

## 依达拉奉细菌内毒素检查法的研究

贾首前, 呼延婷婷, 焦洁, 王莉芳, 冯润东

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

**摘要 目的:**建立依达拉奉细菌内毒素检查方法,为依达拉奉及其注射液质量控制提供依据**方法:**采用中和法及稀释法,按照《中国药典》2015年版四部通则1143细菌内毒素检查法进行试验**结果:**依达拉奉在pH值调整为7.0时对鲎试剂与内毒素反应最大不产生干扰作用的浓度为 $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。**结论:**依达拉奉的细菌内毒素限值可定为 $2.0\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,建立的细菌内毒素检查方法可行。

**关键词:**依达拉奉;细菌内毒素;干扰试验

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2019)-2-0000-0

doi:10.19778/j.chp.2019.03.00?

## Investigation on bacterial endotoxin test of edaravone

JIA Shouqian, HUYAN Tingting, JIAO Jie, WANG Lifang, FENG Rundong

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

**Abstract Objective:** To establish a bacterial endotoxins test method for edaravone and provide the reference for quality control of edaravone and edaravone injection. **Methods:** The test was performed with neutralization and dilution methods in accordance in the test for bacterial endotoxins in general notice 1143, Chinese Pharmacopoeia 2015 Volume IV. **Results:** The maximum non-interference concentration of edaravone for TAL and endotoxins reaction was  $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  when pH was adjusted as 7.0. **Conclusion:** The bacterial endotoxins limit of edaravone is set as  $2.0\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , and the established method for bacterial endotoxins test of edaravone is feasible.

**Key words:** edaravone; bacterial endotoxins; interference test

依达拉奉(edaravone)为自由基清除药<sup>[1]</sup>,本品为白色结晶性粉末,无臭。其化学名为3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮,具有很强的自由基清除及抗氧化作用,于2001年在日本上市,随后国内多家企业相继上市仿制药,临床可用于改善急性脑梗死导致的神经症状<sup>[2]</sup>。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015年版二部对依达拉奉注射液<sup>[3]</sup>有细菌内毒素检查项,但对于依达拉奉原料未设置其细菌内毒素检查项。药典中规定对于注射剂药用辅料的热原或细菌内毒素等应符合要求,本实验参照<sup>[4]</sup>《中国药典》2015年版四部通则及相关文献<sup>[5,6]</sup>,研究依达拉奉对细菌内毒素的干扰情况,考

察其进行细菌内毒素检查的可行性,为依达拉奉及其注射液质量控制提供依据。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

鲎试剂(Tachypleus Amebocyte Lysate, TAL):湛江博康海洋生物有限公司,批号1812121;湛江安度斯生物有限公司,批号1805211;灵敏度( $\lambda$ )均为 $0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,规格均为 $0.1\text{ mL}\cdot\text{支}^{-1}$ 。细菌内毒素工作标准品(Control Standard Endotoxin, CSE):中国食品药品检定研究院,批号:150601-201784,规格: $80\text{ EU}\cdot\text{支}^{-1}$ 。细菌内毒素检查用水(Bacterial Endotoxin

Test Water, BET 水): 湛江博康海洋生物有限公司, 批号 1805180, 规格: 5 mL · 支<sup>-1</sup>。色谱乙醇: EMD Millipore Corporation, 批号: 654833。碱性调节剂: 湛江博康海洋生物有限公司, 批号: 1802110, 规格: 2 mL · 支<sup>-1</sup>。依达拉奉(3 批): 陕西健民制药有限公司, 批号: 1804504、1804505、1804506。

## 1.2 仪器

SCW-HS-840 洁净工作台(苏州宏瑞净化科技有限公司), DHG-9245A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), TAL-40D 试管恒温仪(湛江安斯生物有限公司), ZH-2 混旋仪(天津药标准仪器厂), 微量移液枪(Eppendorf), 细菌内毒素检查用具(试验所用玻璃仪器均经 250 °C 干烤 30 min), PP-15 酸度计(德国赛多利斯)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品细菌内毒素限值的确定

根据《中国药典》2015 年版二部依达拉奉注射液质量标准的规定, 依达拉奉注射液的细菌内毒素的限值(Limit L)为每 1 mg 依达拉奉中含内毒素的量应小于 2.0 EU, 因此将依达拉奉限值定为 2.0 EU · mg<sup>-1</sup>。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 1 The test results of TAL sensitivity

批号 (batch No.)	标示值 (labeled) λ / (EU · mL <sup>-1</sup> )	细菌内毒素浓度 (concentration of endotoxins) / (EU · mL <sup>-1</sup> )				NC	λ <sub>c</sub> / (EU · mL <sup>-1</sup> )
		0.5	0.25	0.125	0.062 5		
1812121	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
1805211	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25

注: 反应阳性(+); 反应阴性(-), 下同。(Note: positive reaction is marked "+", negative reaction is marked "-", similarly hereinafter)

### 2.4 供试品干扰试验预实验

按照“2.2”项下方法将依达拉奉先用 60% 乙醇配制成 20 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 用检查用水 1:40 稀释, 同时用碱性调节剂调节 pH 值至 7.0, 再用 1.5% 乙醇为溶媒配制成 0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 6 mg · mL<sup>-1</sup> 的系列稀释液(记为供试品阴性对照管 Negative Product Control, NPC 管); 另制备同样稀释浓度的系列稀释液, 并使每一稀释浓度的稀释液均含有 0.5 EU · mL<sup>-1</sup> (2λ) 的内毒素(记为供试品阳性对照管 Positive Product Control, PPC 管), 使用两个厂家灵敏度为 0.25 EU · mL<sup>-1</sup> 的鲎试剂, 每一浓度分别取 0.1 mL, 加入用 1.5% 乙醇复溶的鲎试剂管中, 每一浓度做 2 管, 同时设阴性对照

### 2.2 供试品最大有效稀释倍数的确定

目前市售鲎试剂灵敏度为 0.5 ~ 0.03 EU · mL<sup>-1</sup>, 根据《中国药典》2015 年版四部通则 1143 细菌内毒素检查法最大有效稀释倍数(Maximum valid dilution, MVD) 计算公式 MVD = CL/λ, 由于依达拉奉在水中极微溶解或几乎不溶, 在乙醇中溶解, 选择 60% 乙醇对样品进行溶解, 经过试验 20 mg · mL<sup>-1</sup> 依达拉奉溶液为均一透明液体, 测得其 pH 值为 5.0。考虑选择用 1.5% 乙醇作为溶媒进行试验, 因此样品浓度选择为 0.5 mg · mL<sup>-1</sup>, 0.5 mg 样品在 1.5% 乙醇中完全溶解, L 为 2.0 EU · mg<sup>-1</sup>, 则 MVD<sub>0.5~0.03</sub> 为 2 倍(0.25 mg · mL<sup>-1</sup>) ~ 33.3 倍(0.015 mg · mL<sup>-1</sup>)。

### 2.3 鲎试剂灵敏度复核

参考文献<sup>[5,6]</sup>当乙醇浓度稀释至 5% 以下无明显干扰作用, 取细菌内毒素工作标准品一支, 用 60% 乙醇溶解, 用检查用水 1:40 稀释, 再以 1.5% 乙醇溶液作为溶媒按《中国药典》2015 年版四部通则 1143 检查两个厂家灵敏度为 0.25 EU · mL<sup>-1</sup> 的 TAL, 复核结果 λ<sub>c</sub> 均在 0.5 ~ 2.0λ 之间, 符合细菌内毒素检查要求, 结果见表 1。

管(Negative Control, NC 管), 阳性对照管(Positive Control, PC 管), 轻轻混匀, 封口, 放置在(37 ± 1) °C 保温(60 ± 2) min。结果见表 2。

由表 2 可知: 使用标示灵敏度为 0.25 EU · mL<sup>-1</sup> 的两个厂家的 TAL, 供试品在浓度为 0.25 mg · mL<sup>-1</sup> 及以下时对细菌内毒素的试验结果均无干扰。因此进行以下干扰试验正式试验来最终确认是否存在干扰因素的影响。

### 2.5 干扰试验正式试验

按照“2.2”项下方法将依达拉奉配制成 0.25 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 使其最终干扰试验稀释倍数为 2 倍, 按照“2.3”项下方法配制标准品溶液, 试验时用 1.5% 乙醇和 0.5 mg · mL<sup>-1</sup> 依达拉奉溶液分别稀释

内毒素工作标准品, 配制成含细菌内毒素浓度为  $2\lambda$ 、 $1\lambda$ 、 $0.5\lambda$ 、 $0.25\lambda$  的系列溶液, 每个浓度分别平行

做 2 管和 4 管, 按《中国药典》2015 年版四部通则 1143 进行干扰试验, 结果见表 3。

表 2 依达拉奉细菌内毒素干扰试验预试验结果

Tab. 2 The preliminary interference test results of bacterial endotoxins foredaravone

鲎试剂批号 (batch number of TAL)	供试品批号 (batch number of sample)	组别 series	供试品浓度 (concentration of sample) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$					NC	PC
			0.250	0.125	0.062	0.031	0.015		
1812121	1804504	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	1804505	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	1804506	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
1805211	1804504	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	1804505	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	1804506	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		

表 3 依达拉奉细菌内毒素干扰试验正式试验结果

Tab. 3 The interference test results of bacterial endotoxins foredaravone

鲎试剂批号 (batch number of TAL)	组别 (series)	细菌内毒素浓度 (concentration of endotoxins) / ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				阴性对照 (NC)	结果 (result) / $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$
		0.5	0.25	0.125	0.062 5		
1812121	1.5% 乙醇 (1.5% ethanol)	++	++	--	--	--	$E_s = 0.25$
	1804504	++++	+-	----	----	--	$E_t = 0.35$
	1804505	++++	----	----	----	--	$E_t = 0.5$
	1804506	++++	----	----	----	--	$E_t = 0.5$
1805211	1.5% 乙醇 (1.5% ethanol)	++	++	++	--	--	$E_s = 0.25$
	1804504	++++	+-	----	----	--	$E_t = 0.42$
	1804505	++++	----	----	----	--	$E_t = 0.5$
	1804506	++++	+-	----	----	--	$E_t = 0.42$

由表 3 结果可知, 细菌内毒素工作标准品在 1.5% 乙醇溶液中的反应终点浓度 (标准品系列溶液内毒素反应终点浓度  $E_s$ ) 均在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$  之间, 细菌内毒素工作标准品在依达拉奉稀释溶液中的反应终点浓度 (供试品含标准品系列溶液反应终点浓度  $E_t$ ) 均在  $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$  之间, 符合《中国药典》2015 年版四部对细菌内毒素检查有效性的规定。

## 2.6 供试品的细菌内毒素检查

根据干扰试验结果, 取 3 批供试品, 用 60% 乙醇配制成  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 用检查用水 1:40 稀释, 同时用碱性调节剂调节 pH 值至 7.0, 再用 1.5% 乙醇为溶媒配制成  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 分别用

两个厂家的 TAL ( $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行细菌内毒素检查, 结果 3 批供试品检查结果均符合规定。结果见表 4。

## 3 结论

### 3.1 依达拉奉细菌内毒素检查法的可行性

鲎试剂的最适反应 pH 值为 6.0 ~ 8.0, 过酸或者过碱会对试验起干扰作用<sup>[7]</sup>, 依达拉奉溶解后 pH 值偏酸, 本研究利用中和法及稀释法对依达拉奉进行了细菌内毒素检查, 结果表明, 依达拉奉最大不产生干扰的浓度为  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 用细菌内毒素检查方法来控制依达拉奉中细菌内毒素含量是可行的。

表4 依达拉奉细菌内毒素检查结果

Tab.4 The bacterial endotoxin test results for edaravone

鲨试剂批号 (batch number of TAL)	供试品批号 (batch number of sample)	供试品管 (sample)	供试品阳性管 (test sample PC)	阴性对照管 (NC)	阳性对照管 (PC)
1812121	1804504	--	++	--	++
	1804505	--	++	--	++
	1804506	--	++	--	++
1805211	1804504	--	++	--	++
	1804505	--	++	--	++
	1804506	--	++	--	++

### 3.2 依达拉奉细菌内毒素检查方法

依达拉奉用 60% 乙醇配制成  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,用检查用水 1:40 稀释,同时用碱性调节剂调节 pH 值至 7.0,再用 1.5% 乙醇为溶媒配制成  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,依法检查(《中国药典》2015 年版四部通则 1143),每 1 mg 依达拉奉注射液中含细菌内毒素的量应不超过 2.0 EU。建立的依达拉奉细菌内毒素检查法可行。

### 3.3 原料药细菌内毒素检查的意义

由于注射剂上市前均要进行细菌内毒素检查,对原料药更加严格的质量控制,可以有效控制注射剂成品的安全性。本研究建立的方法同样可应用于注射剂药用辅料,用来提高注射剂成品的安全性。

### 参考文献

- [1] 《中国药典》2015 年版. 二部 [S]. 2015:670  
ChP 2015. Vol II [S]. 2015:670
- [2] 陈久艳. 依达拉奉注射液的细菌内毒素检查[J]. 苏州大学学报(医学版),2006,26(4):596
- [3] 《中国药典》2015 年版. 二部[S]. 2015:671  
ChP 2015. Vol II [S]. 2015:671
- [4] 《中国药典》2015 年版. 四部[S]. 2015:1143:154  
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015:1143:154
- [5] 张震宇,章小萍. 紫杉醇脂质体内毒素的检测[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(6):266  
ZHANG ZY, ZHANG XP. Detection of bacterial endotoxin for paclitaxel liposomes[J]. Chin J Pharm, 2001, 32(6):266
- [6] 杨先启. 紫杉醇细菌内毒素检测方法的探讨[J]. 安徽医药, 2005,9(5):356  
YANG XQ. Discussion on the bacterial endotoxins of paclitaxel [J]. Anhui Med Pharm J, 2005,9(5):356
- [7] 陈群英,郑马庆. 药用辅料苯甲醇细菌内毒素检查方法学研究[J]. 山东化工,2018,47(7):68  
CHEN QY, ZHENG MQ. Study on bacterial endotoxins test for pharmaceutical excipient benzyl alcohol[J]. Shandong ChemInd, 2018, 47(7):68

(收稿日期:2019-04-18)