

磺达肝癸钠注射液细菌内毒素检查方法的建立

陈娟红*, 邵丽晓(武警浙江省总队医院, 浙江 嘉兴 314000)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1218-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.23

摘要 目的:建立磺达肝癸钠注射液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质量浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至质量浓度0.01 mg/ml(鲎试剂标示灵敏度为0.25 EU/ml)或0.005 mg/ml(鲎试剂标示灵敏度为0.125 EU/ml)时对细菌内毒素检查无干扰作用。结论:建立的方法可用于磺达肝癸钠注射液的细菌内毒素检查。

关键词 磺达肝癸钠注射液;细菌内毒素检查;鲎试剂;凝胶法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Fondaparinux Sodium Injection

CHEN Juan-hong, 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 Fondaparinux sodium injection. METHODS: Maximal non-interference mass concentration of samples was determined by interference test according to appendix of *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 0.01 mg/ml [Tachypleus amebocyte lysate (TAL): $\lambda=0.25$ EU/ml] and 0.005 mg/ml (TAL: $\lambda=0.125$ EU/ml). CONCLUSIONS: The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Fondaparinux sodium injection.

KEYWORDS Fondaparinux sodium injection; Bacterial endotoxin test; Tachypleus amebocyte lysate; Gel-clot; Interference test

磺达肝癸钠注射液为抗血栓药物,是一种人工合成的活化因子X选择性抑制剂^[1],其可与抗凝血酶的活化部位特异性结合,加速抗凝血酶-Xa因子复合物形成约340倍,快速抑制Xa因子,阻断凝血级联反应,减少凝血酶产生和纤维蛋白形成^[2]。临床上该药主要用于行下肢重大骨科手术的患者以预防其静脉血栓栓塞事件的发生,或使用溶栓或初始不接受其他形式再灌注治疗的ST段抬高心肌梗死患者的治疗等^[3]。《中国药典》规定静脉用注射剂都需要进行热原检查^[4],传统的家兔法检查热原操作复杂且易受多种因素影响,而用细菌内毒素凝胶法检查热原操作简便、灵敏度较高,现已广泛应用于注射剂中热原的检查。由于目前尚未见磺达肝癸钠注射液细菌内毒素检查法的文献报道,为此,笔者通过试验探讨采用细菌内毒素凝胶法检测磺达肝癸钠注射液中细菌内毒素的可行性。

1 材料

1.1 仪器

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。

1.2 药品与试剂

磺达肝癸钠注射液[葛兰素史克(中国)有限公司,批号:20120807、20120910、20121106、120123、120310、120411,规格:0.5 ml:2.5 mg];鲎试剂[湛江安度斯生物有限公司,批号:

1108201,标示灵敏度(λ)=0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1203071, $\lambda=0.125$ EU/ml;每支均为0.1 ml];细菌内毒素工作标准品(简称CSE,批号:1010150,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(简称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

根据两批鲎试剂灵敏度的标示值,取CSE用BET水溶解,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)4个浓度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复核试验用鲎试剂的灵敏度^[4],计算反应终点浓度的几何平均值,即鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c), $\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/4)$,X为反应终点浓度的对数值(lg),而反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中的最后一个呈阳性结果的浓度。结果两批鲎试剂灵敏度均在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(表中“+”表示凝胶形成,反应阳性;“-”表示凝胶未形成,反应阴性。下表同)。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of TAL sensitivity recheck

鲎试剂批号	内毒素浓度,EU/ml					λ ,EU/ml	λ_c ,EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.062 5	0.031 25		
1108201	++++	++++	----	----		0.25	0.25
1203071		++++	++++	----	----	0.125	0.125

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定^[5]

按2010年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定, $L=K/M$,L为供试品细菌内毒素的限值,K为按规定的给药途径给药人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量[注射剂 $K=$

* 药师。研究方向:医院药学。电话:0573-82082851-34725。E-mail:Chenjuanhong_80@126.com

5 EU/(kg·h)], M 为人用每千克体质量每小时的最高供试品剂量。磺达肝癸钠注射液(葛兰素史克有限公司)说明书的最大推荐剂量是2.5 mg,推荐剂量以上可能导致出血风险的增加^[9]。没有已知针对该药的解药,因此本品静脉内给药的最大剂量为2.5 mg,每天1次,人均体质量按60 kg计算,静脉滴注时间按1 h计算;由于本品为静脉内给药,则 $K=5$ EU/(kg·h), $M=2.5$ mg/60(kg·h)=0.041 67 mg/(kg·h)。因此, $L=K/M=5/0.041 67=120$ EU/mg。根据2010年版《中国药典》附录“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”的要求,限值可适当严格,至计算值的1/3~1/2,以保证安全^[1]。为此,本试验安全系数定为3^[6],故 $L=120/3=40$ EU/mg。

2.3 供试品最小有效稀释质量浓度(c)的确定

按2010年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定,最大有效稀释倍数(MVD)= cL/λ 。3批磺达肝癸钠注射液的规格均为0.5 ml:2.5 mg,则 $c=5$ mg/ml。试验中分别采用两种灵敏度即 $\lambda_1=0.25$ EU/ml、 $\lambda_2=0.125$ EU/ml的鲎试剂,计算得 $MVD_1=cL/\lambda=5\times 40/0.25=800$, $MVD_2=cL/\lambda=5\times 40/0.125=1 600$ 。由此可知,供试品对应于 λ_1 稀释倍数不大于800倍,即最小有效稀释质量浓度 $c\geq 0.006 25$ mg/ml;对应于 λ_2 稀释倍数不大于1 600倍,即最小有效稀释质量浓度 $c_2\geq 0.003 125$ mg/ml。因此,供试品可在对应于 λ_1 稀释倍数小于800倍、对应于 λ_2 稀释倍数小于1 600倍的情况下进行内毒素的检查。

2.4 预干扰试验

取3批磺达肝癸钠注射液,用BET水分别稀释0、200、300、400、500、600倍,制成5、0.025、0.016 7、0.012 5、0.01、0.008 3 mg/ml共6个质量浓度梯度的溶液以及稀释700、800、900、1 000、1 100、1 200倍,制成0.007 1、0.006 2、0.005 6、0.005 0、0.004 6 mg、0.004 2 mg/ml共6个质量浓度梯度的两组溶液,分别将此系列浓度样品溶液记为NPC₁、NPC₂;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、0.25 EU/ml)的磺达肝癸钠注射液溶液,含样品溶液内毒素记为PPC₁、PPC₂;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3。

表2 样品预干扰试验结果($\lambda=0.25$ EU/ml)

Tab 2 Results of preliminary interference test of sample($\lambda=0.25$ EU/ml)

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC
		5	0.025	0.016 7	0.012 5	0.01	0.008 3		
1108201	20120807	NPC ₁	--	--	--	--	--	++	--
		PPC ₁	--	--	--	--	++	++	
20120910	NPC ₁	NPC ₁	--	--	--	--	--	++	--
		PPC ₁	--	--	--	--	++	++	
20121106	NPC ₁	NPC ₁	--	--	--	--	--	++	--
		PPC ₁	--	--	--	--	++	++	

由表2结果可知,3批样品稀释至0.01 mg/ml或以下质量浓度的溶液时,对灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂与细菌内毒素反应无干扰作用。

由表3结果可知,3批样品稀释至0.005 mg/ml或以下质量浓度的溶液时,对灵敏度为0.125 EU/ml的鲎试剂与细菌内毒素反应无干扰作用。

2.5 干扰试验

根据预干扰试验结果,取3个批号的磺达肝癸钠注射液,

表3 样品预干扰试验结果($\lambda=0.125$ EU/ml)

Tab 3 Results of preliminary interference test of sample($\lambda=0.125$ EU/ml)

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC
		0.007 1	0.006 2	0.005 6	0.005	0.004 6	0.004 2		
1203071	20120807	NPC ₂	--	--	--	--	--	--	++
		PPC ₂	--	--	--	++	++	++	
20120910	NPC ₂	NPC ₂	--	--	--	--	--	++	--
		NPC ₂	--	--	--	++	++	++	
20121106	NPC ₂	NPC ₂	--	--	--	--	--	++	--
		PPC ₂	--	--	--	++	++	++	

对应相应的鲎试剂灵敏度,用BET水稀释成0.01 mg/ml(500倍)、0.005 mg/ml(1 000倍)质量浓度的样品稀释溶液,并用此样品稀释溶液将CSE分别稀释成2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 系列浓度与2个厂家鲎试剂反应(λ 为0.25、0.125 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。通过试验结果计算 E_s 和 E_i ,计算公式分别为 $E_s=\text{anti}lg(\sum X_i/4)$ 和 $E_i=\text{anti}lg(\sum X_i/4)$ [X_i 是用BET水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的对数值(lg), X_i 是用供试品溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的对数值(lg), E_s 是用BET水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值; E_i 是用供试品溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值),结果见表4。

表4 样品干扰试验结果

Tab 4 Results of interference test of sample

批号	系列	内毒素质量浓度,EU/ml					NC	E_s, E_i , EU/ml	E_i/E_s	
		0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 2 5				
1108201	BET水	++++	++++	----	----	----	--	$E_s=0.25$		
		20120807	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.25$	1.0
		20120910	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.25$	1.0
		20121106	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.25$	1.0
1203071	BET水	++++	++++	----	----	----	--	$E_s=0.125$		
		20120807	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.125$	1.0
		20120910	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.125$	1.0
		20121106	++++	++++	----	----	----	--	$E_i=0.125$	1.0

由表4结果表明,不同厂家的两种不同灵敏度的鲎试剂 E_s 在2 λ ~0.5 λ 之间,且 E_i 在2 E_s ~0.5 E_s 之间,表明磺达肝癸钠注射液稀释液 ≤ 0.01 mg/ml时对灵敏度为0.25 EU/ml的鲎试剂试验无干扰;稀释液 ≤ 0.005 mg/ml时对灵敏度为0.125 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

取不同厂家两种不同灵敏度的鲎试剂,另取3个批号的供试品,对应于 $\lambda=0.25$ EU/ml的鲎试剂,用BET水500倍稀释($c=0.01$ mg/ml);对应于 $\lambda=0.125$ EU/ml的鲎试剂,用BET水1 000倍稀释($c=0.005$ mg/ml)。按细菌内毒素检查法^[1],并按要求对应相应的鲎试剂,平行做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照,结果见表5。

由表5结果可知,供试品(NPC)和BET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。本试验表明用两个厂家不同灵敏度的鲎试剂对3批磺达肝癸钠注射液的细菌内毒素检查结果均符合规定。

气相色谱法测定凡德他尼原料药中8种有机溶剂残留量

王金玉^{1*}, 韩斌丽¹, 郑 昆¹, 相茂花²(1.日照市中医医院, 山东日照 276800; 2.日照市药品检验所, 山东日照 276800)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1220-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.24

摘要 目的:建立同时测定凡德他尼原料药中8种有机溶剂即甲醇、乙醇、四氢呋喃、正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺含量的方法。方法:采用毛细管气相色谱法,以二甲基亚砜(DMSO)为溶剂,按外标法计算溶剂残留量。色谱柱为DB-624,进样口温度为250℃,氢火焰离子化检测器温度为270℃,程序升温,载气为N₂,分流比为20:1。结果:8种有机溶剂在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好($r=0.998\ 1\sim 0.999\ 4$);平均加样回收率为95.90%~101.4%(RSD=0.56%~3.16%, $n=3$);3批样品中有1批检出四氢呋喃和*N,N*-二甲基甲酰胺。结论:建立的方法操作简单、灵敏、结果准确,可用于凡德他尼原料药中有机溶剂残留量检查。

关键词 凡德他尼;原料药;毛细管气相色谱法;有机溶剂;残留量

Determination of 8 Residual Organic Solvents in Vandetanib Raw Material by Gas Chromatography

WANG Jin-yu¹, HAN Bin-li¹, ZHENG Kun¹, XIANG Mao-hua²(1.Rizhao Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Rizhao 276800, China; 2.Rizhao Institute for Drug Control, Shandong Rizhao 276800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of 8 residual organic solvents as methanol, ethanol, tetrahydrofuran, *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, isopropanol, *N,N*-dimethylformamide in vandetanib raw material. METHODS: Gas chromatography method was adopted using DMSO as solvent. The contents of residual solvent were determined by external standard method. The determination was performed on DB-624 column with FID detector. The injector temperature was set at 250℃ and the detector temperature was 270℃ by temperature programming. Carrier gas was nitrogen, and the splitting ratio was 20:1. RESULTS: The good linear relation of 8 kind of organic solvents were achieved ($r=0.998\ 1\sim 0.999\ 4$). The average recoveries were ranged from 95.90% to 101.4% (RSD=0.56%~3.16%, $n=3$). Among 3 batches of samples, tetramethylene oxide and *N,N*-dimethylformamide were detected in 1 batch of sample. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the determination of residual organic solvents in vandetanib raw material.

KEYWORDS Vandetanib; Raw material; Capillary gas chromatography; Organic solvents; Residual

表5 样品细菌内毒素检查结果

Tab 5 Results of bacterial endotoxin test of sample

批号		供试品质量浓度,mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
鲎试剂	供试品					
1108201	120123	0.01	--	++	++	--
	120310	0.01	--	++	++	--
	120411	0.01	--	++	++	--
1203071	120123	0.005	--	++	++	--
	120310	0.005	--	++	++	--
	120411	0.005	--	++	++	--

3 讨论

预干扰试验目的是评价样品质量浓度对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度,初步筛出对细菌内毒素检查无干扰的样品质量浓度范围。而干扰试验的目的则是对预干扰试验初步筛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。故本试验采用两个不同厂家的鲎试剂($\lambda_1=$

0.25 EU/ml, $\lambda_2=0.125$ EU/ml)对3个批号的样品进行试验,对应将样品稀释至 ≤ 0.01 、0.005 mg/ml时,不干扰细菌内毒素检查。因此,磺达肝癸钠注射液用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

参考文献

- [1] Wong NN. Fondaparinux: a synthetic selective factor-Xa inhibitor[J]. *Heart Dis*, 2003, 5(4): 295.
- [2] Alban S. From heparins to factor Xa inhibitors and beyond [J]. *Eur J Clin Invest*, 2005, 35(Suppl 1): 12.
- [3] Glaxo Wellcome Production. 磺达肝癸钠注射液说明书[S]. 2011-04-29.
- [4] 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XIE、XIXM.
- [5] 黄荣富, 厉青, 李龙健, 等. 注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查方法的研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(17): 1602.
- [6] 周梅, 武谷. 注射用盐酸吉西他滨细菌内毒素检查方法的研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(1): 76.

(收稿日期: 2013-06-28 修回日期: 2013-10-09)

* 主管药师。研究方向: 医院药学和药物制剂。电话: 0633-8290199。E-mail: pharm_2012@126.com