

# 替尼泊昔注射液细菌内毒素检查方法的建立

李洁\*, 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)41-3914-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.25

**摘要** 目的:建立替尼泊昔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不干扰质量浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至质量浓度0.02 mg/ml( $\lambda=0.25$  EU/ml)或0.01 mg/ml( $\lambda=0.125$  EU/ml)以下时对细菌内毒素检查法无干扰作用。结论:所建立的方法可用于替尼泊昔注射液的细菌内毒素检查。  
**关键词** 替尼泊昔注射液;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

## Establishment of Method for Bacterial Endotoxin Test of Teniposide Injection

LI Jie, CHEN Juan-hong, SHAO Li-xiao(Zhejiang Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Teniposide injection. METHODS: Maximum noninterference concentration of sample was determined by interference test according to bacterial endotoxins gel-clot test stated in the appendix of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 0.02 mg/ml ( $\lambda=0.25$  EU/ml) or 0.01 mg/ml ( $\lambda=0.125$  EU/ml). CONCLUSIONS: The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Teniposide injection.

**KEYWORDS** Teniposide injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot test; Interference test

替尼泊昔注射液为抗肿瘤药物,为周期特异性细胞毒类药物,通过抑制拓扑异构酶 II,阻止细胞进入有丝分裂期<sup>[1]</sup>。体外试验发现替尼泊昔对人胃癌 BGC-823 细胞具有良好的抑制生长作用,主要用于恶性淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤和膀胱癌的治疗<sup>[2]</sup>。《中国药典》对注射剂的细菌内毒素限值作了明确的规定,传统的热原检查法成本高、操作复杂、影响因素多、重现性差,而细菌内毒素检查法则操作简便、重现性好、成本低,已被广泛应用,但目前未见替尼泊昔注射液细菌内毒素检查法的文献报道。本文通过试验探讨,建立用细菌内毒素凝胶检查法检查替尼泊昔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(浙江嘉兴新滕电器设备有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

替尼泊昔注射液(百时美施贵宝公司,批号:1M00553、2B01212、3C01331,规格均为:1 ml:10 mg, pH 6.5);鲎试剂[湛江安度斯生物有限公司,批号:1108201,标示灵敏度( $\lambda$ ):0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1203071, $\lambda$ :0.125 EU/ml;规格:每支均为0.1 ml);细菌内毒素工作标准品(CSE,批号:1010150,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:1008123,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2批鲎试剂灵敏度的标示值,将CSE用BET水溶解,

\* 药师。研究方向:医院药学。电话:0573-82082851-34725。

E-mail:leejie1117@126.com

置于漩涡混合器混合15 min,然后制成浓度为2  $\lambda$ 、1  $\lambda$ 、0.5  $\lambda$ 、0.125  $\lambda$ (0.50、0.25、0.125、0.062 5 EU/ml或0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 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<sup>[3]</sup>,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( $\lambda_c$ )。 $\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/4)$ , $X$ 为反应终点浓度的对数值,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2批鲎试剂 $\lambda_c$ 均在0.5  $\lambda \sim 2.0 \lambda$ 范围内,均符合《中国药典》规定,可用于细菌内毒素检查,详见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Recheck results of TAL sensitivity test

批号	内毒素浓度,EU/ml					$\lambda_c$ ,EU/ml	$\lambda_c$ ,EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.062 5	0.031 25		
1108201	++++	++++	----	----		0.25	0.25
1203071		++++	++++	----	----	0.125	0.125

注:“+”表示凝胶形成(阳性);“-”表示凝胶未形成(阴性);其余表同

Note:“+” means gel formation (positive);“-” means no gel formation

(negative);the other table with the same

### 2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定

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 $K = 5$  EU/(kg·h)。 $M$ 为人用每千克体质量每小时的最高供试品剂量,从替尼泊昔注射液的使用说明书可知本品的最大日推荐剂量是130 mg/m<sup>2</sup><sup>[4]</sup>,推荐剂量以上则可能导致不良反应的增加,供试品每平方米体表面积剂量乘以0.027即可转换为每千克体质量的剂量。每天1次,人均表面积按1.62 m<sup>2</sup>计算,静注时间按1 h计算<sup>[3]</sup>,由于本品为皮下注射或静脉内给药,则 $K = 5$  EU/(kg·h), $M = 1.62 \times 130 \times 0.027/60$  (kg·h) = 0.094 77 mg/(kg·h), $L = K/M = 5/0.094 77 = 53$  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,本试验安全系数定为3<sup>[3]</sup>,故L=53/3=18 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。目前市售鲎试剂灵敏度最高为λ=0.03 EU/ml,替尼泊昔注射液的规格均为1 ml:10 mg,计算得MVD=cL/λ=10×18/0.03=6 000,由此可知,供试品稀释倍数应不大于6 000倍,即最小有效稀释质量浓度c<sub>1</sub>≥0.001 7 mg/ml,由此进行干扰试验,以确定最大不干扰浓度。

### 2.4 预干扰试验<sup>[4]</sup>

取3批次替尼泊昔注射液各1瓶,用BET水稀释至125倍,而后用BET水倍比稀释至125、250、500、1 000、2 000、4 000倍,连同原液制成10、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5 mg/ml共7个浓度梯度溶液,将此系列浓度溶液标记为供试品管(NPC系列,各2管);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或0.25 EU/ml)的替尼泊昔液,标记此系列溶液为阳性对照管(PC系列,各2管)。同时做细菌内毒素阳性对照管(PC)及BET水阴性对照管(NC)各2管,然后按细菌内毒素检查法操作,进行预干扰试验,结果见表2、表3。

表2 样品预干扰试验结果(λ=0.25 EU/ml)

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

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC
		10	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005		
1108201	1M00553	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		
2B01212	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		
3C01331	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		

表3 样品预干扰试验结果(λ=0.125 EU/ml)

Tab 3 Results of preliminary interference test of sample(λ=0.125 EU/ml)

批号	系列	供试品质量浓度,mg/ml						PC	NC
		0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.002 5		
1203071	1M00553	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		
2B01212	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		
3C01331	NPC	--	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++	++		

由表2结果可知,3批样品稀释至0.02 mg/ml或以下质量浓度的溶液时,对λ为0.25 EU/ml的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。

由表3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λ为0.125 EU/ml的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。

### 2.5 干扰试验<sup>[4]</sup>

根据预干扰试验结果,取3个批号的替尼泊昔注射液,对应相应的鲎试剂灵敏度,用BET水稀释成0.02 mg/ml(500倍)、0.01 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,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<sub>s</sub>和E<sub>t</sub>,计算公式分别为E<sub>s</sub>=antilg(ΣX<sub>i</sub>/4)和E<sub>t</sub>=antilg(ΣX<sub>i</sub>/4)[X<sub>i</sub>系用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<sub>i</sub>系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<sub>s</sub>系用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<sub>t</sub>系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	内毒素浓度,EU/ml	NC	E <sub>s</sub> ,EU/ml	E <sub>t</sub> /E <sub>s</sub>							
					0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 25		
1108201	BET水	---	---	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.25	
	1M00553	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.25	1.0
	2B01212	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.25	1.0
	3C01331	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.25	1.0
1203071	BET水	---	---	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.125	
	1M00553	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.125	1.0
	2B01212	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.125	1.0
	3C01331	+++	+++	---	---	---	---	---	---	E <sub>s</sub> =0.215	1.0

由表4结果显示,2种不同灵敏度的鲎试剂E<sub>s</sub>在2 λ~0.5 λ之间,且E<sub>t</sub>在2 E<sub>s</sub>~0.5 E<sub>s</sub>之间,表明替尼泊昔注射液稀释液≤0.02 mg/ml对λ为0.25 EU/ml的鲎试剂试验无干扰,替尼泊昔注射液稀释液≤0.01 mg/ml对λ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

试验中采用的2种不同灵敏度的鲎试剂(λ<sub>1</sub>=0.25 EU/ml; λ<sub>2</sub>=0.125 EU/ml),相对应的MVD<sub>1</sub>=cL/λ=10×18/0.25=720, MVD<sub>2</sub>=cL/λ=10×18/0.125=1 440,而干扰试验的结果分别为500、1 000倍,小于对应的MVD<sub>1</sub>、MVD<sub>2</sub>,符合《中国药典》细菌内毒素检查要求,因而可进行内毒素检查。取3个批号的供试品,对应于λ=0.25 EU/ml鲎试剂,用BET水500倍稀释(c=0.02 mg/ml);对应于λ=0.125 EU/ml鲎试剂,用BET水1 000倍稀释(c=0.01 mg/ml);按文献<sup>[4]</sup>细菌内毒素检查法,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。

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	供试品质量浓度,mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
	2B01212	0.02	--	++	++	--
	3C01331	0.02	--	++	++	--
1203071	1M00553	0.01	--	++	++	--
	2B01212	0.01	--	++	++	--
	3C01331	0.01	--	++	++	--

由表5结果可知,NPC和NC阴性对照管均为阴性,表明样品中未检出细菌内毒素;PPC和PC阳性对照管均为阳性,表明试验有效。试验表明,用2种灵敏度的鲎试剂,对3个批次替尼泊昔注射液的细菌内毒素检查结果均符合规定。

## 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质量浓度的进一步确认。另外,不同厂家的

# 两种方法测定比沙可啶纯度及不确定度评定

郭永辉\*, 姜建国, 闫凯, 韩学静(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917;R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3916-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.26

**摘要** 目的:采用两种不同原理的测定方法对比沙可啶纯度进行联合定值,并建立其不确定度评定方法。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)与非水溶液电位滴定法测定比沙可啶纯度,并依据相关规范要求,对两种方法测定过程的不确定度进行了系统分析。结果:比沙可啶HPLC法、非水溶液电位滴定法纯度测定值分别为 $(99.81 \pm 0.29)\%$ 、 $(99.82 \pm 0.51)\%$ ,两种方法联合测定比沙可啶纯度的标准值及其不确定度分别为 $99.82\%$ 、 $(\pm)0.59\%$  ( $k=2, P=0.95$ )。结论:采用HPLC与非水溶液电位滴定法联合测定比沙可啶纯度及不确定度评定结果准确可靠,避免了采用一种技术带来的分析方法缺陷,有利于提高比沙可啶的质量评价与控制水平,同时为比沙可啶纯度标准物质的研制提供了科学依据。

**关键词** 比沙可啶;纯度;不确定度;高效液相色谱法;非水溶液电位滴定法

## Purity Determination and Uncertainty Evaluation of Bisacodyl by Using 2 Different Methods

GUO Yong-hui, JIANG Jian-guo, YAN Kai, HAN Xue-jing (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the purity of bisacodyl by two different principles methods, and to establish the method for uncertainty evaluation of it. METHODS: HPLC and non-aqueous potentiometric titration were selected for the purity determination of bisacodyl. According to the requirements of related measuring technique criterion, the uncertainty of the determination of 2 different principles methods were analyzed systematically. RESULTS: The purities were  $(99.81 \pm 0.29)\%$  by HPLC and  $(99.82 \pm 0.51)\%$  by non-aqueous potentiometric method. By using two different methods, standard value of purity and uncertainty of bisacodyl were  $99.82\%$  and  $(\pm)0.59\%$  ( $k=2, P=0.95$ ). CONCLUSIONS: HPLC combined with non-aqueous potentiometric titration is accurate and reliable for the purity determination and uncertainty evaluation of bisacodyl, and avoids the defect of single analysis method. It is helpful to improve quality evaluation and control of bisacodyl, and provides a scientific basis for the development of bisacodyl purity reference materials.

**KEYWORDS** Bisacodyl; Purity; Uncertainty; HPLC; Non-aqueous potentiometric titration

比沙可啶为2010年版《中国药典》收录的品种,是目前临床上广泛使用的通便剂。本文参考2010年版《中国药典》及有关文献<sup>[1-7]</sup>,采用高效液相色谱(HPLC)法与非水溶液电位滴定法对比沙可啶的纯度进行了测定。依据标准物质技术规范及相关计量技术规范要求,分别对HPLC法与非水溶液电位滴定

法测定比沙可啶纯度的过程进行不确定度评定,并将两种不同原理方法的测定结果进行联合定值及不确定度评定。最终确定的比沙可啶纯度值及其不确定度值准确可靠,更加准确地反映了比沙可啶的真实纯度,有利于提高药品的质控水平,同时对比沙可啶纯度标准物质的研制与标定赋值提供了科学

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<sup>[7-8]</sup>。由于替尼泊昔结构较复杂,较高质量浓度时对内毒素试验的凝集有一定的干扰,但通过BET水的稀释则完全可以排除干扰。本试验采用2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,对应将样品稀释至质量浓度 $\leq 0.02$  mg/ml、 $\leq 0.01$  mg/ml时,不干扰细菌内毒素检查。因此,替尼泊昔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] 高明,赵丹.沙利度胺联合替尼泊昔对人胃腺癌移植瘤生长的影响[J].中国医药指南,2013,11(23):58.
- [2] Wang M, Ming G, Wei H, et al. Oxaliplatin and teniposide can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of

gastric cancer cell line BGC-823 synergistically[J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2010, 3(9): 149.

- [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、XIX.
- [4] 百时美施贵宝公司.替尼泊昔注射液说明书[S].2011-02-10.
- [5] 曾云胜.复方甘草酸苷注射液的细菌内毒素检查[J].中国医院药学杂志,2013,33(17):1456.
- [6] 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建立[J].中国药房,2013,24(17):1602.
- [7] 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.
- [8] 杨娟,李昇刚,朱爱民.环磷腺苷注射液的细菌内毒素检查方法探讨[J].中国药师,2013,16(1):145.

(收稿日期:2014-01-09 修回日期:2014-03-08)

\* 主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:0311-85212004-8085。E-mail: guo19830723@163.com