

# 注射用兰索拉唑细菌内毒素检查法的建立

李逢春\*(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2379-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.28

**摘要** 目的:建立注射用兰索拉唑的细菌内毒素检查法。方法:按照2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法,采用2个厂家的鲎试剂对5个厂家的5批样品,通过预干扰和干扰试验确定样品最大无干扰质量浓度,并进行细菌内毒素检查。结果:将供试品溶液稀释到质量浓度为0.1 mg/ml时,不干扰细菌内毒素试验,其细菌内毒素限值为5 EU/mg。结论:采用细菌内毒素检查法检查注射用兰索拉唑中的细菌内毒素方法可行。

**关键词** 注射用兰索拉唑;细菌内毒素;鲎试剂;干扰试验

## Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Lansoprazole for Injection

LI Feng-chun(Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for bacterial endotoxin test of Lansoprazole for injection. METHODS: According to bacterial endotoxin test stated in appendix II of *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition), maximal non-interference concentrations of 5 batches of samples from 5 manufacturers were determined by pre-interference test and interference test by using tachypleus amebocyte lysate (TAL) from 2 manufacturers. And then bacterial endotoxin test was conducted. RESULTS: Lansoprazole for injection which is diluted to 0.1 mg/ml will not interfere with bacteria endotoxin test. The limitation of bacteria endotoxin was 5 EU/mg. CONCLUSIONS: It is feasible to detect the bacterial endotoxin of Lansoprazole for injection by the method of bacterial endotoxin test.

**KEYWORDS** Lansoprazole for injection; Bacterial endotoxin; Tachypleus amebocyte lysate; Interference test

注射用兰索拉唑属于质子泵抑制剂,为新型的抑制胃酸分泌的药物,适用于反流性食管炎、胃溃疡及十二指肠溃疡的治疗,是消化内科常用药物。目前在国家食品药品监督管理局批准的标准中只有热原检查项<sup>[1]</sup>,而将热原检查项以灵敏、便捷、经济、易于标化的细菌内毒素检查项替代是注射剂质量控制方法的改进趋势。为了提高该品种质量标准,加强国家药品质量控制,笔者对注射用兰索拉唑中细菌内毒素检查法的可行性进行了研究。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

DC-3A型干式恒温器(南京三爱斯技术开发有限公司); ZH-2漩涡混合器(天津大学无线电厂)。

#### 1.2 药品与试剂

注射用兰索拉唑(国内A公司,批号:16120604; B公司,批号:1303164; C公司,批号:120601; D公司,批号:513073454; E公司,批号:11830604。规格:均为每支30 mg);鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1202101,灵敏度:0.25 EU/ml;湛江博康海洋生物有限公司,批号:1203190,灵敏度:0.25 EU/ml。规格:均为每支0.5 ml);细菌内毒素工作标准品(以下简称WSE,批号:150601-201069,效价:每支120 EU)、细菌内毒素检查用水(以下简称BET水,批号:2010-1,规格:每支10 ml)均来源于中国食品药品检定研究院。

### 2 方法与结果

#### 2.1 鲎试剂标示灵敏度( $\lambda$ )的复核

根据鲎试剂灵敏度的标示值(0.25 EU/ml),将WSE用BET水溶解,制成0.5、0.25、0.125、0.06 EU/ml 4个浓度的内毒

素标准溶液。取分装有0.1 ml鲎试剂的试管18支,其中16管分别加入0.1 ml不同浓度内毒素标准溶液,每个浓度平行4管,另取2管加0.1 ml BET水作为阴性对照。37℃保温60 min,取出后轻轻旋转180°,以凝胶从管壁不脱落为阳性、脱落为阴性判断结果。根据鲎试剂灵敏度测试值( $\lambda_c$ )公式 $\lambda_c = \text{anti} \lg(\sum X/4)$ 计算其为0.25 EU/ml[其中X为反应终点浓度的对数值(Ig),反应终点浓度指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度],结果表明 $\lambda_c$ 在0.5  $\lambda \sim 2 \lambda$  (0.125~0.5 EU/ml)之间,符合试验要求。

#### 2.2 样品内毒素限值(L)的确定

按照《中国药典》相关方法<sup>[2]</sup>,L的计算公式: $L = K/M$ ,注射剂的K值为5 EU/(kg·h),M为人用每kg体质量每小时的最大供试品剂量,人均体质量按60 kg计算。参照该药品使用说明书<sup>[3]</sup>,本品成人一次最大给药剂量为30 mg,用0.9%的氯化钠注射液100 ml溶解后静脉滴注,  $M = 30 \text{ mg}/60 (\text{kg} \cdot \text{h}) = 0.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ,则 $L = 10 \text{ EU}/\text{mg}$ 。考虑到本品临床应用安全性,实际使用的L值可适当比理论L值小些,因此,本品采用 $L = 5 \text{ EU}/\text{mg}$ 的限值来进行细菌内毒素研究。

#### 2.3 样品预干扰试验

由于本品为注射用无菌粉末,有效稀释浓度可根据公式 $c = \lambda/L$ 计算。目前市售鲎试剂灵敏度一般在0.5 EU/ml( $\lambda_{\text{max}}$ )~0.03 EU/ml( $\lambda_{\text{min}}$ )之间,由此计算出本品细菌内毒素检查时的有效浓度为: $c_{\text{max}} = \lambda/L = 0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ ,  $c_{\text{min}} = \lambda/L = 0.012 \text{ mg}/\text{ml}$ ,即有效浓度范围为0.1~0.012 mg/ml。取1支样品,加BET水10 ml,制成3 mg/ml的溶液,然后分别制成0.1、0.05、0.025、0.012 mg/ml的供试品溶液作为阴性供试品(NPC)系列溶液。根据鲎试剂的灵敏度分别添加2  $\lambda$ 的细菌内毒素,制成供试品阳性溶液作为PPC系列溶液。用 $\lambda = 0.25 \text{ EU}/\text{ml}$ 鲎试剂,分别与4

\*主管药师,硕士。研究方向:药品检验。电话:0371-63388203。E-mail:lihyang@126.com

个系列溶液反应,各重复2管,同时用BET水加0.25 EU/ml 鲎试剂制成阴性对照(NC)各2管和用0.5 EU/ml的细菌内毒素加0.25 EU/ml 鲎试剂制成阳性对照(PC)各2管,进行样品预干扰试验<sup>[1-3]</sup>,结果见表1(注:表中“-”表示阴性,“+”表示阳性,“/”表示未做;其余表同。1203190批鲎试剂结果同1202101批,故结果略,其余表同)。

表1 预干扰试验结果

Tab 1 Results of preliminary interference test

批号	组别	样品质量浓度,mg/ml				NC	PC
		0.1	0.05	0.025	0.012		
1202101	16120604	NPC	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	/	++
1303164	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	/	++
120601	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	/	++
513073454	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	/	++
11830604	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	/	++

从预干扰试验结果看,注射用兰索拉唑稀释至0.1 mg/ml 即不再对试验产生干扰。

#### 2.4 供试品正式干扰试验

使用鲎试剂,对注射用兰索拉唑质量浓度为0.1 mg/ml 的溶液做正式干扰试验<sup>[4-5]</sup>:用供试品溶液及BET水分别稀释WSE,制备成细菌内毒素浓度分别为0.5、0.25、0.125、0.06 EU/ml 的系列溶液,分别取0.1 ml 加入到已复溶的两个厂家鲎试剂管内,每个浓度平行4管,另取供试品溶液制备4支NC管,结果见表2。

表2 干扰试验结果

Tab 2 Results of interference test

批号	内毒素浓度,EU/ml	NC	$E_s$ , EU/ml	$E_t$ , EU/ml	$E_s/E_t$	结果
1202101	BET水	++++	----	----	----	符合规定
	16120604	++++	----	----	----	无干扰
	1303164	++++	----	----	----	无干扰
	120601	++++	----	----	----	无干扰
	513073454	++++	----	----	----	无干扰
	11830604	++++	----	----	----	无干扰

表中 $E_s$ 为BET水制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值, $E_t = \text{antilg}(\sum X_i/4)$ , $X_i$ 为阳性对照(PC)系列溶液的反应终点浓度的对数值(lg); $E_t$ 为供试品溶液制成的内毒素溶液的反应终点浓度几何平均值, $E_t = \text{antilg}(\sum X_i/4)$ , $X_i$ 为供试品阳性对照(PPC)系列溶液的反应终点浓度的对数值(lg)。

由表2结果可见,5个厂家5个批号供试品溶液在质量浓度为0.1 mg/ml 时对两个厂家的鲎试剂干扰试验结果为: $E_s$ 在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$  (包括 $0.5 \lambda$ 和 $2.0 \lambda$ ), $E_t$ 在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$  (包括 $0.5 E_s$ 和 $2.0 E_s$ ),表明该供试品溶液在 $\leq 0.1$  mg/ml 质量浓度的情况下,对细菌内毒素的凝集反应无干扰。

#### 2.5 样品细菌内毒素检查

取5个批号样品,用鲎试剂 $\lambda$ 为0.25 EU/ml,以 $L$ 为5 EU/mg 作为结论评定标准,按照细菌内毒素检查法项下凝胶限度试验法进行操作和结果判断。其中,以样品溶液(0.05 mg/ml)为供试品,供试品阳性对照(PPC)为含0.5 EU/ml 的细菌内毒素和0.05 mg/ml 的供试品溶液,阳性对照(PC)为0.5 EU/ml 的

菌内毒素溶液,阴性对照(NC)为BET水,每种溶液各制备2管,每管各取0.1 ml,然后加入0.1 ml 的鲎试剂溶液,37 °C 保温60 min,结果见表3。

表3 样品细菌内毒素检查结果

Tab 3 Results of endotoxin detection of sample

批号		供试品	PPC	PC	NC
鲎试剂	样品				
1202101	16120604	--	++	++	--
	1303164	--	++	++	--
	120601	--	++	++	--
	513073454	--	++	++	--
	11830604	--	++	++	--

表3结果显示,5个批号样品采用两个厂家鲎试剂进行细菌内毒素检查<sup>[2]</sup>,结果均小于限值(5 EU/mg),表明可用此限值进行该样品细菌内毒素检查。

### 3 讨论与结论

细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁上的一种脂多糖和微量蛋白的复合物,是细菌死亡后释放出来的具有生物内毒素生物活性的物质,具有很强的致热性。1942年美国首先将家兔热原检查法收入到《美国药典》中,1953年版《中国药典》也开始收载此法。半个世纪以来,家兔热原检查法对药品质量控制发挥了极其重要的作用,但是随着近年来医药工业的飞速发展,该法的局限性越来越明显,于是基于科学实践基础诞生了细菌内毒素检查法。

细菌内毒素检查法相比于家兔热原检查法,具有经济、快捷、灵敏和易于标准化的优点,因此受到了现代药品检验技术的青睐。1995年版《中国药典》收录细菌内毒素检查品种12个,2005年版《中国药典》增至168个,2010年版《中国药典》已经达到400多个,按照这种趋势,更多的药品细菌内毒素检查法将被国家药品标准所收录,因此,开展注射用兰索拉唑细菌内毒素检查法的研究有着重要的实际意义。

关于注射用兰索拉唑细菌内毒素的研究工作,已经有相关文献<sup>[4-5]</sup>报道,但是选用的试验样本均为单一厂家生产的样品。笔者在本次试验中选用了5个厂家的样品进行对照试验,排除了在生产工艺方面的干扰,增加了试验的可信度。在试验结果方面,也将注射用兰索拉唑的不干扰质量浓度从文献资料中的0.05 mg/ml 提高到了0.1 mg/ml。

由本试验结果表明,注射用兰索拉唑稀释到0.1 mg/ml 质量浓度时对鲎试剂和细菌内毒素的凝聚反应未见干扰作用,注射用兰索拉唑采用限值5 EU/mg 进行细菌内毒素检查法是可行的。因此,本试验为该制剂在新版的国家药品标准中将家兔法修订为细菌内毒素检查法提供了科学依据。

#### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局标准.YBH0209201 注射用兰索拉唑[S].2010-05-26.
- [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.
- [3] 悦康药业集团有限公司.注射用兰索拉唑说明书[S].2011-05-13.
- [4] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[M].北京:中国医药科技出版社,2005:287.
- [5] 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,2012,23(9):844.

(收稿日期:2014-02-13 修回日期:2014-04-04)