

# 丹参川芎嗪注射液细菌内毒素检查法研究

张馨,梅群,肖植国

(曲靖市食品药品检验检测中心生测室,云南 曲靖 655000)

**摘要:**目的 建立丹参川芎嗪注射液细菌内毒素检查法。方法 依据《中国药典》2015 年版四部(通则 1143)细菌内毒素检查法,通过预干扰预试验和干扰试验,确定丹参川芎嗪注射液最大无干扰的浓度,并进行方法学验证。结果 将丹参川芎嗪注射液稀释 20 倍,对细菌内毒素检测法无干扰作用。结论 丹参川芎嗪注射液内毒素检查法可用于检查丹参川芎嗪注射液。

**关键词:**丹参川芎嗪注射液;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

中图分类号:R286

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.24.041

文章编号:1006-1959(2018)24-0139-04

## Study on Bacterial Endotoxin Test of Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride

ZHANG Xin,MEI Qun,XIAO Zhi-guo

(Department of Bioassay,Qujing Food and Drug Testing Center,Qujing 655000,Yunnan,China)

**Abstract:**Objective Establish a bacterial endotoxin test for Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride. Methods According to the Chinese Pharmacopoeia's 2015 edition of the four-part (General Rule 1143) bacterial endotoxin test, the maximum interference-free concentration of Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride was determined by pre-interference pre-test and interference test, and the methodological verification was carried out. Results The Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride was diluted 20 times, which had no interference effect on the bacterial endotoxin test. Conclusion The endotoxin test of Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride can be used to check Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride.

**Key words:**Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Hydrochloride;Bacterial endotoxin test;Gel method;Interference test

丹参川芎嗪注射液为复方制剂,浅棕红色澄明液体,用于闭塞性脑血管疾病,如脑供血不全,脑血栓形成脑栓塞及其他缺血性心血管疾病,如冠心病的胸闷、心绞痛、心肌梗塞、缺血性中风、血栓闭塞性脉管炎,收载在国家药品西药标准(化学药品地标升国标第十二册),执行标准 WS-10001-(HD-1138)-2002<sup>[1]</sup>,目前标准采用家兔法进行热原检查,该检查方法所用家兔的饲养时间长,操作繁琐,实验结果受家兔的个体差异影响较大。而细菌内毒素检查法具有灵敏、快速、操作简便、结果准确等优点,为建立该品种细菌内毒素检查法的可行性研究提供理论参考。

### 1 材料

**1.1 试剂与药品** 细菌内毒素工作标准品(CSE)(湛江博康海洋生物有限公司,批号:1607302,规格:10 EU/支);鲎试剂(TAL)(湛江安度斯生物科技股份有限公司,标示灵敏度 0.5 EU/ml,批号:1609021,规格:0.1 ml/支;标示灵敏度 0.25 EU/ml,批号:1705041,规格:0.1 ml/支;湛江博康海洋生物有限公司,标示灵敏度 0.5 EU/ml,批号:1607270,规格:0.1 ml/支;标示灵敏度 0.25 EU/ml,批号:1708230,

规格:0.1 ml/支);细菌内毒素检查用水(BET水)(湛江博康海洋生物有限公司,批号:1607050,规格:5 ml/支);丹参川芎嗪注射液(贵州拜特制药有限公司,批号:20160445、20161233、20170313,规格:5 ml/支)。

**1.2 仪器** BET-48G 细菌内毒素测定仪(天大天发科技有限公司);ZH-2BLENDER 涡式振荡器(天津药典标准仪器厂);Transferpette 移液器;AXYGEN 带过滤无内毒素枪头。

### 2 方法与结果

**2.1 鲎试剂灵敏度的复核试验** 所用鲎试剂应依法进行灵敏度复核,结果均应符合规定。根据鲎试剂灵敏度的标示值( $\lambda$ ),用 BET 水分别将 CSE 溶解并制成 2.0 $\lambda$ 、1.0 $\lambda$ 、0.5 $\lambda$ 、0.25 $\lambda$  的细菌内毒素标准溶液,每一个浓度的溶液做 4 管,用 BET 水做 2 支阴性对照管。按《中国药典》2015 年版四部(通则 1143)<sup>[2,3]</sup>对 TAL 进行标示灵敏度复核。由表 1 可见,2 个厂家生产的鲎试剂灵敏度均符合规定。

**2.2 内毒素限值的计算** 根据《中国药典》2015 年版四部(通则 1143)的有关要求<sup>[2]</sup>,内毒素限值(L)按以下公式计算: $L=K/M$ 。式中 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  $K=5 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ;

作者简介:张馨(1988.7-),女,山西襄垣人,本科,助理工程师,研究方向:食品药品检验检测

M 为人用每千克体重每小时的最大供试品剂量,根据说明书丹参川芎嗪注射液最大剂量为 10 ml,中国人均体重按 60 kg 计算, $M=10 \text{ ml}/(60\text{kg}\cdot\text{h})=0.167 \text{ ml}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ,则  $L=30 \text{ EU/ml}$ 。因此,计算出本品的细菌内毒素限值为每 1 ml 丹参川芎嗪注射液中含内毒素应 $<30 \text{ EU}$ 。

**2.3 干扰预实验最大有效稀释倍数的确定** 按药典标准中供试品最大稀释倍数 (MVD) 计算公式: $MVD=CL/\lambda^2$ ,C 为供试品溶液的浓度,L 为供试品溶液的内毒素限值, $MVD=CL/\lambda=1.0 \text{ ml/ml}\times 30 \text{ EU/ml}/0.50(\text{EU})=60$ 。

**2.4 干扰预试验** 为了确定丹参川芎嗪注射液在多

大浓度下对细菌内毒素(CSE)和鲎试剂(TAL)的反应不存在干扰作用,首先进行干扰试验的预实验<sup>[4]</sup>。将 3 批丹参川芎嗪注射液用 BET 水分别稀释 5、10、20、40、60 倍作为供试品系列(NPC),同时用上述每一个浓度的溶液制备成含 1 EU/ml(2 $\lambda$ )浓度的内毒素溶液作为供试品阳性对照系列(PPC)。用标示灵敏度( $\lambda$ )为 0.50 EU/ml 的 2 个厂家的鲎试剂(TAL)分别与 2 个系列溶液反应,每一稀释度作 2 支。BET 水作阴性对照(NC),加入 2  $\lambda$  浓度的内毒素标准溶液作为阳性对照(PC),从表 2 可见丹参川芎嗪注射液存在干扰作用,稀释 20 倍时,即不再对试验产生干扰。

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验结果

TAL 生产厂家	TAL 批号	TAL 标示灵敏度(EU/ml)	细菌内毒素标准品浓度( $\lambda$ )				NC	$\lambda_c$ (EU/ml)
			2.0	1.0	0.5	0.25		
湛江安度斯	1609021	0.5	++++	++++	++++	----	--	0.5
湛江博康	1607270	0.5	++++	++++	++++	----	--	0.5
湛江安度斯	1705041	0.25	++++	++++	++++	----	--	0.25
湛江博康	1708230	0.25	++++	++++	++++	----	--	0.25

表 2 丹参川芎嗪注射液干扰预试验结果

TAL 批号(0.5 EU/ml)	供试品批号	系列	供试品稀释倍数					阳性对照	阴性对照
			5	10	20	40	60		
1609021	20160445	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
	20161233	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
	20170313	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
1607270	20160445	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
	20161233	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
	20170313	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--

**2.5 干扰试验** 根据预实验结果,在进行正式干扰试验时选择供试品的不干扰浓度为稀释 20 倍。取 3 个批号的丹参川芎嗪注射液用 BET 水分别稀释 20 倍,分别用稀释 20 倍的供试品溶液和 BET 水稀释细菌内毒素标准品 (CSE),制成含 1.0、0.5、0.25、0.125 EU/ml 4 种浓度内毒素的系列溶液。分别与  $\lambda=0.5 \text{ EU/ml}$  的鲎试剂(TAL)反应,按照《中国药典》2015 年版四部通则 1143 的凝胶限度试验法,进行干扰试验,当阴性对照(NC)为阴性时,结果按公式  $E_s=\lg^{-1}(\sum X_i/4)$ 和  $E_t=\lg^{-1}(\sum X_i/4)$ 计算各系列反应终点

内毒素浓度的绝对值。式中: $E_s$  为内毒素标准对照系列溶液的反应终点浓度的几何平均值; $E_t$  为含内毒素的供试品系列溶液的反应终点浓度的几何平均值; $X_s$ 和  $X_t$  分别为含和不含丹参川芎嗪注射液系列各反应终点细菌内毒素浓度的对数值。由表 3 可见, $E_s$  均在 0.5 $\lambda$ ~2 $\lambda$  范围内,并且  $E_t$  在 0.5 $E_s$ ~2 $E_s$  范围内,说明稀释 20 倍的丹参川芎嗪注射液在此试验条件下,对鲎试剂(TAL)与细菌内毒素(CSE)之间的凝聚反应无干扰作用,符合《中国药典》2015 年版四部(通则 1143)的判断标准。同时,可以确定丹参川芎

噻注射液对 TAL 无干扰的浓度>20 倍,目前市售的鲎试剂(TAL)均可用于丹参川芎噻注射液进行细菌内毒素检查。

2.6 供试品细菌内毒素检测法的验证 取 3 个批号的丹参川芎噻注射液分别用 BET 水稀释 20 倍,使

用  $\lambda=0.25$  EU/ml 的 2 个厂家的鲎试剂进行细菌内毒素检查,并按要求做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照,3 批丹参川芎噻注射液的内毒素检查结果均符合规定,见表 4。

表 3 丹参川芎噻注射液 20 倍稀释干扰试验结果

TAL 批号(0.5 EU/ml)	供试品批号	供试品稀释倍数	细菌内毒素浓度(EU/ml)					$E_t$ (EU/ml)	$E_s$ (EU/ml)
			1.0	0.5	0.25	0.125	NC		
1609021	20160445	20	++++	++++	- - - -	- - - -	--	0.25	/
	20161233	20	++++	++++	- - - -	- - - -	/	0.25	/
	20170313	20	++++	++++	- - - -	- - - -	/	0.25	/
1607270	20160445	20	++++	++++	- - - -	- - - -	/	0.25	/
	20161233	20	++++	++++	- - - -	- - - -	/	0.25	/
	20170313	20	++++	++++	- - - -	- - - -	/	0.25	/
BET 水	/	/	++++	++++	- - - -	- - - -	--	/	0.5

表 4 供试品细菌内毒素检查结果<sup>[9]</sup>

TAL 生产厂家	批号	$\lambda$ (EU/ml)	供试品批号	供试品稀释倍数	NPC	PPC	NC	PC
湛江安度斯生物科技有限公司	1705041	0.25	20160445	20	- -	++	- -	++
			20161233	20	- -	++	- -	++
			20170313	20	- -	++	- -	++
湛江博康海洋生物有限公司	1708230	0.25	20160445	20	- -	++	- -	++
			20161233	20	- -	++	- -	++
			20170313	20	- -	++	- -	++

### 3 结论

3.1 本文所有表格中“+”表示阳性,“-”表示阴性。其判断标准是形成凝胶且倒转 180。不变形、不从管壁滑脱者为阳性;未形成凝胶或形成凝胶不坚固、变形并从管壁滑脱者为阴性。

3.2 鲎试剂灵敏度复核试验主要考察鲎试剂灵敏度的标示值( $\lambda$ )是否准确、人员操作方法是否正确及实验条件是否符合规定<sup>[6]</sup>。

3.3 不同批次供试品对不同厂家的鲎试剂的干扰程度可能存在不同,为了避免因鲎试剂造成的判断失误,在干扰预试验中使用了两个厂家的鲎试剂,对 3 个批次的丹参川芎噻注射液进行凝胶限度法内毒素检查,结果显示,两个厂家生产的鲎试剂检验结果相同,同一厂家不同批次的供试品对鲎试剂的反应结果也无差异,因此确定丹参川芎噻注射液的最大不干扰浓度为稀释 20 倍。

3.4 在干扰实验中,将供试品稀释 20 倍,用两个厂家的鲎试剂进行干扰验证,结果显示, $E_s$  均在  $0.5\lambda\sim 2\lambda$  范围,3 个供试品的  $E_t$  均在  $0.5E_s\sim 2E_s$  范围,确认在该浓度下供试品无干扰作用。

3.5 在内毒素限值确定为 30 EU/ml 情况下,用灵敏度为 0.25 EU/ml 的鲎试剂按凝胶限度检查法对 3 个批次供试品进行细菌内毒素检查,结果均符合规定,表明丹参川芎噻注射液可适用凝胶限度法进行细菌内毒素检查。

3.6 采用凝胶限度检查法检查细菌内毒素,符合《中国药典》2015 年版四部(通则 1143)的标准,操作简便,结果准确,可以用于质量控制。

3.7 《中国药典》2015 年版并未收录丹参川芎噻注射液,也无国家标准对其进行细菌内毒素检查。采用传统的家兔法检查热原,成本高、时间长、影响因素多、灵敏度低。细菌内毒素检查法相比于家兔热原检查法,具有经济、快捷、灵敏和易于标准化的优点,受到了现代药品检验技术的青睐。因此,开展丹参川芎噻注射液内毒素检查法的研究有着重要的实际意义。

3.8 建议将丹参川芎噻注射液质量标准中的热原检查项改为细菌内毒素检查项,规定每 1 ml 丹参川芎噻注射液中含内毒素的量应<30 EU。

(下转第 186 页)

(上接第 141 页)

# 参考文献:

- [1]国家药典委员会.国家药品监督管理局国家药品标准(化学药品地方标准上升国家标准)[M].第 12 册.北京:中国医药科技出版社,2002:125-126.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版[S].四部.北京:中国医药科技出版社,2015:154-157.
- [3] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M].北京:中国医药科技出版社,2010:310-325.

- [4]王宗尉,肖佳音,李庆忠.注射用阿莫西林舒巴坦钠细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2016,17(1):31-34.
- [5]李姮.柴胡注射液细菌内毒素检查法的探讨[J].中国药事,2017,31(2):174-177.
- [6]武海萍,卜莹,张心悦,等.维生素 B<sub>12</sub> 注射液细菌内毒素检查方法的建立[J].药学研究,2014,22(6):521-523.

收稿日期:2018-9-19;修回日期:2018-9-27

编辑/王海静