

动态浊度法定量测定碘海醇中细菌内毒素的含量

姚治,倪维芳,朱社敏,匡荣(浙江省药品检验所药理室,杭州 310004)

摘要:目的 应用动态浊度法试验定量测定供注射用的碘海醇原料中的细菌内毒素含量。方法 通过干扰试验确定样品检测浓度,并建立标准曲线对精制程度不同的样品进行细菌内毒素的定量测定。结果 样品在 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对鲎试验检查无干扰作用,细菌内毒素回收率在 50% ~ 200% 范围内。样品中的内毒素含量可定量测定。检测结果与热原检测的结果有一定的相关性。结论 动态浊度法可用于碘海醇中的细菌内毒素定量检测。

关键词:碘海醇;细菌内毒素;动态浊度法;

中图分类号:R927.33

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2009)02-0150-04

作者简介:姚治,男,副主任药师

Tel: (0571) 86458914

E-mail: yaozhi_1118@126.com

Detection of Bacterial Endotoxin in Iohexol by the Method of Kinetic Turbidimetric Limulus Test

YAO Zhi, NI Weifang, ZHU Shemin, KUANG Rong(Department of Pharmacology, Zhejiang Insititute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To detect the quantity of endotoxin in iohexol for injection by the method of the kinetic turbidimetric limulus test. **METHODS** The kinetic turbidimetric limulus test was applied to detect the quantity of endotoxin in several samples. The standard endotoxin working curve was set up and the interference test was studied to range the effective concentrations of sample. **RESULTS** The diluted concentration of sample preparation down to 10 mg · mL⁻¹ was effective to eliminate the interference. The endotoxin recovery was more than 50% and less than 200%. The endotoxin level in samples could be quantified exactly, and the results were accorded with the results of the pyrogen test. **CONCLUSION** The kinetic turbidimetric limulus test can be used to quantitate the endotoxin level in iohexol. **KEY WORDS:**iohexol;endotoxin;kinetic turbidimetric limulus test

碘海醇是一种含有 3 个碘原子的非离子水溶性造影剂,碘含量为 46.4%,为 X 光及 CT 检查常用的造影剂,可供血管内、椎管内和体腔内使用。动物试验结果表明本品对犬肝脏、腹主动脉、CT 扫描影像有增强效应。临床使用的剂型为碘海醇注射液。碘海醇注射液的质量标准^[1]中规定的细菌内毒素限度非常低,为 0.2 EU · 50 mgI⁻¹,相当于碘海醇 0.008 6 EU · mg⁻¹。碘海醇原料的合成工艺复杂,步骤多,可能的污染来源多,导致其内毒素污染的控制非常难,往往需要多次精制。由于常用的细菌内毒素检测方法凝胶法不能准确定量,给产品的精制工艺的质量控制带来不利。本研究参照中国药典 2005 年版二部^[2]中细菌内毒素检查法中的动态浊度法,对碘海醇原料中的细菌内毒素定量检测进行了研究,力图找到一种快速、准确的定量检测方法。

1 仪器与试药

碘海醇原料(未精制的样品 4 批,批号 060706、060708、061007、061008,精制的样品,批号 061101、061108,浙江新华制药有限公司);细菌内毒素标准品(批号 2005-10,规格 100 EU,中国药品生物制品检定所);动态比浊法鲎试剂(批号 0609271,灵敏度 0.015 EU · mL⁻¹,规格 1.2 mL,湛江安度斯生物有限公司);细菌内毒素检查用水(BET 水,批号 0707170,规格 100 mL);BET-32B 细菌内毒素定量检查仪(天津大学无线厂);ZRY-2A 热原测温仪(天津大学无线厂)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定

碘海醇的临床最大用量(M)为 24 000 mgI · (60 kg)⁻¹ · h⁻¹,静脉给药制剂最大可接受的内毒素量(K)为 5.0 EU · kg⁻¹ · h⁻¹, L = K/M = 5.0

EU · kg⁻¹ · h⁻¹/24 000 mg · (60 kg)⁻¹ · h⁻¹ = 0.625 EU · 50 mgI⁻¹,USP30 碘海醇注射液^[1]的限值为 0.2 EU · 50 mgI⁻¹,综合考虑确定本品的限值为 0.2 EU · 50 mgI⁻¹。碘海醇的含碘量以 46.4% 计,折算成原料的限值为 0.008 6 EU · mg⁻¹。

2.2 供试品的制备及最大可稀释倍数(MVD)的确定

供试品在无菌条件下精密称定,用 BET 水溶解成 100 mg · mL⁻¹的初始溶液,限值 L 为 0.008 6 EU · mg⁻¹,标准曲线最低浓度 λ₁ 为 0.015 EU · mL⁻¹,供试品的最大可稀释倍数(MVD) = LC/λ₁ = 0.008 6 EU · mg⁻¹ × 100 mg · mL⁻¹/0.015 EU · mL⁻¹ = 54 倍。

2.3 细菌内毒素标准曲线的建立和可靠性测试

用 BET 水将细菌内毒素标准品进行稀释,使其最终细菌内毒素浓度分别为 10,2.0,0.4,0.08,0.016 EU mL⁻¹,各取 0.2 mL 分别加到预先加有 0.1 mL 动态比浊法鲎试剂(TAL)的反应管内,混合均匀,插入 BET-328 型细菌内毒素检测系统内进行自动检测,其中每一浓度重复 3 管。标准曲线回归方程为 LogT = 2.776 8 - 0.184 2LogC,相关系数 r = -0.997(绝对值应大于 0.98),平行管之间的 RSD 均小于 10%,空白对照管在规定检测时间外,故细菌内毒素标准曲线成立。结果见表 1。

表 1 细菌内毒素标准曲线及可靠性(n=3)

Tab 1 Truth of standard curve (n=3)

内毒素浓度 C/EU · mL ⁻¹	平均反应时间 T/s	RSD/%
阴性对照	<3 600	
10	398.0	1.51
2	527.7	0.39
0.4	676.0	0.34
0.08	970.0	0.30
0.016	1 292.5	1.42

2.4 干扰试验

取批号为061008的样品,精密称定,用BET水将供试品复溶使成 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,再进一步稀释5,10,20,40倍,记为Ai稀释液;同时另取4管进行同样倍数的稀释,并在稀释液中添加内毒素,使各稀释液中的内毒素含量均为 $0.4\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (标准曲线中点浓度),记为Bi稀释液,进行回收率试验。分别取上述各液0.2 mL,加到预先加有0.1 mL TAL的反应管内,混合均匀,插入仪器内进行测定,每个浓度重复2管。同步作标准曲线,并根据标准曲线计算各被测液中的内毒素含量,计算回收率,结果见表2。

结果显示,样品10倍、20倍、40倍稀释液的回收率均在50~200%,符合要求。

2.5 供试品的动态浊度法定量检测

取全部6批样品,分别精密称定,用BET水复
表3 样品动态浊度法定量检测结果($n=3$)

Tab 3 Results of sample test ($n=3$)

批号	是否精制	平均反应时间/s	内毒素浓度/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD%	回收率%	稀释倍数	内毒素含量/ $\text{EU}\cdot\text{mg}^{-1}$
060706	未精制	741	0.328 6	0.61		20	0.066
PPC		616	0.863 7	0.09	33.78		
060708	未精制	887	0.127 1	0.79		20	0.127
PPC		649	0.658 3	0.41	132.81		
061007	未精制	875	0.136 8	0.48		20	0.027
PPC		653	0.639 1	3.13	125.58		
061008	未精制	704	0.428 1	7.12		20	0.086
PPC		616	0.866 2	1.84	109.52		
061101	精制	1 305	0.016 7	0.35		20	0.003
PPC		674	0.541 1	0.67	131.08		
061108	精制	1 093	0.042 4	2.04		20	0.008
PPC		661	0.596 3	2.27	138.47		

标准曲线: $\text{Log}T = 2.788\ 1 - 0.189\ 3\text{Log}C$, $r = -0.995$ 。

结果显示,样品20倍稀释液的外加内毒素回收率在50%~200%内,可进行定量测定,检测结果显示未精制的4批样品的内毒素含量较高,超出了限度,精制过的2批样品内毒素含量显著降低,且均小于限度。

2.6 供试品的热原检测

取其中4批样品,按 $300\text{ mgI}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ [1]的剂量进行家兔法热原检测,结果显示未精制的2批样品(060708、060706)热原不合格,精制的2批样品(061101、061108)热原检测合格,与定量测定的结果有一定的相关性。

3 讨论

3.1 经过十几年的发展,在我国的药品检验领域,

表2 干扰试验结果($n=2$)

Tab 2 Results of interference test ($n=2$)

稀释倍数	批号061008		
	Ai/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	Bi/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%
5	0.662 7	0.721 2	14.6
10	0.651 7	1.103 5	119.7
20	0.375 2	0.831 6	122.4
40	0.190 0	0.622 5	108.1

溶使成 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,再作20倍的稀释。并同时制备样品阳性对照PPC(添加内毒素使成含外加内毒素 $0.4\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$)和标准曲线各浓度系列。分别取上述各液0.2 mL,加到预先加有0.1 mL TAL的反应管内,混合均匀,插入仪器内进行测定,每个浓度重复3管。根据标准曲线计算回收率和样品的内毒素含量。结果见表3。

用鲎试验法替代家兔法来检测产品中的细菌内毒素已经十分广泛和成熟[4,5]。但目前所使用的方法多为凝胶限值法,其检验结果只能判断产品的内毒素含量是否超标,而无法给出准确的含量。而采用定量法(有动态浊度法、终点比色法等),则可以相对准确地测定真实的内毒素含量。由于该法较凝胶法更为快速、准确,在成品检验、中间体控制、工艺筛选等方面有更大的优势。比如本试验所测定的经不同精制处理的样品,若用常用的凝胶法检测,难以检测其细菌内毒素的含量,而采用定量法则可有效检测并结合检测结果来控制精制工艺的结果,从而快速有效地控制产品的质量。该法具有推广的实用价值。

3.2 试验结果表明,用动态浊度法来定量检测碘海醇中的细菌内毒素的实际含量是可行的。样品对本

法基本无干扰作用。该法可有效地用于产品的日常检验和过程质量控制。

REFERENCES

- [1] USP30-NF 25 Vol 2 Iohexol Injection (美国药典 25 版) [S] 2383-2384.
- [2] Ch. P(2005) Vol II(中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: Appendix, 85-88.
- [3] YBH11692004 Iohexol (国家食品药品监督管理局标准) [S].

- [4] DING S P, DU G, LI S P. Quantitative determination of bacterial endotoxin in cefpirome sulfate for injection [J]. Her Med (医药导报), 2007, 26(4) 420-422.
- [5] CHEN J Y. Quantitative measurement of bacterial endotoxin in cefotiam hydrochloride for injection by kinetic turbidimetric limulus test [J]. Anti-Infection Pharm (抗感染药学). 2006, 3(3): 107-109.

收稿日期: 2008-07-09