

# 注射用奥扎格雷钠细菌内毒素检查方法研究

王晓雯, 于德志, 方选, 扈雪涛, 朱爱民 (山东省青岛市食品药品检验研究院, 青岛 266071)

**摘要** **目的:** 探讨注射用奥扎格雷钠细菌内毒素检查方法替代家兔热原检查法的可行性。**方法:** 采用 2 个不同厂家的鲎试剂, 用凝胶法进行干扰预试验及干扰试验; 用灵敏度为  $0.5\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  鲎试剂和  $0.8\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的奥扎格雷钠溶液进行细菌内毒素检查。**结果:** 注射用奥扎格雷钠稀释到  $0.8\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对鲎试剂与内毒素的凝集反应无干扰作用; 样品的细菌内毒素限值确定为  $0.625\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:** 注射用奥扎格雷钠可用细菌内毒素检查法替代原有的家兔热原检查法。

**关键词:** 注射用奥扎格雷钠; 细菌内毒素检查法; 凝胶法

中图分类号: R92 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)04-0403-06  
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.04.009

## On Bacterial Endotoxin Test for Ozagrel Sodium for Injection

Wang Xiaowen, Yu Dezhi, Fang Xuan, Yi Xuetao, Zhu Aimin (Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao 266071, China)

**Abstract Objective:** To investigate the feasibility of replacing pyrogen test with bacterial endotoxin test for ozagrel sodium for injection. **Methods:** Gelation method was adopted for pre-trial interference experiment and interference experiment with tachypleus amebocyte lysatein from two different manufacturers. Tachypleus amebocyte lysatein with a  $0.5\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  sensitivity and  $0.8\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  solution of ozagre sodium were used in the bacterial endotoxin test. **Results:** There was no interference in the agglutination reaction between tachypleus amebocyte lysatein and endotoxin when  $0.8\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  solution of ozagre sodium was utilized. The most suitable limit for bacterial endotoxin in preparation for ozagrel sodium for injection was  $0.625\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ . **Conclusion:** Bacterial endotoxin test can be used for ozagrel sodium for injection to replace pyrogen test.

**Keywords:** ozagrel sodium for injection; bacterial endotoxin test; gelation method

注射用奥扎格雷钠用于治疗急性血栓性脑梗塞和脑梗塞所伴随的运动障碍, 以及改善蛛网膜下腔出血手术后的脑血管痉挛收缩和并发的脑缺血症状<sup>[1-3]</sup>。该产品以国家食品药品监督管理局标准 YBH09742005 和 YBH15602005 为依据, 均以家兔法进行热原物质检查。但家兔法操作复杂、耗时; 而细菌内毒素检查法简便、快捷, 且检测灵敏度高<sup>[4]</sup>。本试验根据静脉用药时细菌内毒素总

限量<sup>[5-7]</sup>确定注射用奥扎格雷钠细菌内毒素的限值, 按照《中国药典》2015 年版四部通则<sup>[8]</sup>建立该产品的细菌内毒素检查法, 以确保临床用药安全。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器

恒温水浴箱 (JULABO, 型号: TW20), 涡旋混合器 (IKA, 型号: MS3 digital), 电热鼓风干燥箱 (上海三发科学仪器有限公司, 型号: DHG-

9101-35A)。

## 1.2 样品及试药

注射用奥扎格雷钠(山东罗欣药业集团股份有限公司,批号:516022081,516042182,516062181,家兔法热原检查均为阴性)。鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1602221,标示灵敏度:0.25 EU·mL<sup>-1</sup>;福州新北生化工业有限公司,批号:16032112,标示灵敏度:0.25 EU·mL<sup>-1</sup>;湛江安度斯生物有限公司,批号:1412013,标示灵敏度:0.5 EU·mL<sup>-1</sup>;福州新北生化工业有限公司,批号:15011912,标示灵敏度:

0.5 EU·mL<sup>-1</sup>)。细菌内毒素检查用水(福州新北生化工业有限公司,批号:13090715)。细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201580,规格:80 EU/支)。

## 2 方法与结果

### 2.1 鲎试剂灵敏度复核

按《中国药典》2015年版四部通则细菌内毒素检查法进行操作,结果显示试验用鲎试剂灵敏度均在0.5范围内,符合规定,可用于细菌内毒素检查。结果见表1、表2。

表1 鲎试剂( $\lambda=0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )灵敏度复核实验结果

批号	细菌内毒素浓度 / EU·mL <sup>-1</sup>				阴性对照	$\lambda c /$ (EU·mL <sup>-1</sup> )
	1.0	0.5	0.25	0.125		
1412013	++++	++++	----	----	--	0.5
15011912	++++	++++	----	----	--	0.5

表2 鲎试剂( $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )灵敏度复核实验结果

批号	细菌内毒素浓度 / EU·mL <sup>-1</sup>				阴性对照	$\lambda c /$ (EU·mL <sup>-1</sup> )
	0.5	0.25	0.125	0.06		
1602221	++++	++++	----	----	--	0.25
16032112	++++	++++	----	----	--	0.25

## 2.2 干扰预试验

### 2.2.1 供试品细菌内毒素限值(L)的确定

按联合用药内毒素总限量确定:本品用法用量为成人一次80 mg,一天2次,溶于500 mL生理盐水或5%葡萄糖溶液中,静脉滴注。生理盐水或5%葡萄糖溶液的内毒素限值均为0.5 EU·mL<sup>-1</sup>,则500 mL内毒素量为500 mL×0.5 EU·mL<sup>-1</sup>=250 EU,一人每小时可接受的最大内毒素量为60 kg×K=60 kg×5 EU/(kg·h)=300 EU·h<sup>-1</sup>(中国人均体重按60 kg计算,K为人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量<sup>[9-10]</sup>),则注射用奥扎格雷钠细菌内毒素理论限值为(300 EU-250 EU)·h<sup>-1</sup>/80 mg·h<sup>-1</sup>=0.625 EU·mg<sup>-1</sup>。

### 2.2.2 最大有效稀释浓度(MVC)的确定

目前,市售鲎试剂灵敏度通常在0.5 EU·mL<sup>-1</sup>~

0.03 EU·mL<sup>-1</sup>之间,根据公式MVC= $\lambda / L$ 计算,式中L为供试品的细菌内毒素限值, $\lambda$ 为鲎试剂的标示灵敏度。则灵敏度为0.5 EU·mL<sup>-1</sup>、0.25 EU·mL<sup>-1</sup>、0.125 EU·mL<sup>-1</sup>、0.06 EU·mL<sup>-1</sup>、0.03 EU·mL<sup>-1</sup>鲎试剂对应的MVC分别为0.8 mg·mL<sup>-1</sup>、0.4 mg·mL<sup>-1</sup>、0.2 mg·mL<sup>-1</sup>、0.1 mg·mL<sup>-1</sup>、0.05 mg·mL<sup>-1</sup>。每一稀释浓度下做2支供试品管和2支供试品阳性对照(即含2个内毒素的供试品稀释液)。同时另取2支加入细菌内毒素检查用水作为阴性对照,2支加入2浓度的内毒素标准品做阳性对照。使用标示灵敏度为0.25 EU·mL<sup>-1</sup>的2个厂家的鲎试剂。

注射用奥扎格雷钠的干扰预试验表明,阴性对照结果为阴性,阳性对照结果为阳性,试验有效。注射用奥扎格雷钠对细菌内毒素与鲎试剂的反应无

干扰作用,最大有效稀释浓度为  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.3 干扰试验

取1支细菌内毒素标准品,用细菌内毒素检查用水稀释成2.0、1.0、0.5、0.25  $\lambda$  4个浓度的内毒素标准溶液,每一浓度平行做2管。将注射用奥扎格雷钠溶解稀释至最大不干扰浓度,再用此溶液将

内毒素标准品稀释成2.0、1.0、0.5、0.25  $\lambda$  4个浓度的含内毒素的供试品溶液,每一浓度平行做4管。选用2个厂家的灵敏度为  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的鲎试剂做干扰试验,注射用奥扎格雷钠选择3个批号。同时用细菌内毒素检查用水做阴性对照,平行做2管。结果见表3、表4。

表3 干扰试验结果(福州新北)

供试品批号	内毒素浓度 / $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$				Nc	Es	Et
	0.5	0.25	0.125	0.0625		/ ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	
内毒素标准溶液	++	++	--	--	--	0.25	/
516022081	++++	++++	----	----	--	/	0.25
516042182	++++	++++	----	----	--	/	0.25
516062181	++++	++++	----	----	--	/	0.25

表4 干扰试验结果(湛江安度斯)

供试品批号	内毒素浓度 / $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$				Nc	Es	Et
	0.5	0.25	0.125	0.0625		/ ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	
内毒素标准溶液	++	++	--	--	--	0.25	/
516022081	++++	++++	----	----	--	/	0.25
516042182	++++	++++	----	----	--	/	0.25
516062181	++++	++++	----	----	--	/	0.25

从干扰试验结果看出,2个厂家的鲎试剂、3个批号的注射用奥扎格雷钠的Es、Et值均符合Es在0.5 ~ 2.0  $\lambda$  之间,且Et在0.5 ~ 2.0 Es之间(包括0.5 Es和2.0 Es)的要求。说明注射用奥扎格雷钠稀释到  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度时对鲎试剂无干扰。

### 2.4 细菌内毒素检测结果

将3批样品分别溶解至  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,用灵敏

度  $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的鲎试剂进行细菌内毒素检查,同时做供试品阳性对照、阳性对照和阴性对照,按照《中国药典》2015年版四部通则1143细菌内毒素检查法操作。结果表明,3批供试品均为阴性,与家兔法进行的热原检查阴性结果相吻合。结果见表5。

表5 供试品细菌内毒素检查结果

供试品批号	供试品	供试品阳性对照	阳性对照	阴性对照
516022081	--	++	++	--
516042182	--	++	++	--
516062181	--	++	++	--

### 3 讨论

药品是否可用细菌内毒素检查法替代家兔法热原检查,首先要证实是否存在干扰因素,确定该品种在有效浓度范围内进行细菌内毒素检查时既可以克服干扰因素,又能客观地反映其所含细菌内毒素的限值<sup>[11]</sup>。本实验按《中国药典》2015年版四部通则1143进行细菌内毒素检查法的研究,结果表明:注射用奥扎格雷钠浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对细菌内毒素检查法无干扰作用。采用凝胶法,用灵敏度为 $0.5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鲎试剂和浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的注射用奥扎格雷钠进行细菌内毒素检查,3个批号供试品结果均符合规定。因此,本品可用细菌内毒素检查法代替家兔热原法。

#### 参考文献:

- [1] 王成湖,易林高.注射用奥扎格雷钠与含果糖注射液的配伍稳定性考察[J].中国药房,2016,27(2):191-192.
- [2] 孟王玲,孟祥军,葛欣.HPLC法测定奥扎格雷钠注射液的含量[J].中国现代药物应用,2010,4(21):32-33.
- [3] 刘伟强.奥扎格雷钠注射液制备工艺研究[J].医学信息,2011,24(10):6801-6802.
- [4] 梦婷,康军,刘向萍,等.细菌内毒素法检查注射用奥扎格雷钠热原[J].武警医学院学报,2007,16(3):297-298.
- [5] 肖贵南,孙清萍,盛英美.如何建立新药的细菌内毒素检查方法[J].工作探讨,2011,8(32):159-162.
- [6] 周素文,李波.细菌内毒素检查法常见问题[J].科技园地,2006,41(19):1516-1518.
- [7] 张虞婷,丁苏苏,李倚云.细菌内毒素的研究进展及其检查法的应用[J].天津药学,2015,27(5):66-69.
- [8] 中国药典四部[S].2015.
- [9] 杨娟,李晟刚,朱爱民.环磷腺苷注射液细菌内毒素检查方法探讨[J].科技交流,2013,16(1):144-145.
- [10] 杨娟,李晟刚,邵磊.卡络磺钠注射液细菌内毒素检查方法研究[J].中国药事,2013,27(8):887-889.
- [11] 肖贵南,区璇,陆惠文,等.盐酸普罗帕酮注射液细菌内毒素的鲎试验研究[J].中国药理学通报,2004,20(2):226-229.

(收稿日期 2016年8月1日 编辑 王萍)