

# 布洛芬细菌内毒素检查法研究

张德波(成都市药品检验所, 成都 610045)

**摘要:** 目的 建立布洛芬细菌内毒素检查方法。方法 按中国药典 2010 年版二部, 确定合理的布洛芬内毒素限值, 并研究布洛芬对细菌内毒素与鲎试剂反应的干扰情况, 以确定其最大不干扰试验浓度。结果 根据临床实际应用情况, 确定布洛芬的内毒素限值为  $L=0.20 \text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 使用 2 个厂家生产的鲎试剂试验, 结果本品配制成  $\leq 0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度对反应无干扰作用。结论 细菌内毒素检查法可用于布洛芬细菌内毒素的检查。

**关键词:** 布洛芬; 细菌内毒素检查; 干扰试验

中图分类号: R927.33

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)03-0261-04

## Study on Testing for Bacterial Endotoxin in Ibuprofen

ZHANG Debo(*Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610045, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method of examining bacterial endotoxin for ibuprofen. **METHODS** To determine the reasonable limit of bacterial endotoxin by Chinese Pharmacopoeia 2010; and study on testing for bacterial endotoxin to determine the noninterference concentration for ibuprofen. **RESULTS** According the dose of clinical medication to determine the most suitable limit of bacterial endotoxin in preparations for ibuprofen was  $0.20 \text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$  and used the TAL of two manufacturers to test, and it was proved that the maximum noninterference concentration was  $0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the best testing concentration was no more than  $0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . **CONCLUSION** It was showed that the method is suitable for the ibuprofen of bacterial endotoxin test.

**KEY WORDS:** ibuprofen; bacterial endotoxin test; interference test

布洛芬为解热镇痛非甾体抗炎药, 可用于治疗疼痛、痛风、关节炎、以及发烧等疾病。中国药典 2010 年版二部收录了本品的片剂、胶囊、缓释胶囊、口服溶液、混悬滴剂和糖浆 6 种制剂, 但没有收录本品的注射制剂。本实验考查布洛芬经精制工艺处理, 制备成注射用原料的细菌内毒素检查方法。

## 1 材料

### 1.1 鲎试剂

标示灵敏度( $\lambda$ ):  $0.25 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL}\cdot\text{支}^{-1}$ , 批号: 1005132;  $\lambda$ :  $0.125 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL}\cdot\text{支}^{-1}$ , 批号: 1004121, 均来源于湛江安度斯生物有限公司。 $\lambda$ :  $0.25 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 规格:  $0.1 \text{ mL}\cdot\text{支}^{-1}$ , 批号: 09112412;  $\lambda$ :  $0.125 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,

作者简介: 张德波, 男, 副主任中药师 Tel: (028)85366371

E-mail: zhangdebo69@126.com

规格: 0.1 mL·支<sup>-1</sup>, 批号: 10032912, 均来源于福州新北生化工业有限公司。

### 1.2 细菌内毒素检查用水

检查用水含细菌内毒素<0.003 EU mL<sup>-1</sup>(湛江安度斯生物有限公司, 规格: 5 mL·支<sup>-1</sup>, 批号: 1003250)。

### 1.3 细菌内毒素工作标准品(冻干)

细菌内毒素工作标准品(冻干)(中国药品生物制品检定所, 效价: 120 EU·支<sup>-1</sup>, 批号: 150601-200963)。

### 1.4 药品

布洛芬, 批号: 1001011, 1001012, 1001013,

1002010, 1002011, 原料, 每袋约 2 g, 巨化集团公司制药厂提供。

## 2 方法与结果<sup>[1-3]</sup>

### 2.1 鲎试剂灵敏度复核

以细菌内毒素检查用水溶解内毒素工作标准品, 并配制成含内毒素为 2.0λ, 1.0λ, 0.5λ, 0.25λ 系列浓度的溶液, 依法进行加样操作。每一浓度平行做 4 支, 同时用细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照, 记录结果, 并按式  $\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/4)$  计算  $\lambda_c$  值, 结果见表 1。由结果可知, 每一批鲎试剂灵敏度测得值均在 0.5~2.0 λ 范围内, 符合要求, 可按标示灵敏度值使用。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Sensitivity verification of TAL

TAL		细菌内毒素工作标准品液浓度/EU·mL <sup>-1</sup>				阴性对照	结果/EU·mL <sup>-1</sup>
标示灵敏度/EU·mL <sup>-1</sup>	批号	2λ	λ	0.5λ	0.25λ		
0.250	1005132	++++	++++	----	----	--	0.250
0.125	1004121	++++	++++	----	----	--	0.125
0.250	09112412	++++	++++	----	----	--	0.250
0.125	10032912	++++	++++	----	----	--	0.125

注: +形成凝胶且倒转凝胶不变形或滑落; -未形成凝胶

Note: +form a gel and don't deform or slide when upside down; - not to form a gel

### 2.2 内毒素限值(L)确定

本品注射制剂临床[用法用量]: 使用前需用 0.9%氯化钠注射液、5%葡萄糖注射液或乳酸钠林格注射液稀释成浓度为 4 mg·mL<sup>-1</sup> 或更低的溶液, 方能使用。

用于镇痛时, 每次给药 400~800 mg, 每 6 h 1 次, 每次输注时间不少于 30 min; 用于发烧时, 每次给药 400 mg, 每 4~6 h 1 次, 或每次给药 100~200 mg, 于每 4 h 1 次, 每次输注时间不少于 30 min。

故本品临床使用的最大剂量为: 1 h 使用 800 mg。

$$L = \frac{5.0 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{800 \text{ mg} \cdot (60 \text{ kg})^{-1} \cdot \text{h}} = 0.375 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$$

考虑临床使用的具体情况, 为了保证临床用药的安全性, 将本品细菌内毒素限值定为  $L=0.20 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

### 2.3 干扰试验预试验

取供试品(批号 1001011), 无菌操作法, 精密称取适量, 加 1.5 倍量无内毒素碳酸钠后, 用细菌内毒素检查用水溶解并稀释成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31 mg·mL<sup>-1</sup> 系列浓度。依法操作试验。结果见表 2。预试结果显示, 供试品配制成 >1.25 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度时对反应有抑制性干扰作用; 供试品配制成 ≤1.25 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度可能对反应无干扰作用。

表 2 布洛芬细菌内毒素检查干扰试验预试结果

Tab 2 Results of bacterial endotoxins preliminary test for product

鲎试剂	组别	供试品各稀释浓度/mg·mL <sup>-1</sup>					阴性对照	阳性对照	
		10	5	2.5	1.25	0.625			0.31
1004121	供试品阳性	----	----	----	++++	++++	++++	-	+
	供试品阴性	--	--	--	--	--	--	-	+
10032912	供试品阳性	----	----	----	++++	++++	++++	-	+
	供试品阴性	--	--	--	--	--	--	-	+

注: +形成凝胶且倒转凝胶不变形或滑落; -未形成凝胶

Note: +form a gel and don't deform or slide when upside down; - not to form a gel

## 2.4 供试品干扰试验

取供试品 3 批, 无菌操作法, 分别精密称取适量, 再分别加入 1.5 倍量无热原碳酸钠, 用细菌内毒素检查用水分别溶解并稀释成 1.25, 0.625 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 依法试验。结果见表 3。

表 3 布洛芬细菌内毒素检查干扰试验结果

Tab 3 Results of inhibition or enhancement test for products

鲎试剂	供试品		添加的细菌内毒素工作标准品浓度/EU·mL <sup>-1</sup>				阴性对照	结果/EU·mL <sup>-1</sup>
	批号	浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	2λ	λ	0.5λ	0.25λ		
1005132(0.25EU·mL <sup>-1</sup> )	BET 水	-	++++	++++	----	----	--	0.25
	1001011	1.25	++++	++++	----	----	--	0.25
	1001012	1.25	++++	++++	----	----	--	0.25
	1001013	1.25	++++	++++	----	----	--	0.25
09112412(0.25 EU·mL <sup>-1</sup> )	BET 水	-	++++	++++	----	----	--	0.25
	1001011	1.25	++++	----	----	----	--	0.50
	1001012	1.25	++++	----	----	----	--	0.50
	1001013	1.25	++++	----	----	----	--	0.50
1004121(0.125 EU·mL <sup>-1</sup> )	BET 水	-	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001011	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001012	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001013	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125
10032912(0.125 EU·mL <sup>-1</sup> )	BET 水	-	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001011	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001012	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125
	1001013	0.625	++++	++++	----	----	--	0.125

注: +形成凝胶且倒转凝胶不变形或滑落; -未形成凝胶

Note: + form a gel and don't deform or slide when upside down; - not to form a gel

## 3 质量标准起草

取本品适量, 加 1.5 倍量的无内毒素碳酸钠, 用细菌内毒素检查用水溶解并稀释成每 1 mL 中含布洛芬 ≤ 0.625 mg 的溶液, 依法检查<sup>[1]</sup>, 每 1 mg 布洛芬中含内毒素的量应 < 0.20 EU。

## 4 样品内毒素的常规检查

另取布洛芬样品原料 2 批(批号 1002010, 1002011), 无菌操作法, 将供试品液配制最大不干扰浓度 0.625 mg·mL<sup>-1</sup>, 按本研究起草的标准进行常规检验, 结果见表 4。结果显示, 本实验成立, 供试品管呈阴性。2 批样品的内毒素检查符合起草的质量标准要求。

## 5 讨论

### 5.1 使用碳酸钠溶解供试品

布洛芬在水中几乎不溶, 根据布洛芬在氢氧化钠或碳酸钠试液中易溶的性质, 选择加入碳酸钠的方法使布洛芬溶解。如选择添加氢氧化钠,

结果显示, 当供试品配制为 1.25 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度时, 用福州新北生产的鲎试剂试验, 结果有一定的抑制性干扰作用; 当供试品配制为 0.625 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度时, 用 2 个厂家生产的鲎试剂试验均无干扰作用。

表 4 布洛芬细菌内毒素检查常规检验结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxins test for products

试管编号	供试品管		阳性对照管		供试品阳性对照管		阴性对照管	
	1	2	3	4	5	6	7	8
鲎试剂/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
供试品/mL	0.1	0.1						
内毒素阳性液/mL			0.1	0.1				
供试品阳性液/mL					0.1	0.1		
BET 水/mL							0.1	0.1
结果判断	-	-	+	+	+	+	-	-

注: +形成凝胶且倒转凝胶不变形或滑落; -未形成凝胶

Note: + form a gel and don't deform or slide when upside down; - not to form a gel

则氢氧化钠溶液需要用盐酸调节 pH 值, 操作复杂, 且氢氧化钠有腐蚀性, 操作的安全性差, 而碳酸钠无腐蚀性, 操作安全可靠。

### 5.2 碳酸钠中内毒素的去除方法

碳酸钠的熔点为  $851^{\circ}\text{C}$ ，可直接使用  $250^{\circ}\text{C}$  干热 30 min 以上的药典方法去除热原质，并且可与实验用玻璃器具除热原同时进行，简便快捷。有资料采取  $170^{\circ}\text{C}$  干热 4 h 的方法除碳酸钠的热原质，笔者认为此法并不好，会给实际工作增加很多麻烦。

### 5.3 碳酸钠添加量与方法

在溶解布特洛芬时，可采取 2 种方式添加碳酸钠：①先将碳酸钠配制成溶液来溶解与稀释供试品；②直接在供试品中定量添加碳酸钠，然后再加细菌内毒素检查用水溶解与稀释。本研究显示采取第 2 种方法较好，若每一步均使用碳酸钠液配制，容易导致最终供试液中碳酸钠量过大而影响实验结果。

### 5.4 内毒素限值确定

临床应用时，配制布洛芬的稀释液如氯化钠注射液含有一定的内毒素，在计算布洛芬的内毒素限值时应加以扣除，这样才能保证临床用药不会因为二者的内毒素叠加而引起发热现象。确定稀释液中含有的大致内毒素量的方法为：假定配

制这些稀释液的溶质都是经处理后使用，几乎无内毒素，稀释液的内毒素主要集中在配制溶质的水中，如灭菌注射用水( $L=0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )，因此，稀释液含有的内毒素可按  $L=0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$  计算(如果按稀释液的内毒素限值  $L=0.5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$  计算则太严)。布洛芬需要稀释成浓度为  $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  或更低的溶液方能使用，即每次使用 800 mg 布洛芬，需要的稀释液至少是 200 mL，含有的内毒素量为  $200\text{ mL}\times 0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}=50\text{ EU}$ 。同时还要考虑临床应用时注射器，输液器含有的内毒素。减去这些因素含有的内毒素，最后得出较为安全的布洛芬的内毒素限值。

### REFERENCES

- [1] ChP(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部)[S]. Appendix XI E.
- [2] ZHANG D B, PU X F, YANG K. Study of testing for bacterial endotoxin in oxaliplatin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2004, 21(6): 487-490.
- [3] ZHANG D B, PU X F, YANG Y Q. Study on bacterial endotoxins test for paclitaxel injection [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2006, 7(6): 23-27.

收稿日期: 2011-08-31