时,采用 0.06 EU/ml 的鲎试剂进行试验无干扰,可用于细菌内毒素检查。

2.5 供试品细菌内毒素检查

取灵敏度为 0.06 EU/ml 的鲎试剂,按本研究建立的检查法用两个厂家的鲎试剂对 3 批维生素 B₆ 注射液进行细菌内毒素常规检查。维生素

表5 稀释剂Ⅱ稀释维生素B₆注射液干扰试验结果

鲎试剂批号	溶液名称	内毒素浓度(EU/ml)				NC	λ_c, E_t
		0.125	0.06	0.03	0.015		
19050112	BET水	++	++	--	--	--	$\lambda_c=0.06$
	稀释剂Ⅱ	++	--	--	--	--	$\lambda_c=0.125$
	1905131	++++	----	----	----	--	$E_t=0.125$
	1904261	++++	----	----	----	--	$E_t=0.125$
	1905132	++++	----	----	----	--	$E_t=0.125$
1903132	BET水	++	++	--	--	--	$\lambda_c=0.06$
	稀释剂Ⅱ	++	+-	--	--	--	$\lambda_c=0.09$
	1905131	++++	+---	----	----	--	$E_t=0.1$
	1904261	++++	----	----	----	--	$E_t=0.125$
	1905132	++++	+---	----	----	--	$E_t=0.1$

注: $\lambda_c = \log^{-1}(\sum X_s/2)$, $E_t = \log^{-1}(\sum X_t/4)$ 。其中: X_s 为BET水、稀释剂Ⅱ的反应终点浓度的对数值; X_t 为干扰试验溶液(即稀释剂Ⅱ稀释的3批供试品)的反应终点浓度的对数值。

B₆注射液用稀释剂Ⅰ和稀释剂Ⅱ进行供试品稀释和pH调节后,细菌内毒素检查结果相同,皆符合规定。结果见表6。

表6 维生素B₆注射液细菌内毒素检查

鲎试剂批号	供试品批号	PPC	NPC	PC	NC
19050112	1905131	++	--	++	--
	1904261	++	--	++	--
	1905132	++	--	++	--
1903132	1905131	++	--	++	--
	1904261	++	--	++	--
	1905132	++	--	++	--

注: NPC为不含细菌内毒素的1.04 mg/ml维生素B₆注射液; PPC为含有2 λ 浓度细菌内毒素的1.04 mg/ml维生素B₆注射液。

3 讨论

《中国药典(二部)》2015年版收载的维生素B₆注射液品种,内毒素的限值为每1 mg维生素B₆中含内毒素的量应小于0.30 EU^[8]。由于本供试品规格和浓度在《中国药典》2015年版中未涵盖,且由于本品说明书中的用量较大,根据说明书的用法用量及《注射剂安全性检查法应用指导原则》^[9],计算出本品内毒素的限值为:每1 mg维生素B₆中含内毒素的量应小于0.06 EU,比药典规定的限值提出了更高的要求,试验中需要切实解决干扰问题。

经过一系列试验摸索,最终以市售的湛江安度斯生物有限公司生产的镁离子缓冲液(pH6.5~7.5)和Tris缓冲液(pH6.5~7.5)对供试品进行稀释和pH调节。经预实验可知,将供试品稀释120倍以

下对凝胶法内毒素检查存在抑制性干扰,稀释120倍及以上对凝胶法内毒素检查无干扰,并通过正式干扰试验得到验证。试验结果表明:以pH6.5~7.5缓冲液稀释本品至1.04 mg/ml,用灵敏度为0.06 EU/ml鲎试剂对供试品进行细菌内毒素检查,方法可行。

【参考文献】

- [1] 苏龙翔,李洪霞,肖永久,等.维生素B₆对利奈唑胺相关性血细胞减少影响的回顾性研究[J].中国临床药理学杂志,2010,26(10):733-736.
- [2] 张金佳,刘晓红.孕产期相关因素对婴儿行为发育的影响[J].中国临床医生杂志,2017,45(1):26-28.
- [3] 许小宴,朱洁怡.维生素B₆穴位注射及穴位敷贴联合心理辅助治疗对妊娠剧吐症状的影响[J].中医临床研究,2019,11(16):138-140.
- [4] 刘菁,刘素军.盐酸多西环素胶囊加复合维生素B治疗重度痤疮18例疗效观察[J].心血管外科杂志(电子版),2019,8(2):20-21.
- [5] 陈新谦.新编药理学:第17版[M].北京:人民卫生出版社,2011:780.
- [6] 陈冠容.老药新用:第4版[M].北京:人民卫生出版社,2011:626-629.
- [7] 刘骅.注射用维生素B₆细菌内毒素检查法的研究[J].中国现代应用药学,2012,29(3):267-271.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)2015年版[S].北京:中国医药科技出版社,2015:1235.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)2015年版[S].北京:中国医药科技出版社,2015:通则1143;指导原则9301.

【收稿日期】 2019-09-25 【修回日期】 2019-11-08

【本文编辑】 李睿旻