

高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液细菌内毒素检查方法的研究

赵莲,王波,王广义,周虹* (军事医学科学院野战输血研究所,北京 100850)

摘要:目的 研究高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液细菌内毒素检查的可行性,为制定细菌内毒素检查法质量标准提供依据。方法 按中国药典 2005年版二部中细菌内毒素检查法进行操作,并与热原检查法进行对比试验。结果 高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液对鲎试剂的凝集反应无干扰作用。内毒素的限值定为 0.5 EU/mL。结论 高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液采用细菌内毒素检测方法是可行的。

关键词:高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液;鲎试剂;细菌内毒素

中图分类号:R927.12 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2007)02-0141-03

Methodology Study on Bacterial Endotoxin Test of Hypertonic Sodium Chloride Dextran 70 Injection

ZHAO Lian, WANG Bo, WANG Guang-yi, ZHOU Hong* (*Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To examine the feasibility for bacterial endotoxin test of hypertonic sodium chloride dextran70 injection, and provide bases for establishing the quality standard of method for bacterial endotoxin test. **METHODS** Bacterial endotoxin test in the Chinese Pharmacopoeia 2005 was applied, and was compared with pyrogen test. **RESULTS** Hypertonic sodium chloride dextran 70 injection did not interfere the congregating reactivity of tachypleus ameocyte lysate. The appropriate limit of endotoxin was 0.5 EU/mL. **CONCLUSION** It is feasible to use this method in the examination of hypertonic sodium chloride dextran70 injection.

KEY WORDS: hypertonic sodium chloride dextran 70 injection; tachypleus ameocyte lysate; bacterial endotoxin

高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液 (hypertonic sodium chloride dextran70 injection, HSD) 为血容量扩充剂,主要用于创伤失血性低血压的初始治疗^[1]。本课题组所研制的高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液已申报新药并获得临床批文。本研究依据中国药典 2005年版二部中细菌内毒素检查法进行试验^[2],并与热原检查法进行了对比,证明了高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液采用细菌内毒素检查法的可行性,为该药品质量标准中细菌内毒素检查项的制定提供了依据。

1 试验材料

1.1 鲎试剂 (tachypleus ameocyte lysate, TAL)

标示灵敏度 0.25 EU/mL,规格:0.1 mL/支,批号:0304161;标示灵敏度 0.125 EU/mL,规格 0.1 mL/支,批号:0011022,湛江安度斯生物有限公司生产。

标示灵敏度 0.25 EU/mL,规格:0.1 mL/支,批号:030326C;标示灵敏度 0.125 EU/mL,规格 0.1 mL/支,批号:030325E,厦门鲎试剂厂生产。

标示灵敏度 0.125 EU/mL,规格:0.1 mL/支,批号:030301,湛江海洋生物制品厂生产。

基金资助:军队“十五”指令性课题(010L43)

作者简介:赵莲(1974-),女,辽宁省鞍山市人,助理研究员,电话:010-66931937

*通讯作者:周虹

1.2 细菌内毒素检查用水

规格:10 mL/皮,批号:W2001-4,W2003-3,中国药品生物制品检定所出品。

1.3 细菌内毒素工作标准品

规格:70 EU/皮,批号:2001-3,中国药品生物制品检定所出品。

1.4 供试品

高渗氯化钠右旋糖酐 70注射液,规格:250 mL,15 g右旋糖酐 70与 18.75 g氯化钠,批号:031126,031127,031128,军事医学科学院野战输血研究所研制,内蒙古康源药业有限公司中试生产。

1.5 其他

电热恒温水浴箱,型号:SHH.W21.C1600,北京东霞科学仪器厂出品。旋涡混合器,型号:GL88B,江苏海门麒麟医用仪器厂出品。试验所用玻璃器皿按规定清洗,烘干后在干燥箱中 250℃干烤 1 h去除热原。

2 方法与结果

2.1 供试品内毒素限值的确定

临床用量:成人,一次性给药,2~5 min内静脉推注,推荐最大剂量为 4 mL/kg体重。供试品细菌内毒素限值(L)按以下公式计算:

$$L = K/M = \frac{5EU/(kg \cdot h)}{4mL/(kg \cdot h)} = 1.25EU/mL$$

其中,K为按规定给药途径,人用每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量,静脉注射剂的 K值为 5 EU/(kg·h)。M为用每千克体重每小时最大剂量。根据以上公式

表 1 鲎试剂(TAL)的灵敏度复核结果

Tab 1 The checking-result of sensitivity of tachypleus ameobocyte lysate (TAL)

鲎试剂 批号	标示灵敏度(λ) /(EU/mL)	细菌内毒素浓度/(EU/mL)					阴性对照	复核灵敏度(λ _c) /(EU/mL)
		0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125		
0304161	0.25	++++	++++	++++	---	---	---	0.125
030326C	0.25	++++	++++	---	---	---	---	0.25
0011022	0.125	++++	++++	++++	++++	---	---	0.0625
030325E	0.125	++++	+++	---	---	---	---	0.1768
030301	0.125	++++	++++	++++	---	---	---	0.125

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note:“+” represents positive reaction, and “-” represents negative reaction

表 2 干扰预试验结果

Tab 2 Results of interference preparatory testing

鲎试剂 (λ=0.25EU/mL)	供试品	供试品稀释倍数					阴性对照	
		原液	2倍	4倍	8倍	16倍		
湛江安度斯生物 有限公司生产 (批号:0304161)	031126	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-
	031127	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-
厦门鲎试剂厂生产 (批号:030326C)	031128	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-
	031126	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-
	031127	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-
	031128	NPC	-	-	-	-	-	-
		PPC	++	++	++	++	++	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note:“+” represents positive reaction, and “-” represents negative reaction

计算,细菌内毒素限值应定为 1.25 EU/mL。参照中国药典 2005年版葡萄糖注射液和氯化钠注射液的细菌内毒素限值(均为 0.5 EU/mL),为严格质量标准,最终将细菌内毒素限值定为 0.5 EU/mL。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

根据文献[2]规定,进行鲎试剂的标示灵敏度复核,结果λ_c均在 2λ~0.5λ之间,符合规定。见表 1。

2.3 干扰预试验

2.3.1 确定供试品进行内毒素检查的浓度

供试品进行内毒素检查时的最大有效稀释倍数(MVD)按以下公式计算:

$$MVD = CL/\lambda$$

其中,L为供试品细菌内毒素限值;C为供试品溶液的浓度,当 L以 EU/mL表示时,C为 1.0 mL/mL。根据市售鲎试剂标示灵敏度范围,当 λ为 0.5 EU/mL时,稀释倍数为 1倍;当 λ为 0.032 EU/mL时,稀释倍数为 16倍。所以,干扰预试验选择原液及 2,4,8,16倍稀释液。

2.3.2 干扰预试验

将供试品用细菌内毒素检查用水倍量稀释,配制 2,4,8和 16倍稀释液,将此系列浓度溶液记为 NPC。同时在供试品原液及稀释液中加入细菌内毒素标准溶液,使每一浓度试验液中均含有 2λ浓度的细菌内毒素,此系列浓度溶液记为 PPC。取灵敏度为 0.25 EU/mL的两个不同厂家的鲎试剂,分别与上述 NPC和 PPC进行反应,每一浓度重复两管,并设阴性对照。结果表明,供试品原液对两个厂家生产的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用,见表 2。

2.4 正式干扰试验

取供试品用细菌内毒素检查用水进行倍量稀释,使其最终干扰试验浓度为 2 倍稀释,按文献[2]规定进行试验,结果见表 3 正式干扰试验结果

Tab 3 Results of formal interference testing

鲎试剂 ($\lambda=0.125$ EU/mL)	供试品	细菌内毒素浓度 (EU/mL)				阴性对照	实测灵敏度 (EU/mL)	E_t/E_s
		0.25	0.125	0.0625	0.03125			
湛江安度斯生物 有限公司生产 (批号:0011022)	水溶液	++++	++++	++++	----	--	0.0625	0.5
	031126	++++	++++	++++	----	--	0.0625	0.5
厦门鲎试剂厂生产 (批号:030325E)	031127	++++	++++	++++	----	--	0.0625	0.5
	031128	++++	++++	++++	----	--	0.0625	0.5
水溶液	031126	++++	++++	----	----	--	0.125	1
	031126	++++	++++	----	----	--	0.125	1
	031127	++++	++++	----	----	--	0.125	1
	031128	++++	++++	----	----	--	0.125	1

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note:“+” represents positive reaction, and “-” represents negative reaction

按文献[2]法,使用两个不同厂家生产的鲎试剂分别对供试品进行检查。取三批供试品原液各 0.1 mL。在供试品原液中加入细菌内毒素标准溶液,试验液中含有 2λ 浓度的细菌内毒素,此系列浓度溶液记为 PPC。同时,设立阳性和阴性对照。结果:三批供试品均符合规定,见表 4。

表 4 高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液细菌内毒素法检查结果

Tab 4 Results of the bacterial endotoxin test of hypertonic sodium chloride dextran70 injection

鲎试剂 ($\lambda=0.25$ EU/mL)	样品批号	供试品	PPC	阳性	阴性
湛江安度斯生物有限公司 (批号:0304161)	031126	--	++		
	031127	--	++	++	--
	031128	--	++		
厦门鲎试剂厂 (批号:030326C)	031126	--	++		
	031127	--	++	++	--
	031128	--	++		

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性

Note:“+” represents positive reaction, and “-” represents negative reaction

2.6 高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液细菌内毒素检查与热原检查比较

细菌内毒素检查法按“2.5”项下操作;热原检查按中国药典 2005 年版二部附录 XID 方法,剂量按家兔体重每 kg 注射 10 mL。两种检查均符合规定,结果一致。

3 讨论

3.1 细菌内毒素检查法具有快速、简便、费用低且灵敏度

表明:2 倍稀释浓度时, E_t/E_s 均在 0.5 ~ 2 之间,确认无干扰作用,见表 3。

2.5 供试品试验

高、重复性好的优点,如采用家兔法控制热原,则操作复杂、费时,而且耗费动物,影响因素多。本研究考察高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液细菌内毒素检查的可行性,为采用细菌内毒素检查法提供依据。

3.2 不同厂家生产的鲎试剂在生产工艺、质量等方面有一定差异,即抗干扰能力存在一定差别。本研究采用不同厂家生产的鲎试剂,对供试品的 3 个批号进行干扰试验。干扰试验结果表明,供试品原液对两个厂家生产的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用,且两个厂家生产的鲎试剂反应结果一致。正式干扰试验用 2 倍稀释供试品浓度且用两个厂家的鲎试剂 ($\lambda=0.125$ EU/mL),结果 E_t/E_s 均在 0.5 ~ 2 之间,表明无干扰作用。高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液可采用细菌内毒素检查,限值定为 0.5 EU/mL 比较合适。

3.3 根据试验结果,确定高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液细菌内毒素检查方法如下:

取本品,依法检查(中国药典 2005 年版二部附录 XIE),每 mL 高渗氯化钠右旋糖酐 70 注射液中细菌内毒素含量应小于 0.5 EU。

参考文献

- [1] KREIMEIER U, MESSMER K. Small-volume resuscitation: from experimental evidence to clinical routine. Advantages and disadvantages of hypertonic solutions [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2002, 6: 625
- [2] Ch. P (2005) Vol II (中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005.

收稿日期:2005-04-14