

注射用磷酸依托泊苷细菌内毒素检查法研究

陈文星, 谢吉元, 徐霞飞(南京中医药大学, 南京 210029)

摘要: **目的** 建立注射用磷酸依托泊苷的细菌内毒素检查的方法。 **方法** 按中国药典 2005 年版(二部)附录收载的细菌内毒素检查方法及指导原则进行实验。 **结果** 将注射用磷酸依托泊苷粉针经稀释至浓度为 $0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对试验无干扰作用, 用标示灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂(TAL)检测细菌内毒素有效可行, 注射用磷酸依托泊苷内毒素限值为 $0.3 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 **结论** 注射用磷酸依托泊苷内毒素检查可以采用细菌内毒素检查法代替家兔热原法。

关键词: 注射用磷酸依托泊苷; 细菌内毒素检查法建立; 干扰试验

中图分类号: R979.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)05-0396-03

Study on Testing for Bacterial Endotoxin in Etoposide Phosphate Injection

CHEN Wen-xing, XIE Ji-yuan, XU Xia-fei(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of assaying bacterial endotoxin in etoposide phosphate injection. **METHODS** Bacterial endotoxin test procedure and guideline in Chinese Pharmacopoeia(2005 edition) were used. **RESULTS** The test showed that the interference elements could be excluded by diluting Etoposide Phosphate injection at a concentration of $0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and it is effective that endotoxin can be tested by tachypleus amebocyte lysate with accuracy of $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. The limited value of endotoxin of etoposide phosphate injection was $0.3 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$. **CONCLUSION** Bacterial endotoxin test could take place of rabbit method for pyrogen to control the quantity of Etoposide Phosphate injection.

KEY WORDS: Etoposide Phosphate injection; bacterial endotoxin test; interference test

磷酸依托泊苷是一种抗肿瘤药, 作用于 DNA-拓扑异构酶 II 或形成自由基从而造成 DNA 链断裂抑制肿瘤细胞生长, 临床主要用于治疗难治性睾丸肿瘤、小细胞肺癌。本研究

按照中国药典 2005 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对注射用磷酸依托泊苷的细菌内毒素检查法进行了研究, 建立了其细菌

作者简介: 陈文星, 男, 硕士 Tel: (025)86798154 E-mail: chenwxmail@163.com

内毒素检查质量标准。

1 实验材料

注射用磷酸依托泊苷,海口康力元制药有限公司提供,批号:20040303,20040306,20040309。规格:100mg/支。临床应用时用5%葡萄糖溶液或0.9%氯化钠注射液溶解稀释使用,最低浓度可达0.1 mg·mL⁻¹,本实验以溶解于250ml 5%葡萄糖溶液为准,即0.4 mg·mL⁻¹;鲎试剂(灵敏度0.125 EU·mL⁻¹,湛江博康海洋生物有限公司,批号:051205。灵敏度0.125 EU·mL⁻¹,湛江安度斯生物有限公司,批号:060219);细菌内毒素检查用水(5 mL/Amp,内毒素含量≤0.005 EU·mL⁻¹,湛江博康海洋生物有限公司,批号:060112);细菌内毒素工作标准品(每支效价120EU,中国药品生物制品检定所,批号:2005-11);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,试验操作在

表1 鲎试剂灵敏度复核试验结果

Tab 1 Sensitivity verification of TAL

鲎试剂 批号	标示灵敏度 /EU·mL ⁻¹	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹				阴性对照	复核灵敏度 /EU·mL ⁻¹
		0.25	0.125	0.062	0.031		
051205	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
060219	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125

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。(以下同)

Note:(+)gelating and no deforming when inversion,(-)no gelating or gelating but deforming when inversion

2.2 注射用磷酸依托泊苷细菌内毒素限值(L)的确定

$L = K/fM$,式中K为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时可接受的内毒素最大剂量,注射液的 $K = 5EU \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$;M为人用每公斤体重每小时给药的最大剂量,临床磷酸依托泊苷使用最大剂量为100 mg·m⁻²,60 kg人体表面积为1.625 m²,则 $M = 100 \times 1.625/60 = 2.7 mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$;f为安全系数,一般取值为3~10,本实验取f=5;则 $L = K/M = 5 EU \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}/2.7mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}/5 = 0.37 EU \cdot mg^{-1}$,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0.3 EU·mg⁻¹。

2.3 最小有效稀释浓度

选用灵敏度为0.125 EU·mL⁻¹鲎试剂时, $C = \lambda/L = 0.125/0.3 = 0.42 mg \cdot mL^{-1}$ 。

2.4 干扰试验预试验

以0.42 mg·mL⁻¹为样品的最小稀释浓度,用细菌内毒素检查用水以最小稀释浓度为终点,将样品稀释,得样品的浓度系列溶液,即3.36,1.68,0.84,0.42 mg·mL⁻¹,记此系列溶液为NPC系列;PPC系列:将样品稀释成与上述NPC相同浓度系列,但在稀释过程中每一浓度样品都含有0.125 EU·mL⁻¹浓度的内毒素,采用灵敏度0.125 EU·mL⁻¹鲎试剂分别和NPC和PPC两个系列的样品反应,按检查法项下试验。结果表明,注射用磷酸依托泊苷浓度为0.42 mg·mL⁻¹时,对试验无干扰作用。见表2。

2.5 注射用磷酸依托泊苷的干扰实验

按鲎试剂灵敏度复核试验项下,用细菌内毒素检查用水和注射用磷酸依托泊苷溶液(预试验中无干扰作用浓度0.42

无菌操作台中进行。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核

按2005版药典附录XI E细菌内毒素检查法鲎试剂灵敏度复核项下实验,用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品稀释成2λ,1λ,0.5λ,0.25λ的标准溶液,每稀释一步均在旋涡混匀器上混匀30 s,每一浓度平行做四支,同时用细菌内毒素检查用水做2支阴性对照管,轻轻混匀,封闭管口,垂直放入(37℃±1)℃恒温水浴中,保温(60±2)min。保温和拿取过程应避免受到振动造成假阴性结果。按细菌内毒素检查法结果判断项下判定结果,计算反应终点浓度的几何平均值(λ_c)。结果显示,两批鲎试剂反应终点浓度几何平均值均为0.125 EU·mL⁻¹,复核灵敏度为0.125 EU·mL⁻¹,试剂符合试验要求。见表1。

表2 注射用磷酸依托泊苷干扰试验预试验结果

Tab 2 Screening test of inhibition or enhancement test for Etoposide Phosphate injection

鲎试剂		样品稀释浓度/mg·mL ⁻¹				阴性 对照	阳性 对照
		3.36	1.68	0.84	0.42		
051205	NPC	--	--	--	--	--	++
	PPC	-+	+-	++	++		
051205	NPC	--	--	--	--	--	++
	PPC	--	-+	-+	++		

mg·mL⁻¹)分别将细菌内毒素工作标准品制成含细菌内毒素工作标准品2.0λ,1λ,0.5λ,0.25λ四种浓度的内毒素溶液。用细菌内毒素检查用水和注射用磷酸依托泊苷溶液制成的每一浓度平行做四支,另取细菌内毒素检查用水和注射用磷酸依托泊苷溶液做两支阴性对照管。计算用细菌内毒素检查用水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值(Es)和用注射用磷酸依托泊苷溶液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值(Et)。结果显示,使用灵敏度0.125 EU·mL⁻¹的鲎试剂进行试验,内毒素标准溶液的Es=0.125 EU·mL⁻¹,值在0.5λ~2.0λ之间;三个批号注射用磷酸依托泊苷在0.42 mg·mL⁻¹稀释浓度下的Et值均在0.5Es~2.0Es之间,说明三批注射用磷酸依托泊苷用该方法稀释对该试验无干扰作用。见表3。

2.6 标准建立

通过以上干扰试验可认为注射用磷酸依托泊苷对细菌内毒素与鲎试剂反应完全无干扰作用的浓度为0.42 mg·mL⁻¹。

表3 注射用磷酸依托泊苷干扰试验结果

Tab 3 Results of inhibition or enhancement test for Etoposide Phosphate injection

内毒素配制溶液	鲎试剂 批号	内毒素浓度/EU · mL ⁻¹				Es 或 Et/EU · mL ⁻¹	检查用水 阴性对照
		0.250	0.125	0.062	0.031		
细菌内毒素检查用水	051205	+++ +	+++ +	----	----	0.125 (Es)	--
	060219	+++ +	+++ +	----	----	0.125 (Es)	--
注射用磷酸依托泊苷 0.42 mg · mL ⁻¹ 20040303	051205	+++ +	+++ -	----	----	0.149 (Et)	
	060219	+++ +	+++ +	+ ---	----	0.105 (Et)	
注射用磷酸依托泊苷 0.42 mg · mL ⁻¹ 20040306	051205	+++ +	+++ +	----	----	0.125 (Et)	
	060219	+++ +	+++ +	+ + --	----	0.088 (Et)	
注射用磷酸依托泊苷 0.42 mg · mL ⁻¹ 20040309	051205	+++ +	+++ -	----	----	0.178 (Et)	
	060219	+++ +	+++ +	+ ---	----	0.105 (Et)	

因此可建立如下标准:取本品,依法检查(中国药典 2005 年版二部附录 XI E),每 mg 注射用磷酸依托泊苷含内毒素量应小于 0.3 EU。

2.7 注射用磷酸依托泊内毒素检查

取三批注射用磷酸依托泊苷粉针剂依上述方法按检查法项下检查,结果全部呈阴性,注射用磷酸依托泊的细菌内毒素检查符合要求。结果见表 4。

表4 三批样品内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test for three batch of products

样 品	批号	鲎试剂	
		051205	060219
阳性对照		++	++
阴性对照		--	--
供试品阳性对照	20040303	++	++
	20040306	++	++
	20040309	++	++
注射用磷酸依托泊苷	20040303	--	--
	20040306	--	--
	20040309	--	--

3 讨论

细菌内毒素鲎试剂检查法在实验环境相对稳定、鲎试剂及内毒素标准品合格的情况下,最易受溶液因素的干扰,因此需通过各种方法来排除溶液的干扰因素。在本实验条件下,注射用磷酸依托泊苷经按细菌内毒素检查法应用指导原

则实验,可以用稀释法排除干扰,对供试品用细菌内毒素检查法进行检测控制热原。实验显示将注射用磷酸依托泊苷稀释至浓度为 0.42 mg · mL⁻¹ 进行实验,对试验无干扰。注射用磷酸依托泊苷粉针剂细菌内毒素限值为 0.3 EU · mg⁻¹,建立该品种内毒素标准每 mg 内毒素含量应小于 0.3 EU。三批样品按方法稀释进行检验均符合要求,可以用细菌内毒素检查法代替家兔法来控制注射用磷酸依托泊苷的质量。

REFERENCES

[1] Chp(2005) Vol II[S]. 2005:suppl 85-87.

[2] HUANG Q Q, XIA Z M. Experimental design for bacterial endotoxin test of drugs[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1997,32(2):722-724.

[3] YE Y J. Establishment of the Quality standard for bacterial endotoxins test of ribavirin injection[J]. Chin J Mol Appl Pharm(中国现代应用药学), 2003,20(2):151-153.

[4] TANG Y T. Establishment of limit to bacterial endotoxin in injections[J]. Drug Standards of China(中国药品标准), 2003,4(4):5-6.

[5] ZHANG D B, PU X F, YANG K. Study on testing for bacterial endotoxin in oxaliplatin[J]. Chin J Mol Appl Pharm(中国现代应用药学), 2004,21(6):487-490.