

# 专利蓝 V 号钠盐注射液细菌内毒素检查法的研究

矫建, 鲁军, 张婷婷, 刘进朋\* (大连市药品检验所, 大连 116021)

**摘要** 目的: 建立肿瘤检测用药物专利蓝 V 号钠盐注射液细菌内毒素检查方法。方法: 按《中国药典》2015 年版细菌内毒素检查法, 对不同批号的样品进行干扰试验和细菌内毒素检查。结果: 高浓度专利蓝 V 号钠盐注射液对鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应有干扰作用, 在稀释 120 倍时可排除干扰。结论: 本试验建立的细菌内毒素检查方法可用于专利蓝 V 号钠盐注射液的细菌内毒素检查, 控制其产品质量。

**关键词:** 食品染色剂; 肿瘤检测药物; 专利蓝 V 号钠盐; 细菌内毒素; 鲎试剂; 干扰试验

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)07-0785-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.07.013

## Study on Bacterial Endotoxin Test for Patent Blue V Sodium Salt Injection

Jiao Jian, Lu Jun, Zhang Tingting, Liu Jinpeng\* (Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China)

**Abstract Objective:** To establish a method of bacterial endotoxin test for tumors-detected drugs patent blue V (PB V) sodium salt injection. **Methods:** Interference test and bacterial endotoxin test of different batches of samples were carried out according to *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition). **Results:** Agglutination interference to tachypleus amebocyte lysate (TAL) and bacterial endotoxin occurred at a high concentration of PB V sodium salt injection which was eliminated after being diluted to 120 times. **Conclusion:** The bacterial endotoxin test may be suitable for PB V sodium salt injection to control its quality effectively.

**Keywords:** food stain; tumors-detected drugs; PB V sodium salt injection; bacterial endotoxin; TAL; interference test

专利蓝 V 是一种合成染料, 与亚甲蓝同为三芳基甲烷类染料<sup>[1]</sup>。一般以钠盐或钙盐形式用于食品添加剂的着色剂<sup>[2-3]</sup>。专利蓝 V 之前一直被用于淋巴管造影<sup>[4]</sup>。最近, 专利蓝 V 被广泛应用于乳腺癌前哨淋巴结活检技术<sup>[5-6]</sup>, 也被用于其他恶性肿瘤包括皮肤黑色素瘤<sup>[7]</sup>、宫颈癌<sup>[8]</sup>和胃癌的检测<sup>[9-10]</sup>。专利蓝 V 钠盐注射液的法国生产企业采用光度测定法进行细菌内毒素检测。作为一种注射液, 控制其产品质量, 保证用药安全十分重要。光度测定法检查细菌内毒素的成本比较高, 在我国检测细菌内毒素使用凝胶法更为普遍, 所以本文对专利蓝 V 号钠盐注

注射液进行凝胶法的细菌内毒素检查方法学研究。

### 1 仪器与试剂

电热恒温水浴箱; 旋涡混合器; 试管恒温仪等。实验用玻璃器皿经 250 °C 烘烤 2 h 以上。

专利蓝 V 号钠盐注射液, 2 mL: 50 mg (批号: 15PA601A, 14PA605A, 14PA606A); 鲎试剂, (湛江博康海洋生物有限公司, 批号: 1503050, 灵敏度 0.25 EU · 支<sup>-1</sup>, 规格 0.1 mL · 支<sup>-1</sup>; 湛江安度斯生物有限公司, 批号: 1505292, 灵敏度 0.25 EU · 支<sup>-1</sup>, 规格 0.1 mL · 支<sup>-1</sup>); 细菌内毒素工作标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号:

150601-201164, 规格:  $100 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$ ); 细菌内毒素检查用水(湛江博康海洋生物有限公司, 批号: 1303160, 规格:  $5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ; 湛江安度斯生物有限公司, 批号: 1305130, 规格:  $5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ )。

## 2 方法与结果

### 2.1 细菌内毒素限值的确定

企业标准规定的细菌内毒素限值应设定为每1 mL中含内毒素的量小于35 EU。本品临床最大给药剂量为10 mL, 根据《中国药典》2015年版四部通则1143细菌内毒素检查法<sup>[1]</sup>和9301注射剂安全性检查法应用指导原则<sup>[11]</sup>的规定, 细菌内毒素的限值  $L=K/M$ , K为人每千克体重每小时最大可接受的细菌内毒素剂量, 以  $\text{EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$  表示, 注射剂  $K=5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ , 以人的体重60 kg计算限值L, 则  $L=30 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。所以专利蓝V号钠盐注射液细菌内毒素限值应设定为每1 mL中含内毒素的量小于30 EU。

### 2.2 鲎试剂灵敏度的复核

按《中国药典》2015年版四部通则1143的要求

对所用的鲎试剂进行灵敏度复核, 经复核, 所用鲎试剂的灵敏度测定值均在0.5~2.0 $\lambda$ , 符合规定。

### 2.3 供试品稀释浓度范围

厂家专利蓝V号钠盐注射液有效稀释倍数(MVD)的计算公式  $MVD=L \times C/\lambda$ ; 其中L为专利蓝V号钠盐注射液的细菌内毒素限值  $30 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。 $\lambda$ 为鲎试剂标示灵敏度, 目前市售鲎试剂灵敏度 $\lambda$ 通常在0.5~0.03  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。则最大有效稀释倍数( $MVD_{0.5-0.03}$ )为60~960倍。

### 2.4 干扰预试验

取专利蓝V号钠盐注射液, 用细菌内毒素检查用水分别稀释至60、120、240、480、960倍, 将此系列浓度溶液记为NPC。同时在上述试验液中加入细菌内毒素标准溶液, 使每一浓度的试验液中均含有2 $\lambda$  ( $\lambda$ 为所用鲎试剂的标示灵敏度)浓度的细菌内毒素, 记此系列溶液为PPC。取灵敏度为0.25  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的2个不同厂家的鲎试剂, 分别与上述PPC和NPC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 专利蓝V号钠盐注射液干扰预试验结果 ( $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

鲎试剂批号及 厂家	供试品 批号	系列	专利蓝V号钠盐注射液稀释倍数						阳性 对照	阴性 对照
			原液	60	120	240	480	960		
1503050 (博康)	15PA601A	NPC	---	---	---	---	---	---	++	--
		PPC	---	---	++	++	++	++		
	14PA605A	NPC	---	---	---	---	---	---		
		PPC	---	---	++	++	++	++		
	14PA606A	NPC	---	---	---	---	---	---		
		PPC	---	---	++	++	++	++		
1505292 (安度斯)	15PA601A	NPC	---	---	---	---	---	++	--	
		PPC	---	---	++	++	++			++
	14PA605A	NPC	---	---	---	---	---			---
		PPC	---	---	++	++	++			++
	14PA606A	NPC	---	---	---	---	---			---
		PPC	---	---	++	++	++			++

干扰预试验结果表明：专利蓝 V 号钠盐注射液与鲎试剂反应有干扰作用，但当稀释 120 倍以上时，可以消除干扰。

## 2.5 正式干扰试验

为了最终确认是否存在干扰因素的影响，进行正式干扰试验。取专利蓝 V 号钠盐注射液用细菌内毒素检查用水稀释至 120 倍，用灵敏度为  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的鲎试剂进行试验，结果见表 2。

结果表明，测定的细菌内毒素检查用水的鲎试剂灵敏度 ( $E_s$ ) 均在标示的灵敏度 ( $\lambda$ )

$0.5 \sim 2.0\lambda$ ，测定的供试品鲎试剂灵敏度 ( $E_t$ ) 值均在  $0.5 \sim 2.0E_s$ ，表明采用凝胶法对专利蓝 V 号钠盐注射液进行细菌内毒素检查是可行的。

## 2.6 供试品的细菌内毒素检查

根据干扰试验结果，本品采用上述制定的限值进行细菌内毒素检查。分别选用 2 个不同厂家生产的鲎试剂，按照《中国药典》2015 年版四部通则 1143 进行供试品的细菌内毒素检查。结果由表 3 可见，3 批供试品的细菌内毒素检查结果符合规定。

表 2 专利蓝 V 号钠盐注射液正式干扰试验 ( $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

鲎试剂批号及厂家	供试品批号	细菌内毒素浓度 / ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				测定值
		0.5	0.25	0.125	0.06	
1503050 (博康)	15PA601A	++++	++ --	-----	-----	0.35 (Et)
	14PA605A	++++	++ --	-----	-----	0.35 (Et)
	14PA606A	++++	+++ -	-----	-----	0.30 (Et)
	检查用水	++++	++++	-----	-----	0.25 (Es)
1505292 (安度斯)	15PA601A	++++	+++ -	-----	-----	0.30 (Et)
	14PA605A	++++	+++ -	-----	-----	0.30 (Et)
	14PA606A	++++	+++ -	-----	-----	0.30 (Et)
	检查用水	++++	++++	-----	-----	0.25 (Es)

表 3 专利蓝 V 号钠盐注射液细菌内毒素检查结果 ( $\lambda=0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

鲎试剂批号及厂家	供试品批号	供试品阳性对照	供试品溶液	阳性对照	阴性对照
1503050 (博康)	15PA601A	++	--		
	14PA605A	++	--	++	--
	14PA606A	++	--		
1505292 (安度斯)	15PA601A	++	--		
	14PA605A	++	--	++	--
	14PA606A	++	--		

### 3 讨论

目前《中国药典》仍以凝胶法作为法定的仲裁标准,因此,本研究采用凝胶法对专利蓝V号钠盐注射液的细菌内毒素检查进行了研究,结果显示凝胶法也是可行的。试验使用2个不同厂家的鲎试剂,对3批样品分别进行了干扰试验,结果表明,高浓度专利蓝V号钠盐注射液对鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应有干扰作用,当最小稀释倍数为120倍时,可排除干扰作用。本试验为专利蓝V号钠盐注射液计算并设定了细菌内毒素限值,以凝胶法考察了其可行性,为该药品安全用药提供了检验依据。

#### 参考文献:

- [1] Haque R. A, Wagner A, Whisken, J. A, et al. Anaphylaxis to Patent Blue V: a Case Series and Proposed Diagnostic Protocol [J]. Contact Derm, 2010, 65 (3): 396 - 400.
- [2] Scherer K, Bircher A.J, Figueiredo V. Blue Dyes in Medicine—a Confusing Terminology [J]. Contact Dermatitis, 2006, 54 (4): 231-232.
- [3] 马晓燕,朱顺达,肖海龙,等.液相色谱-串联质谱法测定食品中喹啉黄、酸性绿S和专利蓝V[J].中国食品学报,2012,12(4):182-186.
- [4] Giuliano A E, Kirgan D M, Guenther J M, et al. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Breast Cancer[J]. Ann Surg, 1994, 220 (3): 391 - 398.
- [5] Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The Sentinel Node in Breast Cancer: a Multicenter Validation Study[J]. New England Journal of Medicine, 1998, 339 (14): 941 - 946.
- [6] 何建军,任予,陈武科,等.美蓝和专利蓝在乳癌前哨淋巴结活检中作用的研究[J].中国普通外科杂志,2001,10(5):388-390.
- [7] Morton D L, Wen D R, Wong J H, et al. Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma[J]. Archives of Surgery, 1992, 127 (4): 392 - 399.
- [8] Barranger E, Grahek D, Cortez A, et al. Laparoscopic Sentinel Lymph Node Procedure Using a Combination of Patent Blue and Radioisotope in Women with Cervical Carcinoma[J]. Cancer, 2003, 97 (12): 3003 - 3009.
- [9] 程黎阳,陈晓东,周宏锋,等.专利蓝示踪胃癌前哨淋巴结及其微转移检测[J].肿瘤,2006,26(1):71-73.
- [10] 程黎阳,陈晓东,张玉新,等.专利蓝和放射物联合示踪检测胃癌前哨淋巴结及其临床意义[J].中华外科杂志,2005,43(9):569-572.
- [11] 中国药典:四部[S].2015:通则1143:154-157,通则9301:400-402.

(收稿日期 2016年12月5日 编辑 邹宇玲)