

左卡尼汀注射液细菌内毒素检查法研究

王莉, 张红宇, 赵祎, 来国防*
(云南省食品药品检验所, 昆明 650011)

[摘要] 目的: 对左卡尼汀注射液进行细菌内毒素检查法研究, 建立其细菌内毒素检查方法。方法: 采用《中国药典》2005 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法进行。结果: 左卡尼汀注射液经 10 倍及以上稀释, 即在 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下浓度对鲎试剂与内毒素的反应无干扰。结论: 左卡尼汀注射液可以建立细菌内毒素检查法。

[关键词] 左卡尼汀注射液; 细菌内毒素检查; 干扰试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0050-03

Study on Bacterial Endotoxin Test of Levocarnitine Injection

WANG Li, ZHANG Hong-yu, ZHAO Yi, LAI Guo-fang*
(Yunnan Institute for Food And Drug Control, Kunming 650011, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for the bacterial endotoxin test of Levocarnitine Injection. **Method:** The bacterial endotoxin test was carried out according to the method of bacterial endotoxin test in Appendix XI E of China Pharmacopoeia 2005 Edition. **Result:** After more than ten times of dilution, ie below the concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the Injection was found no interference in the reaction of endotoxin with TAL. **Conciusion:** Bacterial endotoxin test is applicable to Levocarnitine.

[Key words] Levocarnitine Injection; bacterial endotoxin test; interference test

左卡尼汀注射液临床用于慢性肾衰长期血透病人因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症, 经检索该品种国内检验标准为热原检查, 未收载细菌内毒素检查。笔者参照《中国药典》2005 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法对该品种进行细菌内毒素方法学验证试验^[1], 建立其细菌内毒素检查标准。

1 仪器与试药

1.1 鲎试剂 (TAL) 批号 0808202, $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 规格 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$, 湛江安度斯生物有限

公司; 批号 0903111, $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 规格 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$, 湛江博康海洋生物有限公司; 批号 0811100, $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 规格 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$, 湛江博康海洋生物有限公司。

1.2 细菌内毒素检查用水 (WBET) 批号 0810230, 规格 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{Amp}^{-1}$, 湛江安度斯生物有限公司; 批号 081222, 规格 $50 \text{ mL}/\text{瓶}$, 湛江博康海洋生物有限公司。

1.3 细菌内毒素工作对照品 (WSE) 批号 200861, 规格 $150 \text{ EU} \cdot \text{Amp}^{-1}$, 中国药品生物制品检定所。

1.4 左卡尼汀注射液 批号 20090701, 20090702, 20090703, 规格 $5 \text{ mL} \text{ } 1\text{g}$, 均为云南龙海天然植物药业有限公司产品。

1.5 仪器 电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9075A 型, 上海一恒科学仪器有限公司; GL-88B 旋涡混合器, 江苏海门麒麟医用仪器厂; 恒温水浴 SUB28, Grant Instrument Ltd. England.

[收稿日期] 20100415(004)

[基金项目] 云南省技术创新人才培养对象第九批(2009CI107)

[第一作者] 王莉, 硕士, 主管药师, 主要从事药检药理、药品药理及毒理学研究工作; Tel: 0871-3136820, E-mail: liwangmail@163.com

[通讯作者] * 来国防, 副主任药师, 博士, 主要从事中草药活性成分及中药质量标准研究; Tel: 0871-3135806, E-mail: lguofang@yahoo.com.cn

2 方法与结果

2.1 TAL 灵敏度复核 按《中国药典》2005 年版二

部附录 XI E 细菌内毒素检查法“鲎试剂灵敏度复核试验”项下规定进行, 结果均符合规定, 结果见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核

批号	/EU · mL ⁻¹	细菌内毒素浓度 /EU · mL ⁻¹					阴 性	c /EU · mL ⁻¹					
		1	0.5	0.25	0.125	0.0625							
0808202	0.5	+	+	+	+	-	-	-	-	/	-	-	0.5
0903111	0.5	+	+	+	+	-	-	-	-	/	-	-	0.5
0811100	0.25	/	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0.25

注: “/”表示未做, 下表同。

2.2 细菌内毒素限值 L 的确立 左卡尼汀注射液临床用于慢性肾衰长期血透病人因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症, 临床人用最大剂量为 20 mg · kg⁻¹。按《中国药典》2005 年版二部附录 E 细菌内毒素检查法计算内毒素限值: $L = K/M = 5/20 = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 经检索, 美国药典(USP 31) 收载该品种^[2], 其细菌内毒素检查限值为: 应小于 0.1 EU · mg⁻¹。最终确立左卡尼汀注射液细菌内毒素限值^[3-5] L 应小于 0.1 EU · mg⁻¹。

2.3 最大有效稀释倍数(MVD) 的计算 按公式 $MVD = CL$ 计算, $L = 0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, C 为 200 g · L⁻¹, 为鲎试剂标示灵敏度, 以 EU · mL⁻¹ 表示, 目前 TAL 最高灵敏度为 0.03 EU · mL⁻¹, 则试验时左卡尼汀注射液的 MVD 为 640 倍。

2.4 预干扰试验 用 WBET 对左卡尼汀注射液进行稀释, 使稀释倍数分别为 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 倍(即 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 g · L⁻¹), 将此系列溶液记为样品供试液, 取相应浓度样品稀释液加入标准内毒素溶液制成内毒素浓度为 2 和 0.25 的样品供试液, 取 TAL 与上述系列溶液进行反应, 每一浓度重复 2 管。结果见表 2。

表 2 左卡尼汀注射液预干扰试验

系列	左卡尼汀溶液浓度 /EU · mL ⁻¹						
	10 倍	20 倍	40 倍	80 倍	160 倍	320 倍	640 倍
样品供试液(2)	++	++	++	++	++	++	++
样品供试液	-	-	-	-	-	-	-
样品供试液(0.25)	-	-	-	-	-	-	-

注: TAL 批号 0903111, 规格 0.1 mL · Amp⁻¹, 湛江博康海洋生物有限公司; 左卡尼汀注射液批号 20080702。

由表 2 预干扰试验结果可初步了解, 左卡尼汀注射液经 10 倍及以上稀释, 即在 20 g · L⁻¹ 以下对 TAL 与内毒素的反应无干扰。为进一步确证有无干扰因素, 进行如下正式干扰试验。

2.5 正式干扰试验 按《中国药典》2005 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法“供试品干扰试验”项下规定进行, 将 3 批左卡尼汀注射液分别用 WBET 稀释为终浓度为 10 g · L⁻¹ 溶液。用 WBET 及浓度为 10 g · L⁻¹ 的左卡尼汀溶液分别将 WSE 配成浓度为 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 EU · mL⁻¹ 的试验液, 用两批为 0.5 EU · mL⁻¹ 的不同厂家的鲎试剂进行试验。结果见表 3, 4。

表 3 左卡尼汀注射液正式干扰试验

批号	细菌内毒素浓度 /EU · mL ⁻¹				Es	Et /EU · mL ⁻¹				
	1.0	0.5	0.25	0.125						
20080701	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
20080702	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
20080703	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
WBET	+	+	+	+	-	-	-	-	0.5	/

注: TAL 批号 0808202, 规格 0.1 mL · Amp⁻¹, 湛江安度斯生物有限公司。

3 左卡尼汀注射液细菌内毒素检查

按《中国药典》2005 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法对 3 批左卡尼汀注射液进行细菌内毒素检

按拟订的细菌内毒素限值, 结合干扰试验结果,

表 4 左卡尼汀注射液正式干扰试验

批号	细菌内毒素浓度 / EU · mL ⁻¹				Es	Et / EU · mL ⁻¹				
	1.0	0.5	0.25	0.125						
20080701	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
20080702	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
20080703	+	+	+	+	-	-	-	-	/	0.5
WBET	+	+	+	+	-	-	-	-	0.35	/

注: TAL 批号 0903111, 规格 0.1 mL · Amp⁻¹, 湛江博康海洋生物有限公司。

查。结果见表 5。

表 5 左卡尼汀注射液细菌内毒素检查

批号	供试品管	阴性管	阳性管	供试品阳性管
20090701	-	-	+	+
20090702	-	-	+	+
20090703	-	-	+	+

注: TAL 批号 0811100, 规格 0.1 mL · Amp⁻¹, 湛江博康海洋生物有限公司。

4 结论

从表 3, 4 可见, 用 2 个厂家的 TAL 对云南龙海天然植物药业有限公司生产的 3 批左卡尼汀注射液进行干扰试验, 结果 Et 均在 0.5 ~ 2.0 Es, 此结果表明左卡尼汀注射液经 10 倍 (即 20 g · L⁻¹) 以上稀释对细菌内毒素检查法 (凝胶法) 无干扰。其细菌

内毒素项可拟订为取本品依《中国药典》二部附录 XI 项下检查, 每 1 mg 中含内毒素的量应小于 0.1 EU。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 86.
- [2] 美国药典会. 《美国药典》[S]. 31 版. USP31: 2516.
- [3] 于婷, 蔡彤, 张国来. 盐酸布比卡因注射液细菌内毒素检查方法的研究[J]. 中国药事, 2009, 23(8): 807.
- [4] 郑霞, 赵毓梅, 刘春. 盐酸尼卡地平葡萄糖注射液细菌内毒素检查[J]. 中国药房, 2008, 19(1): 56.
- [5] 郭贵芳, 曹艳玲. 注射用对氨基水杨酸钠的细菌内毒素检查[J]. 中国药师, 2007, 10(12): 1125.

[责任编辑 顾雪竹]

(上接第 49 页)

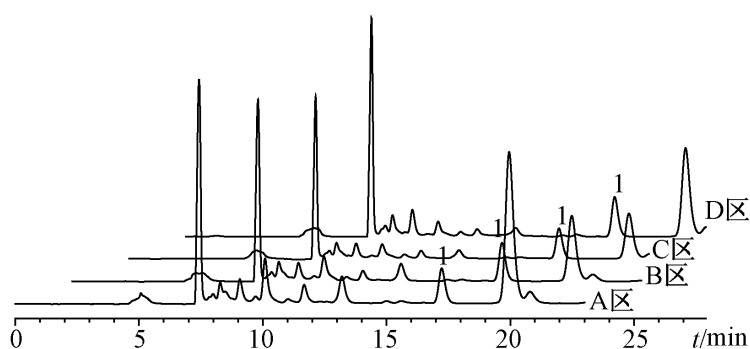


图 3 野生草珊瑚 3D 色谱图
1. 异皮

3 讨论

对不同产地野生和栽培草珊瑚的异皮检测结果表明, 异皮质量分数均达到了《中国药典》2005 年版一部规定的 0.02% 要求以上, 可以看出, 野生草珊瑚的异皮质量分数除永泰的低些, 其他 6 个品种异皮含量均超过栽培草珊瑚。可能跟野生状态下的土壤、环境条件更有利于异皮的代谢积累有关, 也跟野生品生长期可能更长有关。

草珊瑚是市场重要的药材之一, 由于野生资源的匮乏, 野生草珊瑚完全不能满足市场的需求, 测试

的结果也表明, 栽培草珊瑚所含的异皮含量也远远高于或达到国家药典的标准。本文人工栽培样品采自泰宁试验区林下套种 2 年半的栽培草珊瑚, 种子直播方式栽培, 种源为泰宁野生种子, 从色谱图上可看出, 栽培品的成分较野生品似乎更复杂些, 特别是在 20 min 流出的组分, 栽培品明显高于野生品, 其光谱鉴别相似于异皮, 可能也是香豆素类成分, 有待于进一步研究证实, 人工栽培的草珊瑚其利用价值仍有待于进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] 朱丽萍, 李媛, 杨敬芝, 等. 草珊瑚的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 155.
- [2] 张金莲, 罗文华, 李文贵, 等. HPLC 法测定复方草珊瑚含片中反丁烯二酸与异皮的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1470.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 154.

[责任编辑 顾雪竹]