

^{18}F -16 α -17 β -氟雌二醇注射液细菌内毒素检查法的建立

郭莘^{1,2}, 史道华^{1,3} (1.福建医科大学药学院, 福州 350108; 2.福建省立医院 PET-CT 中心, 福州 350001; 3.福建省妇幼保健院药剂科, 福州 350001)

摘要: 目的 建立 ^{18}F -16 α -17 β -氟雌二醇(^{18}F -FES)注射液细菌内毒素检查法。方法 参照中国药典 2010 年版二部附录 VIE 收载的细菌内毒素检查法进行试验。结果 ^{18}F -FES 注射液稀释 10 倍时对细菌内毒素检查无干扰, 其细菌内毒素限值为 $5 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。10 批样品的细菌内毒素检查均符合规定。结论 所建立的细菌内毒素检查法操作简单, 重复性好, 方法可靠, 可用于 ^{18}F -FES 注射液的细菌内毒素检查。

关键词: ^{18}F -16 α -17 β -氟雌二醇注射液; 细菌内毒素检查; 干扰试验

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0322-05

Establishment of Bacterial Endotoxin Test for ^{18}F -16 α -17 β -Fluoroestradiol(^{18}F -FES) Injection

GUO Shen^{1,2}, SHI Daohua^{1,3} (1.College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 2.Centre of PET-CT, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 3.Department of Pharmacy, Fujian Provincial Maternity and Children Health Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of bacterial endotoxin test for ^{18}F -16 α -17 β -fluoroestradiol(^{18}F -FES) injection. **METHODS** The test procedure was carried out according to the bacterial endotoxin test in China Pharmacopoeia (2010) Volume II. **RESULTS** Ten-fold dilution of ^{18}F -FES injection had no interferential effect on the bacterial endotoxin test. The limit value of the bacterial endotoxin was $5 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results of bacterial endotoxin test were conformed to the required stipulation in 10 batches of samples. **CONCLUSION** The method of bacterial endotoxin test can be used to control the quality of ^{18}F -FES injection.

KEY WORDS: ^{18}F -16 α -17 β -fluoroestradiol(^{18}F -FES); bacterial endotoxin test; interference test

^{18}F -16 α -17 β -氟雌二醇(^{18}F -FES)是一种新型雌激素受体显像剂, 为正电子发射断层显像(PET)的放射性诊断用药^[1]。该显像剂为雌激素类似物, 能够特异性地与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合。 ^{18}F -FES 受体显像可为临床提供乳腺癌组织及转移灶内癌细胞的 ER 分布、密度变化及活动状态等方面的信息。

家兔对正电子放射性药品产生的 γ 射线及 β 射线比较敏感, 注射一定剂量正电子放射性药品后可致体温升高, 从而造成正电子放射性药品热原检查结果呈假阳性, 故用家兔法检查放射性药品的热原质不可靠^[2-3]。另外, 临床常用的放射性药品半衰期多数很短, 而采用家兔法检查热原周期较长, 因此检查的结果无实用意义。细菌内毒素检查法是利用鲎试剂来检测或量化由革兰氏阴性菌产生的细菌内毒素, 以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。鲎试剂用于检测细菌内毒素, 操作简单, 灵敏度高, 重复性

好, 实用性强。基于上述原因, 本研究拟采用细菌内毒素检查法检查放射性药品的细菌内毒素。目前中国药典(2010 年版)二部尚未收载 ^{18}F -FES 注射液, 笔者参照本版附录“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”, 为检查正电子放射性药品的细菌内毒素, 严格控制药品质量, 建立了该注射液的细菌内毒素检查法。

1 实验材料

1.1 仪器

ZH-2 旋涡混合器(天津药典标准仪器厂); GNP-9160 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂

鲎试剂(TAL, 福州新北生化工业有限公司, 灵敏度为 $0.5 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 批号: 10031812); 细菌内毒素工作标准品(效价为 $10 \text{ EU}\cdot\text{支}^{-1}$, 批号: 100421); 细菌内毒素检查用水(福州新北生化工业有限公司, 内毒素含量 $<0.015 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 批号:

作者简介: 郭莘, 女, 硕士生, 主管药师 Tel: (0591)87557768
授, 主任药师, 硕士 Tel: (0591)88312079 E-mail: shidh@yeah.net

E-mail: guoshenldq@sina.com *通信作者: 史道华, 男, 博士, 教

10031005); 鲎试剂(TAL, 广西北海市兴龙生物制品有限公司, 灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批号: 111010); ^{18}F -FES 注射液(福建省立医院 PET-CT 中心, $20 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$, 批号: 20110428, 20110503, 20110507, 20110511, 20110620, 20110805, 20110903, 20111027, 20111115, 20111126)。

2 方法

2.1 确定细菌内毒素限值^[4-6]

根据 $L=K/M$, L 为供试品细菌内毒素限值, K 为人每公斤体质量每小时最大可接受的内毒素剂量, 放射性药品注射剂 $K=2.5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, M 为人用每公斤体质量每小时的供试品最大剂量, 本品临床用量为 $15 \sim 20 \text{ mL}$, 人均体质量按 60 kg 计算, L 理论值为 $7.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 为从严控制药品质量, 拟定本品内毒素限值(L)为 $5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 也符合美国药典中非肠道 PET 放射性药物的细菌内毒素限量 ($5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 175 \text{ EU} \cdot \text{V}^{-1}$, V 为最大注射体积)。

2.2 确定最大有效稀释倍数(MVD)^[4]

根据 $\text{MVD}=c/L$, 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 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 表示时, 则 c 等于 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$, λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 本次试验采用的鲎试剂灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可得本供试品最大有效稀释倍数为 10 倍。

2.3 复核鲎试剂灵敏度(λ)^[4]

根据本试验鲎试剂灵敏度的标示值(λ), 将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解, 在旋涡混合器上混合 15 min , 然后制成 2.0λ , 1.0λ , 0.5λ , 0.25λ 4 个浓度的内毒素标准溶液, 每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s 。取复溶后规格为 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ 的鲎试剂原安瓿 18 支, 其中 16 支分别加入 0.1 mL 不同浓度的内毒素标准溶液, 每一个内毒素浓度平行做 4 支; 另外 2 支加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将安瓿中溶液轻轻混匀后, 封闭管口, 垂直放入 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 保温 $(60 \pm 2) \text{ min}$ 。

2.4 供试品干扰试验^[7]

为确保 ^{18}F -FES 注射液对细菌内毒素检查法不造成干扰, 应首先确定供试品对鲎试剂的最大不干扰浓度。用细菌内毒素检查用水将 ^{18}F -FES 注射液稀释成 $1:2$, $1:4$, $1:6$, $1:8$, $1:10$ 系列浓度, 与 ^{18}F -FES 注射液原液一起作为供试品阴性对照(NPC)系列; 同时每个浓度中加入 2.0λ 的细

菌内毒素工作标准品, 作为供试品阳性对照(PPC)系列, 每一浓度平行做 2 支。另取 2 支试管, 加入等体积细菌内毒素检查用水(BET)作为阴性对照; 取 2 支试管, 加入 2.0λ 浓度的细菌内毒素工作标准品溶液作为阳性对照。

2.4.1 鲎试剂溶液制备 取 2 个不同厂家灵敏度均为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂若干支, 用 1 mL 吸管, 吸取细菌内毒素检查用水 0.1 mL 沿鲎试剂瓶壁缓缓加入到瓶中, 轻轻转动瓶壁, 使内容物充分溶解, 避免产生气泡。

2.4.2 供试品稀释液制备 将 3 批 ^{18}F -FES 注射液用细菌内毒素检查用水进行稀释, 使其最终稀释倍数为 10 倍。

2.4.3 供试品内毒素阳性对照液制备 用稀释好的供试品将同一支细菌内毒素工作标准品制成 2.0λ 、 1.0λ 、 0.5λ 、 0.25λ 浓度的供试品内毒素阳性对照液。

2.4.4 细菌内毒素工作标准品阳性对照液制备 用细菌内毒素检查用水将同一支细菌内毒素工作标准品制成 2.0λ , 1.0λ , 0.5λ , 0.25λ 浓度的细菌内毒素工作标准品阳性对照液。

2.4.5 加样 取复溶后规格为 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ 的鲎试剂原安瓿若干支, 分为 4 组。其中, 第 1 组各加入 0.1 mL 稀释好的 ^{18}F -FES 注射液, 作为供试品管; 第 2 组各加入 0.1 mL 细菌内毒素工作标准品阳性对照液, 作为阳性对照管; 第 3 组各加入 0.1 mL 供试品内毒素阳性对照液, 作为供试品阳性对照管; 第 4 组各加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水, 作为阴性对照管。每一个内毒素浓度平行做 4 支, 阴性对照管平行做 2 支。将安瓿中溶液轻轻混匀后, 封闭管口, 垂直放入 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 保温 $(60 \pm 2) \text{ min}$ 。

2.5 供试品的细菌内毒素检查^[4]

根据拟定的细菌内毒素限值以及干扰试验结果, 对 10 批次 ^{18}F -FES 注射液进行细菌内毒素检查。取复溶后规格为 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ 的鲎试剂原安瓿若干支, 分为 4 组, 第 1 组各加入 0.1 mL 按有效稀释倍数稀释的供试品溶液, 作为供试品管; 第 2 组各加入 0.1 mL 用 BET 水将细菌内毒素工作标准品制成的 2λ 浓度的内毒素溶液, 作为空白阳性对照; 第 3 组各加入 0.1 mL BET 水, 作为空白阴性对照; 第 4 组各加入 0.1 mL 用稀释好的供试品溶液将细菌内毒素工作标准品制成 2λ 浓度的内毒素

溶液，作为供试品阳性对照管。每一组均平行做 2 支。

3 结果

3.1 鲎试剂灵敏度(λ)的复核

每批鲎试剂其最大浓度 2 λ 管均为阳性，最

低浓度 0.25 λ 管均为阴性，阴性对照管为阴性；鲎试剂灵敏度的测定值(E_s)为 0.5 λ ~2.0 λ 。表明该两批号鲎试剂可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度(E_t)为该两批号鲎试剂的灵敏度，结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核

Tab 1 Results of TAL sensitivity recheck test

鲎试剂(批号)	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹				阴性对照	E_s /EU·mL ⁻¹	E_s/E_t
	1.0	0.5	0.25	0.125			
111010	++++	++++	----	----	--	0.5	1
10031812	++++	++++	----	----	--	0.5	1

3.2 供试品干扰试验

供试品干扰预试验结果表明，¹⁸F-FES 注射液稀释到 10 倍时，对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰，结果见表 2。以 10 倍稀释液进行正式的干扰试验。

¹⁸F-FES 注射液干扰试验的 E_s 、 E_t 均在 0.5 λ ~

2.0 λ 之间，且 E_s/E_t 的比值在 0.5~2 之间。 E_s 在 0.5 λ ~2 λ 之间，表明所用鲎试剂的灵敏度符合规定，此时进行的干扰试验是有效的。 E_t 在 0.5 λ ~2.0 λ 之间，且 E_s/E_t 的比值在 0.5~2 之间时表明 ¹⁸F-FES 注射液在本试验中的浓度对细菌内毒素试验无干扰因素，即无增强或抑制作用，结果见表 3。

表 2 供试品干扰预试验

Tab 2 Results of interference pre-test of samples

鲎试剂批号 (0.5 EU·mL ⁻¹)	供试品批号	溶液	供试品稀释倍数						阴性对照	阳性对照
			原液	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10		
111010	20111126	PPC	--	--	--	--	--	++	--	++
		NPC	--	--	--	--	--	--		
	20111027	PPC	--	--	--	--	--	++		
		NPC	--	--	--	--	--	--		
	20111115	PPC	--	--	--	--	--	++		
		NPC	--	--	--	--	--	--		
10031812	20111126	PPC	--	--	--	--	--	++	--	++
		NPC	--	--	--	--	--	--		
	20111027	PPC	--	--	--	--	--	++		
		NPC	--	--	--	--	--	--		
	20111115	PPC	--	--	--	--	--	++		
		NPC	--	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	--	--	++		
		NPC	--	--	--	--	--	--		

表 3 供试品干扰试验

Tab 3 Results of interference test of samples

鲎试剂批号 (0.5 EU·mL ⁻¹)	供试品批号	内毒素浓度/EU·mL ⁻¹				阴性对照	测定值		E_s/E_t
		1	0.5	0.25	0.125		E_s	E_t	
111010	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5		
	20111126	++++	++++	----	----	--		0.5	1
	20111027	++++	++++	----	----	--		0.5	1
	20111115	++++	++++	----	----	--		0.5	1
10031812	BET 水	++++	++++	----	----	--	0.5		
	20111126	++++	++++	----	----	--		0.5	1
	20111027	++++	++++	----	----	--		0.5	1
	20111115	++++	++++	----	----	--		0.5	1

3.3 供试品细菌内毒素检查

阴性对照溶液的平行管均为阴性，供试品阴性对照溶液的平行管均为阳性，阳性对照溶液的平行管均为阳性，表明该试验有效。供试品 ¹⁸F-FES 注射液的平行管均为阴性，判定该供试品符合规定，结果见表 4。

表 4 供试品细菌内毒素检查

Tab 4 Results of endotoxin of sample

鲎试剂 (批号)	供试品 批号	供试品	供试品 阳性对照	阳性 对照	阴性 对照
10031812	20110428	--	++	++	--
	20110503	--	++		
	20110507	--	++		
	20110511	--	++		
	20110620	--	++		
	20110805	--	++		
	20110903	--	++		
	20111027	--	++		
	20111115	--	++		
	20111126	--	++		

4 讨论

建立新药的细菌内毒素检查法，首先需查阅最新版《中国药典》、《临床用药须知》、《美国药典》等权威资料，然后根据临床最大用量规定及实验结果，确定其细菌内毒素限值。进行试验之前，要注意不同厂家生产鲎试剂所用的原材料和生产工艺有所不同，可能导致不同厂家之间、同一生产厂家各批次之间的鲎试剂质量不稳定和差异性。每批新的鲎试剂在用于试验之前都应进行灵敏度的复核，当灵敏度测定值在其标示值的 0.5~2.0 之间时，方可用于细菌内毒素的检查。为消除供试品对细菌内毒素检查的干扰作用(增强或抑制)，应经干扰试验确证。即应用 2 个厂家或 2 个以上厂家的鲎试剂对 3 批样品进行鲎试剂检查(普通凝胶法或动态浊度法定量试验)，如结果能证实样品在不低于最大有效稀释浓度时对细菌内毒素检查无干扰作用，可建立该品种的细菌内毒素检查法。

在供试品干扰试验中，如果实验结果空白阳性和空白阴性对照符合要求，供试品阳性管呈阴性或阴性管呈阳性，并且供试品经热原检查法测试符合要求，说明供试品可能有一定干扰作用(抑

制或增强)，反之该样品在该浓度下可能无干扰。供试品如有干扰可尝试选用更高灵敏度的鲎试剂，并对供试品进行更大倍数的稀释后再进行干扰试验，一般情况下大部分的干扰作用能得到有效控制^[8-12]；或者通过其他适宜的方法(如滤过、中和、透析或加热处理等)排除干扰。尽量确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性。

在供试品细菌内毒素检查结果中，如果供试品两管均为阴性，应认为符合规定。如两管均为阳性，则不符合规定；如果两管中有一管为阳性，另一管为阴性，则应另取 4 支供试品管按同法操作进行复试，如果 4 管中有一管为阳性，即认为不符合规定。空白阳性对照呈阴性或供试品阳性对照呈阴性或空白阴性对照呈阳性，则可判定试验无效。

5 结论

根据中国药典 2010 年版，参照美国药典 32-NF27 中的细菌内毒素限值计算得出 ¹⁸F-FES 注射液每 1 mL 含细菌内毒素的量应<5 EU，1：10 倍的稀释液对细菌内毒素试验不存在干扰作用。本研究所建立的细菌内毒素检查法操作简单，重复性好，方法可靠，可用于 ¹⁸F-FES 注射液的细菌内毒素检查。福建省立医院 PET-CT 中心提供的 ¹⁸F-FES 注射液可采用细菌内毒素检查法控制药品质量，且该注射液细菌内毒素检查符合规定。

REFERENCES

[1] KUMAR P, MERCER J, DOERKSON C, et al. Clinical production, stability studies and PET imaging with 16-alpha-[¹⁸F]fluoroestradiol ([¹⁸F]FES) in ER positive breast cancer patients [J]. J Pharm Pharm Sci, 2007, 10(2): 256s-265s.

[2] ZHONG J M, XIA Z M, WANG S L. Production and quality control administration of PET radioactive drugs in the USA [J]. Foreign Med Sci(Radiat Med Nucl Med)(国外医学 放射医学核医学分册), 1999, 23(5): 198-202.

[3] DANG S Q, XIA Z M. Quality guarantee and quality control of PET radioactive drugs [J]. Isotopes(同位素), 2001, 14(8): 241-245.

[4] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 99-102.

[5] US.P(2009)Vol 33(3) [S]. 2009: 539.

[6] SFDA. Good preparation practice of positron radioactive drugs in medical institution [S]. 2006.

[7] PAN W S, XIAO Y, PAN J M. Method of bacterial endotoxin test of fluorescein sodium injection [J]. J China Pharm(中国药房), 2009, 20(13): 1010.

[8] WU H Y, MENG D S. Establishment of bacterial endotoxins test for multi-trace elements injection(II) [J]. J China

- Pharm(中国药房), 2011, 22(5): 440-442.
- [9] WANG Y M, WANG J C, CHEN W P. Study on bacterial endotoxin test of vinpocetine and glucose injection [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(20): 40-41.
- [10] HE J, GAO J, CHEN J W. Interference factors and theirs elimination of bacterial endotoxins test(gel-clot method) [J]. China Pharm(中国药师), 2010, 13(2): 284-287.
- [11] ZHANG D B. Study on Testing for Bacterial Endotoxin in Ibuprofen [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(3): 261-264.
- [12] LIU H. Bacteria Endotoxin Test of Vitamin B6 for Injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(3): 267-271.
- 收稿日期: 2012-04-09

推荐第 16 届中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目的通知

中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目是由中国药学会与法国施维雅研究院共同设立, 每年评选一次, 旨在鼓励我国优秀青年药物化学工作者立足于国内, 致力于新药研究。设奖十多年来, 有力推动了优秀青年药物化学工作者的健康成长和科学发展。2013 年第 16 届奖项推荐评选工作已经开始。

根据设奖宗旨和国内药物化学学科发展的实际情况, 2013 年奖励办法为: (1)继续面向全国, 奖励 3 名从事药物化学研究的青年药物化学(合成药物和天然药物)学者; 获奖者每人可获得奖金(含税)22000 元人民币、奖杯和证书。(2)面向边远地区的专项资助项目, 资助 1 项研究课题, 经费为 50000 元人民币, 二年内完成; 并颁发专项资助项目证书。(3)如专项资助项目空缺, 则青年药物化学奖奖励名额为 5 名。

申请人条件:

1. 中国药学会会员(中国药学会高级会员或地方药学会普通会员);
2. 年龄在 37 周岁以下(1976 年 1 月 1 日以后出生);
3. 在国内从事药物化学研究并取得优秀成绩(不包括在国外工作);
4. 三年内无长期(超过或等于一年)出国计划;
5. 遵纪守法, 学风正派;
6. 面向边远地区的专项资助项目, 申请人应是内蒙古、宁夏、新疆、西藏、广西、陕西、海南、云南、贵州等省、自治区和延边朝鲜族自治州所属单位科技人员, 符合 1~5 项基本条件, 课题有较高研究价值。

评审程序和颁奖时间:

评审委员会由中国药学会和法国施维雅研究院共同推荐的中外著名药物化学专家组成, 获奖者由评委会民主投票产生候选人, 上报法方终审审定。

详情请查询中国药学会网站(www.cpa.org.cn)。