

# 注射用二乙酰胺乙酸乙二胺细菌内毒素检查方法验证

包云堂 (江苏大同盟制药有限公司, 泰州 225300)

**摘要** **目的:** 建立注射用二乙酰胺乙酸乙二胺的细菌内毒素的检查方法。**方法:** 按《中国药典》2015 年版四部通则 1143 进行, 用不同厂家的鲎试剂对不同批号的注射用二乙酰胺乙酸乙二胺进行干扰试验和细菌内毒素检查。**结果:** 用细菌内毒素检查用水将本品稀释至 96 倍时, 用灵敏度  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的鲎试剂检查细菌内毒素, 无干扰作用, 按拟定标准检查, 该品种 3 批样品细菌内毒素检查结果均符合规定。**结论:** 本品可采用细菌内毒素检查法检查, 其细菌内毒素限值 (L) 为  $0.12 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

**关键词:** 注射用二乙酰胺乙酸乙二胺; 细菌内毒素检查; 干扰试验

中图分类号: R927.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0301-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.012

## Validation of the Detection Method for Bacterial Endotoxins in Ethylenediamine Diacetate for Injection

Bao Yuntang (Jiangsu Unipul Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

**Abstract Objective:** To establish a detection method for bacterial endotoxins in ethylenediamine diacetate for injection. **Methods:** Interference test and bacterial endotoxin inspection were performed on ethylenediamine diacetate for injection with different batch numbers by using limulus reagents from different manufacturers according to general rule 1143 of Chinese Pharmacopoeia 2015 Vol. IV. **Results:** The products were diluted with BET water to 96 times, bacterial endotoxins were detected by using limulus reagent with a sensitivity of  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  and no interference was detected. The bacterial endotoxin test results of the 3 batch samples met the requirement of the proposed standard inspection. **Conclusion:** Bacterial endotoxin detection method can be used to test the product, and the bacterial endotoxin limit (L) is  $0.12 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

**Keywords:** ethylenediamine diacetate for injection; detection of bacterial endotoxins; interference test

注射用二乙酰胺乙酸乙二胺是一种抗纤维溶解类止血药, 临床上用于预防和治疗各种原因出血, 如手术渗血、外科出血、颅脑出血等。为了探讨鲎试剂 (TAL) 法检查细菌内毒素的可行性, 本试验对注射用二乙酰胺乙酸乙二胺细菌内毒素检查进行了研究。

## 1 材料

### 1.1 试剂

鲎试剂: 批号: 1504271,  $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格: 0.1 mL, 湛江安度斯生物有限公司; 批号: 1411130,  $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格: 0.1 mL, 湛江博康海洋生物有限公司。细菌内毒素工作标准

品：批号：150601-201580，效价：80 EU/支，中国食品药品检定研究院。细菌内毒素检查用水：批号：1510270，规格：50 mL，湛江安度斯生物有限公司。

### 1.2 仪器

鼓风干燥箱：型号：DHG-9245A，上海一恒科学仪器有限公司；试管恒温仪：型号：TAL-40D，湛江安度斯生物有限公司；旋涡混合器：型号：ZH-2，天津药典标准仪器厂；洁净工作台：型号：SW-CJ-1FD，苏州安泰空气技术有限公司。

### 1.3 样品

注射用二乙酰氨乙酸乙二胺，规格：0.4 g，批号：20141201、20141202、20141203，江苏大同盟制药有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 细菌内毒素限值的确定

细菌内毒素限值的确定根据《中国药典》2015年版四部通则1143规定的方法，根据公式 $L=K/M$ ，式中 $K=5\text{ EU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量，根据药品使用说明书，成人一次最大给药剂量为1.2 g，人均体重按60 kg计算，滴注时间按1 h计算，则 $M=20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，计算得 $L=0.25\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ ，出于对化学药品注射剂安全

性考虑，将计算值严格控制至 $1/3\sim 1/2$ 。故拟定本品的细菌内毒素限值为 $0.12\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

### 2.2 鲎试剂灵敏度复核

鲎试剂灵敏度复核按《中国药典》2015年版四部通则1143进行，根据TAL灵敏度的标示值，将细菌内毒素工作标准品用BET水溶解，在旋涡混合仪上充分混合15 min，然后将混匀的细菌内毒素工作标准品溶液稀释成 $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$ 、 $0.25\lambda$ 四个浓度，每一浓度平行4管进行试验，结果表明：试验用2个厂家的鲎试剂灵敏度值均在 $0.5\sim 2\lambda$ ，符合规定，可用于本试验。

### 2.3 干扰试验预试验

供试品溶液的制备：取本品1瓶，加检查用水2 mL制成供试品溶液 $200\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

通常用鲎试剂灵敏度( $\lambda$ )为 $0.5\sim 0.03\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，据 $MVD=C L/\lambda$ ，则样品的最大有效稀释倍数为 $48\sim 800$ 倍，因此采用48、96、192、400、800倍的稀释液为系列供试品溶液(NPC)。同时根据所用鲎试剂的灵敏度，使上述NPC系列溶液中含 $2\lambda$ 的细菌内毒素标准品溶液，制成供试品阳性溶液为PPC系列溶液。取2个厂家的鲎试剂分别与上述NPC、PPC系列溶液反应，每一浓度重复两管，并设阳性(PC)和阴性(NC)对照，结果注射用二乙酰氨乙酸乙二胺的最小不干扰稀释倍数为48倍，见表1。

表1 干扰试验预试验结果

稀释倍数	鲎试剂(湛江安度斯)				鲎试剂(湛江博康海洋)			
	NC	PC	NPC	PPC	NC	PC	NPC	PPC
原液			-	-			-	-
48倍			-	-			-	-
96倍	-	-			-	-		
192倍			-	-			-	-
400倍			-	-			-	-
800倍			-	-			-	-

### 2.4 正式干扰试验

为进一步确认是否存在干扰因素的影响，选用 $\lambda=0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂进行正式干扰试验。

分别用上述2个厂家的鲎试剂考察样品在稀释倍数为96倍时的干扰情况，取3批注射用二乙酰氨乙酸乙二胺用BET水稀释至96倍，用48倍样品

溶液和BET水分别将细菌内毒素标准品制成0.5、0.25、0.125、0.06 EU·mL<sup>-1</sup>的系列浓度，与2个厂家灵敏度为0.25 EU·mL<sup>-1</sup>的鲎试剂反应，用48倍样品溶液稀释的细菌内毒素标准品系列，每一浓度重复2管，用BET水稀释的细菌内毒素标准品系列，每一浓度重复4管，同时做阴性对照，结果见表2。E<sub>s</sub>和E<sub>t</sub>均在0.5~2λ，符合灵敏度复核试验要求，表明3批样品在稀释倍数为96倍时对试验均没

有干扰作用。

### 2.5 样品细菌内毒素检查

根据正式干扰试验结果，取3个批号样品，用BET水分别稀释成96倍液，对注射用二乙酰氨基乙酸乙二胺采取上述制定的限值并分别用2个不同厂家的鲎试剂进行细菌内毒素检查，按《中国药典》2015年版四部通则1143细菌内毒素检查法进行试验，3批样品检查结果完全符合标准规定，见表3。

表2 正式干扰试验结果

鲎试剂 (TAL) / (EU·mL <sup>-1</sup> )	样品批号	内毒素浓度 / (EU·mL <sup>-1</sup> )				NC	E <sub>s</sub> 或 E <sub>t</sub> / (EU·mL <sup>-1</sup> )	结果
		0.5	0.25	0.125	0.06			
1504271 λ=0.25 EU·mL <sup>-1</sup> (湛江安度斯)	BET水	++	--	--	--	--	E <sub>s</sub> =0.5	符合规定
	20141201	++++	----	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.5	无干扰
	20141202	++++	----	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.5	无干扰
	20141203	++++	----	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.5	无干扰
1411130 λ=0.25 EU·mL <sup>-1</sup> (湛江博康海洋)	BET水	++	++	--	--	--	E <sub>s</sub> =0.25	符合规定
	20141201	++++	++++	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.25	无干扰
	20141202	++++	++++	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.25	无干扰
	20141203	++++	++++	----	----	--	E <sub>t</sub> =0.25	无干扰

表3 注射用二乙酰氨基乙酸乙二胺细菌内毒素检查结果

鲎试剂 (TAL) / (EU·mL <sup>-1</sup> )	样品批号	供试品	PPC	PC	NC	结果
1504271 λ=0.25 EU·mL <sup>-1</sup> (湛江安度斯)	20141201	--	++	++	--	小于限值
	20141202	--	++	++	--	小于限值
	20141203	--	++	++	--	小于限值
1411130 λ=0.25 EU·mL <sup>-1</sup> (湛江博康海洋)	20141201	--	++	++	--	小于限值
	20141202	--	++	++	--	小于限值
	20141203	--	++	++	--	小于限值

### 3 讨论

1) 在检查操作中, 为防止内毒素污染试剂, 实验室要保持洁净, 所用的器皿必须要洗涤干净, 玻璃器皿要经过高温除热原处理, 避免外源性内毒素影响试验结果。

2) 本试验用2个不同厂家的鲎试剂对连续3个批号的注射用二乙酰氨基乙酸乙二胺进行了干扰试验, 结果表明,  $E_s$ 和 $E_t$ 均在 $0.5 \sim 2 \lambda$ , 符合灵敏度复核试验要求, 说明3个批号样品在稀释倍数为96倍时对试验没有干扰作用。

3) 用2个厂家鲎试剂与3个批号样品的96倍液进行细菌内毒素检查, 结果表明, 样品细菌内毒素限值均在 $0.12 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以下, 样品细菌内毒素限量均合格。

4) 根据试验结果, 确定注射用二乙酰氨基乙酸乙二胺细菌内毒素检查方法: 取本品, 依法检查(《中国药典》2015年版四部通则1143), 每 $1 \text{ mg}$ 二乙酰氨基乙酸乙二胺中含内毒素的量应小于 $0.12 \text{ EU}$ 。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典: 四部[S]. 2015: 通则1143.  
[2] 王江融, 刘用国, 李鸣. 二乙酰氨基乙酸乙二胺注射液细菌内毒素检查方法研究[J]. 海峡药学, 2005, 73

(2): 60.

- [3] 张献冲, 李新中, 李健和. 注射用二乙酰氨基乙酸乙二胺的制备与质量控制[J]. 西北药学杂志, 2007, (1): 23-24.  
[4] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规程[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 321-325.  
[5] 裴宇盛, 蔡彤, 张宇辰, 等. 中国药典2010年版细菌内毒素检查凝胶法干扰试验判断模式研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(7): 1296-1299.  
[6] 代秀梅, 于风平. 氟马西尼注射液细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药房, 2014, 25(2): 2003-2004.  
[7] 贾瑞波, 刘静, 耿欣. 注射用奈达铂细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师, 2014, 17(2): 332-334.  
[8] 厉青, 杨玲, 秦明明. 注射用帕瑞昔布细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1940-1941.  
[9] 彭燕, 张玲莉, 刘红. 鲎试剂法检测盐酸多沙普仑注射液中细菌内毒素的可行性[J]. 中国药师, 2013, 16(11): 1743-1745.  
[10] 彭玉华. 干扰鲎试验的因素探讨[J]. 中华临床医学杂志, 2006, 7(10): 66-66.

(收稿日期 2016年7月26日 编辑 邹宇玲)