

帕拉米韦氯化钠注射液细菌内毒素检查方法的建立

乔世琴^{1*}, 孙著作¹, 李维刚¹, 吴立磊²(1.日照市中医医院药剂科, 山东日照 276800; 2.山东绿因药业有限公司, 山东临沂 276000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3853-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.39

摘要 目的:建立帕拉米韦氯化钠注射液细菌内毒素的检查方法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素凝胶检查法,采用不同厂家的鲎试剂,通过干扰试验对不同批号的样品最大不干扰质量浓度及细菌内毒素进行检查。结果:样品质量浓度为2.5 mg/ml时对鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应无干扰;样品的细菌内毒素限值为0.5 EU/ml。结论:本方法可用于帕拉米韦氯化钠注射液的细菌内毒素检查。

关键词 帕拉米韦氯化钠注射液;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test Method for Peramivir Hydrate and Sodium Chloride Injection

QIAO Shi-qin¹, SUN Zhu-ye¹, LI Wei-gang¹, WU Li-lei²(1.Dept. of Pharmacy, Rizhao Hospital of TCM, Shandong Rizhao 276800, China; 2.Shandong Lvyin Pharmaceutical Co., Ltd, Shandong Linyi 276000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test for Peramivir hydrate and sodium chloride injection. METHODS: Maximum non-interference concentration of the sample with different batches were used for interference test. was determined by interference test according to endotoxin gel method stated in Chinese Pharmacopoeia (2010 edition) and bacterial endotoxin test by tachypleus amoebocyte lysate from 2 manufacturers. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test could be excluded when the sample was diluted to 2.5 mg/ml and the limit of bacterial endotoxins was 0.5 EU/ml. CONCLUSIONS: The established method can be used to detect the bacterial endotoxin of Peramivir hydrate and sodium chloride injection.

KEYWORDS Peramivir hydrate and sodium chloride injection; Bacterial endotoxin test; Gel method; Interference test

帕拉米韦是由美国生物晶体公司研制的一种环戊烷神经氨酸酶抑制剂,是世界首个静脉途径治疗流感的药物,该药可有效抑制各种流感病毒株,具有耐受性好、毒性小等优点。2010年由日本盐野义制药株式会社推广上市,用于甲型、乙型流感病毒感染的治疗^[1]。2013年,我国国家食品药品监督管理总局批准抗流感新药帕拉米韦氯化钠注射液上市,现有临床试验数据证明该药对甲型和乙型流感有效^[2]。但目前尚未有帕拉米韦氯化钠注射液细菌内毒素检查法的文献报道。为确保临床用药安全,笔者采用细菌内毒素凝胶检查法^[3-4]检测了帕拉米韦氯化钠注射液中细菌内毒素,现报道如下。

1 材料

KXB-12A型恒温培养箱(上海科析试验仪器厂);XW-8A型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);PHS-2F型雷磁酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司);XS 105型电子天平(德国Sartorius公司)。

帕拉米韦氯化钠注射液(山东绿因药业有限公司,批号:130901、130902、130903,规格:60 ml:300 mg);鲎试剂[TAL,湛江安度斯生物有限公司,批号:1010211,标示灵敏度:0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1007121,标示灵敏度:0.125 EU/ml];细菌内毒素工作标准品(CSE,湛江安度斯生物有限公司,批号:1010150,规格:100 EU/ml);细菌内毒素检查(BET)用水(湛江安度斯生物有限公司,批号:1011230,规格:50 ml/瓶)。

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0633-8290853。E-mail:pharm_2012@126.com。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素限值(L)的确定

参考相关文献^[5-6],确定大容量注射液的细菌内毒素限值L为0.5 EU/ml。根据公式 $L=K/M$ 计算。K为人用每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K=5 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$;M为人用每千克体质量每小时的最高剂量。帕拉米韦氯化钠注射液静脉注射最大用药剂量为600 mg(120 ml),给药时间每次至少为15 min,平均体质量按60 kg计,静脉注射时间按1 h计,故 $L=K/M=2.5 \text{ EU}/\text{ml}$ 。根据《化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则》的要求,为保证用药安全,本研究规定帕拉米韦氯化钠注射液的细菌内毒素限值为0.5 EU/ml。

2.2 样品最小有效稀释浓度(c)的确定

根据公式 $c=\lambda/L$ 计算。式中,L为0.5 EU/ml, λ 为TAL灵敏度。目前,市售TAL的 λ 为0.50、0.25、0.125、0.0625、0.03 EU/ml,得c为5.0、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/ml。

2.3 TAL灵敏度复核试验

根据2010年版《中国药典》(二部)附录TAL灵敏度复核试验的方法操作^[3],结果均符合规定,详见表1[注:“+”表示凝胶形成(阳性);“-”表示凝胶未形成(阴性)]。

2.4 干扰预试验

取BET用水将帕拉米韦氯化钠注射液稀释成质量浓度为5.0、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/ml的系列浓度溶液,作为供试品阴性对照溶液(NPC)。另制备相同浓度的系列供试品溶液,使每一供试品溶液中含有2.0 λ (0.50 EU/ml)的细菌内毒素,作为阳性对照溶液(PPC)。另设CSE的阳性对照管(PC)和BET用水阴性对照管(NC)各2管,按细菌内毒素检查法操作,结果

见表2(注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应)。

表1 TAL灵敏度复核结果

Tab 1 Recheck results of TAL sensitivity test

TAL批号	标示灵敏度, EU/ml	细菌内毒素浓度, EU/ml					阴性对照	复核灵敏度, EU/ml
		0.5	0.25	0.125	0.0625	0.031		
1010211	0.25	++++	+++	---	---	---	--	0.354
1007121	0.125	---	++++	+++	---	---	--	0.149

表2 样品干扰预试验结果

Tab 2 Results of pre-interference test of samples

TAL批号	λ , EU/ml	系列	样品质量浓度, mg/ml					PC	NC
			5.0	2.5	1.25	0.625	0.3125		
1010211	0.25	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--
1007121	0.25	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	++	++	++	++	++	--

预试验结果表明,帕拉米韦氯化钠注射液原液对两批

表3 样品干扰试验结果

Tab 3 Results of interference test of samples

TAL批号	λ , EU/ml	批号	细菌内毒素浓度, EU/ml					NC	Es	Et	Es/Et
			0.5	0.25	0.125	0.0625	0.031				
1010211	0.25	BET水	++++	++++	---	---	---	--	0.25		
		130901	++++	++++	---	---	---	--		0.25	1.0
		130902	++++	++++	+-	---	---	--		0.21	1.2
		130903	++++	++++	---	---	---	--		0.25	1.0
1007121	0.125	BET水	++++	++++	---	---	---	--	0.25		
		130901	++++	++++	---	---	---	--		0.25	1.0
		130902	++++	++++	+-	---	---	--		0.21	1.2
		130903	++++	++++	---	---	---	--		0.25	1.0

取3批次的样品各适量,加BET用水制成质量浓度为2.5 mg/ml的溶液,使用 λ 为0.25 EU/ml的TAL,按文献[7]方法进行细菌内毒素检查,并按要求做阳性(PPC、PC)、阴性(NPC、NC)对照,结果均符合规定,详见表4(注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应)。

表4 细菌内毒素检查结果

Tab 4 Results of bacterial endotoxin test

TAL批号	批号	样品质量浓度, mg/ml	NPC	PPC	PC	NC
1010211	130901	2.5	--	++	++	--
	130902	2.5	--	++	++	--
	130903	2.5	--	++	++	--
1007121	130901	2.5	--	++	++	--
	130902	2.5	--	++	++	--
	130903	2.5	--	++	++	--

3 讨论

细菌内毒素检查法是通过TAL与细菌内毒素间产生凝聚反应以判断供试品中细菌内毒素是否符合规定的一种方法,具有操作简单、检测周期短、灵敏度高、结果准确等优点^[8]。在进行预干扰试验时,加入BET用水将帕拉米韦氯化钠注射液稀释并溶解到质量浓度为2.5 mg/ml时不干扰测定。本试验中笔者采用两家不同企业的TAL对3个批号的样品进行试验对比^[9],在样品质量浓度稀释至2.5 mg/ml及以下时,不干扰细菌内毒素检查。因此,帕拉米韦氯化钠注射液用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

综上所述,本方法可用于帕拉米韦氯化钠注射液的细菌

TAL均有强抑制作用,样品经稀释后,TAL的最大不干扰浓度(2.5 mg/ml)对试验可能无干扰。

2.5 干扰试验

根据预试验结果,用质量浓度为2.5 mg/ml的供试品溶液及BET用水分别稀释CSE,制成细菌内毒素浓度为0.5、0.25、0.125、0.0625、0.031 EU/ml的系列溶液,与两批TAL反应,按2010年版《中国药典》(二部)附录中细菌内毒素检查法进行干扰试验,结果见表3[注: E_s 为BET用水制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值, E_t 为用供试品溶液制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值; $E_s = \lg^{-1}(\sum X_i/4)$, $E_t = \lg^{-1}(\sum X_i/4)$;"+"表示阳性反应;"-"表示阴性反应]。

试验结果表明, E_s 为2~0.5 EU/ml, E_t/E_s 为0.5~2,说明质量浓度为2.5 mg/ml的样品溶液对TAL无干扰,可用于细菌内毒素检查。

2.6 样品细菌内毒素检查

内毒素检查。

参考文献

- [1] 陈小勇,李佩杰,梁杰.一种帕拉米韦德制备方法:中国,201110034757.9[P].2011-02-09.
- [2] 国家食品药品监督管理总局.帕拉米韦氯化钠注射液[EB/OL].(2013-04-05)[2013-08-20]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/>.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录85.
- [4] 刘海疆,陈志勇,田冰,等.长春西汀氯化钠注射液细菌内毒素检查法的研究[J].黑龙江医药,2014,27(1):108.
- [5] 李霞.细菌内毒素检查法在药品申报资料中应注意的问题[J].中国药事,2007,21(6):401.
- [6] 李荣,吴玲.动态浊度法检测乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的细菌内毒素[J].中国药房,2012,23(9):837.
- [7] 厉青,陈娟红,陆金花.注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸内毒素检查方法的建立[J].中国药房,2013,24(25):2376.
- [8] 周梅,武谷.注射用盐酸吉西他滨细菌内毒素检查方法的研究[J].中国药房,2013,24(1):77.
- [9] 蒋立云,汤群,堵娴,等.注射用吗替麦考酚酯的细菌内毒素检查法可行性研究[J].药物分析杂志,2013,28(3):490.

(收稿日期:2014-12-23 修回日期:2015-06-05)

(编辑:刘柳)