

医用聚乙二醇小檗碱液的细菌内毒素检测

陈丹丹, 黄清泉, 王春仁

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 考察医用聚乙二醇小檗碱液(粘连平)细菌内毒素检查方法的可行性。方法: 依据中国药典 2005 年版附录 X E 细菌内毒素检查法, 确定粘连平的有效稀释浓度和细菌内毒素限值。结果: 粘连平在稀释 50 倍后对细菌内毒素实验无干扰作用, 其细菌内毒素限值符合规定。结论: 该产品可以采用细菌内毒素检查法。

关键词 细菌内毒素; 干扰试验; 鲎试剂

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1762-03

Bacterium endotoxin test of medical macrogol 400 berberine hydrochloride

CHEN Dan-dan, HUANG Qing-quan, WANG Chun-ren

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050 China)

Abstract Objective The research reviewed bacterium endotoxin test of medical macrogol 400 berberine hydrochloride **Method** The bacterium endotoxin test were performed to detect valid dilution concentration and limit value according to the Chinese pharmacopoeia edited 2005 **Result** The sample which were diluted 50 times didn't disturb the bacterium endotoxin test and the limit value accord with demand **Conclusion** The product may use bacterium endotoxin test

Key words bacterium endotoxin; interference test; tachyleus amoebocyte lysate

作为评价医用生物材料生物学安全性指标之一的细菌内毒素试验是检测其是否含有引起机体发热的内毒素的方法。细菌内毒素试验利用鲎的变形细胞与微量内毒素产生凝集反应的现象, 来判断样品中细菌内毒素限量是否符合规定, 具有简便、快速、灵敏度高、重现性好等优点。本文依据中国药典 2005 年版附录 X E 细菌内毒素检查法^[1]的要求, 考察医用聚乙二醇小檗碱液(粘连平)细菌内毒素检查方法的可行性。

1 材料与仪器

1.1 试剂

细菌内毒素检查用水 (BET 水): 批号: 080203Q 规格: 25 mL, 生产单位: 湛江安度斯生物有限公司。

细菌内毒素工作标准品: 批号: 2007-5 规格: 100 EU, 生产单位: 中国药品生物制品检定所。

鲎试剂: 灵敏度: $0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批号:

0805082 规格: 0.1 mL, 生产单位: 湛江安度斯生物有限公司。

鲎试剂: 灵敏度: $0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批号: 08012221, 规格: 0.1 mL, 生产单位: 福州新北生化工业有限公司。

1.2 样品 医用聚乙二醇小檗碱液又名粘连平: 第一批样品 (S1) 批号: 070928 第二批样品 (S2) 批号: 080406 第三批样品 (S3) 批号: 090505 规格: 每支 3 mL, 生产单位: 黑龙江燎原科技有限公司。

1.3 仪器 电热鼓风干燥箱, 型号: DL-101-2RS 生产单位: 天津市中环实验电炉有限公司; 恒温水浴箱, 型号: 42 生产单位: 北京市长风仪器仪表公司。

2 方法

2.1 试验准备 实验所用器材, 经 180°C 烘烤 3 h 以上除去可能存在的外源性内毒素。

2.2 鲎试剂灵敏度的复核 按中国药典 2005 年版

附录 X E 细菌内毒素检查法复核鲎试剂灵敏度^[1 2], 结果见表 1。所用 2 个厂家的鲎试剂灵敏度为 0.03 EU · mL⁻¹, 其灵敏度符合规定, 可用于试验。

表 1 灵敏度复核结果

Tab 1 Results of sensitive degree check

批号 (batch number)	细菌内毒素浓度 (centration of bacterium endotoxin) /EU · mL ⁻¹				阴性对照 (negative control)	λ
	0.06	0.03	0.015	0.0075		
0805082	++++	++++	-----	-----	--	0.03
08012221	++++	++--	-----	-----	--	0.03

2.3 计算样品的最大有效稀释倍数 参照医用聚乙二醇小檗碱液的企业标准, 本品限值定为 1.5 EU

表 2 干扰预试验的测定结果

Tab 2 Detemine results of beforehand interfere test

鲎试剂批号 (batch number of tachyus an docyte lysate)	系列 (series)	样品稀释倍数 (d ilution mu ltiple of sample)					
		6倍 (6 times)	12倍 (12 times)	25倍 (25 times)	50倍 (50 times)	阳性对照 (positive control)	阴性对照 (negative control)
0805082	S1 样品阴性对照 (S1 sample negative control)	--	--	--	--	++	--
	S1 样品阳性对照 (S1 sample positive control)	--	--	++	++		
	S2 样品阴性对照 (S2 sample negative control)	--	--	--	--		
	S2 样品阳性对照 (S2 sample positive control)	--	--	++	++		
	S3 样品阴性对照 (S3 sample negative control)	--	--	--	--		
	S3 样品阳性对照 (S3 sample positive control)	--	--	++	++		
08012221	S1 样品阴性对照 (S1 sample negative control)	--	--	--	--	++	--
	S1 样品阳性对照 (S1 sample positive control)	--	--	++	++		
	S2 样品阴性对照 (S2 sample negative control)	--	--	--	--		
	S2 样品阳性对照 (S2 sample positive control)	--	--	++	++		
	S3 样品阴性对照 (S3 sample negative control)	--	--	--	--		
	S3 样品阳性对照 (S3 sample positive control)	++	--	++			

2.5 干扰试验 按中国药典 2005 年版附录 X E 进行干扰试验^[4], 分别用 BET 水及每批样品的 50 倍稀释液将细菌内毒素工作标准品配制成浓度为 0.06 0.03 0.015 0.0075 EU · mL⁻¹ 的溶液, 同时用 BET 水和样品 50 倍稀释液各做两管阴性对照, 用两个厂家灵敏度均为 0.03 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂进行试验 (试验结果见表 3)。结果表明, Es 均在 0.5 λ ~ 2.0 λ, Et 均在 0.5 Es ~ 2.0 Es, 说明样品 50 倍稀释液对细菌内毒素试验无干扰作用, 该产品可以采用细菌内毒素检查法控制其质量。

2.6 样品检测 取 3 批样品的 50 倍稀释液作为供试液, 用灵敏度为 0.03 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂按中国药典进行细菌内毒素检查。结果表明, 阳性对照管均为阳性, 阴性对照管均为阴性, 供试品阳性产品对

· mL⁻¹。目前市售鲎试剂灵敏度一般在 0.5 ~ 0.03 EU · mL⁻¹, 所以供试品在对应不同灵敏度鲎试剂时的最大有效稀释倍数分别为 3 倍, 6 倍, 12 倍, 25 倍, 50 倍。

2.4 干扰预试验 3 批样品原液, 分别用 BET 水制成 6 倍, 12 倍, 25 倍, 50 倍的 3 个系列稀释溶液^[3], 用各系列稀释溶液作溶剂, 稀释内毒素工作标准品, 以制成含细菌内毒素工作标准品 2λ 浓度的内毒素溶液, 用两个厂家灵敏度为 0.03 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂进行试验, 同时做阳性和阴性对照 (试验结果见表 2)。结果表明, 3 批样品的低倍稀释液都对细菌内毒素试验有抑制作用, 在 25 倍或 50 倍稀释后有可能排除干扰。

照管均为阳性, 供试品管均为阴性, 所以该 3 批产品的细菌内毒素检查是符合规定的。即 3 批样品中的细菌内毒素含量均小于 1.5 EU · mL⁻¹。

3 讨论

本文先根据公式计算出医用聚乙二醇小檗碱液 (粘连平) 的有效稀释倍数, 先进行干扰试验的预试验推测无干扰的稀释浓度, 再由正式的干扰试验进行验证, 从而减少试验的盲目性, 避免浪费试剂并且节省时间。由于样品对细菌内毒素检查法存在抑制性干扰, 实验结果证实此干扰作用可通过稀释原液 50 倍的方法而消除。如果样品没有达到 50 倍稀释就进行细菌内毒素试验, 则会导致供试品阳性产品对照管结果为阴性, 供试品管结果为假阴性, 导致一个错误的无效的检测结果。本文所进行的干扰试验

表 3 50倍稀释液的干扰试验结果

Tab 3 Interfere test results of 50 times diluent solution

鲎试剂 (tachyleus an docyte lysate)	系列 (series)	细菌内毒素浓度 (centration of bacterium endotoxin) /EU• mL ^{- 1}				阴性对照 (negative control)	结果 (results) /EU • mL ^{- 1}
		0. 06	0. 03	0. 015	0. 0075		
0805082	BET水 (BET water)	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -	Es= 0. 03
	S1样品 (S1 sample)	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 042
	S2样品 (S2 sample)	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 050
	S3样品 (S3 sample)	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 050
08012221	BET水 (BET water)	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	Es= 0. 042
	S1样品 (S1 sample)	+ + + +	+ + - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 042
	S2样品 (S2 sample)	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 050
	S3样品 (S3 sample)	+ + + +	+ - - -	- - - -	- - - -	- -	Et= 0. 050

避免了假阴性结果。

本试验结果还表明,参照美国药典 32版中细菌内毒素检查方法^[5],医用聚乙二醇小檗碱液 (粘连平)的细菌内毒素含量小于 1. 5 EU• mL^{- 1},该产品的细菌内毒素检查是符合规定的。该产品可以用细菌内毒素检查法来控制样品中的细菌内毒素含量。

参考文献

1 ChP (中国药典). 2005. V olII (二部): Appendix (附录) XIE

2 ZHANG Yi (张逸), IU Shuang- yun (鲁双云), GAO Wen- juan (高文娟), et al. Establish new bacterium endotoxin exam ine method of absorbable medical m em brane (建立可吸收的医用膜细菌内毒

素检查的新方法). *Mod Prev Med* (现代预防医学), 2007, 34 (18): 3442

3 FENG Zhi- min (冯智敏), JIANG X iao- ming (江肖明), HUANG De- kun (黄得坤). Bacterium endotoxin detem ination of carbonic acid hydrogen saltmanualkidney dialyse liquid (碳酸氢盐人工肾透析液的细菌内毒素检测). *Acad J Guangdong CollPhram* (广东药学院学报), 2005, 2(3): 274

4 YANG Yong (杨勇). Study for bacterium endotoxin exam ine method of puerarin injection (葛根素注射液细菌内毒素检查方法的研究). *J AnhuiHealth Voact Tech Coll* (安徽卫生职业技术学院学报), 2005, 4(4): 52

5 USP 32- NF 27 V olII : 93

(本文于 2009年 2月 4日收到)