

凝胶法鲎试验检测氟康唑葡萄糖注射液细菌内毒素

黄循明(中国人民解放军第187医院天涯制药厂,海南海口571159)

摘要 目的:建立用鲎试剂检查氟康唑葡萄糖注射液细菌内毒素的方法。方法:参照中国药典2000年版二部细菌内毒素检查法进行试验。结果:氟康唑葡萄糖注射液对鲎试剂的细菌内毒素检查无干扰。结论:鲎试剂可用于氟康唑葡萄糖注射液的细菌内毒素检查。

关键词 氟康唑葡萄糖注射液;凝胶法;细菌内毒素;干扰试验;鲎试剂

中图分类号:R953 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2005)05-0300-02

Application of agglutinative limulus test to monitor bacterial endotoxin in fluconazole and glucose injection

HUANG Xun-ming (Hainan Tianya Pharmaceutical Factory, 187 Hospital of PLA, Haikou 571159, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method of bacterial endotoxin test for fluconazole and glucose injection using limulus lysate agent. **Methods:** The experiment was made according to bacterial endotoxin test in China Pharmacopoeia 2000 (vol. II). **Results:** Fluconazole and glucose injection has not interference on bacterial endotoxin inspection. **Conclusion:** Bacterial endotoxin test can be used for fluconazole and glucose injection.

KEY WORDS fluconazole and glucose injection; agglutinative limulus test; bacterial endotoxin; interference test; limulus amoebocyte lysate

氟康唑(fluconazole)为新型三唑类广谱、高效抗真菌药物,由美国辉瑞公司最先开发研制,于1990年美国FDA批准在美国上市,现国内有以氯化钠调节等渗的氟康唑注射液,其热源检查采用家兔法。因鲎试验法具有快速、准确、经济、操作简便等优点,随着鲎试验的发展和完善,鲎试验法取代家兔法进行细菌内毒素检查已是必然趋势。在研制氟康唑葡萄糖注射液的过程中,我们根据中国药典2000年版二部附录细菌内毒素检查法^[1]进行了用鲎试剂(TAL)检查氟康唑葡萄糖注射液中细菌内毒素的实验研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 电子恒温水浴箱(北京医疗设备厂制造);漩涡混合器(江苏泰县仪器厂制造);无热源试管、吸管等试验所用器具均经250℃干烤1h去除外源性内毒素。

1.2 试剂与药品 TAL₁(0.5mL/支,标示灵敏度(λ):0.5EU/mL,批号:010902),TAL₂(0.5mL/支,λ:0.25EU/mL,批号:010417),均由福州新北生化

工业有限公司生产;TAL₃(0.5mL/支,λ:0.25EU/mL,批号:010105,湛江海洋生物制品厂生产);细菌内毒素工作标准品(每支效价70EU,批号:2001-3),细菌内毒素检查用水(BET)(10mL/支),均由中国药品生物制品检定所提供;氟康唑葡萄糖注射液(规格:100mL:200mg,批号:010410,010411,010412,010901,010902,010903,040201,040202,040203,天涯制药厂生产,家兔法热源检查符合规定)。

2 实验方法与结果

2.1 供试品的细菌内毒素限值(L)确定^[2] 按细菌内毒素限值公式: $L = K/M$,式中,K为按规定的给药途径,即人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂为5.0EU/(kg·h);M为供试品(氟康唑葡萄糖注射液)每公斤体重每小时最大给药剂量,200mg/(60kg·h)。计算细菌内毒素限值 $L = 5.0\text{EU}/(\text{kg} \cdot \text{h}) \times 60\text{kg} \cdot \text{h}/200\text{mg} = 1.5\text{EU}/\text{mg}$ (或3EU/mL),参照中国药典2000年版细菌内毒素应用指导原则^[3],考虑到氟康唑葡萄糖注射液生产条件及临床用药情况,按输液标准从严要求,因此取0.5EU/mL为该药最终细菌内毒素限值。

2.2 供试品的最大有效稀释倍数(MVD) 根据目

作者简介:黄循明(1973-),男,学士,助理研究员、工程师。
Tel:(0898)65884591,E-mail:hxm@hntyzy.com.

前市售 TAL 最高灵敏度 λ 为 0.03EU/mL, 按样品最大有效稀释倍数公式 $MVD = CL/\lambda$, 其中 L 为氟康唑葡萄糖注射液的细菌内毒素限值 0.5EU/mL, 可计算出 MVD 为 16 倍, 则干扰试验时药液稀释倍数不得超过所对应 TAL 的 MVD 。

2.3 TAL 灵敏度的复核 按照中国药典 2000 版二部附录细菌内毒素检查法规定进行标示灵敏度复核, 结果 3 个批号 TAL 灵敏度均在 0.5λ 与 2λ 之间, 符合规定, 可用于细菌内毒素的检查。

2.4 干扰预试验和干扰试验

2.4.1 干扰预试验 取氟康唑葡萄糖注射液用水 (BET) 稀释, 使其最终稀释倍数分别为 1、2、4、8、16 倍的溶液, 将此系列溶液记为 NPC 液; 同时另取上述试验分别添加细菌内毒素标准液, 使每一试验液中均含有 2λ 浓度的细菌内毒素, 此系列溶液记为 PPC 液; 将 TAL 复溶后分别与上述 NPC 液和 PPC 液进行反应, 每一浓度重复 2 管, 并设阳性和阴性对照, 结果见表 1。

表 1 供试品干扰预试验结果

反应管		预干扰溶液稀释倍数					
		1	2	4	8	16	NC
TAL ₁	NPC	++	--	--	--	--	--
TAL ₂	PPC	++	++	++	++	++	++
TAL ₃	NPC	--	--	--	--	--	--
TAL ₃	PPC	++	++	++	++	++	++

预干扰试验结果显示: 氟康唑葡萄糖注射液药液与 TAL 反应, 在原液时不同试剂存在一定增强干扰作用, 当将药液稀释至 2 倍时, 则完全无干扰, 而且两厂家的 TAL 反应结果一致。

2.4.2 干扰试验 取氟康唑葡萄糖注射液 (批号: 010410) 用水 (BET) 2 倍稀释, 按中国药典 2000 年版二部附录中的细菌内毒素供试品干扰试验项进行, 结果见表 2。

表 2 干扰试验结果

样品	稀释倍数	细菌内毒素浓度 (EU/mL)					
		0.5	0.25	0.125	0.0625	NC	E _t
TAL ₂	010410	++++	++++	----	----	-	0.25
TAL ₂	BET	++++	++++	----	----	-	0.25
TAL ₃	010410	++++	----	----	----	-	0.5
TAL ₃	BET	++++	----	----	----	-	0.5

在干扰试验中, 氟康唑葡萄糖注射液在稀释 2 倍时用 TAL 检测, 反应终点为 $2\lambda \geq \lambda$ 、 $>0.25\lambda$, 表明样品对 TAL 既无抑制作用, 也无增强作用, 即无干扰作用。

2.5 样品细菌内毒素检查 取经家兔法热源检查合格的氟康唑葡萄糖注射液 5 批 (批号: 010411, 010412, 010901, 010902, 010903), 以及经细菌内毒素污染后热源检查不合格的氟康唑葡萄糖注射液 3 批 (批号: 040201, 040202, 040203), 每批设 5 支反应管, 其中供试品管 2 支, 阴性、阳性、供试品阳性对照管各 1 支, 在规定条件下与 TAL 反应。结果经家兔法热源检查合格的供试品管、阴性对照管均为阴性, 阳性对照管、供试品阳性对照管、经细菌内毒素污染后热源检查不合格的供试品管均为阳性。

反应已完全排除了干扰因素的影响, 而且不同批号 TAL 的反应结果一致。5 批经家兔法热源检查合格样品细菌内毒素检查均符合规定, 另 3 批经细菌内毒素污染后热源检查不合格的样品细菌内毒素检查均不符合规定, 因此认为用细菌内毒素检查法检测氟康唑葡萄糖注射液中的细菌内毒素是可行的, 并确立其细菌内毒素限值为 0.5EU/mL。

参考文献:

[1] 中国药典 2000 年版. 二部[S]. 附录. 2000:86.
 [2] 夏振民. 药品细菌内毒素的限值[J]. 药物分析杂志. 1995, 15 (3):54.
 [3] 中国药典 2000 年版. 二部[S]. 附录. 2000:204.

收稿日期: 2005-03-21

3 讨论

氟康唑葡萄糖注射液在稀释 2 倍以下与 TAL