

注射用氨磷汀细菌内毒素检查方法的建立

李龙健*, 陆金花(武警浙江总队医院, 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)01-0076-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.27

摘要 目的:建立注射用氨磷汀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,通过预干扰和干扰试验确定样品最大无干扰浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至5.00 mg/ml时对细菌内毒素检查法无干扰作用。结论:建立的方法用于检查注射用氨磷汀的细菌内毒素可行。

关键词 注射用氨磷汀;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Amifostine for Injection

LI Long-jian, LU Jin-hua (Zhejiang Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Amifostine for injection. METHODS: Maximal non-interference concentrations of samples were determined by pre-interference test and interference test according to the appendix of *Chinese Pharmacopiea* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when the sample was diluted to below 5.00 mg/ml. CONCLUSIONS: The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Amifostine for injection.

KEYWORDS Amifostine for injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot; Interference test

注射用氨磷汀为正常细胞保护剂,主要用于各种癌症的辅助治疗。在对肺癌、卵巢癌、乳腺癌、鼻咽癌、骨肿瘤、消化道肿瘤、血液系统肿瘤等多种癌症患者进行化疗前应用本品,可明显减轻化疗药物所产生的肾脏、骨髓、心脏、耳及神经系统的毒性,同时并不降低化疗药物的药效^[1]。笔者通过试验探讨用《中国药典》凝胶法^[2]检测注射用氨磷汀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(天津市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(浙江嘉兴新腾电器设备有限公司);玻璃器材包括试管、刻度吸管等均经250℃干烤1h除细菌内毒素处理。

1.2 药品与试剂

注射用氨磷汀(湖北葛店人福药业有限公司,批号:120103、120104、120403,规格均为:每支500mg);鲎试剂[湛江安度斯生物有限公司,批号:1010211,标示灵敏度(λ)=0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1007121, λ =0.25 EU/ml。规格均为:每支0.1ml];细菌内毒素工作标准品(CSE,批号:1010150,规格:每支10EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:1011230,规格:每支5ml)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,置于漩涡混合器混合15min,然后制成浓度为2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、

0.25 λ (0.50、0.25、0.125、0.0625 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^[2]。结果2批鲎试剂灵敏度均在0.5 λ ~2.0 λ 范围内,均符合《中国药典》规定,可用于细菌内毒素检查,结果见表1(表中“+”指阳性反应,“-”为阴性反应,下表同)。

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				λ , EU/ml
	0.50	0.25	0.125	0.0625	
1010211	+++	+++	----	----	0.25
1007121	+++	+++	----	----	0.25

2.2 样品细菌内毒素限值(L)的确定^[3-4]

按2010年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定, $L=K/M$, K 为按规定的给药途径人用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大供试品剂量,从注射用氨磷汀的产品使用说明书可知本品单次静注剂量为600 mg/m²。按细菌内毒素检查法限值确定,人均体质量按60 kg、人体表面积按1.62 m²、静注时间按1 h计算, $L=K/M=0.30$ EU/mg。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 $L=0.1$ EU/mg。

2.3 供试品最大有效稀释倍数(MVD)的确定

按2010年版《中国药典》细菌内毒素检查法的规定, $MVD=cL/\lambda$ 。本品为注射用无菌粉末, $MVD=1$,则 $c=\lambda/L=0.25/0.1=2.5$ mg/ml。对应本品10 ml规格,则最大有效稀释倍数为20倍。

2.4 预干扰试验

取3批注射用氨磷汀各1瓶,分别加BET水10 ml溶解,制

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

成 50 mg/ml 的供试品原液 (pH 为 5.63), 用 BET 水再将供试品原液按 5、7.5、10、12.5、15 倍进行倍比稀释, 制得 10.00、6.67、5.00、4.00、3.33 mg/ml 共 5 个质量浓度梯度的溶液, 将此系列浓度样品溶液记为 NPC; 用上述稀释液作为溶剂, 分别溶解并稀释 CSE, 制得每个稀释液中细菌内毒素含量均为 2.0 λ (0.5 EU/ml) 的含样品内毒素溶液, 记为 PPC; 同时平行做阳性对照管 PC 及阴性对照管 NC 各 2 管, 结果见表 2。

表 2 样品干扰试验结果

Tab 2 Results of preliminary interference test of sample

样品批号		系列	供试品质量浓度, mg/ml					PC	NC
鲎试剂	供试品		10.00	6.67	5.00	4.00	3.33		
1010211	120103	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		
	120104	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		
	120403	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		
1007121	120103	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		
	120104	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		
	120403	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	++	++	++		

由表 2 结果可知, 3 批样品稀释到 5.00 mg/ml 或以下质量浓度的溶液时, 对 2 个厂家的鲎试剂与细菌内毒素反应无干扰作用。

2.5 干扰试验

根据预干扰试验结果, 取 3 个批号的注射用氨磷汀, 用 BET 水稀释成 5.00 mg/ml (10 倍) 的样品溶液, 将 CSE 分别稀释至 2 λ、1 λ、0.5 λ、0.25 λ 系列浓度与 2 个厂家鲎试剂 (λ 为 0.25 EU/ml) 反应, 按细菌内毒素检查法进行干扰试验, 计算 E_s 、 $E_t^{[2]}$, 结果见表 3。

表 3 样品干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test of sample

样品批号		内毒素浓度, EU/ml				NC	E_s 、 E_t , EU/ml	E_t/E_s
鲎试剂	供试品	0.5	0.25	0.125	0.0625			
1010211	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120103	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.21$	1.0
	120104	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	120403	++++	++++	---+	----	--	$E_t=0.21$	1.2
1007121	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_s=0.25$	
	120103	++++	++++	---+	----	--	$E_t=0.21$	1.2
	120104	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	120403	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0

由表 3 结果可知, E_s 在 2 λ~0.5 λ 之间, 且 E_t 在 2 E_s ~0.5 E_s 之间, 表明注射用氨磷汀 5.00 mg/ml 稀释液对 λ 为 0.25 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

取 3 个批号的供试品, 分别用 BET 水 10 倍稀释 (5.00 mg/ml), 使用 λ 为 0.25 EU/ml 的 2 个厂家的鲎试剂, 按文献^[2]方法进行内毒素检查, 并按要求做阳性 (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

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test of sample

批号		供试品质量浓度, mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
鲎试剂	供试品					
1010211	120103	5.00	--	++	++	--
	120403	5.00	--	++	++	--
	120104	5.00	--	++	++	--
1007121	120103	5.00	--	++	++	--
	120403	5.00	--	++	++	--
	120104	5.00	--	++	++	--

由表 4 结果可知, 供试品 (NPC) 和 BET 水 (NC) 阴性对照管结果均为阴性, 表明样品中未检出细菌内毒素; 供试品 (PPC) 和 BET 水 (PC) 阳性对照管结果均为阳性, 表明试验有效。本试验结果表明 3 批注射用氨磷汀的细菌内毒素检查均符合规定。

3 讨论

通过预干扰试验可以评价注射用氨磷汀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质量浓度范围。而干扰试验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, 由于不同厂家的鲎试剂生产工艺、质量参数等方面有一定差异, 其抗干扰能力存在差异, 所以本试验采用 2 个不同厂家的鲎试剂 (λ=0.25 EU/ml) 对 3 个批号的样品进行试验。试验结果表明, 注射用氨磷汀稀释至 5.00 mg/ml 及以下质量浓度后与灵敏度为 0.25 EU/ml 的鲎试剂反应无抑制性干扰, 不干扰细菌内毒素检查。因此, 注射用氨磷汀用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

参考文献

- [1] 王蜀梅. 氨磷汀在肿瘤治疗中的应用与不良反应[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(10): 1 313.
- [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 99-101、213.
- [3] 徐冬, 徐玲笑. 注射用夫西地酸钠细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药房, 2012, 23(9): 844.
- [4] 刘雪莉, 张敏, 袁坤, 等. 克林霉素磷酸酯注射液细菌内毒素检查限值的研究[J]. 中国药房, 2012, 23(5): 443.

(收稿日期: 2013-04-01 修回日期: 2013-06-25)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅