

注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查方法的建立

黄荣富*, 厉青, 李龙健, 邵丽晓(武警浙江总队医院, 浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R927.12;R973*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1602-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.25

摘要 目的:建立注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素的检查方法。方法:按2010年版《中国药典》附录细菌内毒素凝胶检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大无干扰浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至0.04 U/ml时对细菌内毒素检查无干扰作用。结论:所建立的方法可用于注射用尖吻蝮蛇血凝酶的细菌内毒素检查。

关键词 注射用尖吻蝮蛇血凝酶;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Haemocoagulase Agkistrodon for Injection

HUANG Rong-fu, LI Qing, LI Long-jian, SHAO Li-xiao(Zhejiang People's Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Haemocoagulase agkistrodon for injection. METHODS: Maximum non-interference concentration of samples was determined by interference test according to bacterial endotoxin gel-clot assay in appendix of *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 0.04 U/ml. CONCLUSIONS: The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Haemocoagulase agkistrodon for injection.

KEY WORDS Haemocoagulase agkistrodon for injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot assay; Interference test

注射用尖吻蝮蛇血凝酶为止血药,通过水解纤维蛋白原使其变为纤维蛋白而增强机体的凝血功能,临床辅助用于外科手术浅表创面的止血。由于本品为蛋白类物质,制剂工艺复杂,在提取、生产过程中较易引入细菌内毒素,在药品的保管过程中应按要求在凉暗处保存,使用时必须在临用前配置。目前未见注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查法的报道。本文通过试验,探讨建立用细菌内毒素凝胶检查法检测注射用尖吻蝮蛇血凝酶中细菌内毒素的可行性。

1 材料

BET-32细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH-2自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);BS-1300U型超净工作台(苏州净化设备有限公司);SC-101型鼓风电热恒温干燥箱(浙江嘉兴市新腾电器设备有限公司);玻璃

器材包括试管、刻度吸管等均经250℃干烤1h除细菌内毒素处理。

注射用尖吻蝮蛇血凝酶样品(北京康辰药业有限公司,批号:20120123、20120310、20120411,规格均为:每支1U);鲎试剂[湛江安度斯生物有限公司,批号:1010211,标示灵敏度(λ)为0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1007121, λ 为0.25 EU/ml,每支均为0.1 ml];细菌内毒素工作标准品(CSE,批号:1010150,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:0912150,规格:每支5 ml)均为湛江安度斯生物有限公司产品。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

根据2批鲎试剂灵敏度的标示值,将CSE用BET水溶解,

腈)流动相系统。结果认为,乙腈-甲醇-水溶液(含有适量磷酸二氢钠和辛酸磺酸钠)组成的流动相系统优于单一的甲醇和乙腈与缓冲盐组成的系统。通过调整其不同的体积比,如辛酸(磷酸盐-乙腈-甲醇(50:25:25)、(55:20:25)、(59:16:25)、(59:17:24)等,最终确立了本试验采用的流动相。在该流动相下,主峰出峰时间合适,杂质峰与主峰能够完全分离,适合本品主成分含量和有关物质的测定。

(4)本方法流动相中有离子对试剂,虽然可能对分析柱损害较大,但可以更好地保持主峰的峰形,使其拖尾因子符合要求,测定结果更准确。

(5)破坏性试验中,由于本品在常温下反应时基本无新的降解产物产生,故均在80℃下进行破坏试验。

参考文献

- [1] 杨建坤,商亚贞,刘宏伟,等.盐酸伊立替康的药理特性及其临床应用[J].河北职工医学院学报,2007,24(1):61.
- [2] 安云婷,郑子雯.伊立替康联合铂类治疗复发性卵巢癌临床研究[J].实用肿瘤杂志,2007,27(1):88.
- [3] 雷妍玮,宫深谋.伊立替康联合希罗达一线治疗晚期大肠癌近期疗效观察[J].中国实用医药,2012,7(3):171.
- [4] 李语如,顾萍,蒋素梅,等.盐酸伊立替康及注射液的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2001,32(6):268.
- [5] 邱永红,戈延茹,王成润,等.盐酸伊立替康脂质体冻干粉针的制备和质量评价[J].江苏大学学报:医学版,2009,19(4):314.
- [6] 鲁军,牛玉娟,王戈.HPLC测定盐酸伊立替康脂质体注射液中的溶血卵磷脂[J].中国药事,2009,23(5):457.

(收稿日期:2012-12-19 修回日期:2013-02-17)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。E-mail:wjyylj@sohu.com

置于漩涡混合器混合 15 min, 然后制成浓度为 2 λ、1 λ、0.5 λ、0.125 λ(0.50、0.25、0.125、0.062 5 EU/ml) 的细菌内毒素标准溶液, 按 2010 年版《中国药典》附录细菌内毒素检查法^[1]复核试验用鲎试剂的灵敏度。结果 2 批鲎试剂灵敏度 λ 均在 0.5 λ~2.0 λ 范围内, 均符合《中国药典》规定, 可用于细菌内毒素检查, 结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Recheck results of TAL sensitivity test

批号	细菌内毒素浓度, EU/ml				λ, EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.062 5	
1010211	++++	++++	----	----	0.25
1007121	++++	++++	----	----	0.25

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定

按《中国药典》细菌内毒素检查法的规定: $L=K/M$ 。K 为按规定的给药途径人用每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量, 注射剂 $K=5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$; M 为人用每千克体重每小时的最大供试品剂量, 从注射用尖吻蝮蛇血凝酶的产品使用说明书可知本品静脉注射最大用药剂量为 2 U, 每天 1 次, 静脉注射时间按 1 h 计算。则 $L=K/M=150 \text{ EU}/\text{U}$ 。根据《化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则》的要求^[1], 本品安全系数定为 3^[2], 故 $L=50 \text{ EU}/\text{U}$ 。

2.3 供试品最小有效稀释浓度(c)的确定

按 2010 年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定^[1], 最大有效稀释倍数 (MVD) = cL/λ 。本品为注射用无菌粉末, $MVD=1$, 则 $c=\lambda/L=0.25/50=0.005 \text{ U}/\text{ml}$ 。对应本品 1 ml 容量, 则最大有效稀释倍数为 200 倍。

2.4 干扰预试验

取 3 批注射用尖吻蝮蛇血凝酶各 1 瓶, 分别加 BET 水 1 ml 溶解, 制成 1 U/ml 的供试品原液, 用 BET 水将供试品原液按 1、12.5、25、50、100、150 倍进行倍比稀释, 制得 1、0.08、0.04、0.02、0.01、0.006 7 U/ml 共 6 个浓度梯度的溶液, 将此系列浓度样品溶液记为 NPC, 即供试品阴性对照; 用上述稀释液作为溶剂, 分别溶解并稀释 CSE, 制得每个稀释度中细菌内毒素含量均为 2.0 λ(0.5 EU/ml) 的注射用尖吻蝮蛇血凝酶溶液, 此供试品阳性对照记为 PPC。同时平行做阳性对照管 PC 及阴性对照管 NC 各 2 管, 结果见表 2。

表 2 样品干扰预试验结果

Tab 2 Results of preliminary interference test of sample

鲎试剂	样品批号	系列	供试品浓度, U/ml						PC	NC
			1.0	0.08	0.04	0.02	0.01	0.006 7		
1010211	20120123	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	20120310	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	20120411	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
1007121	20120123	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	20120310	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		
	20120411	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++	++		

由表 2 结果可知, 3 批样品稀释到 0.04 U/ml 或以下浓度时, 对 2 个厂家的鲎试剂与细菌内毒素反应无干扰作用。

2.5 干扰试验^[3]

根据预干扰试验结果, 取 3 个批号的注射用尖吻蝮蛇血凝

酶, 用 BET 水稀释成 0.04 U/ml(25 倍) 浓度的样品溶液, 将 CSE 分别稀释至 2、1、0.5、0.25 λ 系列浓度, 与 2 个厂家鲎试剂(λ 为 0.25 EU/ml) 按 2010 年版《中国药典》(二部) 附录的细菌内毒素检查法进行干扰试验, 结果见表 3。

表 3 样品干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test of sample

鲎试剂	样品批号	供试品	细菌内毒素浓度, EU/ml				NC	$E_1, E_2, \text{EU}/\text{ml}$	E_1/E_2
			0.5	0.25	0.125	0.062 5			
1010211	BET 水	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	
		20120123	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	1.0
		20120310	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.30$	0.8
1007121	BET 水	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	1.0
		20120123	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	1.0
		20120310	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	1.0
		20120411	++++	++++	----	----	--	$E_1=0.25$	1.0

由表 3 结果表明, E_1 在 2 λ~0.5 λ 之间, 且 E_1 在 2 E_2 ~0.5 E_2 之间, 表明注射用尖吻蝮蛇血凝酶 0.04 U/ml 稀释液对 λ 为 0.25 EU/ml 的鲎试剂试验无干扰, 可用于细菌内毒素检查。

2.6 样品细菌内毒素检查

取 3 个批号的供试品, 分别用 BET 水 25 倍稀释($c=0.04 \text{ U}/\text{ml}$), 使用 λ 为 0.25 EU/ml 的 2 个厂家的鲎试剂, 按内毒素检查法^[1], 并按要求做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照, 结果见表 4。

表 4 样品细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test of sample

鲎试剂	批号	供试品	供试品浓度, U/ml	NPC	PPC	PC	NC
		20120310	0.04	--	++	++	--
		20120411	0.04	--	++	++	--
1007121	BET 水	20120123	0.04	--	++	++	--
		20120310	0.04	--	++	++	--
		20120411	0.04	--	++	++	--

由表 4 结果可知, 供试品(NPC)和 BTE 水(NC) 阴性对照管均为阴性, 表明样品中未检出细菌内毒素; 供试品(PPC)和 BET 水(PC) 阳性对照管均为阳性, 表明试验有效。试验表明 3 批注射用尖吻蝮蛇血凝酶的细菌内毒素检查均符合规定。

3 讨论

预干扰试验目的是评价样品浓度对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度, 初步筛选出对细菌内毒素检查无干扰的样品浓度范围。而干扰试验的目的则是对预干扰试验初步筛选出无干扰的样品浓度的进一步确认。另外, 不同厂家的鲎试剂由于生产工艺、质量参数等方面有一定差异, 其抗干扰能力存在差异。本试验采用 2 个不同厂家的鲎试剂(λ=0.25 EU/ml) 对 3 个批号的样品进行试验, 结果将样品稀释至 0.04 U/ml 时, 不干扰细菌内毒素检查。因此, 注射用尖吻蝮蛇血凝酶用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 XI E、XI X M.
- [2] 徐冬, 徐玲笑. 注射用夫西地酸钠细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国药房, 2011, 22(21): 844.
- [3] 李逢春, 李震. 盐酸多巴酚丁胺注射液细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药房, 2012, 23(1): 77.

(收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2012-08-24)