

注射用尤瑞克林细菌内毒素检查方法的建立

孙云*(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)21-2005-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.29

摘要 目的:建立注射用尤瑞克林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,用2个厂家的鲎试剂对3个批号的注射用尤瑞克林进行干扰试验和细菌内毒素检查。结果:样品的浓度 ≤ 0.00075 PNA/ml时对细菌内毒素检查无干扰。结论:细菌内毒素检查法可以用于注射用尤瑞克林细菌内毒素的限量检查。

关键词 注射用尤瑞克林;细菌内毒素检查法;鲎试剂;干扰试验

Establishment on Bacterial Endotoxin Test of Urinary Kininogenase for Injection

SUN Yun(Zhejiang Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaying 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Urinary kininogenase for injection. METHODS: According to the requirements of bacterial endotoxin test stated in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition II), interference experiment and bacterial endotoxins test were carried out among 3 batches of Urinary kininogenase for injection with tachypleus amoebocyte lysate (TAL) from 2 different manufacturers. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 0.00075 PNA/ml. CONCLUSIONS: Bacterial endotoxin test is applicable for limit test of bacterial endotoxin for Urinary kininogenase for injection.

KEYWORDS Urinary kininogenase for injection; Bacterial endotoxin test; TAL; Interference experiment

注射用尤瑞克林主要成分为人尿激肽原酶,适用于轻-中度急性血栓性脑梗死,应在起病48 h内开始用药^[1]。2010年版《中国药典》规定静脉用注射剂都需要进行热原检查^[2],以确保用药安全。传统的家兔热原检查法操作复杂,影响因素较多,笔者参考了相关的注射剂细菌内毒素检查文献^[3-10],目前未见注射用尤瑞克林的细菌内毒素检查的文献报道。因此笔者按照2010年版《中国药典》(二部)附录XIE细菌内毒素检查法对其进行研究,以探讨建立其细菌内毒素检查法的可行性。

1 材料

1.1 仪器

BET-32M细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);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)。

1.2 药品与试剂

注射用尤瑞克林[广东天普生化医药股份有限公司,批号:311205131、311205161、321208141,规格:每瓶0.15肽核酸(PNA)];鲎试剂[TAL,湛江安度斯生物有限公司,批号:1212081,标示灵敏度(λ):0.25 EU/ml];厦门市鲎试剂试验厂有限公司,批号:120412, λ :0.25 EU/ml];细菌内毒素工作标准品(CSE,湛江安度斯生物有限公司,批号:1208280,效价:每支10 EU);细菌内毒素检查用水(BET水,湛江安度斯生物有限公司,批号:1206130,规格:每支5 ml)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核

根据两批鲎试剂灵敏度的标示值,将CSE用BET水溶解,

*主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:sunyun911@163.com

然后制成浓度为2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.125 λ (0.50、0.25、0.125、0.0625 EU/ml)的细菌内毒素标准液,按照《中国药典》细菌内毒素检查法复核试验用鲎试剂灵敏度(λ_c),结果表明2个批号鲎试剂的 λ_c 均在0.5 λ ~2.0 λ 范围内,符合《中国药典》的规定,结果见表1[“+”表示凝胶形成(阳性),“-”表示凝胶未形成(阴性)。以下各表同]。

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_c ,EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.0625	
1212081	+++	+++	----	----	0.25
120412	+++	+++	----	----	0.25

2.2 样品细菌内毒素限值(L)确定^[2]

$L=K/M$,K为成人每千克体质量每小时最大可接受的细菌内毒素剂量,《中国药典》规定注射剂 $K=5$ EU/(kg·h);M为成人用每千克体质量每小时的最高供试品剂量。按照尤瑞克林说明书^[1],成人静脉滴注给药量为0.15 PNA,每日1次,人均体质量按60 kg计算,滴注时间按1 h计算, $L=K/M=2000$ EU/PNA。根据《化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则》的要求^[2],本品安全系数定为3,故 $L=666.7$ EU/PNA。

2.3 样品最小有效稀释浓度(c)的确定

按《中国药典》细菌内毒素检查法规定,最大稀释倍数 $MVD=cL/\lambda$ 。本品为注射用无菌粉末, $MVD=1$, λ 为鲎试剂标示的灵敏度, $\lambda=0.25$ EU/ml,则 $c=\lambda/L=0.25/666.7=0.000375$ PNA/ml,对应本品应溶解于50 ml液体中^[1],可见供试品最大稀释倍数应为 0.15 PNA/(50 ml \times 0.000375 PNA/ml)=8。

2.4 样品干扰预试验

取3个批号的注射用尤瑞克林,分别加BET水50 ml制成0.003 PNA/ml的原液,再用BET水分别稀释0、2、3、4、6、8倍,制成0.003、0.001 5、0.001、0.000 75、0.000 5、0.000 375 PNA/ml共6个浓度梯度的溶液,将此系列浓度供试品溶液记为NPC;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)的注射用尤瑞克林溶液,含供试品溶液内毒素记为PPC。同时做阳性对照管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(λ=0.25 EU/ml)

Table 2 Results of preliminary interference test of sample (λ=0.25 EU/ml)

批号	系列	供试品浓度, PNA/ml						PC	NC
		0.003	0.001 5	0.001	0.000 75	0.000 5	0.000 375		
1212081	311205131	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--
	311205161	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--
	321208141	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--
120412	311205131	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--
	311205161	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--
	321208141	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++	++	--

由表2结果可知,当3批样品稀释至0.000 75 PNA/ml及以下浓度的溶液时,对灵敏度λ=0.25 EU/ml的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。

2.5 样品干扰试验

根据样品干扰预试验结果,取3个批号的注射用尤瑞克林,稀释成0.000 75 PNA/ml的供试品溶液,与BET水分别将CSE制成含细菌内毒素2 λ、1 λ、0.5 λ、0.25 λ 4个浓度的溶液,按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_t ,计算公式为 $E_s = \lg^{-1}(\sum X_i/4)$ 和 $E_t = \lg^{-1}(\sum X_i/4)$ (X_i 为用BET水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的对数值, X_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对数值, 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),结果见表3。

表3 样品干扰试验结果(λ=0.25 EU/ml)

Table 3 Results of interference test of sample (λ=0.25 EU/ml)

批号	内毒素浓度, EU/ml	NC	E_s, E_t , EU/ml	E_s/E_t			
					0.5	0.25	0.125
1212081	BET水	++++	++++	----	----	$E_s=0.25$	
	311205131	++++	++++	----	----	$E_t=0.25$	1.0
	311205161	++++	++++	----	----	$E_s=0.22$	0.88
	321208141	++++	++++	----	----	$E_t=0.25$	1.0
120412	BET水	++++	++++	----	----	$E_s=0.25$	
	311205131	++++	++++	----	----	$E_t=0.25$	1.0
	311205161	++++	++++	----	----	$E_s=0.25$	1.0
	321208141	++++	++++	----	----	$E_t=0.25$	1.0

结果显示,不同厂家的鲎试剂 E_s 均在0.5 λ~2.0 λ之间, E_t/E_s 也在0.5~2.0之间,说明样品浓度≤0.000 75 PNA/ml时对细菌内毒素检查无干扰。

2.6 样品细菌内毒素检查

取3个批号的样品用BET水稀释至0.000 75 PNA/ml,用2个厂家的鲎试剂,按细菌内毒素检查法进行试验,并按要求分别平行做阳性(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

Table 4 Results of bacterial endotoxin test of sample

批号	供试品浓度, PNA/ml	NPC	PPC	PC	NC	
						鲎试剂
1212081	311205131	0.00075	--	++	++	--
	311205161	0.00075	--	++	++	--
	321208141	0.00075	--	++	++	--
120412	311205131	0.00075	--	++	++	--
	311205161	0.00075	--	++	++	--
	321208141	0.00075	--	++	++	--

结果表明,3批样品细菌内毒素检查均符合规定。

3 讨论

与传统的家兔热原检查法相比,细菌内毒素检查法有着操作简便、快捷、重现性好、结果准确等优点。因不同厂家的鲎试剂存在着抗干扰能力的差异,笔者采用2个厂家的鲎试剂对3个批号的注射用尤瑞克林样品进行了试验,结果显示在供试品浓度≤0.000 75 PNA/ml时对细菌内毒素检查无干扰。由此表明,细菌内毒素检查法可用于注射用尤瑞克林细菌内毒素的限量检查。

参考文献

- [1] 广东天普生化医药股份有限公司.注射用尤瑞克林说明书[S].2008-02-04.
- [2] 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.
- [3] 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):1 602.
- [4] 徐东,徐玲笑.注射用夫西地酸钠细菌内毒素检查方法的研究[J].中国药房,2011,22(21):844.
- [5] 许雷鸣,武谷,顾倩.门冬氨酸鸟氨酸注射液细菌内毒素检查法的研究[J].中国医药导报,2013,10(6):100.
- [6] 肖贵南,孙清萍,盛英美.如何建立新药的细菌内毒素检查方法[J].中国医药导报,2011,8(32):159.
- [7] 王莉,张红宇,刘勤,等.盐酸氨溴索注射液细菌内毒素检查法研究[J].中国药业,2011,20(5):31.
- [8] 王宗春,姜俊勇,宋金春.注射用脑蛋白水解物细菌内毒素检查法的建立[J].食品与药品,2012,14(1):45.
- [9] 厉青,赵赤,苏静,等.奥硝唑注射液的细菌内毒素检查研究[J].西北药学杂志,2011,26(2):54.
- [10] 李琳.注射用盐酸克林霉素细菌内毒素的检查方法[J].中国医药指南,2012,10(30):455.

(收稿日期:2013-11-11 修回日期:2013-12-12)