

注射用单磷酸阿糖腺苷细菌内毒素检查方法研究*

陈素珍, 曾秋敏, 吴燕虹
(广东省药品检验所, 广州 510180)

摘要 目的: 建立注射用单磷酸阿糖腺苷的细菌内毒素检测方法并进行方法学验证, 以期对该品种的质量控制标准进行统一规范。方法: 按照《中国药典》2020 年版四部通则 1143“细菌内毒素检查法”, 确定细菌内毒素的限值, 进行干扰试验, 并进行内毒素检查。结果: 按经验拟定的限值标准(每 1mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.06EU)对 15 个厂家提供的 25 个批次的供试品进行细菌内毒素检查, 结果均符合规定。结论: 本文建立的细菌内毒素检查法检查, 可用于注射用单磷酸阿糖腺苷的质量控制。

关键词: 注射用单磷酸阿糖腺苷; 细菌内毒素; 质量标准; 干扰试验; 凝胶法; 鲎试剂

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2024)01-0068-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.01.011

Investigation on bacterial endotoxins test of vidarabine monophosphate for injection*

CHEN Suzhen, ZENG Qiumin, WU Yanhong
(Institute of Drug Control in Guangdong Province, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective: To establish a bacterial endotoxin detection method for vidarabine monophosphate for injection and conduct methodological validation for harmonizing the quality control standard of this product. **Methods:** According to the *Chinese Pharmacopoeia* 2020 volume IV general chapter 1143 “Bacterial endotoxin test”, the limit of bacterial endotoxin was determined, interference test and endotoxin testing were performed. **Results:** The bacterial endotoxin test were performed on 25 batches of test samples provided by 15 manufacturers according to the experienced experimented limitation which is the amount of endotoxin in 1 mg of adenosine monophosphate should be less than 0.06 EU. All results were found to be in compliance with the specified standards. **Conclusion:** The established bacterial endotoxin method can be used for quality control of vidarabine monophosphate for injection.

Key words: vidarabine monophosphate for injection; bacterial endotoxin test; quality standards; interference test; gel-clot method; Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL)

注射用单磷酸阿糖腺苷是一种抗病毒药物, 通过和病毒中的脱氧核糖核酸聚合酶结合, 使酶的活性降低, 从而抑制病毒的 DNA 合成, 起到抗病毒的作用。主要用于治疗疱疹病毒感染所致的口炎、皮炎、脑炎及巨细胞病毒感染^[1]。

注射用单磷酸阿糖腺苷作为注射用冻干粉, 热原质检查是其成品质量控制中必备的安全性检查项目。该品种现行的检查标准共有 15 个, 其中 10 个标准设置了热原检查^[2], 其余 5 个标准为细菌内毒素检查, 且设置的内毒素限值不一。详见表 1。

* 基金项目: 广东省药品检验所 2022 年所内项目(SN2022018)

第一作者简介: 陈素珍, 主管药师; 研究方向: 药品、化妆品的安全性评价研究。Tel: 020-81273071; E-mail: 40586313@qq.com

表 1 注射用单磷酸阿糖腺苷的不同标准比较

Tab. 1 Standards comparison of vidarabine monophosphate for injection

标准号(standard No.)	标准规定(standards item)
WS1-(X-***)-2001Z 等 10 个标准	热原:按家兔体重每 1 kg 注射 30 mg
YBH27 * * * 005	每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.16 EU
YBH32 * * * 005	每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.16 EU
YBH10 * * * 008	每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.16 EU
YBH00 * * * 014	每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.06 EU
YBH11 * * * 008	每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.05 EU

与传统的热原检查相比,细菌内毒素检查法灵敏度高、操作简单易行、试验费用低、结果迅速可靠。本研究共收集到 15 个厂家共 25 个批次样品,拟对注射用单磷酸阿糖腺苷建立细菌内毒素检查的可行性进行研究,以期对该品种建立规范统一的质量控制标准。

1 实验材料

1.1 试剂

鲎试剂(Tachypleus Amebocyte Lysate, TAL)(灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$),福州新北生化工业有限公司(批号 20160512)、湛江安度斯生物有限公司(批号 2103092);细菌内毒素工作标准品(80 EU/支),中国食品药品检定研究院(批号为 150601-201987);细菌内毒素检查用水(规格为 50 mL/瓶),湛江博康海洋生物有限公司(批号 2102250)。

1.2 供试品

取 2 个规格各 3 个厂家的注射用单磷酸阿糖腺苷进行细菌内毒素检查的干扰试验,规格 0.1 g/瓶 : 厂家 1、厂家 2、厂家 3;规格 0.2 g/瓶 : 厂家 A、厂家 B、厂家 C。

1.3 仪器

恒温水浴箱(JulaboTW12);涡旋混合器(IKA MS 3 digital)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值的确定

根据本品的使用说明书,本品的单次临床最大用量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,一日一次。按照细菌内毒素的计算公式: $L = K/M$,其中注射剂的 K 值为 $5.0 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,计算求得 $L = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。按照内毒素限值设定的从严原则,再综合考虑不同厂家的生产工艺可能有参差,拟将注射用单磷酸阿糖

腺苷的内毒素限值定为 $L = 0.06 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2 鲎试剂灵敏度的复核

按《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020 年版四部通则 1143 的方法^[3]进行,所用鲎试剂灵敏度均符合规定。

2.3 供试品干扰预试验

取灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂(批号: 20160512),对 6 个厂家提供的 2 个规格供试品进行干扰预试验,稀释浓度分别为 0.5 、 1 、 2 、 4 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,另外设立阳性对照(positive control, PC)、阴性对照(negative control, NC),每个浓度平行做 2 管,结果见表 2。可见供试品在浓度为 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或以下浓度时对鲎试验检查无干扰作用。

2.4 供试品干扰试验

取本品,用细菌内毒素检查用水稀释至 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,选用灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的两个厂家鲎试剂进行干扰试验,结果见表 3、表 4。

由表 3、表 4 可以看出,供试品溶液(NPC)和阴性对照溶液(NC)的所有平行管均为阴性;内毒素标准系列溶液的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求: λc 值在 $(0.5 \sim 2.0)\lambda$ 之间(λ 为鲎试剂的灵敏度 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$);供试品干扰试验系列溶液的结果也符合鲎试剂灵敏度复核试验: E_t 值在 $(0.5 \sim 2.0)\lambda$ 之间,说明注射用单磷酸阿糖腺苷在 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或以下浓度时对细菌内毒素检查无干扰作用。

2.5 供试品细菌内毒素检查

取灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂(批号: 20160512)按拟定标准对 15 个厂家提供的 25 个批次的供试品进行细菌内毒素检查,结果均符合规定。

3 讨论

热原质检查是非肠道途径(如注射、输注)类药物质量标准中必备的安全性项目,是确保药品质量

和安全用药必不可少质量控制手段。现行版《中国药典》关于热原质检查的方法包括家兔热原检查、细菌内毒素检查^[4-7]。细菌内毒素检查自1980年首先收载于美国药典,随后英、德、意、日以及中国相继在药典中收载。经过四十多年的实际应用,细菌内毒素检查法以灵敏度高、操作简单易行、试验费用低、结果迅速可靠等优点,逐步取代了传统热原检测方法,使细菌内毒素检查法成为热原质检查的重要方法^[8]。以《中国药典》为例,2005年版中规定了

133个品种进行细菌内毒素检查法,而2015年版中收载的涉及细菌内毒素检查法检测的品种已达到了595个^[9,10]。

本研究收集到的2个规格的注射用单磷酸阿糖腺苷样品来自15个不同厂家,其中有10个热原标准、5个内毒素标准,甚至还有一个厂家0.1 g/瓶规格采用热原标准、0.2 g/瓶规格采用细菌内毒素标准,这对检验工作以及该品种的质量控制都造成了一定的影响。

表2 干扰预试验结果

Tab. 2 The results of pre-interference test

鲎试剂批号 (TAL batch No.)	批号(batch No.)/ 厂家(manufacturers)	规格 (specification)	/	供试品浓度(sample concentration)/(mg · mL ⁻¹)					PC	NC
				8	4	2	1	0.5		
20160512	20210101-2 (厂家1)	0.1 g	NPC	--	--	--	--	--	++	--
			PPC	++	++	++	++	++		
	2004022 (厂家2)	0.1 g	NPC	--	--	--	--	--		
			PPC	++	++	++	++	++		
	20201001 (厂家3)	0.1 g	NPC	--	--	--	--	--		
			PPC	++	++	++	++	++		
20160512	20042501 (厂家A)	0.2 g	NPC	--	--	--	--	--	++	--
			PPC	++	++	++	++	++		
	20200801 (厂家B)	0.2 g	NPC	--	--	--	--	--		
			PPC	++	++	++	++	++		
	20191205 (厂家C)	0.2 g	NPC	--	--	--	--	--		
			PPC	++	++	++	++	++		

注(note):NPC为供试品管(negative product control);PPC为供试品阳性管(positive product control);PC为阳性对照管(positive control);NC为阴性对照管(negative control)。

表3 干扰试验结果(供试品规格:0.1 g/瓶)

Tab. 3 The results of interference test (sample specification:0.1 g/bottle)

鲎试剂批号 (TAL batch No.)	水/样品批号 (water/sample batch No.)	细菌内毒素浓度 (Bacterial endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)				NC	NPC	结果 (result)/(EU · mL ⁻¹)
		(Bacterial endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)						
		0.25	0.125	0.06	0.03			
20160512	水	++	++	--	--	--		0.125
	20210101-2(厂家1)	++++	----	----	----		--	0.25
	2004022(厂家2)	++++	----	----	----		--	0.25
	20201001(厂家3)	++++	----	----	----		--	0.25
2103092	水	++	+-	--	--	--		0.177
	20210101-2(厂家A)	++++	----	----	----		--	0.25
	2004022(厂家B)	++++	----	----	----		--	0.25
	20201001(厂家C)	++++	----	----	----		--	0.25

注:NPC为供试品管;NC为阴性对照管。

本研究干扰试验抽取的6个厂家样品,其中厂家1、厂家2、厂家A、厂家B原法定标准为热原检查,厂家3、厂家C原法定标准为细菌内毒素

限值为0.16 EU · mg⁻¹;本研究结合临床用法用量综合考虑,拟将该品种的内毒素限值定为:每1 mg单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于

0.06 EU。结果表明,该品种在此限值下对细菌内毒素无干扰。按拟定标准检验 15 个厂家提供

的 25 个批次样品,其细菌内毒素检查结果均符合规定。

表 4 干扰试验结果(供试品规格:0.2 g/瓶)

Tab. 4 The results of interference test (sample specification:0.2 g/bottle)

鲎试剂批号 (TAL batch No.)	水/样品批号 (water/sample batch No.)	细菌内毒素浓度 (bacterial endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)				NC	NPC	结果 (result)/(EU · mL ⁻¹)
		0.25	0.125	0.06	0.03			
		20160512	水	++	++			
	20210101-2(厂家1)	++++	----	----	----	--	0.25	
	2004022(厂家2)	++++	+++-	----	----	--	0.149	
	20201001(厂家3)	++++	+-	----	----	--	0.177	
2103092	水	++	++	--	--	--	0.125	
	20210101-2(厂家A)	++++	----	----	----	--	0.25	
	2004022(厂家B)	++++	+-	----	----	--	0.177	
	20201001(厂家C)	++++	++++	----	----	--	0.125	

注: NPC 为供试品管; NC 为阴性对照管。

注射用单磷酸阿糖腺苷对细菌内毒素检查无干扰作用,采用细菌内毒素凝胶法进行热原质检查,方法可行。本研究将该品种不同厂家的质量标准中细菌内毒素、热原检查项统一为细菌内毒素检查项,并且统一细菌内毒素检查项的检查限值拟定为:每 1 mg 单磷酸阿糖腺苷中含内毒素的量应小于 0.06 EU,此检查限值可满足产品用药安全的需求,且考察的不同厂家的工艺水平均可达到此要求。此标准可作为注射用单磷酸阿糖腺苷的热原质检查标准。

参考文献

[1] 宋瑞,卞光奇,陈晓东. 我院注射用单磷酸阿糖腺苷用药分析[J]. 海峡药学,2021,33(2):188.
SONG R, BIAN GQ, CHEN XD. Analysis of vidarabine monophosphate for injection in our hospital[J]. Strait Pharm J, 2021, 33(2):188.

[2] 国家食品药品监督管理局. WS1-(X-061)-2001Z 注射用单磷酸阿糖腺苷[S]. 2002-04-01.
State food and drug administration. WS1-(X-061)-2001Z vidarabine monophosphate for injection[S]. 2002-04-01.

[3] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:通则 1143. ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:GeneralChapter1143.

[4] 于海洲. 注射用乙酰左卡尼汀细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药品标准,2022,23(3):322.
YU HZ. Establishment of bacterial endotoxins testin acetyl-L-

carnitine for injection[J]. Drug Stand China, 2022, 23(3):322.

[5] 方选. 乙酰半胱氨酸细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药品标准,2022,23(2):220.
FAND X. Establishment of bacterial endotoxin test method for acetylcysteine [J]. Drug Stand China, 2022, 23(2):220.

[6] 张媛. 细菌内毒素检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2023,36(3):368.
ZHANG Y. Research progress of bacterial endotoxin detection methods[J]. Chin J Biol, 2023, 36(3):368.

[7] 张昇昉. 注射用伏立康唑细菌内毒素检查研究[J]. 中国药品标准, 2023,24(1):57.
ZHANG HF. Investigation on bacterial endotoxins test of voriconazole for injection[J]. Drug Stand China, 2023, 24(1):57.

[8] 颀晓勇. 基于鲎试剂需求的中国鲎资源保护的迫切性研究[J]. 中国渔业经济,2021,39(2):109.
XIE XY. The urgency of horseshoe crab protection in China from the perspective of tachypleus amebocyte lysate industry[J]. Chin Fisheries Econom, 2021, 39(2):109.

[9] 裴宇盛. 微量凝胶法检查细菌内毒素方法学验证研究[J]. 中国新药杂志,2018,27(12):1340.
PEI YS. Study on micro-gel method verification of bacterial endotoxin test[J]. Chin J New Drugs, 2018, 27(12):1340.

[10] 周丹. 阿奇霉素原料药细菌内毒素检查方法学验证[J]. 中国药品标准,2023,24(4):398.
ZHOU D. Investigation of bacterial endotoxin test for azithromycin [J]. Drug Stand China, 2023, 24(4):398

(收稿日期:2023-08-15)