

奥沙利铂注射制剂细菌内毒素检查法研究

张德波¹, 蒲旭峰¹, 杨奎² ((1. 成都市药品检验所, 四川 成都 610021; 2. 成都中医药大学)

摘要:目的 建立奥沙利铂注射制剂细菌内毒素检查法质量标准。方法 按中国药典 2000 年版二部, 确定合理的奥沙利铂注射液和注射用奥沙利铂细菌内毒素限值, 并研究两种注射制剂对细菌内毒素与鲎试剂反应的干扰情况, 以确定其最大不干扰试验浓度。结果 根据临床实际情况, 将注射用奥沙利铂和奥沙利铂注射液的内毒素限值定为 $1 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较为合适, 研究证明本品最大不干扰浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最佳实验浓度为不大于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 注射用奥沙利铂和奥沙利铂注射液均可以采用细菌内毒素检查法替代热原检查法。

关键词: 奥沙利铂注射液; 注射用奥沙利铂; 细菌内毒素检查; 干扰试验

中图分类号: R927.12; R979.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)06-0487-04

Study on testing for bacterial endotoxin in oxaliplatin

ZHANG De-bo¹, PU Xu-feng¹, YANG Kui² (1. Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610021, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of examining bacterial endotoxin for oxaliplatin injection and oxaliplatin for injection. **METHOD** According to bacteria endotoxin test and eliminated interfere factors approved by Chinese Pharmacopoeia 2000. **RESULTS** The most suitable limit of bacterial endotoxin in preparations for injection of oxaliplatin was $1 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. It was proved that the maximum noninterference concentration was $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the best testing concentration was no more than $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** This method for bacterial endotoxin is accurate and reliable and can replace the pyrogen test.

KEY WORDS: oxaliplatin injection; oxaliplatin for injection; bacterial endotoxins test; interference test

奥沙利铂属于新的铂类衍生物, 能通过产生烷化结合作用于 DNA, 形成链内和链间交联, 从而抑制 DNA 的合成及

复制, 主要适用于经过氟尿嘧啶治疗失败后的结、直肠癌转移的患者, 可单独或联合氟尿嘧啶使用。注射用奥沙利铂目

前执行的质量标准是热原检查法;而奥沙利铂注射液为新申报的制剂。本研究按照中国药典 2000 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法、附录 XIX F 细菌内毒素检查法应用指导原则及中国药品检验标准操作规范 2000 年版细菌内毒素检查法对奥沙利铂两种注射制剂的细菌内毒素检查法进行了研究,建立了其细菌内毒素检查质量标准。

1 实验材料

1.1 鲎试剂

标示灵敏度(λ) 0.25 EU/ mL,规格:10 × 0.1 mL/支,批号:0203251,0306021;标示灵敏度(λ) 0.5 EU/ mL,规格:10 × 0.1 mL/支,批号:0208092,0306021;标示灵敏度(λ) 0.125 EU/ mL,规格:10 × 0.1 mL/支,批号:0306182;湛江安度斯生物有限公司生产。

标示灵敏度(λ) 0.25 EU/ mL,规格:10 × 0.1 mL/支,批号:20020731,20030402;标示灵敏度(λ) 0.5 EU/ mL,规格:10 × 0.1 mL/支,批号:20021030,20031224,湛江海洋鲎试剂厂生产。

1.2 细菌内毒素检查用水

规格:10 × 2 mL/支,批号 0111200,含细菌内毒素 < 0.01 EU/ mL;规格:10 × 5 mL/支,批号 0210090;规格:10 × 5 mL/支,批号 0311050,含细菌内毒素 < 0.015 EU/ mL,湛江安度

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Sensitivity verification of TAL

TAL		细菌内毒素工作标准品液浓度(EU·mL ⁻¹)				阴性 NC	实测灵敏度 (EU·mL ⁻¹)
Lot. No	Sensitivity(EU·mL ⁻¹)	2λ	λ	0.5λ	0.25λ		
20021030	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5
0208092	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5
0203251	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
20020731	0.25	++++	----	----	----	--	0.5
0306182	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
0306111	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
0306021	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5
20031224	0.5	++++	++++	----	----	--	0.5
20030402	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25

注:(+)为形成凝胶且倒置不变形,(-)为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变形。

Note:(+) gel formed and without change when inversion, (-) gel was not formed or gel formed but changed when inversion

表 1 结果显示:每一批鲎试剂灵敏度测得值均在 0.5λ~2.0λ 范围内,符合要求,均可按标示灵敏度值使用。

2.2 样品内毒素限值(L)的确定

临床用法用量:在单独或联合用药时,推荐剂量 130 mg/ m²(注射用奥沙利铂加入 250~500 mL 的 5%葡萄糖注射液)没有主要毒性出现时每 3 周(21 d)给药 1 次,输注 2~6 h。剂量的调整以安全性,尤其是神经学的安全性为依据。

给药剂量折算:60 kg 体重成人的体表面积一般为 1.73 m²,即成人一次最大用药量为 130 mg/ m² × 1.73 m² = 225 mg。

$$L = \frac{5.0 \text{ EU/kg} \cdot \text{h}}{225 \text{ mg} / 60 \text{ kg} \cdot 2 \text{ h}} = 2.66 \text{ EU/ mg}$$

综合考虑本品临床用药特点,为了达到临床用药的安全性,将本品细菌内毒素限值确定为 1 EU/ mg。

斯生物有限公司生产。

1.3 细菌内毒素工作标准品(冻干)

效价:180 EU/支,规格:10 支/盒,批号:2002-3;效价:100 EU/支,规格:10 支/盒,批号:2002-12,由中国药品生物制品检定所出品。

1.4 药品

奥沙利铂注射液,规格:100 mL,奥沙利铂 0.1 g 与甘露醇 5.1 g,批号:020511,020512,020513,四川美大康佳乐药业有限公司。注射用奥沙利铂,规格:50 mg,批号:20030601,20030801,20030802,成都世纪华洋制药有限责任公司。

1.5 其他

定量刻度移液管、玻璃试管(配液用)等玻璃器材按规定清洗,烘干后在干燥箱中 250℃ 干烤 1 h 除去热原质。

2 实验方法

2.1 鲎试剂灵敏度复核

取鲎试剂分别加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水复溶,然后各批复溶的鲎试剂分为四列,每一列 4 支,各列分别加入相应的 2.0λ,1.0λ,0.5λ,0.25λ 细菌内毒素工作标准品液,37~38℃ 水浴恒温 60 min 后取出观察结果。同时用细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照。记录结果,并按式 λ = antilog (Σ X/4) 计算实测灵敏度值,见表 1。

2.3 干扰试验预试验

两种制剂各取一批(020512 批和 20030801 批)样品,用细菌内毒素检查用水配制 1.0λ,0.5λ,0.25λ,0.125λ,0.0625 mg/mL 的供试溶液,分别复溶对应的鲎试剂,然后每一浓度供试液复溶的鲎试剂分为 2 列,分列 4 支,两列鲎试剂分别加入对应的 2.0λ,0.25λ 内毒素工作标准品液,37~38℃ 水浴恒温 60 min 后取出观察结果。同时,每一浓度的供试液设供试液阴性对照管。另外同时设细菌内毒素检查用水阴性对照和阳性对照管。结果:加入 2.0λ 内毒素液各浓度管均呈阳性,加 0.25λ 内毒素液各浓度管均呈阴性,表明两种制剂在浓度不大于 1 mg/ mL 时即可能对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用。

2.4 供试品干扰试验

用细菌内毒素检查用水和浓度为 1,0.5 mg/ mL 的供试品液分别复溶 TAL,各分为四列,每列 4 支;各对应列分别加入 2.0,1.0,0.5,0.25 λ 的细菌内毒素工作标准品溶液。同时设各浓度的供试品液阴性对照管,以及 BET 水复溶 TAL

表 2 两种奥沙利铂注射剂干扰试验结果(I)

Tab 2 Results of inhibition or enhance ment test for products(I)

药品	TAL(λ)	供试品		细菌内毒素工作标准品液浓度(EU $\cdot$ mL $^{-1}$)				阴性对照	终点 (EU $\cdot$ mL $^{-1}$)
		Lot No.	浓度 (mg/ mL)	2.0 λ	1.0 λ	0.5 λ	0.25 λ		
奥沙利铂注射液	0208092	BET 水		+	+	+	+	-	0.5
		020511	1	+	+	+	+	-	1.0
		020512	1	+	+	+	+	-	1.0
		020513	1	+	+	+	+	-	1.0
	20021030	BET 水		+	+	+	+	-	1.0
		020511	1	-	-	-	-	-	>1.0
		020512	1	-	-	-	-	-	>1.0
		020513	1	-	-	-	-	-	>1.0
注射用奥沙利铂	0306021	BET 水		+	+	+	+	-	0.5
		20030601	1	+	+	+	+	-	0.84
		20030801	1	+	+	+	+	-	1.0
		20030802	1	+	+	+	+	-	1.0
	20031224	BET 水	-	+	+	+	+	-	0.5
		20030601	1	+	+	+	+	-	1.0
		20030801	1	+	+	+	+	-	1.0
		20030802	1	+	+	+	+	-	1.0

注:(+)为形成凝胶且倒置不变形,(-)为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变形

Note:(+) gel formed and without change when inversion, (-) gel was not formed or gel formed but changed when inversion

从表 2 可见:(1)奥沙利铂注射液试验结果,用 0208092 批鲎试剂试验结果 $E_s=0.5$ EU/ mL, $E_t=1.0$ EU/ mL,且 $E_t/E_s=2.0$,可以认为无干扰(但严格地讲有一定的抑制性干扰作用)。用 20021030 批鲎试剂试验结果 $E_s=1.0$ EU/ mL, $E_t>1.0$ EU/ mL,说明 1 mg/ mL 的奥沙利铂注射液对反应有

表 3 两种奥沙利铂注射剂干扰试验结果(II)

Tab 3 Results of inhibition or enhance ment test for products(II)

药品	TAL(λ)	供试品		细菌内毒素工作标准品液浓度(EU $\cdot$ mL $^{-1}$)				阴性对照	终点 (EU $\cdot$ mL $^{-1}$)
		Lot No.	浓度 (mg/ mL)	2.0 λ	1.0 λ	0.5 λ	0.25 λ		
奥沙利铂注射液	0208092	BET 水		+	+	+	+	-	0.5
		020511	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		020512	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		020513	0.5	+	+	+	+	-	0.5
	20021030	BET 水		+	+	+	+	-	0.5
		020511	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		020512	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		020513	0.5	+	+	+	+	-	0.5
注射用奥沙利铂	0306021	BET 水		+	+	+	+	-	0.5
		20030601	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		20030801	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		20030802	0.5	+	+	+	+	-	0.5
	20031224	BET 水	-	+	+	+	+	-	0.5
		20030601	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		20030801	0.5	+	+	+	+	-	0.5
		20030802	0.5	+	+	+	+	-	0.5

注:(+)为形成凝胶且倒置不变形,(-)为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变形

的阴性对照管和阳性对照管。37~38℃水浴恒温 60 min,观察结果,并按 $E_s = \text{antilg}(\sum X/4)$, $E_t = \text{antilg}(\sum X/4)$ 计算 E_s 和 E_t 。结果见表 2,表 3。

Note:(+) gel formed and without change when inversion, (-) gel was not formed or gel formed but changed when inversion

从表 3 可见:奥沙利铂注射液与注射用奥沙利铂两种制剂的实验结果 $E_s = 0.5 \text{ EU/mL}$, $E_t = 0.5 \text{ EU/mL}$,且 E_t / E_s 值在 $0.5 \sim 2.0$ 之间,说明两种制剂配制成 0.5 mg/mL 的浓度对细菌内毒素与鲎试剂的反应完全无干扰作用。

3 标准建立

通过以上干扰试验可认为奥沙利铂注射液、注射用奥沙利铂两种制剂对细菌内毒素与鲎试剂反应完全无干扰作用的最大浓度为 0.5 mg/mL ,最佳实验浓度为配制成不大于 0.5 mg/mL 。

表 4 两种奥沙利铂注射制剂细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxins test for products

药品	TAL	供试品		供试品管结果	PPC	PC	NC
		Lot No.	浓度 (mg/mL)				
奥沙利铂注射液	0203251	020511	0.25	- -	+	+	-
	$0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	020512	0.25	- -	+	+	-
		020513	0.25	- -	+	+	-
注射用奥沙利铂	0306111	20030601	0.25	- -	+	+	-
	$0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	20030801	0.25	- -	+	+	-
		20030802	0.25	- -	+	+	-

注:(+)为形成凝胶且倒置不变形,(-)为未形成凝胶或形成凝胶但倒置变形

Note:(+) gel formed and without change when inversion, (-) gel was not formed or gel formed but changed when inversion

5 讨论

5.1 干扰试验(I)的供试液浓度均使用的是鲎试剂应对应的试验浓度的 2 倍浓度。

5.2 按照药典的要求,只要干扰试验的结果 E_s, E_t 的终点反应值在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间,且 E_t / E_s 值在 $0.5 \sim 2.0$ 之间,则可以认为供试品液无干扰作用,但我们认为考查结果以 $E_t / E_s = 1$ 为最好,这表明所用的供试液对反应完全无干扰作用。

5.3 本研究试验的结果是供试液配制成 0.5 mg/mL 浓度即对内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用,但在起草标准时定的试验浓度为不大于 0.25 mg/mL ($250 \mu\text{g/mL}$) 是基于以下几点因素考虑:(1)目前我国鲎试剂的灵敏度的标定是以生产方标定的结果作为标示灵敏度,只要使用方复核的结果在 $0.5 \lambda \sim 2.0 \lambda$ 之间则该鲎试剂符合中国药典的规定而应按标示灵敏度值使用。这使得实际工作中存在应该使用的 TAL 灵敏度与标示灵敏度有时有 2 倍的差别。(2)有些药厂或研究机构使用的是鲎试剂生产厂家配套提供的细菌内毒素工作品,因此有时存在试验结果与使用中检所发放的细菌内毒素工作标准品作的试验结果不一致的情况。(3)委托单位提供的试验用样品有时是实验室做的小样或中试生产的产品,其质量不一定完全与正式大生产一致。同时全国各地有不少厂家生产同一品种,因此我们在起草标准时考虑了普遍适用性这

25 mg/mL 的浓度。可建立如下标准:细菌内毒素,取本品,依法检查(中国药典 2000 年版二部附录 XI E),每 $250 \mu\text{g}$ 奥沙利铂中含内毒素量应小于 0.25 EU 。

4 供试品细菌内毒素的常规检查

取两种制剂各三批,供试品浓度为配制成 0.25 mg/mL ,用灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂,按“3”项下检查供试品中的细菌内毒素。结果供试品管呈阴性,两种制剂供试品的细菌内毒素检查符合要求。见表 4。

一因素。

5.4 起草的质量标准规定的内毒素限值为每 $250 \mu\text{g}$ 奥沙利铂中含内毒素量应小于 0.25 EU 。该表述包含了干扰试验结果,避免了标准文字叙述的累赘。

5.5 现行的注射用奥沙利铂热原检查标准收载在国家食品药品监督管理局国家药品标准新药转正标准第 35 册。方法为加灭菌注射用水将注射用奥沙利铂配制成每 1 mL 中含 5 mg 的溶液,按家兔体重每 1 kg 缓缓注射 1 mL ,应符合规定。

参考文献

[1] 韦奇志.复方氨基酸注射液细菌内毒素检查法的研究[J].中国药品标准,2000,(1):52.
[2] 袁雪梅等.甘露醇注射液细菌内毒素检查法探讨[J].药物分析杂志,2002,(2):138.
[3] 张德波.部分药品标准中安全性检查存在的问题[J].中国药品标准,2001,(1):28.
[4] 张玉武等.双黄连注射液细菌内毒素检查及其限值的确定[J].中国药理学杂志,2001,36(6):403.
[5] 叶亚菊.利巴韦林注射液细菌内毒素检查法质量标准的建立[J].中国现代应用药学杂志,2003,20(2):151.
[6] 唐元泰.关于注射制剂细菌内毒素检查限值的确定[J].中国药品标准,2003,(4):5.

收稿日期:2003-07-08