

注射用磷酸肌酸钠中细菌内毒素的检测

王宗春,罗丽萍,周延安,宋金春

(武汉大学人民医院药学部,湖北 武汉 430060)

摘要:考察采用鲎试剂方法检测注射用磷酸肌酸钠中细菌内毒素的可行性。选择灵敏度为 0.5 EU/mL 的鲎试剂,通过对不同浓度的注射用磷酸肌酸钠供试品溶液进行细菌内毒素与鲎试剂之间凝集反应的干扰试验,结果显示:浓度为 2.0 mg/mL 的供试品溶液对鲎试剂与细菌内毒素之间的凝集反应既无抑制作用,也无增强作用。因此,使用鲎试剂方法检测注射用磷酸肌酸钠中细菌内毒素具有简便、快捷、可靠等优点。

关键词:细菌内毒素;鲎试剂;注射用磷酸肌酸钠

中图分类号:R927.12

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2010.11.008

0 引言

注射用磷酸肌酸钠是一种化学药制剂,原料药化学名为 N-[亚胺基(胍氨基)-甲基]-N-甲基甘氨酸二钠盐四水合物,临床主要用于缺血状态下的心肌代谢异常,也可用于心脏手术时加入心脏停搏液中保护心肌等。采用鲎试剂方法检测样品中细菌内毒素具有灵敏度高、重现性好、简便易行等优点,已被各国药典所采用。笔者参照中国药典 2010 年版(二部)^[1]以及《中国药品检验标准操作规范》2005 年版^[2],应用鲎试剂方法对注射用磷酸肌酸钠进行了研究,为该品种细菌内毒素检测方法的建立提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器

SW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);恒温水浴箱(江苏南通嘉程仪器有限公司);微量取液器(50~250 μ L)(上海金林生化试剂仪器厂);细菌内毒素检查用具(厦门鲎试剂实验厂)。

1.2 药品与试剂

注射用磷酸肌酸钠(海口奇力制药股份有限公司,批号:20090802,20100213,20100422,规格 0.5 g);细菌内毒素检查用水(BET 水,厦门鲎试剂实验厂,批号:090816,每支 10 mL);细菌内毒素工作标准品(中国生物制品检定所,批号:2009-7,每支 10 EU);鲎试剂(厦门鲎试剂实验厂,批号:091149,灵敏度:0.5 EU/mL);鲎试剂(湛江安度

斯生物有限公司,批号:090325,灵敏度:0.5 EU/mL)。

1.3 实验方法

1.3.1 鲎试剂灵敏度复核 将细菌内毒素工作标准品用 BET 水溶解,在旋涡混合器上混匀 15 min,然后稀释成 2.0,1.0,0.5,0.25 λ (灵敏度标示值)4 个内毒素单位浓度等级,依法^[1]进行灵敏度复核试验。

1.3.2 细菌内毒素限值(L)的确定^[1,3] 按照注射用磷酸肌酸钠说明书,本品临床每次用量为 1 g,在 30~45 min 内静脉滴注,故人用每千克体重每小时的最大供试品剂量 $M = 1\ 000 / (50 \times 1) = 20\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ (输液时间不足 1 h 按 1 h 计算,人平均体重按 50 kg 计算),静脉注射剂的每千克体重每小时最大可接受的细菌内毒素剂量 K 为 5 EU/(kg·h),因此本品的细菌内毒素限值 $L = K/M = 0.25\text{ EU}/\text{mg}$ 。

1.3.3 样品最小有效稀释浓度(C)的确定 样品有效稀释浓度 $C = \lambda/L$,其中 λ 为鲎试剂常用灵敏度, L 为细菌内毒素限值,即 0.25 EU/mg,目前市售的鲎试剂 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 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL。

1.3.4 干扰预试验 用 BET 水将注射用磷酸肌酸钠稀释成浓度分别为 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL 的系列溶液,作为供试品阴性对照(NPC)系列。另制备同样浓度的供试品系列溶液,使每一浓度的供试品溶液中都含有 2 λ 内毒素,作为供试品阳性对照(PPC)系列。每一供试品浓度重

收稿日期:2010-07-27

作者简介:王宗春(1967-),男,江西宜春人,副主任药师,博士。研究方向:药物制剂及分析。

复两管,按常规设立阳性对照(PC)管和阴性对照(NC)管^[4-5]。用 λ 为0.5 EU/mL的鲎试剂与上述NPC和PPC系列溶液进行反应。将反应管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入(37±1)℃恒温水浴箱中,保温(60±2) min,将反应管轻轻取出,缓缓倒转180°,观察结果,若管内形成凝胶,并且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性;未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。

1.3.5 干扰试验 根据干扰预试验结果,用质量浓度为2.0 mg/mL的注射用磷酸肌酸钠溶液及BET水分别稀释细菌内毒素工作标准品,配成细菌内毒素最终浓度为1.0、0.5、0.25、0.125 EU/mL的系列溶液,分别取0.1 mL加入到已复溶的两个不同厂家生产的鲎试剂(λ 为0.5 EU/mL)管内,每个浓度平行做4管,另取供试品溶液做2

支阴性对照(NC)管,同法进行供试品干扰试验。

1.3.6 样品的细菌内毒素检查 取3批注射用磷酸肌酸钠(每批各取5支),用BET水配成质量浓度为2.0 mg/mL的溶液,使用 λ 为0.5 EU/mL的鲎试剂,按中国药典2010年版(二部)附录细菌内毒素检查法操作。

2 结果和讨论

2.1 鲎试剂灵敏度复核

由于鲎试剂是一种生物制品,灵敏度常有变异。另外,贮存条件、出厂时间的不同有时也会影响灵敏度^[6],因此,在进行干扰试验前需进行灵敏度复核。表1结果显示灵敏度测定值 λ_c 均在0.5~2.0 λ 之间,说明两个不同鲎试剂生产厂家出厂的鲎试剂其灵敏度符合要求,可用于实验。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果
Table 1 The checking result of tachypleus ameboyte lysate's sensitivity(λ)

鲎试剂批号	λ /(EU/mL)	细菌内毒素单位浓度/(EU/mL)				NC	λ_c /(EU/mL)
		1.0	0.5	0.25	0.125		
091149	0.5	++++	++++	+- - -	- - - -	- -	0.42
090325	0.5	++++	++++	- - - -	- - - -	- -	0.50

2.2 干扰预试验

为了初步评价样品浓度对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质,以便筛选出对检查无干扰的样品浓度范围及相应的鲎试剂灵敏度,避免鲎试剂的浪费^[4-5]。本研究首先用BET水将注射用磷酸肌酸钠配制成浓度为2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL的系列溶液,依法^[1]进行干扰试验。

表2 注射用磷酸肌酸钠干扰预试验结果
Table 2 Results of beforehand interference test for creatine phosphate sodium for injection

鲎试剂批号	系列	样品质量浓度/(mg/mL)					PC	NC
		2.0	1.0	0.5	0.25	0.125		
091149	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	++	
	PPC	++	++	++	++	++		

表3 注射用磷酸肌酸钠干扰试验结果
Table 3 Results of interference test for creatine phosphate sodium for injection

鲎试剂批号	样品	细菌内毒素单位浓度/(EU/mL)				NC	Es	Et
		1.0	0.5	0.25	0.125			
090325	BET水	++++	++++	- - - -	- - - -	- -	0.50	
	20090802	++++	+++ -	- - - -	- - - -	- -		0.60
	20100213	++++	++++	+ - - -	- - - -	- -		0.42
	20100422	++++	++++	+ - - -	- - - -	- -		0.42
091149	BET水	++++	++++	+ - - -	- - - -	- -	0.42	
	20090802	++++	+++ -	- - - -	- - - -	- -		0.60
	20100213	++++	++++	- - - -	- - - -	- -		0.50
	20100422	++++	++++	+ - - -	- - - -	- -		0.42

2.4 样品中细菌内毒素的检测

将3批注射用磷酸肌酸钠配成浓度为2.0 mg/mL的溶液,用灵敏度为0.5 EU/mL的鲎试剂进行细菌内毒素检查,结果全部呈阴性,说明3批注射用磷酸肌酸钠细菌内毒素的限值均符合规定。

3 结 语

注射剂质量控制中,常采用家兔法控制热原(细菌内毒素),但是该法存在操作复杂、影响因素多且费时的缺点。鲎试剂方法具有操作简单、迅速且灵敏度高的特点。本研究采用两个不同厂家的鲎试剂(消除不同厂家生产的鲎试剂在配方、生产工艺、质量参数等方面存在差异的影响),对3个批号的注射用磷酸肌酸钠溶液(配制浓度为2.0 mg/mL)进行干扰试验,干扰试验结果显示Es在0.5~2.0 λ之间,且Fi在0.5~2.0 Fs范围内,按照中国药典2010版(二部)干扰试验的判断标准,浓度为2.0 mg/mL的注射用磷酸肌酸钠溶液不干扰细菌内毒素与鲎试剂的凝集反应。因此,使

用鲎试剂方法检测注射用磷酸肌酸钠中细菌内毒素是可行的,能够用于该品种的内毒素检测。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录99-102.
- [2] 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,2005:287-302.
- [3] 施震,尹银嘉,王宗春. 鲎试剂方法检测注射用盐酸头孢吡肟中细菌内毒素[J]. 中国抗生素杂志,2003,28(2):121-123.
- [4] 陈丹丹,黄清泉,王春仁. 医用聚乙二醇小梁碱液的细菌内毒素检测[J]. 药物分析杂志,2009,29(10):1762-1764.
- [5] 张德波,仲华. 注射用水溶性维生素细菌内毒素检查法质量标准研究[J]. 中国药品标准,2008,9(3):198-201.
- [6] 张义伟. 细菌内毒素检查的几点体会[J]. 中国实用医药,2010,5(3):86-87.

Detection of bacterial endotoxin in creatine phosphate sodium for injection

WANG Zong-chun, LUO Li-ping, ZHOU Yan-an, SONG Jin-chun

(Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: The feasibility for detecting the bacterial endotoxin in creatine phosphate sodium for injection via tachypleus amebocyte lysate test was evaluated. Using the tachypleus amebocyte lysate with sensitivity of 0.5 EU/mL, the experiment was carried out to study the interference effect of sample's concentration on the congregating reactivity between tachypleus amebocyte lysate and bacterial endotoxin. The results showed that samples had no inhibitive or enhanced effect on the congregating reactivity when sample's concentration was 2.0 mg/mL, indicating that the method of tachypleus amebocyte lysate test for detecting the bacterial endotoxin in creatine phosphate sodium for injection is simple, rapid and reliable.

Key words: bacterial endotoxin; tachypleus amebocyte lysate; creatine phosphate sodium for injection

本文编辑:张瑞