

注射用单磷酸阿糖腺苷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)29-2762-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.25

摘要 目的:建立注射用单磷酸阿糖腺苷的细菌内毒素检查方法。方法:按照2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法,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:将供试品溶液稀释至质量浓度为50 mg/ml时,不干扰细菌内毒素试验;确定其细菌内毒素限值为0.5 EU/mg。结论:采用细菌内毒素检查法检查注射用单磷酸阿糖腺苷中的细菌内毒素是可行的。

关键词 注射用单磷酸阿糖腺苷;细菌内毒素;鲎试剂;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test for Vidarabine Monophosphate for Injection

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

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of bacterial endotoxin of Vidarabine monophosphate 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, using TAL from 2 manufacturers. And bacterial endotoxin test was conducted. RESULTS: When test sample was diluted to 50 mg/ml, the limit of bacteria endotoxin was 0.5 EU/mg in non-interference bacteria endotoxin test. CONCLUSIONS: It is feasible to detect the bacterial endotoxin of Vidarabine monophosphate for injection by the method of bacterial endotoxin test.

KEYWORDS Vidarabine monophosphate for injection; Bacterial endotoxin; TAL; Interference test

注射用单磷酸阿糖腺苷为抗脱氧核糖核酸(DNA)病毒药,主要用于肝炎、口腔炎、皮炎、脑炎及巨细胞病毒性视网膜炎方面疾病的治疗,在临床上有着广泛的应用,是继干扰素之后治疗乙肝病毒销量最大的药物^[1]。目前在国家药品标准中该品种只有热原检查项^[2],细菌内毒素检查方面的研究尚未见相关文献发表。细菌内毒素检查相比热原检查法更方便、快捷且便于标准化。为了加强该品种的质量控制,提高国家药品标准,笔者对注射用单磷酸阿糖腺苷的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

注射用单磷酸阿糖腺苷(国内A公司,批号:20130304,规格:每支0.1 g;国内B公司,批号:1209035,规格:每支0.1 g;国内C公司,批号:1308263B,规格:每支0.1 g;国内D公司,批号:20110301,规格:每支0.2 g;国内E公司,批号:130902-1,规格:每支0.2 g);鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1202101,规格:每支0.5 ml,灵敏度:0.25 EU/ml;湛江博康海洋生物有限公司,批号:1203190,规格:每支0.5 ml,灵敏度:0.25 EU/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。

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

2 方法与结果

2.1 鲎试剂标示灵敏度(λ)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,每个浓度平行做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(λ_c)公式: $\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/4)$,计算其为0.25 EU/ml[X为反应终点浓度的对数值(1g),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 λ_c 在0.5 λ ~2 λ (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^[3],L的计算公式: $L = K/M$,注射剂的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。人均体质量按60 kg计算。参照该药品使用说明书^[4],本品成人一次最大给药剂量为10 mg/kg,给药时间按照每小时来计算,则 $M = 10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, $L = 0.5 \text{ EU}/\text{mg}$ 。因此,本品采用0.5 EU/mg的限值来进行细菌内毒素研究。

2.3 样品预干扰试验

分别取样品1瓶,加BET水1 ml,制成100 mg/ml的溶液,目前市售的鲎试剂灵敏度在0.5 EU/ml(λ_{max})~0.03 EU/ml(λ_{min})之间,可以计算样品的最大有效稀释倍数 $\text{MVD}_{0.5-0.03} = cL/\lambda = 1 \sim 16$ 倍,然后分别制成100、50、25、12.5、6.25 mg/ml的供试品溶液作为阴性供试品(NPC)系列溶液。根据采用的鲎试剂的灵敏度分别添加0.5 EU/ml的细菌内毒素,制成供试品阳性

(PPC)系列溶液,用 λ 为0.25 EU/ml的鲎试剂,分别与5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^[4-6],结果见表1(表中“+”表示阳性,“-”表示阴性,“/”表示未做;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	项目	样品质量浓度,mg/ml				NC	PC
		100	50	25	12.5		
1202101	20130304 NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	++	/ ++
1209035	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	++	/ ++
1308263B	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	++	/ ++
20110301	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	++	/ ++
130902-1	NPC	--	--	--	--	--	/
	PPC	++	++	++	++	++	/ ++

从上述结果可知,样品稀释至50 mg/ml时,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,对质量浓度为50 mg/ml的供试品溶液进行正式干扰试验:用供试品溶液及BET水分别稀释WSE,制备成内毒素浓度分别为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2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_i , EU/ml	E_i/E_s	结果				
							0.5	0.25	0.125	0.06
1202101	BET水	++++	----	----	----	----	0.5	/	/	符合规定
	20130304	++++	----	----	----	----	/	0.5	1	无干扰
	1209035	++++	----	----	----	----	/	0.5	1	无干扰
	1308263B	++++	----	----	----	----	/	0.5	1	无干扰
	20110301	++++	----	----	----	----	/	0.5	1	无干扰
	130902-1	++++	----	----	----	----	/	0.5	1	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, $E_s = \text{antilg}(\sum X_i/4)$, 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_i 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, $E_i = \text{antilg}(\sum X_i/4)$, 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50 mg/ml时对2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 0.5λ 和 2.0λ), E_i 在 $0.5E_s \sim 2.0E_s$ (包括 $0.5E_s$ 和 $2.0E_s$),表明该供试品溶液在 ≤ 50 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 λ 为0.25 EU/ml,以L为0.5 EU/mg,按照细菌内毒素检查法^[4]进行操作和结果判断,结果

供试品管、PPC管、PC管和NC管的试验结果见表3。

表3 样品细菌内毒素检查结果

Tab 3 Results of endotoxin detection test of sample

批号	样品	供试品	PPC	PC	NC
1202101	20130304	--	++	++	--
	1209035	--	++	++	--
	1308263B	--	++	++	--
	20110301	--	++	++	--
	130902-1	--	++	++	--

由表3结果可见,5个批号样品采用2个厂家鲎试剂进行细菌内毒素检查,结果均小于限值(0.5 EU/mg),表明可采用此限值进行注射用单磷酸阿糖腺苷的细菌内毒素检查。

3 讨论

细菌内毒素检查法系利用鲎试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素,以判断供试品中的细菌内毒素限量是否符合规定的一种方法。鲎试剂与样品中的细菌内毒素产生凝聚反应时,受到多种因素的影响,如供试品的浓度、离子强度、反应温度、辅料等,因此在进行鲎试剂检查供试品内毒素时,需要进行干扰试验。

干扰试验的预试验是筛选供试品不干扰鲎试剂与细菌内毒素凝聚反应的最大浓度,正式试验是对此浓度进行确证。在本次预试验中,发现样品质量浓度为100 mg/ml时有部分鲎试剂与细菌内毒素的凝聚反应出现阴性结果,在50 mg/ml时所有的反应均为阳性,因此正式试验中选用供试品的质量浓度为50 mg/ml。

注射用单磷酸阿糖腺苷一般由单磷酸阿糖腺苷、甘露醇和氢氧化钠组成,但不同厂家的原辅料来源和生产工艺不同,可能会对试验造成影响,因此在试验中选用2个厂家的鲎试剂和5个厂家的供试品,基本排除了这种因素的干扰。

本次试验结果表明,注射用单磷酸阿糖腺苷的供试品溶液稀释至50 mg/ml质量浓度时对鲎试剂和细菌内毒素的凝聚反应没有干扰作用。因此,注射用单磷酸阿糖腺苷采用L为0.5 EU/mg进行细菌内毒素检查是可行的。本试验结论对于提高国家药品标准,即将其中的家兔热原法修订为细菌内毒素检查法提供了科学依据。

参考文献

- [1] 陈卫波,杨立,杨华.注射用单磷酸阿糖腺苷的冻干工艺研究[J].中国热带医学,2007,7(4):654.
- [2] 国家食品药品监督管理局.WS1-(X-061)-2001Z 注射用单磷酸阿糖腺苷[S].2002-04-01.
- [3] 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.
- [4] 河南辅仁怀庆堂制药有限公司.注射用单磷酸阿糖腺苷说明书[S].2008-09-22.
- [5] 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.
- [6] 厉青,陈娟红,陆金花.注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸内毒素检查方法的建立[J].中国药房,2013,24(25):2375.

(收稿日期:2014-02-13 修回日期:2014-04-04)