

肝素钙注射液的细菌内毒素检测研究

马静芬(宁波市药品检验所,浙江 宁波 315040)

摘要:目的 对肝素钙注射液进行细菌内毒素检查研究,建立检查肝素钙注射液中细菌内毒素的试验方法。方法 采用《中国药典》2000年版附录细菌内毒素检查法。结果 肝素钙注射液在稀释至500倍时检查细菌内毒素可完全排除干扰因素的影响。结论 使用细菌内毒素检查法检查肝素钙注射液中内毒素是可行的,可用细菌内毒素检查法代替家兔热原检查法。

关键词:肝素钙注射液;细菌内毒素检查;干扰试验;鲎试剂

中图分类号:R973.2;R927.12 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)03-0229-02

Study on The Bacterial Endotoxin Test for Heparin Calcium Injection

MA Jing-fen(Ningbo Institute for Drug Control , Ningbo 315040 , China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a method for control on endotoxin in Heparin Calcium Injection. **METHOD** Using bacterial endotoxin test approved by Chinese Pharmacopoeia (edition 2000). **RESULTS** The bacterial endotoxins test showing neither inhibition nor enhancement in diluted solution. **CONCLUSION** These results suggest that the technique of TAL-test could be used as an alternative method for the rabbit pyrogen test for Heparin Calcium Injection.

KEY WORDS:Heparin Calcium Injection; bacterial endotoxin test; interfere factors test; Limulus test

肝素钙注射液为抗凝血药,可抑制血液的凝结过程,用于防止血栓形成。临床上主要用于急性血栓栓塞性疾病;弥散性血管内凝血,尤其在高凝阶段可减少凝血因子的耗竭;体外抗凝剂。目前,卫生部药品标准^[1]中其污染的热原质检查为传统的家兔热原检查法,该法费时、费力、干扰因素多,结果重现性差。细菌内毒素检查法作为替代热原检查法的一种新的检测方法具有检测灵敏度高,检测周期短,检测结果准确等优点,目前已被各国药典所采纳。为此我们参照《中国药典》2000年版^[2]及《美国药典》25版^[3]“细菌内毒素检查法”中干扰试验原理,考察了肝素钙注射液对细菌内毒素检查的干扰情况,为该品种的细菌内毒素检查方法的建立提供依据。

1 实验材料

鲎试剂:批号010423,标示灵敏度0.25 EU/mL,规格0.1 mL/支,厦门鲎试剂厂;批号0302140,标示灵敏度0.25 EU/mL,规格0.1 mL/支,湛江安度斯生物有限公司。

细菌内毒素工作标准品:批号2001-3,规格70 EU/支,中国药品生物制品检定所。

细菌内毒素检查用水:批号W2001-4,规格10 mL/支,

中国药品生物制品检定所。

肝素钙注射液:批号20020124,20020412,20020414,20020510,20020724,20020907,规格1 mL:5000u,广东天普生化制药厂。

2 实验方法和结果

2.1 细菌内毒素限值的确定^[4]

药品细菌内毒素限值按公式 $L = K/M$, K为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂为 $5.0 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, M为每小时每公斤体重人的最大给药剂量,为 $10\,000 \text{ U}/(60 \text{ kg} \cdot \text{h})$,计算结果 $L = 5.0/10000/60 = 0.03 \text{ EU}/\text{u}$ 。《美国药典》25版肝素钙注射液^[5]细菌内毒素限值也为 $0.03 \text{ EU}/\text{u}$ 。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

对二个不同厂家生产的鲎试剂进行灵敏度复核,以细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品稀释成0.5,0.25,0.125,0.0625 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的一系列浓度,照《中国药典》2000年版二部附录操作,观察结果,计算各鲎试剂灵敏度实测值 λ_c ,结果均与标示灵敏度相同,为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。见表1。

表 1 两个不同厂家生产的鲎试剂灵敏度复核实验结果

Tab 1 Limulus test check from two different factory

鲎试剂批号	细菌内毒素标准品溶液浓度(EU·mL ⁻¹)				阴性对照	λ _c (EU·mL ⁻¹)
	0.5	0.25	0.125	0.0625		
010423	++++	++++	----	----	----	0.25
0302140	++++	++++	----	----	----	0.25

2.3 供试品的干扰试验

取一批肝素钙注射液用细菌内毒素检查用水稀释成:A(16.7u·mL⁻¹),B(12.5 u·mL⁻¹),C(10 u·mL⁻¹),D(8.3 u·mL⁻¹)四种浓度稀释液。分别用 A,B,C,D 溶解细菌内毒素工作标准品,并稀释成每 1 mL 中含细菌内毒素 0.5,0.25,0.125,0.0625EU·mL⁻¹的一系列浓度,采用二个不同厂家的鲎试剂参照《中国药典》2000 年版附录分别进行干扰试验,结果见表 2。另取 2 批供试品,重复上述试验,结果与表 2 相同。

2.4 样品的细菌内毒素检测

将样品稀释至 10 EU·mL⁻¹,以鲎试剂检测样品的细菌内毒素,同时作阴性对照,阳性对照,供试品阳性对照,结果 6

批样品均呈阴性。

表 2 肝素钙注射液干扰试验结果

Tab 2 Interfering test of Heparin Calcium Injection

样品(u·mL ⁻¹)	细菌内毒素浓度(EU·mL ⁻¹)				阴性对照
	0.5	0.25	0.125	0.0625	
16.7	----	----	----	----	----
12.5	----	----	----	----	----
10	++++	++++	----	----	----
8.3	++++	++++	----	----	----

2.5 热原检查

6 批样品热原检查均符合规定。

2.6 两法对照实验结果见表 3。

表 3 肝素钙注射液细菌内毒素法、热原法对照试验结果

Tab 3 Comparison test by bacterial endotoxin and pyrogen of Heparin Calcium Injection

方法	020124	020412	020414	020510	020724	020907
细菌内毒 供试品	-	-	-	-	-	-
阴性对照	-	-	-	-	-	-
素检查法 阳性对照	+	+	+	+	+	+
供试品 阳性对照	+	+	+	+	+	+
热原检查法	合格	合格	合格	合格	合格	合格

2.7 样品的最大有效稀释倍数^[6]

按公式 $MVD = CL \cdot \lambda^{-1}$, 式中 C 为 5000u·mL⁻¹, L 为肝素钙注射液的细菌内毒素限值 0.03 EU·u⁻¹, λ 为 0.25 EU·mL⁻¹, 计算得肝素钙注射液最大有效稀释倍数 MVD 为 600 倍。

我们于样品中加入细菌内毒素工作标准品,样品稀释至 10 u·mL⁻¹后,使加入的细菌内毒素终浓度为 0.25 EU·mL⁻¹,以鲎试剂进行细菌内毒素检测,同时作阴性对照,阳性对照,供试品阳性对照,结果 6 批均呈阳性。

3 讨论

3.1 干扰试验表明,将肝素钙注射液稀释至 10 u·mL⁻¹后,对标示灵敏度 0.25 EU·mL⁻¹的鲎试剂检查细菌内毒素无干扰作用。

3.2 我们选用的鲎试剂灵敏度为 0.25 u·mL⁻¹,样品的细

菌内毒素限值为 0.03 EU·u⁻¹,样品的最大有效稀释倍数 MVD=600 倍,将样品稀释至 500 倍(10 u·mL⁻¹)后即可排除干扰因素的影响进行样品的细菌内毒素检测。

3.3 两法符合率为 100%,与传统的家兔热原检查法相比,细菌内毒素检查法具有操作简便,结果准确,检测灵敏度高等优点。因此用细菌内毒素检查法来检测肝素钙注射液中的细菌内毒素是可行的。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准.(二部)[S]. 第六册 1998, 53.
 [2] 中国药典.2000 年版二部[S].2000.附录 86:204.
 [3] 美国药典.25 版[S].2002:1889:838.

收稿日期:2002-12-23