

氟马西尼注射液细菌内毒素检查方法的建立

代秀梅*, 于风平(淄博市食品药品检验所, 山东 淄博 255086)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-2003-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.28

摘要 目的:建立氟马西尼注射液细菌内毒素的检查方法。方法:按照2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法的要求,采用2个不同厂家的鲎试剂对3批氟马西尼注射液进行干扰预试验和干扰试验。结果:供试品溶液质量浓度为0.02 mg/ml及以下时对鲎试剂与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰;样品的细菌内毒素限值确定为25 EU/mg。结论:建立的方法可行,可用于氟马西尼注射液的细菌内毒素检查。

关键词 氟马西尼注射液;细菌内毒素检查;鲎试剂;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxins Test in Flumazenil Injection

DAI Xiu-mei, YU Feng-ping(Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the detection of bacterial endotoxins in Flumazenil injection. METHODS: Preliminary interference experiment and interference experiment were carried out by tachypleus amebocyte lysate (TAL) from 2 different manufacturers and 3 batches of Flumazenil injection, according to the requirements of bacterial endotoxin test stated in appendix II of *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). RESULTS: There was no interference in agglutination reaction between TAL and bacterial endotoxins when the concentration of test sample was 0.02 mg/ml and below it. The limit of bacterial endotoxins was 25 EU/mg. CONCLUSIONS: Established method is feasible for the bacterial endotoxins test of Flumazenil injection.

KEYWORDS Flumazenil injection; Bacterial endotoxins; TAL; Interference experiment

氟马西尼是一种苯二氮草类受体拮抗药,其通过竞争性抑制苯二氮草类与其受体反应从而特异性阻断其中枢神经作用^[1]。氟马西尼注射液在临床上用于治疗急性苯二氮草类药中毒^[2-3]、麻醉手术后的催醒^[4-5]等,疗效确切,应用广泛。氟马西尼注射液以静脉注射的方式进入人体,临床静脉用药中由于细菌内毒素污染可引起发热、寒战等副反应甚至死亡。为了控制药品的质量,本文参考有关文献^[6-10]对氟马西尼注射液细菌内毒素检查方法进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

TAL-40D型试管恒温仪(湛江安度斯生物有限公司);ZH-2型漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);PHS-3D型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

氟马西尼注射液(瑞阳制药有限公司,批号:13042304、13042401、13042402,规格:10 ml:1 mg);鲎试剂[以下简称TAL,湛江安度斯生物有限公司,批号:1302021,标示灵敏度(λ):0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:12090312, λ :0.25 EU/ml];细菌内毒素检查用水(BET水,湛江安度斯生物有限公司,批号:1211200,规格:每支50 ml);细菌内毒素工作标准品(CSE,中国食品药品检定研究院,批号:150601-201176,规格:100 EU/ml)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定

公式: $L=K/M$,式中 K 为人每千克体质量每小时最大可接受的细菌内毒素剂量,注射剂 K 为5 EU/(kg·h); M 为人用每千

克体质量每小时的最大供试品剂量^[11],氟马西尼最大注射总量为2 mg^[12],按照《中国药典》计算 L 为:每1 mg氟马西尼中含内毒素的量应小于150 EU。考虑到临床用药的安全和药品生产的实际水平,拟定氟马西尼注射液的 L 为:每1 mg氟马西尼中含内毒素的量应小于25 EU。

2.2 样品最小有效稀释质量浓度(c)的确定

样品最小有效稀释质量浓度 $c=\lambda/L$ 。目前市售的鲎试剂的 λ 常为0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 EU/ml,对应的样品最小有效稀释质量浓度为0.02、0.01、0.005、0.002 4、0.001 2 mg/ml。

2.3 TAL灵敏度复核

根据2010年版《中国药典》(二部)附录XI E“细菌内毒素检查法鲎试剂灵敏度复核试验”项下进行操作,将CSE用BET水溶解,配制成0.5、0.25、0.125、0.06 EU/ml的溶液,每个浓度平行做4管,并同时以BET水做2管阴性对照(NC)。结果表明,2个批号的TAL灵敏度测定值 λ_c 均在 $0.5\lambda\sim 2.0\lambda$ 之间,符合规定,可用于试验,详见表1(注:“+”代表发生凝集反应,“-”代表未发生凝集反应,下表同)。

表1 TAL灵敏度复核结果

TAL批号	λ , EU/ml	细菌内毒素浓度, EU/ml				NC	λ_c , EU/ml
		0.5	0.25	0.125	0.06		
1302021	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
12090312	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25

2.4 干扰预试验

用BET水将氟马西尼注射液(批号:13042304)分别稀释至质量浓度为0.02、0.01、0.005、0.002 4、0.001 2 mg/ml的系列溶液,作为供试品阴性对照(NPC)系列;另制备同样0.02、0.01、0.005、0.002 4、0.001 2 mg/ml的供试品系列溶液,使每一

* 主管药师, 硕士。研究方向:药物质量控制与分析。电话:0533-7866119。E-mail: yfplover@sina.com

浓度下的供试品溶液中都含有2λ(λ为0.25 EU/ml)细菌内毒素,作为供试品阳性对照(PPC)系列;设立加入CSE的阳性对照(PC)管和BET水阴性对照(NC)管。均重复2管。用2个不同厂家生产的TAL(λ为0.25 EU/ml)与上述系列溶液进行反应。结果表明,质量浓度为0.02 mg/ml的供试品溶液,对TAL与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰作用,详见表2。

表2 样品干扰预试验结果

TAL批号	λ,EU/ml	系列	样品质量浓度,mg/ml					PC	NC
			0.02	0.01	0.005	0.002 4	0.001 2		
1302021	0.25	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	++	++	++	++	++		
12090312	0.25	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	++	++	++	++	++		

2.5 干扰试验

根据干扰预试验结果,用质量浓度为0.02 mg/ml的供试品溶液及BET水分别稀释CSE,制备成细菌内毒素最终浓度分别为0.5、0.25、0.125、0.06 EU/ml的系列溶液,分别取0.1 ml加入到已复溶的2个不同厂家生产的TAL(λ为0.25 EU/ml)管内,每个浓度平行做4管,另取供试品溶液做2支NC管,进行干扰试验。结果表明, E_s/E_t 在0.5~2之间(E_s 为用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_t 为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),按照2010年版《中国药典》(二部)判断标准,供试品溶液质量浓度为0.02 mg/ml及以下时对TAL与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰,详见表3。

表3 样品干扰试验结果

TAL批号	λ,EU/ml	批号	细菌内毒素浓度,EU/ml				NC	E_s	E_t	E_s/E_t
			0.5	0.25	0.125	0.06				
1302021	0.25	BET水	++++	++++	----	----	--	0.25		
		13042304	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	
		13042401	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	
		13042402	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	
12090312	0.25	BET水	++++	++++	----	----	--	0.25		
		13042304	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	
		13042401	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	
		13042402	++++	++++	----	----	--	0.25	1.0	

2.6 样品细菌内毒素检查

取3批氟马西尼注射液,用BET水制备成质量浓度为0.02 mg/ml的溶液(样品测定时,根据TAL灵敏度稀释样品:TAL的λ为0.5 EU/ml时,供试品溶液质量浓度为0.02 mg/ml;TAL的λ为0.25 EU/ml时,供试品溶液质量浓度为0.01 mg/ml),按2010年版《中国药典》(二部)方法进行细菌内毒素的检查。结果3批样品细菌内毒素均符合规定,详见表4。

表4 样品细菌内毒素检查结果

TAL批号	批号	样品质量浓度,mg/ml	NPC	PPC	NC	PC
1302021	13042304	0.01	----	++++	--	++
	13042401	0.01	----	++++	--	++
	13042402	0.01	----	++++	--	++
12090312	13042304	0.01	----	++++	--	++
	13042401	0.01	----	++++	--	++
	13042402	0.01	----	++++	--	++

3 讨论

细菌内毒素检查法检测和量化由革兰阴性菌产生的内毒素,具有灵敏度高、快速、准确等特点,被各国药典所采纳并替代热原检查法。在建立内毒素检查法时应进行干扰试验,目的是评价样品质量浓度对TAL与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质,初步筛选出对细菌内毒素检查无干扰的样品质量浓度范围。不同厂家的TAL由于生产工艺、质量参数等方面存在一定的不同,其抗干扰能力存在差异。因此,本试验采用2个不同厂家的TAL和3批样品进行试验,以确保所建立的检查方法准确、合理。

干扰试验结果显示,3批供试品稀释至质量浓度均为0.02 mg/ml,分别使用2个不同厂家生产的TAL(灵敏度均为0.25 EU/ml)进行干扰试验,其 E_s/E_t 均在0.5~2.0范围内,说明样品在该质量浓度下不干扰细菌内毒素检查。根据以上试验结果,确定氟马西尼注射液细菌内毒素检查标准操作方法如下:“【检查】细菌内毒素 取本品,用细菌内毒素检查用水稀释至每1 ml含0.02 mg的溶液,依法测定(附录XI E),每1 mg氟马西尼中含细菌内毒素的量应小于25 EU。”

在细菌内毒素检查中,过酸、过碱的供试品溶液容易干扰结果,一般要求供试溶液的pH在6.0~8.0范围内,否则应调节被测溶液的pH。本文在建立氟马西尼注射液细菌内毒素检查方法时,采用精密pH计测定了质量浓度为0.02、0.01 mg/ml的3批供试品溶液的pH,结果均在6.4~6.8之间。因此,本供试品溶液的pH不需要调节,可直接用于细菌内毒素检查。

参考文献

- [1] 张秀荣,牛松青.氟马西尼的临床应用[J].中国药学杂志,1998,33(2):52.
- [2] 刘志军,刘福军.氟马西尼治疗安定类药物中毒临床观察[J].中外医疗,2010(9):121.
- [3] 段歆,赵静山.氟马西尼治疗急性苯二氮草类药物中毒18例临床疗效分析[J].吉林医学,2011,32(18):3 673.
- [4] 黄选刁,张永发,刘怀萍,等.氟马西尼用于小儿全麻催醒的临床研究[J].临床和实验医学杂志,2009,8(6):67.
- [5] 李利华,严爵基.氟马西尼用于全麻术后催醒的临床观察[J].华夏医学,2010,23(4):414.
- [6] 易红,陈明安,孙健,等.天麻素氯化钠注射液细菌内毒素检查法研究[J].中国药业,2008,17(5):20.
- [7] 郑霞,赵毓梅.细菌内毒素检查法的应用进展[J].中国热带医学,2009,9(1):170.
- [8] 林小婵,黄敬荣.香菇多糖氯化钠注射液细菌内毒素检测方法的试验研究[J].海峡药学,2008,20(4):49.
- [9] 王宗春,罗丽萍,黄砚青.马来酸桂哌齐特注射液细菌内毒素检查方法的建立[J].中国药房,2011,22(21):1 998.
- [10] 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.
- [11] 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IXE.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:化学药和生物制品卷[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2011:1 231-1 232.

(收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-03-06)