

注射用卡铂细菌内毒素检查法的可行性研究

陈爱瑛¹, 陈澜², 尹淑君¹ (1. 浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的 通过实验以考察注射用卡铂细菌内毒素检查方法的可行性。方法 按照中国药典 2000 年版二部附录收载的细菌内毒素检查方法进行试验, 并与热原家兔检查法进行比较。结果 注射用卡铂在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度内对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用, 细菌内毒素限值为 $0.5 \text{ EU} / \text{mg}$ 。结论 注射用卡铂的热原检查可以用细菌内毒素检查法替代家兔法。

关键词: 注射用卡铂; 细菌内毒素

中图分类号: R927.12; R979.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2004)03-0215-03

Investigation of testing method for bacterial endotoxin in carboplatin for injection

CHEN Ai-ying¹, CHENG Lan², YIN Shu-jun³ (1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Affiliated Hospital of Obstetrics and Gynecology, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the bacterial endotoxin testing method (BET) for carboplatin for injection. **METHOD** The test was conducted according to the method included in the Chinese Pharmacopoeia 2000. Rabbit method for pyrogens was also done compared with BET method. **RESULTS** The carboplatin for injection neither inhibited nor enhanced the test when the concentration was below $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Testing limit of bacterial endotoxin was $5.0 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$. **CONCLUSION** Bacterial endotoxin in carboplatin for injection can be determined with BET method instead of PM method.

注射用卡铂(carboplatin for injection,CAP)为周期特异性抗癌药,直接作用于DNA,从而抑制分裂旺盛的肿瘤细胞,是第二代铂类抗癌药,它保持了第一代铂类抗癌药(顺铂)的优点,又降低了对神经系统及胃肠道的毒性。注射用卡铂国家标准^[1]热原检查采用家兔法,鉴于细菌内毒素检查方法较家兔检查法具有灵敏度高、快速、简便及重现性好等优点,本实验对注射用卡铂进行了细菌内毒素凝胶检查法的方法研究,为该品种细菌内毒素检查法应用提供试验依据。

1 实验材料和仪器

注射用卡铂,批号为020110、020116、020123、020523、020529、020606,规格为100mg/瓶,浙江省医学科学院制药厂提供;鲎试剂(TAL)A:灵敏度(λ)为0.5 EU·mL⁻¹,规格为0.1mL/支,批号020516,由厦门鲎试剂厂提供;TAL(B): λ 为0.5 EU·mL⁻¹,规格为0.1mL/支,批号20021022,由湛江安度斯生物有限公司提供。细菌内毒素检查用水(BET):批号0112050,规格5mL/支;无热原吸头、无热原空安瓿均由湛江安度斯生物有限公司提供。细菌内毒素工作标准品,批号为2002-7,规格150 EU/支,由中国生物制品检定所提供。仪器:旋涡混合器,型号XK95-B,姜堰市康泰医药器材厂;电热恒温水浴箱,型号DK-8A,上海精密实验设备有限公司。实验动物:家兔18只雌雄各半,体重2.0~2.8kg,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,医学实验动物合格证号2001001,医学实验动物环境设施合格证号2001001。

2 方法与结果

2.1 TAL标示灵敏度复核

按文献^[2]方法进行试验,结果所用TAL灵敏度均符合规定。

2.2 CAP细菌内毒素理论限值的计算

细菌内毒素限值的计算公式为 $L = K/M$,式中L为供试品的细菌内毒素限值以EU·mg⁻¹表示;K为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,静脉注射的药品K值规定为5 EU·(kg·h)⁻¹;M为人用每公斤体重每小时最大剂量,以mg·(kg·h)⁻¹表示。据本厂原始资料说明书规定,本品成人临床一次的最大用药量为600mg,按表1 注射用卡铂干扰试验结果

Tab 1 Results of interfere tests of Carboplatin for injection

| 鲎试剂批号 | 供试品批号 | 内毒素浓度 | | | | 阴性对照 | 终点浓度(EU·mL ⁻¹) |
|----------|--------|-------|------|---------|---------|------|----------------------------|
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | | Et 或 Es |
| 020516 | BET水 | ++++ | ++++ | ∕- - - | ∕- - - | ∕∕ | 0.50(Es) |
| | 020110 | ++++ | ++++ | + - - - | - - - - | - - | 0.42(Et) |
| | 020116 | ++++ | ++++ | + - - + | - - - - | - - | 0.35(Et) |
| | 020123 | ++++ | ++++ | - - - - | - - - - | - - | 0.50(Et) |
| 20021022 | 020110 | ++++ | ++++ | + + - - | - - - - | - - | 0.35(Et) |
| | 020116 | ++++ | ++++ | - - - - | - - - - | - - | 0.50(Et) |
| | 020123 | ++++ | ++++ | - - + - | - - - - | - - | 0.42(Et) |

2.5 细菌内毒素(凝胶法)与热原检查(家兔法)的结果比较
根据文献^[2]规定的方法,将CAP稀释成1.0mg·mL⁻¹,

人均体重60kg计,则其细菌内毒素限值为0.5EU·mg⁻¹;中国药典2000年版规定,CAP家兔的给药剂量为5mg·kg⁻¹,按此计算本品的细菌内毒素限值为 $L = K/M = 5EU \cdot (kg \cdot h)^{-1} / 5mg \cdot (kg \cdot h)^{-1} = 1.0EU \cdot mg^{-1}$;而美国药典26版规定CAP细菌内毒素限值为0.54EU·mg⁻¹。考虑到确保临床用药的安全性,将CAP的细菌内毒素限值定在0.5 EU·mg⁻¹。

2.3 供试品有效浓度的计算^[3,4]

目前用于药品检验的细菌内毒素检查凝胶法的鲎试剂灵敏度(λ)一般在0.03EU·mL⁻¹~0.5EU·mL⁻¹之间,故CAP按0.5EU·mg⁻¹的限值进行细菌内毒素检查时,最大有效浓度(C_{max})和最小有效浓度(C_{min})应为

$$C_{max} = \lambda_{max} / L = 0.5EU \cdot mL^{-1} / 0.5EU \cdot mg^{-1} = 1.0 mg \cdot mL^{-1}$$

$$C_{min} = \lambda_{min} / L = 0.03EU \cdot mL^{-1} / 0.5EU \cdot mg^{-1} = 0.06 mg \cdot mL^{-1}$$

由此可知,在对本品进行干扰实验时,应从最大有效浓度(1.0mg·mL⁻¹)开始,如果这一浓度无干扰作用,可以不再对低于该浓度的供试品溶液进行干扰实验;如果这一浓度有干扰作用,则再对该浓度进行稀释,用稀释后的供试品溶液进行干扰实验,直至找出一个最大不干扰浓度为止,此最大浓度不能低于最小有效浓度(0.06mg·mL⁻¹)。

2.4 CAP的干扰实验

按中国药典2000年版附录XIE所规定的方法,以2.3所计算的最大有效浓度1.0mg·mL⁻¹(稀释10倍),采用灵敏度为0.5EU·mL⁻¹的两个厂家的鲎试剂对三批供试品进行了干扰试验,按公式 $E_s = 1g^{-1}(\sum X_s/4)$ 和 $E_t = 1g^{-1}(\sum X_t/4)$ 计算,其中X_s和X_t分别为细菌内毒素检查用水和供试品的溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的对数值(1g);E_s和E_t则分别为细菌内毒素检查用水和供试品的溶液制成的内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值,结果见表1;试验表明E_s在0.5~2.0λ范围内,E_t也均在0.5~2.0λ范围内,说明CAP稀释成1.0mg·mL⁻¹时对细菌内毒素检查无干扰作用。

按0.5EU·mg⁻¹的限值,对6批CAP进行了细菌内毒素检查,并同时根据文献^[1]用氯化钠注射液将样品稀释成每1

mL 含 5 mg 的溶液,按 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (kg 为家兔体重) 剂量依法进行家兔热原检查,两法比较,结果见表 2。

表 2 注射用卡铂细菌内毒素检查与热原检查的试验结果

Tab 2 Results of bacterial endotoxin and pyrogen testing in carboplatin for injection

| 供试品批号 | 细菌内毒素检查结果 (限值 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$) | 热原检查结果 |
|--------|--|--------|
| 020110 | 符合规定 | 符合规定 |
| 020116 | 符合规定 | 符合规定 |
| 020123 | 符合规定 | 符合规定 |
| 020523 | 符合规定 | 符合规定 |
| 020529 | 符合规定 | 符合规定 |
| 020606 | 符合规定 | 符合规定 |

3 讨论

3.1 综合各次干扰试验结果,当 CAP 的细菌内毒素限值为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,其浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,可克服干扰因素,

又能客观地反映出样品中所有的细菌内毒素的量是否符合规定的限值。

3.2 按 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的内毒素限值对六批样品进行了细菌内毒素检查和热原家兔法检查对比试验,结果均符合规定。因此认为可采用细菌内毒素检查法代替家兔热原试验来控制 CAP 的质量,该法既经济又快捷。

参考文献

- [1] 中国药典.二部[S].2000:136 - 137.
- [2] 中国药典.二部[S].2000:附录 XI E.
- [3] 黄清泉.药品细菌内毒素检查的实验设计[J].中国药学杂志,1997,32(2):72.
- [4] 刘维俊.注射用阿莫西林钠克拉维酸钾细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2000,1(2):43.

收稿日期:2003-11-14