烟酸注射液细菌内毒素检查法研究

钟敏,秦美蓉,李俊鹏(深圳市药品检验所,广东 深圳 518029)

摘要:目的 建立烟酸注射液细菌内毒素检查方法。方法 参照中国药典 2005年版(二部)附录收载的细菌内毒素检查法及其原则进行实验,用两个不同厂家的鲎试剂对 3批烟酸注射液进行干扰试验。结果 当烟酸注射液稀释至 20倍(即浓度为 0.5 mg·mL^{-1})时可消除对鲎试剂与细菌内毒素凝集反应的干扰。结论 烟酸注射液可用细菌内毒素检查法进行安全性质量检查。

关键词:烟酸注射液;细菌内毒素检查;鲎试剂;干扰试验

中图分类号:R977.2; R927.31 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)03-0249-03

Study of Bacterial Endotoxin Test for Nicotinic Acid Injection

ZHONG Min, QIN Mei-rong, LI Jun-peng (*Shenzhen Municipal Institute for Drug Control, Shenzhen* 518029)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the bacterial endotoxin test in nicotinic acid injection. **METHODS** According to China Pharmacopoeia 2005 version (Ⅱ) appendix, the interference test was studied using tachypleus amebocyte lysate from two factories and three batches of nicotinic acid injection. **RESULTS** The interference could be eliminated when nicotinic acid injection was diluted by 20 times (0.5 mg·mL^{-1}). **CONCLUSION** Bacterial endotoxin test could be used for nicotinic acid injection.

KEY WORDS: nicotinicacid injection; bacterial endotoxin test(BET); tachypleus amebocyte lysate(TAL); interference test

烟酸注射液(nicotinic acid injection, NAI)为维生素类药,在组织呼吸过程中作为催化重要的氧化还原反应的多种酶中的辅酶发挥作用。烟酸具有扩张血管,降低血脂,减少胆固醇合成,溶解纤维蛋白,防止血栓形成的作用。目前国内尚未见烟酸注射液细菌内毒素检查方法的报道。本实验旨在探讨用鲎试剂(TAL)法检查烟酸注射液细菌内毒素的可行性。

1 实验材料

1.1 样品

烟酸注射液 3批,规格:2 mL:20mg,批号:040901,050301,050701,生产厂家:广州明兴制药有限公司。

1.2 试剂

①鲎试剂:批号 0511090,规格 0.1 mL,λ=0.125 EU·mL^{-1},湛江博康海洋生物有限公司;批号:0403221,规格 0.1 mL,λ=0.06 EU·mL^{-1},湛江安度斯生物有限公司。②细菌内毒素工作标准品:批号 2005-10,效价每支 100 EU,规格 1 mL,中国药品生物制品检定所。③细菌内毒素检查用水(以下简称 BET水):批号 W2004-12,规格:每支 10 mL,中国药品生物制品检定所。

1.3 仪器

XW-80型旋涡混合器:上海医科大学仪器厂;KDZ-2型电热恒温震荡水槽:上海通用恒温设备厂。

2 实验方法与结果

2.1 细菌内毒素限值的确定

细菌内毒素限值 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 K=5 EU·kg^{-1}·h^{-1};M为人用每公斤体重每小时最大剂量,参考本品临床用法用量,K=5 mg·kg^{-1}·h^{-1},计算得 L=1 EU·mg^{-1}。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

按照中国药典 2005年版二部[1]进行鲎试剂的标示灵敏度复核,结果见表 1所示。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of sensitivity check test of LAL reagent

TAL批号	标示灵敏度(λ)	不同内毒素浓度(EU·mL^{-1})复核结果								灵敏度(λc)
		0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 2	0.015 6	0.007 8	NC	
0511090	0.125		++++	++++	----	----				0.125
0403221	0.06			++++	++++	----	----			0.06

2批鲎试剂经用细菌内毒素工作标准品检查,λc在 0.5λ~2.0λ范围,结果均符合规定。

2.3 干扰试验预试验

烟酸注射液有效稀释浓度 MVC=λ/L,其中 L为烟酸注

作者简介:钟敏,男,硕士,主管药师 Tel:13691833970 E-mail: szzm60@163.com

中国现代应用药学杂志 http://www.chinjmap.com

射液的细菌内毒素限值 1 EU· mg^{-1}, λ为鲎试剂标示灵敏度,目前市售鲎试剂灵敏度 λ通常在 0.5 ~ 0.03 EU· mL^{-1}。则烟酸注射液的对应有效稀释浓度为: $C_{0.5}$ = 0.5 /1 = 0.5 mg· mL^{-1}; $C_{0.25}$ = 0.25 /1 = 0.25 mg· mL^{-1}; $C_{0.125}$ = 0.125 /1 = 0.125 mg· mL^{-1}; $C_{0.06}$ = 0.06 /1 = 0.06 mg· mL^{-1}; $C_{0.03}$ = 0.03 /1 = 0.03 mg· mL^{-1}。将烟酸注射液用细菌内毒素检查用水分别稀释成浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 mg· mL^{-1}的溶液,将此系列溶液记为 NPC。

同时在上述试验液中加入细菌内毒素标准溶液,使每一浓度的试验液中均含有 2λ浓度的细菌内毒素,记此系列浓度溶液记为 PPC。

取灵敏度为 0.125, 0.06 EU· mL^{-1}的两个不同厂家的鲎试剂,分别与上述 PPC和 NPC进行反应,每一浓度重复两管,并设阳性和阴性对照。结果见表 2和表 3。

表 2 烟酸注射液干扰预试验结果

Tab 2 Results of interference preparatory testing for NAI

样品		不同样品浓度 (mg· mL^{-1})干扰预试验							
		原液	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	NC
040901	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
050301	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
050701	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +

注:湛江博康海洋生物有限公司,批号: 0511090, λ = 0.125 EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang Bokang marine biological co. LTD., lot No. 0511090, λ = 0.125 EU· mL^{-1}

表 3 烟酸注射液干扰预试验

Tab 3 Results of interference preparatory testing for NAI

样品		不同样品浓度 (mg· mL^{-1})干扰预试验							
		原液	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	NC
040901	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
050301	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
050701	NPC	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	PPC	- -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +

注:湛江安度斯生物有限公司,批号: 0403221, λ = 0.06 EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang A&C biological Ltd., lot No. 0403221, λ = 0.06 EU· mL^{-1}

由以上预干扰试验结果可以初步了解:两个厂家鲎试剂对烟酸注射液的细菌内毒素检查均在 0.5 mg· mL^{-1}以下浓度时无干扰。

2.4 正式干扰试验

为了最终确认是否存在干扰,进行以下正式干扰试验。

取烟酸注射液用细菌内毒素检查用水分别进行稀释,使其最终干扰试验浓度为 0.5 mg· mL^{-1},按中国药典 2005年版二部附录[1]"细菌内毒素检查供试品干扰试验项"进行实验,结果见表 4和表 5。

表 4和表 5中 $Es = lg^{-1}(\Sigma Xs/4)$, $Et = lg^{-1}(\Sigma Xt/4)$。式中 Xs为细菌内毒素检查用水制成的内毒素溶液反应终点的对数值, Xt为样品稀释液制成的内毒素溶液反应终点的对数值。正式干扰试验结果表明: Es/Et均在 0.5 ~ 2.0范围之内,确认烟酸注射液在 0.5 mg· mL^{-1}浓度下无干扰。

2.5 样品细菌内毒素检查

按中国药典 2005年版二部细菌内毒素检查法,使用两

表 4 烟酸注射液干扰试验结果

Tab 4 Results of interference testing for NAI

样品	不同内毒素浓度 (EU· mL^{-1})干扰试验					Es	Et
	0.25	0.125	0.062 5	0.031 2	NC		
水溶液	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.125	
040901	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	0.25	
050301	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	0.25	
050701	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -	0.25	

注:湛江博康海洋生物有限公司,批号: 0511090, λ = 0.125 EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang Bokang marine biological co. LTD., lot No. 0511090, λ = 0.125 EU· mL^{-1}

表 5 烟酸注射液干扰试验

Tab 5 Results of interference testing for NAI

样品	不同内毒素浓度 (EU· mL^{-1})的干扰试验					Es	Et
	0.125	0.062 5	0.031 2	0.015 6	NC		
水溶液	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	0.0625	
040901	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -		0.125
050301	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -		0.105
050701	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- -		0.125

注:湛江安度斯生物有限公司,批号: 0403221, λ = 0.06 EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang A&C biological Ltd., lot No. 0403221, λ = 0.06 EU· mL^{-1}

中国现代应用药学杂志 http://www.chinjmap.com

批不同厂家的鲎试剂分别对样品进行细菌内毒素检查,样品浓度按 $C = \lambda/L$ 计算,当 $\lambda = 0.125$ EU· mL^{-1} 时 $C = 0.125$ mg· mL^{-1},当 $\lambda = 0.06$ EU· mL^{-1} 时 $C = 0.06$ mg· mL^{-1},并同时设立样品的自身阳性对照管,结果见表 6和表 7。

表 6 烟酸注射液细菌内毒素检查结果

Tab 6 Results of bacterial endotoxin test for NAI

样品批号	样品浓度 /mg· mL^{-1}	NPC	PPC	阳性	阴性
040901	0.125	- -	+ +	+ +	- -
050301	0.125	- -	+ +	+ +	- -
050701	0.125	- -	+ +	+ +	- -

注:湛江博康海洋生物有限公司,批号: 0511090, $\lambda = 0.125$ EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang Bokang marine biological co. LTD., lot No. 0511090, $\lambda = 0.125$ EU· mL^{-1}

表 7 烟酸注射液细菌内毒素检查结果

Tab 7 Results of bacterial endotoxin test for NAI

样品批号	样品浓度 /mg· mL^{-1}	NPC	PPC	阳性	阴性
040901	0.06	- -	+ +	+ +	- -
050301	0.06	- -	+ +	+ +	- -
050701	0.06	- -	+ +	+ +	- -

注:湛江安度斯生物有限公司,批号: 0403221, $\lambda = 0.06$ EU· mL^{-1}

Note: Zhangjiang A&C biological Ltd., lot No. 0403221, $\lambda = 0.06$ EU· mL^{-1}

3批烟酸注射液样品的细菌内毒素检查结果均符合规定。

结果可见,烟酸注射液稀释至浓度为 0.5 mg· mL^{-1} 时对鲎试剂与内毒素凝集反应无干扰作用,可适用细菌内毒素检查法。

3 讨论

3.1 干扰预试验目的是评价样品浓度对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质,初步筛选出对细菌内毒素检查无干扰的样品浓度范围。由干扰预试验结果显示,烟酸注射液稀释至浓度为 0.5 mg· mL^{-1} 后则对细菌内毒素检查法无干扰作用。干扰预试验最终要经干扰试验验证。

3.2 不同厂家的鲎试剂由于生产工艺、质量参数等方面有一定差异,其抗干扰能力存在差别。因此,本实验采用 2个不同厂家的鲎试剂对 3个批号的样品进行试验。从正式干扰试验结果可见,样品稀释至 0.5 mg· mL^{-1} 浓度时, Es/Et 均在 0.5 ~ 2.0范围之内,可认为烟酸注射液在该浓度下不干扰细菌内毒素检查。

3.3 烟酸注射液细菌内毒素限值为 1 EU· mg^{-1},鲎试剂灵敏度应使用 0.5 EU· mL^{-1} 或小于 0.5 EU· mL^{-1}。

3.4 根据实验结果,确定烟酸注射液细菌内毒素检查方法如下:取本品,依中国药典 2005年版二部方法检查,每 1 mg 烟酸注射液细菌内毒素含量不得超过 1 EU。

收稿日期: 2007-07-08

中国现代药物 http://www.chinamedicine.com