

- [23] 周海玲, 许舜军, 周若龙, 等. 白芍、赤芍化学成分的高效液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 中药材, 2018, 41(7): 1637-1640.
- [24] 谭淑瑜, 肖 雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 94-100.
- [25] Sheng C, Peng W, Xia Z, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of hydroxysafflor yellow A in patients with traumatic brain injury after intravenous administration of Xuebijing using LC-MS/MS method [J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(5): 545-551.
- [26] Zhang C, Ma W, Zhang Y, et al. Pharmacokinetics, Bioavailability, and Tissue Distribution Study of Angoroside C and Its Metabolite Ferulic Acid in Rat Using UPLC-MS/MS[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1186.
- [27] Barros L, Dueñas M, Ferreira I R, et al. Santos-Buelga C (2011) Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal[J]. *Food Chem*, 2011, 127(1): 169-173.
- [28] 柯细彤, 章瑜芳, 朱兆云, 等. 灯盏细辛中咖啡酰奎宁酸防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3): 609-615.
- [29] 金 鸣, 裴崇强, 臧宝霞, 等. 羟基红花黄色素 A 缓解血小板激活因子诱导的内皮细胞炎症因子表达升高作用的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2011, 30(5): 429-432.
- [30] 吴 丽, 王丽丽, 费文婷, 等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β -EP、PGE-2 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 915-918.
- [31] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

柴胡注射液细菌内毒素检查法的研究

任仲丽, 张秀花, 王 静, 刘 博, 李秀菊
(菏泽市食品药品检验检测研究院生物检测研究所, 山东 菏泽 274023)

摘要: 目的 建立柴胡注射液的细菌内毒素检查方法(凝胶法)。方法 按照 2020 年版《中国药典》四部 1143 细菌内毒素检查法, 设定柴胡注射液细菌内毒素限值, 进行干扰试验预试验、干扰试验及检查验证, 并用凝胶半定量试验进行定量检测。结果 柴胡注射液原液对 2 个厂家的鲎试剂和内毒素均未显示干扰作用, 内毒素限值可定为 15 EU/mL。凝胶半定量试验对 3 批柴胡注射液进行内毒素检查时, 内毒素含量均低于 0.25 EU/mL。结论 本研究建立的细菌内毒素检查法适用于柴胡注射液细菌内毒素检查。

关键词: 柴胡注射液; 细菌内毒素; 凝胶法; 干扰试验

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1354-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.062

柴胡注射液是柴胡干燥根经水蒸气蒸馏制成的灭菌水溶液, 主要成分为挥发油(柴胡醇、丁香酚等), 具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的作用^[1-3]。高阳等^[4]研究发现, 柴胡注射液对脂多糖导致的高热有较强的解热作用, 解热疗效确切, 临床应用广泛。但由于不良反应较多, 国家食品药品监督管理局批准生产柴胡注射液的企业从 2012 年的 120 家左右减到现在的 70 家^[5-7]。同时, 由于儿童群体的不良反应占比较大^[8-13], 2018 年 5 月 29 日国家食品药品监督管理局发布公告, 修订柴胡注射液说明书, 增加“儿童禁用”条款^[14]。本研究依照 2020 年版《中国药典》四部 1143 细菌内毒素检查法的凝胶法, 建立和探讨柴胡注射液的细菌内毒素检查方法的可行性, 以期对制药企业提高药品质量、减少由于热原引起的不良反应、确保用药安全提供依据。

1 材料

1.1 药物 柴胡注射液 1 (河南福森药业有限公司, 批号 1805061, 2 mL/支); 柴胡注射液 2 (河南省康华药业股份有限公司, 批号 18082603A, 2 mL/支); 柴胡注射液 3 (海南制药厂有限公司制药二厂, 批号 180101052, 2 mL/支); 柴胡注射液 4 (河南福森药业有限公司, 批号 1802011, 2 mL/支); 柴胡注射液 5 (河南省康华药业股份有限公司, 批号 19051202, 2 mL/支); 柴胡注射液 6 (海南制药厂有限公司制药二厂, 批号 180101263, 2 mL/支)。

1.2 试剂 细菌内毒素工作标准品 (WSE, 中国食品药品检定研究院, 批号 150601-202088, 60 EU/支)。鲎试剂 1 (TAL1, 湛江安度斯生物有限公司, 灵敏度 0.25 EU/mL, 0.1 mL/支, 批号 1907081); 鲎试剂 2 (TAL2, 湛江博康海洋生物有限公司, 灵敏度 0.25 EU/mL, 0.1 mL/支, 批

收稿日期: 2020-07-06

作者简介: 任仲丽 (1983—), 女, 硕士, 主管药师, 从事药品微生物检验研究。Tel: 15550762299, E-mail: 67790895@qq.com

号 1904032)。细菌内毒素检查用水 (BET, 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司, 10 mL/支, 批号 20036004)。

1.3 仪器 TAL-40D 型试管恒温仪 (湛江安度斯生物有限公司); ZH-2 型自动漩涡混合器 (天津药典标准仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 内毒素限值的确定 按照 2020 年版《中国药典》四部 1143 细菌内毒素检查法规定, 药品细菌内毒素限值 (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, 以 EU/(kg·h) 表示, M 为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量。注射剂 K 为 5 EU/(kg·h), 根据柴胡注射液说明书, 一次最大注射量为 4 mL, 计算得到 M 为 0.067 mL/(kg·h), 即细菌内毒素限值为 75 EU/mL^[15]。

参照 2020 年版《中国药典》四部 9301 细菌内毒素检查项下对限值设定的建议, 同时考虑到柴胡注射液临床上

常联合用药且不良反应较多, 严格控制细菌内毒素限值为其计算限值的 1/5, 即以 15 EU/mL 为最终内毒素限值^[15]。

2.2 确定最大有效稀释倍数 (MVD) 根据 2020 年版《中国药典》四部 9301 规定, 结合常用鲎试剂的灵敏度, 公式为 $MVD=cL/\lambda$, c 为供试品溶液浓度, λ 为鲎试剂灵敏度, 依次得 MVD 为 60、120、240、480 倍^[15]。

2.3 TAL 灵敏度复核 本实验选用标示灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂, 按照 2020 年版《中国药典》四部通则 1143 规定, 首先进行鲎试剂的标示灵敏度复核^[15], 按公式 $\lambda_c = \text{anti lg}(\sum X/n)$ 计算鲎试剂灵敏度的测定值 (λ_c)。 λ_c 均在 0.5 λ ~2 λ 范围内, 表明 TAL1、TAL2 可用标示灵敏度 0.25 EU/mL 为该批次鲎试剂的灵敏度, 并可用于干扰试验及供试品的细菌内毒素检查, 见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核试验结果 ($n=4$)

鲎试剂 (TAL)	内毒素浓度/(EU·mL ⁻¹)				阴性对照	λ /(EU·mL ⁻¹)	λ_c /(EU·mL ⁻¹)	结论
	0.5	0.25	0.012 5	0.062 5				
TAL1	++++	++++	+++	----	-	0.25	0.149	符合规定
TAL2	++++	++++	++++	----	-	0.25	0.125	符合规定

注: 阴性对照结果未形成凝胶记为“-”; 阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

2.4 干扰预试验 按“2.2”项下方法计算 MVD, 将 2 家企业生产的 2 批柴胡注射液用 BET 水稀释 30、60、120、240、480 倍, 作为供试品溶液 (NPC), 其中 2 λ 浓度的溶液作为供试品阳性对照溶液 (PPC), 按照 2020 年版《中

国药典》四部通则 1143 规定测定, 结果见表 2。由此可初步判定, 柴胡注射液稀释 30 倍时, 对 2 个厂家 TAL 与 WSE 无明显干扰抑制作用。

表 2 柴胡注射液干扰预试验结果 ($n=2$)

鲎试剂 (TAL)	供试品	组别	供试品溶液稀释倍数/倍					阴性对照	阳性对照
			30	60	120	240	480		
TAL1	柴胡注射液 1	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	柴胡注射液 2	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		
TAL2	柴胡注射液 1	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	柴胡注射液 2	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		

注: 阴性对照结果未形成凝胶记为“-”; 阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

为进一步确定柴胡注射液对 TAL 与 WSE 的干扰作用, 取上述 2 家企业生产的 2 批柴胡注射液原液及用 BET 水稀释 2、4、8、15 倍的供试品溶液重复进行上述试验, 结果

见表 3。由此可初步判定, 柴胡注射液原液对 2 个厂家的 TAL 与 WSE 无明显干扰抑制作用, 可进行正式干扰试验。

表 3 柴胡注射液干扰预试验结果 ($n=2$)

鲎试剂 (TAL)	供试品	组别	供试品溶液稀释倍数/倍					阴性对照	阳性对照
			1	2	4	8	15		
TAL1	柴胡注射液 1	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	柴胡注射液 2	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		
TAL2	柴胡注射液 1	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++	++	++		
	柴胡注射液 2	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		

注: 阴性对照结果未形成凝胶记为“-”; 阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

2.5 正式干扰试验 为了最终确认柴胡注射液对细菌内毒素检查法是否存在干扰抑制作用,根据“2.4”项下结果,取3家企业生产的3批柴胡注射液,使用2个厂家生产的标示灵敏度为0.25 EU/mL的TAL,按照2020年版《中国药典》四部1143中凝胶法干扰试验要求操作,结果见表4。

表 4 柴胡注射液干扰试验结果

鲎试剂	组别	细菌内毒素浓度/(EU·mL ⁻¹)				阴性对照	供试品阴性对照
		0.5 (2λ)	0.25 (1λ)	0.012 5 (0.5λ)	0.062 5 (0.25λ)		
TAL1	柴胡注射液 1	++++	----	----	----	--	--
	柴胡注射液 2	++++	----	----	----		--
	柴胡注射液 3	++++	----	----	----		--
	BET 水	++	++	+-	--		--
TAL2	柴胡注射液 1	++++	----	----	----	--	--
	柴胡注射液 2	++++	----	----	----		--
	柴胡注射液 3	++++	----	----	----		--
	BET 水	++	++	++	--		--

注:阴性对照结果未形成凝胶记为“-”;阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

2.6 验证试验 另取3家企业生产的3批柴胡注射液,按本研究建立的细菌内毒素检查法进行常规检查,验证方法的可行性,结果见表5。由此可知,按本研究方法检查时均符合规定。

表 5 柴胡注射液细菌内毒素检查结果 (n=2)

鲎试剂 (TAL)	组别	供试品溶液	供试品阳性 对照溶液	阴性 对照	阳性 对照
TAL1	柴胡注射液 4	--	++	--	++
	柴胡注射液 5	--	++		
	柴胡注射液 6	--	++		
TAL2	柴胡注射液 4	--	++	--	++
	柴胡注射液 5	--	++		
	柴胡注射液 6	--	++		

注:阴性对照结果未形成凝胶记为“-”;阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

2.7 凝胶半定量试验 为验证凝胶限度试验与凝胶半定量

表 6 柴胡注射液凝胶半定量试验结果 (n=2)

鲎试剂 (TAL)	组别	细菌内毒素浓度/(EU·mL ⁻¹)				阴性对照	供试品溶液稀释倍数/倍				供试品阳性对照
		0.5 (2λ)	0.25 (1λ)	0.012 5 (0.5λ)	0.062 5 (0.25λ)		1	2	4	8	
TAL1	柴胡注射液 1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	柴胡注射液 2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	柴胡注射液 3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	BET 水	++	++	+-	--	--	--	--	--	--	--
TAL2	柴胡注射液 1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	柴胡注射液 2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	柴胡注射液 3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++
	BET 水	++	++	++	--	--	--	--	--	--	--

注:阴性对照结果未形成凝胶记为“-”;阳性对照形成凝胶且倒转 180°不变形记为“+”。

3 讨论

柴胡注射液是我国自主研发成功的第一个中药注射剂,对中医药发展具有重要的意义^[16-17],广泛应用于临床,但由于生产工艺、原辅料等条件的制约,其不良反应也被频繁报道。因此,监管部门明文规定柴胡注射液“儿童禁

由此可知,按照2020年版《中国药典》的判断标准,柴胡注射液原液对2个厂家的TAL与WSE无明显干扰抑制作用,确定柴胡注射液可使用现市售标示灵敏度为0.25~0.03 EU/mL TAL进行细菌内毒素检查。

试验检验结果的一致性,取3家企业生产的3批柴胡注射液,制成原液及2、4、8倍稀释溶液,作为供试品溶液;用BET水将细菌内毒素工作标准品制成2λ、λ、0.5λ、0.25λ浓度的溶液,作为阳性对照;用柴胡注射液原液将细菌内毒素工作标准品制成2λ浓度的内毒素溶液,作为供试品阳性对照溶液,同时用BET水作为阴性对照,使用2个厂家生产的标示灵敏度为0.25EU/mL的TAL,按照2020年版《中国药典》四部1143中凝胶半定量试验要求操作,结果见表6。由此可知,3家企业生产的3批柴胡注射液的系列稀释供试品溶液均为阴性,则细菌内毒素含量低于0.25 EU/mL。

2.8 细菌内毒素检查标准草案 取本品依法(2020年版《中国药典》四部通则1143)检查,规定柴胡注射液中含内毒素含量应低于15 EU/mL。

用”^[8-14]。

众所周知,注射剂常见的不良反应之一就是引起热源反应,柴胡注射液在临床上通常与西药联合用药,更容易导致内毒素超标,而且柴胡注射液为纯中药制剂,成分复杂,从临床用药安全等多方面考虑,有必要增加细菌内毒

素检查^[18-23]。目前,我国现行柴胡注射液检验标准中没有细菌内毒素检查项目,而是采用动物实验法的热原检查项目,但其操作繁琐,结果受家兔个体差异的影响较大,并会对动物造成一定的伤害。

本研究为避免上述问题,探索替代热原检查法的细菌内毒素检查法,通过干扰预试验、正式干扰试验确定柴胡注射液对细菌内毒素检查法是否存在干扰作用,确定其最小不干扰稀释倍数,并进行验证试验。结果表明,当设定细菌内毒素限值为 15 EU/mL 时,使用标示灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂,采用凝胶法进行柴胡注射液的细菌内毒素检查是可行的,并通过凝胶半定量法验证了凝胶限度试验检验结果的一致性,为建立柴胡注射液的细菌内毒素检验标准提供了试验依据。

综上所述,建议将柴胡注射液质量标准中的热原检查项改为细菌内毒素检查项,规定其含量应低于 15 EU/mL。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 293

[2] WS₃-B-3297-98-2011, 柴胡注射液[S].

[3] Gao Y, Wang Z B, Zuo Z P, et al. Antifebrile effect of bupleurum injection on LPS-induced fever model rats [J]. *Medicinal Plant*, 2013, 4(Z1): 35-36; 39.

[4] 高 阳, 王志斌, 左泽平, 等. 柴胡注射液对 LPS 发热模型大鼠解热药效的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(10): 696-698.

[5] 陈文露, 彭新宇, 余静贤, 等. 不同制备工艺柴胡注射液成分分析及质量标准探讨[J]. 中成药, 2019, 41(4): 895-901.

[6] 蔡 华, 雷 攀, 杜士明, 等. 柴胡制剂的开发利用研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(11): 1963-1966.

[7] 左泽平, 王志斌, 高 阳, 等. 柴胡注射液对 LPS 发热大鼠解热机制的研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 57-60.

[8] 刘 旭, 刘振华, 仲 华, 等. 柴胡注射液致药品不良反应/药品不良事件的分析及防治[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(6): 840-843.

[9] 王长之, 刘 超, 陈晓博, 等. 531 例柴胡注射液不良反应/事件报告分析[J]. 海峡药学, 2018, 30(8): 279-281.

[10] 张翠平. 柴胡注射液的不良反应研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(6): 1173-1174.

[11] 于红权. 柴胡注射液的药理及不良反应分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(1): 167-168.

[12] 康新奇. 柴胡注射液的药理及不良反应分析[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(19): 254-255.

[13] 解 娜. 37 例柴胡注射液不良反应分析[J]. 中医临床研究, 2015, 7(11): 115-116.

[14] 杨果平. 加大监管力度, 确保安全用药——从儿童禁用柴胡注射液谈起[J]. 大众标准化, 2018(5): 5-6.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[16] 宋诚攀. 柴胡的药用植物历史演变[J]. 中医药信息, 2007, 24(5): 29-30.

[17] 吴国平. 浅谈柴胡的研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2016, 37(1): 59-61.

[18] 秦华丽, 朱芳衡. 肝素联合柴胡对内毒素诱导大鼠肾损伤的保护作用[J]. 海南医学, 2019, 30(16): 2041-2044.

[19] 赵望森, 张业聪, 武梦蝶, 等. 柴胡注射液配合奥司他韦治疗流感样症状的临床疗效分析[J]. 系统医学, 2017, 2(20): 34-36.

[20] 刘敏言, 翟英歌. 5-氟尿嘧啶联合柴胡注射液治疗扁平疣 21 例[J]. 中国疗养医学, 2013, 22(9): 808.

[21] 徐杰远. 柴胡注射液与硫酸卡那霉素注射液配伍研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(23): 277-278.

[22] 方靖霞. 复方氨林巴比妥与柴胡注射液肌注致过敏性休克 1 例[J]. 蛇志, 2012, 24(4): 413.

[23] 李华稚, 李 伶, 郭中华, 等. 利巴韦林、柴胡联合重组人干扰素 α -2b 凝胶治疗面部扁平疣 32 例疗效观察[J]. 四川生理科学杂志, 2011, 33(2): 64-65.