

重组人红细胞生成素注射液中细菌内毒素凝胶检查法的研究

张浩(蚌埠医学院第一附属医院药剂科,安徽 蚌埠 233004)

摘要:目的 本文介绍了一种重组人红细胞生成素注射液的细菌内毒素检查法。方法 应用鲎法检查重组人红细胞生成素注射液中的细菌内毒素,考察重组人红细胞生成素注射液对细菌内毒素检查法的干扰。结果 重组人红细胞生成素注射液稀释 150 倍对细菌内毒素检查法无干扰。结论 使用凝胶法检查重组人红细胞生成素注射液中的细菌内毒素是可行的,可用细菌内毒素凝胶法代替家兔热原检查法。

关键词:重组人红细胞生成素注射液;细菌内毒素;凝胶法;干扰试验

中图分类号:R917.796.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)07-0651-03

Apply gel method for studying endotoxin in recombinant human erythropoietin injection

ZHANG Hao(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE This article introduces a method to study the bacterial endotoxin test for detecting pyrogen in recombinant human erythropoietin injection. **METHODS** Limulus reagent was used to detect pyrogen in recombinant human erythropoietin injection, to observe interference of recombinant human erythropoietin injection to bacterial endotoxin test. **RESULTS** Recombinant human erythropoietin injection in 150-fold dilution had no interference to the bacterial endotoxin test. **CONCLUSION** The gel method of bacterial endotoxin test can be used to pyrogen test the endotoxin in recombinant human erythropoietin injection instead of rabbit. **KEY WORDS:** recombinant human erythropoietin injection; bacterial endotoxin; gel method; interfere test

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是由肾脏分泌的一种糖蛋白,通过作用于骨髓的红系造血祖细胞,促进增殖和分化。本品为重组人红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO),与天然的 EPO 相比,体内、外生物作用基本一致。主要用于肾功能不全所致贫血,包括透析及非透析病人,以及外科围手术期的红细胞动员^[1]。生化制品采用家兔法检查热原干扰因素多,结果重现性差,采用细菌内毒素的凝胶法检查,可避免家兔法的一些缺陷。本实验报道用凝胶法检测重组人红细胞生成素中细菌内毒素的可行性研究。

1 材料与仪器

重组人红细胞生成素注射液,批号:20041139-1,20041137-2,20030101,规格:3000u/支,南京华欣药业生物工程有限公。鲎试剂(TAL)批号:040927,灵敏度(λ)=0.5EU/mL,湛江安度斯生物有限公司;批号:031212, λ =0.5EU/mL,湛江海洋生物制品厂。细菌内毒素工作标准品,批号:2004-9,效价 150EU/mL,中国药品生物制品检定所。细

菌内毒素检查用水(BET水),批号:0501200,规格:5mL/支,湛江安度斯生物有限公司。

HHSII-I 型电热恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂),XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),净化工作台(蚌埠净化设备厂),pHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。实验所用器皿经 250℃ 烘烤以除去外源性的内毒素。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核试验^[2]

用 BET 水将细菌内毒素工作标准品制成 2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 四个浓度的内毒素标准溶液,每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30s,每一浓度平行做 4 支管,同时用 BET 水做 2 支阴性管。轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入(37 $\pm$ 1)℃ 水浴箱中,保温(60 $\pm$ 2)min,结果两批鲎试剂灵敏度均为 0.5 EU/mL,符合灵敏度要求。

2.2 供试品的 pH

鲎试剂与细菌内毒素反应适宜 pH 是 6.0~8.0^[3]。精

密测定不同稀释浓度的 rhEPO 的 pH, pH 均符合 2000 年版欧洲药典细菌内毒素检测 pH 范围。见表 1。

表 1 重组人红细胞生成素注射液的 pH

Tab 1 pH of Recombinant human erythropoietin injection

检品批号	不同浓度的重组人红细胞生成素 pH				
	原液	50 倍稀释液	100 倍稀释液	150 倍稀释液	300 倍稀释液
20041139-1	6.9	7.1	7.2	7.1	7.1
20041137-2	6.9	7.0	7.1	7.1	7.1
20030101	6.9	6.9	7.0	7.0	7.0

2.3 供试品的细菌内毒素限值(L)的确定

根据公式^[2] $L = K/M$ 进行计算。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,M 为人用每公斤体重每小时最大剂量,规定注射剂 $K = 5.0 \text{ EU/kg}$

表 2 重组人红细胞生成素注射液的干扰预试验结果

Tab 2 Preparatory test for interfering factors

样品批号	样品浓度 (u/mL)	细菌内毒素浓度(EU/mL)				阴性对照	Et、Es 值 (EU/mL)
		2.0λ	1.0λ	0.5λ	0.25λ		
20041139-1	原浓度	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	---	>1.0
	37.5	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	---	>1.0
	20.0	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.50
	10.0	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - - -	---	0.25
20041137-2	原浓度	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	---	>1.0
	37.5	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	---	>1.0
	20.0	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.50
	10.0	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - - -	---	0.25
0501200	BET 水	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.50

实验发现,BET 水 Es 值在 0.5λ~2.0λ 范围内,两个批号的 rhEPO 原液、80 倍稀释液对鲎试剂灵敏度均有强烈干扰,当浓度稀释为 20 u/mL(即 150 倍稀释液),样品 Et 值在 0.5Es~2.0Es 范围内,说明样品在 150 倍稀释后可以消除鲎试剂的干扰。因此正式干扰试验时选用 150 倍稀释溶液进行。

表 3 重组人红细胞生成素注射液的正式干扰试验

Tab 3 Test for interfering factors

鲎试剂	供试品 溶液	细菌内毒素浓度(EU/mL)				阴性对照	Et、Es 值 (EU/mL)
		2.0λ	1.0λ	0.5λ	0.25λ		
湛江安度	BET 水	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Es)
斯批号	20041139-1	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)
040927	20041137-2	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)
	20030101	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)
湛江海洋	BET 水	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Es)
厂批号	20041139-1	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)
031212	20041137-2	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)
	20030101	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	---	0.5(Et)

实验发现,BET 水 Es 在 0.5λ~2.0λ 之间,且样品 Et 在 0.5Es~2.0Es 之间,三批供试品的内毒素限值均符合药典规定,表明 rhEPO 注射液经 150 倍稀释在本试验条件下对鲎试剂反应无干扰影响,常规监控时用 150 倍稀释液进行检测即可。

• h;参照^[1]rhEPO 使用剂量经计算 $M = 90 \text{ u/kg} \cdot h$; $L = 0.06 \text{ EU/u}$ 。

2.4 干扰试验

2.4.1 计算出供试品的最大稀释倍数(MVD) 按公式^[2] $MVD = CL/\lambda$,L 是 rhEPO 注射液细菌内毒素限值,当 C 为 3000 u/mL,计算得 rhEPO 注射液最大有效稀释倍数为 360 倍。

2.4.2 样品溶液配制及干扰预试验 将同一支细菌内毒素工作标准品分别用内毒素检查用水和稀释成不同浓度(原浓度、37.5u/mL、20.0u/mL、10.0u/mL)的 rhEPO 注射液稀释成 2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ 四个浓度,每个梯度做 4 支管,BET 水和供试品管各做 2 支阴性管,37℃ ± 1 水浴保温 1h,进行结果比较。见表 2。

2.4.3 供试品品溶液正式干扰试验 分别取三个批此 rhEPO 注射液用 BET 水 1→150 稀释后和 BET 水分别将同一支细菌内毒素工作标准品稀释成 2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ 四个浓度,每个梯度做 4 支管,另取供试品的稀释液和 BET 水各做两支阴性对照 37℃ ± 1 水浴保温 1h,进行结果比较。结果见表 3。

2.5 样品的检查

根据中国药典 2000 版附录细菌内毒素检测方法,以 0.5 EU/mL 规格的鲎试剂连续对 3 批 rhEPO 注射液进行凝胶法

检查,同时进行其家兔热原检查对照,结果一致,均为阴性。

3 讨论

3.1 由表2和表3实验结果发现,rhEPO注射液采用细菌内毒素凝胶法检测,当药液稀释150倍时,就不存在干扰,且3批的rhEPO注射液的细菌内毒素均在规定限值(0.06EU/u)以下。

3.2 rhEPO注射液采用凝胶法进行细菌内毒素的检查,与传统的家兔热原法相比较,具有操作简便,结果准确,灵敏度高的优点。因此用凝胶法检测rhEPO注射液的细菌内毒素是可行的。需要注意的是,凝胶化的肉眼判断虽然简便,但容易受操作者主观因素影响而导致判断误差。由于凝固点不易掌握,因此不能进行定量检测^[4]。结果判断应有专业人员复核,对形成半流动性的凝胶或形成颗粒,一般提示有少量内毒素。如将标本进行系列稀释,那么肉眼法也可以进行

半定量分析,并推荐采用双盲试验。

参考文献

- [1] Clinical Guide to the ChP(2000) Vol II(中华人民共和国药典2000年版临床用药须知)[S]. 2001:423.
- [2] ChP(2000) Vol II(中国药典2000年版二部)[S]. 2000:86-87.
- [3] ZHANG X M translate, HU C Q, WANG S L examine and proof-read. Bacterial endotoxins test: guiding principle[J]. Drug Standards of Chin J(中国药品标准杂志), 2004, 5(2):58-61.
- [4] JIANG X J, YAO Y M, ZHENG J. Bacterial endotoxins basic and clinical(细菌内毒素基础与临床)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:395.

收稿日期:2005-05-29