

鲎试剂用于三磷酸腺苷二钠注射液细菌内毒素检测的探讨

刘一波 王小慧(惠州 516001 广东惠州市药品检验所)

摘要 目的:考察三磷酸腺苷二钠(ATP)注射液细菌内毒素检查法的可行性。方法:按中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法和细菌内毒素检查法应用指导原则要求进行试验。结果:将样品稀释成热原检查浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 无干扰作用。结论:将样品稀释 10 倍(浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),可用灵敏度 $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂作细菌内毒素检查。

关键词 三磷酸腺苷二钠注射液;细菌内毒素;干扰试验

The Discussion On Bacterial Endotoxin Inspection Method of Monitoring Pyrogen Injection by TAL

Liu Yibo, Wang Xiaohui(Hui Zhou Institute for Drug Control, Guangdong Huizhou 516001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To inspect the feasibility of bacterial endotoxin testing method to monitor pyrogen injection. **METHOD:** The test was conducted according to bacterial endotoxin test method and the application guide request of bacterial endotoxin test method included in the China Pharmacopeia, 2000. **RESULTS:**There was no interfering with $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of the sample solution, as the test density with rabbit. **CONCLUSION:**monitoring pyrogen injection diluted up 10 times ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of the sample solution) could be tested by tachypleus amebocyte lysate of which the sensitivity was $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$.

KEY WORDS monitoring pyrogen injection, bacterial endotoxin, Interferential test

三磷酸腺苷二钠(ATP)注射液为临床广泛应用的辅酶类药物,热原检查采用家兔法^[1]。方法为:将 ATP 注射液加注射用水制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,剂量按家兔体重注射 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本文参考中国药典 2000 年版“细菌内毒素检查法”^[2]和“细菌内毒素检查法应用指导原则”^[3],对三磷酸腺苷二钠

(ATP)注射液细菌内毒素检查进行了方法学研究,为其热原用细菌内毒素法代替提供参考。

1 材料

鲎试剂(批号 000810,标示灵敏度 $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$);细菌内毒素工作标准品(批号 000301, $10 \text{ Eu}/\text{支}$);细菌内毒素检查

用水 BET 水(批号 000801,内毒素含量 $<0.01 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。以上均为厦门鲎试剂厂产品;鲎试剂(批号 010608,标示灵敏度 $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$);细菌内毒素工作标准品(批号 010601, $10 \text{ Eu}/\text{支}$);细菌内毒素检查用水 BET 水(批号 000711,内毒素含量 $<0.03 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} 6.8 \sim 7.2$)以上均为湛江海洋生物制品厂产品;三磷酸腺苷二钠注射液(批号 000911,000922,000927,规格 $2 \text{ mL}:20 \text{ mg}$,郑州春都药业有限公司)。三批样品经家兔热原检查,结果均符合规定。

电热恒温水浴箱,液体旋涡混合器等。玻璃试管、吸管等均经 250°C 干烤 1 h 以上。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核 按中国药典 2000 年版二部“细菌内毒素检查法”^[2]操作,结果见表 1 和表 2。

表 1 ATP 注射液干扰试验结果 1

样品	内毒素浓度($\text{Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$)				阴性对照	反应终点浓度	
	1	0.5	0.25	0.125		$\text{Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$	Et/Es
BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5	
1 000911	++++	++++	----	----	--	0.5	1.0
2 000922	++++	++++	- - + -	----	--	0.42	0.8
3 000927	++++	++++	----	----	--	0.5	1.0

厦门鲎试剂厂(鲎试剂 000810,内毒素工作标准品 000301,BET 水 000801)

注:灵敏度 = $\text{antilg}(\lg 0.5 + \lg 0.5 + \lg 0.5 + \lg 0.5)/4 = 0.5$;
= $\text{antilg}(\lg 0.5 + \lg 0.5 + \lg 0.25 + \lg 0.5)/4 = 0.42$ 。

表 2 ATP 注射液干扰试验结果 2

样品	内毒素浓度($\text{Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$)				阴性对照	反应终点浓度	
	1	0.5	0.25	0.125		$\text{Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$	Et/Es
BET 水	++++	++++	- - + -	----	--	0.42	
1 000911	++++	++++	- - + +	----	--	0.35	0.8
2 000922	++++	++++	- - + +	----	--	0.35	0.8
3 000927	++++	++++	- - + -	----	--	0.42	1.0

湛江海洋生物制品厂(鲎试剂 010608,内毒素工作品 010601,BET 水 000711)

注:灵敏度 = $\text{antilg}(\lg 0.5 + \lg 0.5 + \lg 0.25 + \lg 0.5)/4 = 0.42$;
= $\text{antilg}(\lg 0.5 + \lg 0.5 + \lg 0.25 + \lg 0.25)/4 = 0.35$ 。

从表 1 和表 2 结果看,当鲎试剂的 Es (BET 水)在 $0.5 \sim 2.0 \lambda$,且三个批号供试品中的 Et 均在 $0.5 \text{ Es} \sim 2.0 \text{ Es}$ 范围内时,则认为供试品在该浓度下不干扰试验。

2.4 样品的细菌内毒素检查结果 将三批 RT 检查合格的供试品,用 BET 水配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,依法^[2]检查,结果供试品和阴性对照管均呈阴性,供试品阳性管和阳性对照管均呈阳性,试验结果成立。3 个批号供试品的细菌内毒素检查均符合规定,与家兔法结果一致。

3 讨论

根据样品细菌内毒素限值(L),采用灵敏度为 $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂检查时,计算得 ATP 的最大有效稀释倍数($\text{MVD} = \text{CL}/\lambda$)为 300 倍及最低有效浓度(MVC)为 $0.033 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 细菌内毒素限值(L)确定^[3]根据公式 $L = K/M$,式中 L 为细菌内毒素限值,K 为按规定的给药途径,人每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,非肠道给药途径的 $K = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,M 为用人用每公斤体重每小时最大给药剂量,以 $\text{mL}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 或 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 表示。小于一小时的,以一小时计。根据 ATP 注射液肌内注射或静脉滴注每次最大用量为 20 mg ,采用本品为 $2 \text{ mL}^{[1]}$,人体重按 60 kg 计算,应为: $L = K/M = 5/(20/60) = 15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 或 $L = 5/(2/60) = 150 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.3 干扰试验 将供试品,用 BET 水配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液(稀释 10 倍),分别用此溶液和 BET 水将细菌内毒素工作标准品稀释成 $1.0, 0.5, 0.25, 0.125 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 4 个浓度的内毒素溶液,每种浓度平行做 4 管,并做阴性对照。结果见表 1 和表 2。

笔者直接选择其热原检查浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (样品稀释 10 倍)为试验浓度。对于最高非抑制浓度还值得进一步试验探讨。

本试验结果证实,将三磷酸腺苷二钠注射液 1:10 稀释成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后对标灵敏度为 $0.5 \text{ Eu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂无干扰作用,细菌内毒素检查结果与兔法一致。

参考文献

1 卫生部药典委员会编.药品标准第六册.生化药品第一分册[S].1998:3.
2 中国药典[S].2000 二部.附录.86.
3 中国药典[S].2000 二部.附录.204.

收稿日期:2001 - 06 - 25