

鲎试剂检测注射用肌氨肽苷中细菌内毒素

徐成坤,李 卓

(南华大学附属第一医院药剂科,湖南 衡阳,421001)

摘 要: **目的** 考察使用鲎试剂方法检测注射用肌氨肽苷中细菌内毒素的可行性。**方法** 按照中国药典 2010 年版(二部)附录 XI E 细菌内毒素检查法,用 2 个厂家的鲎试剂对 4 个批号的注射用肌氨肽苷进行干扰试验。

结果 注射用肌氨肽苷原液对鲎试剂与细菌内毒素之间的凝集反应有抑制作用,将注射用肌氨肽苷样品质量浓度稀释至 $1.4 \mu\text{g/mL}$ 后,使用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂进行实验,干扰消失。**结论** 使用鲎试剂方法检测注射用肌氨肽苷中细菌内毒素是可行的。

关键词: 注射用肌氨肽苷; 细菌内毒素; 鲎试剂; 干扰实验

中图分类号: R927.12 **文献标识码:** A

Bacterial Endotoxin Limulus Amebocyte Lysate Test in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides Injection

XU Chengkun, LI Zhuo

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** The feasibility for detecting the bacterial endotoxins in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides Injection via tachypleus amebocytelysate test was evaluated. **Methods** Using the tachypleus amebocyte lysate produced by two manufacturers, interference test of 4 batches of samples was performed in accordance with appendix XI E, volume two, Chinese pharmacopoeia (2010 edition). **Results** Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides Injection had inhibitive effect on the bacterial endotoxins test, but this interference was eliminated when the samples was diluted in $1.4 \mu\text{g/mL}$ below, using tachypleus amebocyte lysates with the sensitivity λ of 0.25 EU/mL . **Conclusion** The method of tachypleus amebocytelysate test is feasible for detecting the bacterial endotoxins in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides Injection.

Key words: muscular amino acids and peptides and nucleosides injection; bacterial endotoxins; tachypleus amebocyte lysate; interference test

注射用肌氨肽苷是从健康家兔肌肉和心肌中提取的,主要含多肽、氨基酸、核苷及核苷酸等。其中多肽为降钙素基因相关肽,是生物体内具有代表性的一种活性多肽,其舒血管作用是目前已知药物中最强的,同时它还具有增强心肌收缩力、抗心律失常等药理作用;核苷酸和多种氨基酸(必需氨基酸)是参与人体生命活动的重要物质,对心血管系统疾病

有改善血液循环障碍、降低血管阻力、增加心肌利用氧等作用,能促进造血系统活动增强,淋巴细胞数量增多,同时有增加血管弹性、防止血管硬化作用。临床主要用于脑功能紊乱;脑卒中、脑部血液不足所致脑功能减退;周围神经疾病;也可用于治疗冠心病、心力衰竭等疾病。细菌内毒素检查法具有灵敏度高、快速、准确、操作简便等优点,作者参照中国药典 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肌氨肽苷进行了研究。现将具体研究情况报道如下。

1 材料

1.1 仪器

SW—80A 型旋涡混合器（上海医科大学仪器厂）；电热恒温水温箱（SHY—2A,江苏金坛市金城国胜实验厂）；微量取液器（50 ~ 250 μL）（上海其林生化试剂仪器厂）；试验所用的玻璃器皿经重铬酸钾浓硫酸洗液处理后再以 250 ℃烘烤 2 h 去除外源性的细菌内毒素。

1.2 试药

鲎试剂（TAL,湛江博康海洋生物制品厂,批号为 0701062、灵敏度 λ = 0.125 EU/mL 和批号为 0702140、灵敏度 λ = 0.25 EU/mL；厦门鲎试剂试验厂,批号为 20061012、灵敏度 λ = 0.125 EU/mL 和批号为 20070202、灵敏度 λ = 0.25 EU/mL）；细菌内毒素检查用水（BET 水,中国药品生物制品检定所,批号为 200602,规格为 10 mL/支）；细菌内毒素工作标准品（中国药品生物制品检定所,批号 1402—2007—3,效价为 120 EU/支,规格为 10 支/盒）；注射用肌氨肽苷（北京赛生通药业股份有限公司,批号为 200912212,200912213,201001183,201001302,规格为（多肽 8.75 mg + 次黄嘌呤 1.25 mg）/支。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂（TAL）灵敏度复核

按照《中国药典（二部）》附录 XIE 细菌内毒素检查法的规定^[1],进行鲎试剂（TAL）灵敏度复核实验,结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核实验结果

鲎试剂 (批号)	细菌内毒素浓度 (EU/mL)				阴性 对照	灵敏度 (λ _c)
	0.5000	0.2500	0.1250	0.0625		
0701062	++++	++++	++++	----	--	0.125
0702140	++++	++++	----	----	--	0.250
20061012	++++	++++	++++	----	--	0.125
20070202	++++	++++	----	----	--	0.250

注：“+”为形成凝胶且倒置不变型,代表阳性反应,“-”为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变型,代表阴性反应,“+”及“-”的数量分别代表平行实验的次数

结果表明四批鲎试剂的实测灵敏度 λ_c 值均为 1.0 λ,实测灵敏度在 0.5 λ ~ 2.0 λ 之间,两个厂家四批鲎试剂灵敏度标示均符合规定,均可按标示灵

敏度值用于试验。

2.2 注射用肌氨肽苷中细菌内毒素限值的确定^[3-4]

细菌内毒素限值 L = K/M,式中 K = 5 EU/kg · h;由于注射用肌氨肽苷在临床上成人最大用量为 17.5 mg(以多肽计)/次,溶解后加入 500 mL 0.9% 氯化钠注射液或 5% ~ 10% 葡萄糖注射液中,缓慢滴注,滴注速度 2 mL/min,人均体重按 60 kg 计算,静脉滴注 500 mL 输液的时间为 25/6 h,则 M = 17.5/(60 × 25/6)。因此确定:L = K/M = 5/[17.5/(60 × 25/6)] ≈ 71 EU/μg = 0.071 EU/μg。

2.3 注射用肌氨肽苷供试品干扰实验预实验^[5-6]

按照 2010 年版《中国药品检验标准操作规范》中细菌内毒素检查法进行干扰预试验。最大稀释倍数 MVD = C_L/λ,如供试品为注射用无菌粉末,则 MVD 取 1,可计算供试品的最小有效稀释浓度 C = λ/L 目前国内市售 TAL(鲎试剂)最高灵敏度为 0.03 EU/mL,最低灵敏度为 0.5 EU/mL。经计算 C_{最大} = 7.0 μg/mL, C_{最小} = 0.42 μg/mL,以 7 μg/mL 为基准稀释质量浓度,倍比稀释得系列质量浓度为 7.0、3.5、1.4、0.7、0.35 μg/mL 的供试品溶液,记为 NPC。此外在重复做供试品系列的过程中,每一质量浓度的供试品溶液加入 2 λ 细菌内毒素,记为 PPC。取 λ 为 0.25 EU/mL 的不同厂家的 TAL,分别与上述 NPC(供试品阴性对照)和 PPC(供试品阳性对照)进行反应,并同时作阴性对照(NC)(每管加入鲎试剂和 BET 水各 0.1 mL)和阳性对照(PC)(每管加入鲎试剂和细菌内毒素标准溶液各 0.1 mL),结果见表 2。

结果表明,阴性对照为阴性,阳性对照为阳性,试验有效。肌氨肽苷质量在浓度为 3.5 μg/mL 及以上时对 TAL 与内毒素反应存在抑制作用;质量浓度为 1.4 μg/mL 及以下时无干扰,不同厂家的 TAL 检测结果一致,故以此浓度进行正式干扰试验。(注:两厂家的鲎试剂实验结果一致。)

2.4 注射用肌氨肽苷供试品干扰实验

注射用肌氨肽苷供试品的质量浓度为 1.4 μg/mL,而注射用肌氨肽苷中细菌内毒素限值为 0.071 EU/μg,其两者的乘积与 λ 为 0.125 EU/mL 的 TAL 最接近,故选 λ 为 0.125 EU/mL 的 TAL 进行感染实验。按 2010 年版《中国药典(二部)》附录中细菌内毒素检查法的干扰试验项方法进行试验和结果判断,结果见表 3。

表2 注射用肌氨肽苷细菌内毒素干扰预实验结果

注射用肌氨肽苷 供试品批号	项目	注射用肌氨肽苷供试品质量浓度(μg/mL)					NC	PC
		7.00	3.50	1.40	0.70	0.35		
200912212	NPC/PPC	----	----	---+	----+	---+	--	++
200912213	NPC/PPC	----	----	---+	----+	---+	--	++
201001183	NPC/PPC	----	----	---+	----+	---+	--	++
201001303	NPC/PPC	----	----	---+	----+	---+	--	++

注：“+”代表阳性反应,“-”代表阴性反应,“+”及“-”的数量代表平行实验的次数.NC:阴性对照,PC:阳性对照

表3 注射用肌氨肽苷细菌内毒素干扰实验结果

注射用肌氨肽苷 供试品批号	细菌内毒素浓度(EU/mL)				NC	TC	E _s	E _t
	0.250	0.125	0.060	0.030				
BET 检查用水	++++	++++	----	----	--		0.125	
200912212	++++	++++	----	----		--		0.125
200912213	++++	++++	----	----		--		0.125
201001183	++++	++++	----	----		--		0.125
201001303	++++	++++	----	----		--		0.125

注：“+”代表阳性反应,“-”代表阴性反应,“+”及“-”的数量代表平行实验的次数

结果表明,E_s(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)在 0.5 λ ~ 2.0λ 之间,且 E_t(用供试品溶液制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值)均在 0.5 E_s ~ 2.0 E_s 之间,说明注射用肌氨肽苷供试品溶液质量浓度在 1.4 μg/mL 时,用 TAL 测定(TC)注射用肌氨肽苷中的细菌内毒素结果无影响。

2.5 注射用肌氨肽苷供试品检查实验

根据细菌内毒素限值,取 4 批注射用肌氨肽苷用 BET 水配制成浓度为 1.4 μg/mL 的供试品溶液,依《中国药典》2010 年版二部附录 XIE 细菌内毒素检查法对其进行细菌内毒素的检查,结果表明,4 批样品的细菌内毒素检查均符合规定(见表 4)。

表4 注射用肌氨肽苷细菌内毒素检查实验结果

鲎试剂(批号)	注射用肌氨肽苷 供试品(批号)	注射用肌氨肽苷 供试品(1.4 μg/mL)	注射用肌氨肽苷供试品 阳性对照(PPC)	阳性对照	阴性对照
0702140	200912212	--	++	++	--
	200912213	--	++	++	--
	201001183	--	++	++	--
	201001303	--	++	++	--
20070202	200912212	--	++	++	--
	200912213	--	++	++	--
	201001183	--	++	++	--
	201001303	--	++	++	--

注：“+”为形成凝胶且倒置不变型,代表阳性反应,“-”为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变型,代表阴性反应,“+”及“-”的数量代表平行实验的次数

3 讨 论

细菌内毒素是革兰氏阴性菌的细胞壁成分,当细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素。当内毒素大量进入血液就会引起热原反应。因此,生物制品类、注射用药品、化学类药品、透析液等制剂以及医疗器

材类(如一次性注射器,植入性生物材料等)必须经过细菌内毒素检测试验,合格后才能使用。细菌内毒素检查法实验应严格操作规程,pH、温度、恒温时间、内毒素工作对照品、混漩时间等因素均影响实验结果的可靠性。

(下转第 430 页)

(上接第 427 页)

药物能否采用细菌内毒素检查的先决条件是证明其在满足限度检查要求浓度下对细菌内毒素无干扰作用,因此此实验研究需进行干扰实验。干扰预试验的目的是初步评价样品浓度(或稀释倍数)对鲎试剂与细菌内毒素之间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(或稀释倍数)范围及相应的鲎试剂灵敏度,避免鲎试剂的浪费。干扰试验结果显示 E_s 在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间,且 E_t 在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$ 范围内,按照中国药典 2010 版(二部)干扰试验判断标准,将注射用肌氨肽苷供试品溶液稀释到质量浓度在 $1.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时不干扰细菌内毒素与鲎试剂之间的凝集反应,所以可以用 TAL 对其进行内毒素检查。

细菌内毒素检查法具有灵敏度高,重现性好,快速、简便,费用低等优点,目前已被各国药典所收载和应用,作为替代热原检查法用于控制注射剂的质量。本实验研究结果表明,采用鲎试剂进行注射用肌氨肽苷细菌内毒素检测是可行的,本实验结果也

为完善和提升注射用肌氨肽苷的质量标准提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;附录 85.
- [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.
- [3] 朱勇强,李卓. 鲎试剂法检测香丹注射液中的细菌内毒素[J]. 南华大学学报:医学版,2008,36(6):816-817.
- [4] 李卓,肖美珍,鲎试验检测甲硝唑葡萄糖注射液热原的实验观察[J]. 衡阳医学院学报,2000,28(4):391.
- [5] 黄江红,孙华芳,姚伟生,等. 疏罗宁注射液细菌内毒素检查方法的建立[J]. 湖北中医学院学报,2010,12(2):22-24.
- [6] 陈丹丹,黄清泉,王春仁. 医用聚乙二醇小檗碱液的细菌内毒素检测[J]. 药物分析杂志,2009,29(10):1762-1764.

(此文编辑:秦旭平)