

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.020

碘克沙醇注射液细菌内毒素检查法质量标准修订建议

范治云,刘 瑞,赵 岩,肖 英,祝清芬

(山东省食品药品检验研究院·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室,山东 济南 250101)

摘要:目的 为碘克沙醇注射液细菌内毒素检查法质量标准的修订提出建议。方法 采用凝胶法和动态浊度法对4个厂家的样品进行细菌内毒素检查方法适用性研究。结果 凝胶法最小有效稀释质量浓度为30 mg/mL,动态浊度法最小有效稀释质量浓度为20 mg/mL。结论 2种方法均适用于碘克沙醇注射液细菌内毒素检查,但凝胶法须用灵敏度为0.015 EU/mL的鲎试剂进行检查,建议该品种细菌内毒素检查统一采用动态浊度法。

关键词:碘克沙醇注射液;动态浊度法;凝胶法;细菌内毒素;干扰试验

中图分类号:R917;R972

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)22-0082-03

Suggestions on the Revision of the Quality Standard of the Bacterial Endotoxin Test for Iodixanol Injection

FAN Zhiyun, LIU Rui, ZHAO Yan, XIAO Ying, ZHU Qingfen

(Shandong Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Jinan, Shandong, China 250101)

Abstract: Objective To provide suggestions on the revision of the quality standard of bacterial endotoxin test for Iodixanol Injection.

Methods The gel method and kinetic turbidimetric assay(KTA) were used to study the applicability of the bacterial endotoxin test for samples from four manufacturers. **Results** The minimum effective dilution mass concentration of the gel method was 30 mg/mL, and that of the KTA was 20 mg/mL. **Conclusion** Both methods are suitable for the inspection of bacterial endotoxins in Iodixanol Injection, but the gel method must be inspected with tachypleus amebocyte lysate(TAL) with a sensitivity of 0.015 EU/mL. It is suggested that KTA should be adopted in the bacterial endotoxin test of this preparation.

Key words: Iodixanol Injection; kinetic turbidimetric assay; gel method; bacterial endotoxin; interference test

碘克沙醇注射液属X线对比剂,目前国内外几个厂家执行的细菌内毒素检查法质量标准(YBH03522014, YBH01492018, YBH06512010, JX20190104)均有差异,如扬子江药业集团有限公司、南京正大天晴制药有限公司、江苏恒瑞医药股份有限公司、GE Healthcare Ireland Limited的细菌内毒素限值(L)分别为0.05 EU/100 mg、0.672 EU/mL、0.16 EU/mL、0.002 5/0.002 1 EU/mg(270/320 mg/mL),方法分别为凝胶法、动态显色法、浊度法、显色基质法,给该品种的监督检验和质量控制带来不便。本研究中拟统一碘克沙醇注射液细菌内毒素的检查限值和检查方法,并分别用凝胶法和动态浊度法进行检查方法适用性研究,为该品种更有效的质量控制及国家标准修订提出建议。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

PKF96-4K-2296型细菌内毒素检测仪(美国ACC公司)。

1.2 试剂

碘克沙醇注射液(厂家A,扬子江药业集团有限公司,批号为1908206,规格为50 mL:13.5 g,批号为19112161和19111861,规格为50 mL:16 g;厂家B,南京正大天晴制药有限公司,批号分别为2002261,

1910241,2002271;厂家C,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号分别为191202DJ,190921DJ,191204DJ;厂家D,GE Healthcare Ireland Limited,批号分别为14749091,14891355,14895222,后3个厂家的规格均为100 mL:32 g)。细菌内毒素检查用水(BET用水,批号为160006-201805,内毒素含量 ≤ 0.003 EU/mL),细菌内毒素工作标准品(批号为150601-201784,效价为每支80 EU),均购自中国食品药品检定研究院。鲎试剂(TAL,湛江博康海洋生物有限公司,批号为1906062。湛江安度斯生物有限公司,批号为1904103、规格为每支0.1 mL、灵敏度为0.06 EU/mL,批号为2001161、规格为每支0.1 mL、灵敏度为0.015 EU/mL)。动态比浊法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号为1908210,可测内毒素范围为0.01~10 EU/mL,规格为每支1.25 mL)。

2 方法与结果^[1]

2.1 细菌内毒素限值(L)确定

$L = K/M$,式中, K 为人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量, M 为人用每千克体质量每小时最大剂量。按碘克沙醇注射液药品说明书最大剂量为150 mL(48 g碘),注射剂的 K 为5 EU/(kg·h),成人按60 kg计,计算 M 得2.5 mL/(kg·h),即碘800 mg/(kg·h), L 值为0.006 25 EU/mg。现有标准是企业标准上升到国家标准,而企业标准出于内控需要和安全考

虑而制定的限值更严格。故根据现有国家标准,并遵照标准从严的原则,将 L 确定为 4 个厂家标准中最严格的 0.000 5 EU/mg。

2.2 凝胶法干扰试验

2.2.1 样品干扰预试验

目前在售鲎试剂灵敏度(λ)为 0.5~0.015 EU/mL,参考文献[2],本品内毒素有干扰情况,4 个厂家各抽取 1 批,用 BET 用水将样品稀释成 120,60,30 mg/mL 的系列样品溶液(对应的鲎试剂 λ 分别为 0.060,0.030,0.015 EU/mL),分别用 2 个厂家的鲎试剂考察上述系列浓度稀释液的干扰情况,每个浓度做 2 管,同时做阴性对照(NC)和标准对照,结果 4 个厂家的样品在 30 mg/mL 质量浓度下对试验均无干扰。详见表 1。

表 1 碘克沙醇注射液凝胶法干扰预试验结果

Tab. 1 Results of interference pre-test of Iodixanol Injection by the gel method

鲎试剂厂 家及批号	样品批号	稀释用液	样品质量浓度(mg/mL)			BET 用水
			120	60	30	
博康海洋 1906062	19112161	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	--/++
	2002261	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	
	191202DJ	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	
	14891355	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	
安度斯	19112161	A 液/B 液	--/--	--/++	--/++	--/++
1904103	2002261	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	
	191202DJ	A 液/B 液	--/--	--/++	--/++	
	14891355	A 液/B 液	--/--	--/--	--/++	

注:A 液为样品溶液,B 液为含 2 λ 内毒素的样品溶液;- 为阴性反应,+ 为阳性反应。表 2 同。

Note: Solution A is the sample solution, solution B is the sample solution containing 2 λ endotoxin; - refers the negative reaction, + refers the positive reaction; as well as Tab. 2.

2.2.2 样品干扰试验

用 BET 用水将细菌内毒素工作标准品制成 2.0 λ , 1.0 λ , 0.5 λ , 0.25 λ , 即 0.125, 0.060, 0.030, 0.015 EU/mL 的系列标准品溶液;并制备含有上述 4 种浓度细菌内毒素的质量浓度为 30 mg/mL 的样品稀释液,分别用 2.2.1 项下 2 个厂家的鲎试剂考察 4 个厂家 12 批样品在 30 mg/mL 的干扰情况,每个浓度平行 4 管,同时做阴性对照和标准对照。结果反应终点几何平均值为 0.5 λ ~ 2.0 λ ,表明样品在 30 mg/mL 质量浓度下可消除对试验的干扰因素。详见表 2。

2.2.3 样品细菌内毒素检查

采用 λ 为 0.015 EU/mL 的鲎试剂,对 4 个厂家的 12 批样品进行细菌内毒素检查,结果均小于 0.000 5 EU/mg。

2.3 动态浊度法干扰试验

2.3.1 细菌内毒素标准曲线的建立和可靠性分析

用 BET 用水将细菌内毒素标准品进行稀释,使最终

表 2 碘克沙醇注射液凝胶法细菌内毒素干扰试验结果

Tab. 2 Results of bacterial endotoxin interference test of Iodixanol

Injection by the gel method							
鲎试剂厂 家及批号	样品厂家	批号	内毒素浓度(EU/mL)				
			2.0 λ	1.0 λ	0.5 λ	0.25 λ	NC
博康海洋 1906062	A	BET 用水	++++	++++	----	----	--
		19112161	++++	----	----	----	--
		19082061	++++	+-	----	----	--
		19111861	++++	----	----	----	--
		2002261	++++	----	----	----	--
		1910241	++++	----	----	----	--
	B	2002271	++++	+-	----	----	--
		191202DJ	++++	----	----	----	--
		190921DJ	++++	----	----	----	--
	D	191204DJ	++++	+-	----	----	--
		14891355	++++	----	----	----	--
		14749091	++++	+-	----	----	--
安度斯 1904103	A	14895222	++++	+-	----	----	--
		BET 用水	++++	++++	----	----	--
		19112161	++++	+-	----	----	--
		19082061	++++	----	----	----	--
		19111861	++++	----	----	----	--
		2002261	++++	+-	----	----	--
	B	1910241	++++	+-	----	----	--
		2002271	++++	+-	----	----	--
		191202DJ	++++	+-	----	----	--
	D	190921DJ	++++	+-	----	----	--
		191204DJ	++++	+-	----	----	--
		14891355	++++	+-	----	----	--

细菌内毒素浓度分别为 1.25, 0.25, 0.05, 0.01 EU/mL, 各取 0.1 mL, 分别加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂的反应管内,混合均匀,以细菌内毒素检测仪检测,每个浓度平行 3 管,结果见表 3。标准曲线回归方程为 $\lg T = -0.31 \lg C + 2.89$, $r = -0.996$ ($|r|$ 应大于 0.980),平行管之间的 RSD 均小于 10%,NC 反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,故细菌内毒素标准曲线成立。

2.3.2 干扰试验

根据标准曲线内毒素浓度的设置,选择 0.25 EU/mL

表 3 动态浊度法细菌内毒素平均反应时间($n=3$)

Tab. 3 The mean reaction time of bacterial endotoxin by KTA($n=3$)					
内毒素浓度 (EU/mL)	平均反应时间 (s)	RSD (%)	内毒素浓度 (EU/mL)	平均反应时间 (s)	RSD (%)
1.25	767	1.63	0.01	3 368	5.59
0.25	1 116	3.31	0(NC)	>6 000	
0.05	1 946	4.81			

作为靠近曲线中点的内毒素浓度(λ_m),4 个厂家各取 1 批样品,用 BET 用水稀释成 60,30,20,15,10 mg/mL 的系列样品溶液(A 液),同时制备含上述样品浓度并含内毒素浓度为 λ_m (0.25 EU/mL)的溶液(B 液),分别取上述各溶液 0.1 mL,加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂的反应管内,混合均匀并测定,每个浓度平行 2 管。测定结束后,仪器按标准曲线回归方程自动计算出样品溶液和含标准内毒素 λ_m 的样品溶液的内毒素含量,以及该试验条件下的回收率(R)。结果表明,20 mg/mL 质量浓度及以下回收率在 50%~200%。详见表 4。

表 4 动态浊度法干扰试验结果($n=2$)

Tab. 4 Results of the interference test by KTA($n=2$)

质量浓度 (mg/mL)	A 液测定值(EU/mL)				B 液测定值(EU/mL)				回收率(%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
60	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.022	0.027	0.026	0.026	9	11	10	10
30	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.095	0.107	0.101	0.117	38	43	40	47
20	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.159	0.156	0.172	0.172	63	62	69	68
15	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.193	0.203	0.192	0.206	77	81	77	82
10	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.219	0.230	0.225	0.234	87	92	90	94
BET 用水				<0.01				0.281				112

注: I~IV 分别为批号为 19112161, 2002261, 191202DJ, 14891355 的样品。

Note: The sample batch numbers of I~IV was 19112161, 2002261, 191202DJ and 14891355, respectively.

2.3.3 动态浊度法样品细菌内毒素检查

取 4 个厂家共 12 批样品,同法制备 20 mg/mL 浓度的稀释液(A 液)和含相同样品浓度及标准内毒素 λ_m (0.25 EU/mL)的溶液(B 液),每个浓度平行 2 管,测定^[2]。结果,标准曲线回归方程为 $\lg T = -0.30 \lg C + 2.90$ ($r = -0.995$),B 液的回收率均在 50%~200%,样品结果均符合规定。详见表 5。

3 讨论

目前,碘克沙醇注射液生产厂家执行的质量标准各不相同。本研究结果表明,采用凝胶法和动态浊度法对 4 个厂家的样品进行细菌内毒素干扰试验,并按限值 0.000 5 EU/mg 对 12 批样品分别进行检查,结果均符合药典规定。说明本品可采用统一的标准进行质量控制。

本研究结果显示,不干扰浓度,即最小有效稀释质量浓度凝胶法为 30 mg/mL,动态浊度法为 20 mg/mL。结果的细微差异可能与 2 种方法的观察判断标准不同有关,前者以倒转 180°管内形成凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性;后者是检测反应混合物的浊度达到某一预先设定的吸光度所需反应时间。此种现象常见于样品有干扰的情况^[3-6]。凝胶法操作简单,观察结果直观,对

表 5 动态浊度法样品细菌内毒素检查结果($n=2$)

Tab. 5 Results of the bacterial endotoxin test of samples by KTA($n=2$)

生产厂家	样品批号	A 液测定值 (EU/mL)	样品实测值 (EU/mg)	B 液测定值 (EU/mL)	回收率 (%)
A	19112161	<0.01	<0.000 5	0.155	62
	19082061	<0.01	<0.000 5	0.153	61
	19111861	<0.01	<0.000 5	0.148	59
B	2002261	<0.01	<0.000 5	0.159	64
	1910241	<0.01	<0.000 5	0.162	65
	2002271	<0.01	<0.000 5	0.147	59
C	191202DJ	<0.01	<0.000 5	0.146	58
	190921DJ	<0.01	<0.000 5	0.152	61
	191204DJ	<0.01	<0.000 5	0.149	60
D	14891355	<0.01	<0.000 5	0.156	62
	14749091	<0.01	<0.000 5	0.163	65
	14895222	<0.01	<0.000 5	0.149	60
	BET 水	<0.01		0.286	114

仪器要求度低;动态浊度法检测灵敏度高,需要特定仪器和更高灵敏度的鲎试剂^[7-11]。2 种方法均适用于碘克沙醇注射液细菌内毒素的检查。

综上所述,2 种方法均适用于碘克沙醇注射液细菌内毒素的检查。但凝胶法必须用 λ 为 0.015 EU/mL 的鲎试剂进行检查,故建议该品种细菌内毒素的检查限值为 0.000 5 EU/mg,统一采用动态浊度法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:通则 1143.
- [2] 朱佳丽,段 鹏,曹 慧,等. 动态浊度法定量测定碘克沙醇中细菌内毒素的含量[J]. 中国药师,2016,19(2):384-387.
- [3] 牛杰振,何漫漫,刘丽霞,等. 凝胶法与动态浊度法定测定痕热清注射液细菌内毒素[J]. 昆明学院学报,2018,40(6):100-104.
- [4] 曾 艳,董历子,崔 越,等. 动态浊度法检测流感病毒裂解疫苗细菌内毒素的含量[J]. 中国药师,2017,20(1):171-174.
- [5] 魏 霞,国 明,祝清芬,等. 丹红注射液凝胶法和动态浊度法细菌内毒素检查[J]. 中国药事,2012,26(12):1357-1359.
- [6] 田雁钰. 两种方法测定灯盏细辛注射液中细菌内毒素含量[J]. 四川生理科学杂志,2010,32(2):71-72.
- [7] 林金海,陈晓佳,丁友玲. 注射用盐酸溴己新原料中细菌内毒素的检测[J]. 上海医药,2020,41(7):75-77.
- [8] 沈 娟,芦佳月,罗晓茹,等. 高浓度维生素 B₆ 注射液细菌内毒素检查方法学验证[J]. 药学实践杂志,2020,38(1):67-70.
- [9] 刘 洋,王 瑶,汪玉馨,等. 注射用亮菌甲素细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药品标准,2019,20(5):423-426.
- [10] 张 娟,祝清芬,范治云. 动态浊度法定测定人参多糖注射液中细菌内毒素的含量[J]. 药学研究,2014,33(6):334-336.
- [11] 杨晨曦. 细菌内毒素试验凝胶定性法与动态浊度定量法的比较[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2010,23(3):366-367.

(收稿日期:2020-11-20;修回日期:2021-06-13)