动态显色法在注射用甲磺酸萘莫司他 细菌内毒素检查的运用分析

王蓉蓉¹, 曹迎亚¹, 汪云霞¹, 马铮², 刘欢², 周晓雯^{3*}

(1. 南京华威医药科技集团有限公司, 南京 210000;

2. 江苏杜瑞制药有限公司, 江苏 泰州 225300; 3. 江苏省中医院, 南京 210000)

摘要 目的: 建立注射用甲磺酸萘莫司他细菌内毒素检查法。方法: 按《中国药典》四部通则 1143 细菌内毒素检查法进行动态显色法干扰试验。结果: 采用加碱性调节剂作用一定时间处理供试液并进行稀释的方式, 可有效消除甲磺酸萘莫司他的干扰作用。结论: 注射用甲磺酸萘莫司他可采用细菌内毒素动态显色法进行细菌内毒素检查。

关键词: 注射用甲磺酸萘莫司他; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 干扰; 碱性调节剂; 动态显色法; 细菌内毒素检查

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)02-0195-05

doi:10.19778/j.chp.2024.02.014

Investigation on bacterial endotoxin in nafamostat mesilate for injection by kinetic chromogenic assay

WANG Rongrong¹, CAO Yingya¹, WANG Yunxia¹, MA Zheng², LIU Huan², ZHOU Xiaowen^{3*}

(1. Nanjing Huawe Medicine Technology Group Co., Ltd, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Durui Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 225300, China;

3. Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China)

Abstract Objective: To establish a bacterial endotoxin test method for nafamostat mesilate for injection.

Methods: The interference test of the bacterial endotoxin test method-kinetic chromogenic assay was carried out according to the *Chinese Pharmacopoeia* 2020 Volume IV general chapter 1143. **Results:** The interference effect of naphtholimus mesylate can be effectively eliminated by treating the test solution with an alkaline regulator for a certain period of time and diluting it. **Conclusion:** The bacteria endotoxin test-kinetic chromogenic assay for nafamostat mesilate for injection is applicable.

Key words: nafamostat mesilate for injection; serine protease inhibitor; the interference; alkaline regulator; kinetic chromogenic assay; bacterial endotoxin

注射用甲磺酸萘莫司他系主要用于预防血液体外循环时灌流血液凝固(血液透析及血浆置换)的丝氨酸蛋白酶抑制剂,对凝血纤溶系统、激肽释放酶-激肽系统(激肽释放酶)、补体系统及胰酶、磷脂酶 A2 等具有很强的抑制作用^[1];可延长凝血时间、抑制血小板凝集剂补体溶血反应。因其丝氨酸蛋白酶抑制特性,对鲎试剂反应亦具有较强抑制作用,目前常用方法

为热原检查法^[2],对细菌内毒素检查法无相关报道,现对注射用注射用甲磺酸萘莫司他细菌内毒素检查进行研究,以确定该产品采用细菌内毒素检查的可行性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

酶标仪 (Molecular Devices); 旋涡混合器

第一作者简介:王蓉蓉,工程师;研究方向:医药工程研究。Tel:18136494201;E-mail:wangrongrong@huawe.com

* 通讯作者简介:周晓雯,副主任药师;研究方向:药物制剂研究。Tel:025-86617141;E-mail:54713407@qq.com

(Gallop);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);电子天平(梅特勒托利多);电动分液器(Eppendorf)。

1.2 试药

注射用甲磺酸萘莫司他(江苏杜瑞制药有限公司,规格:50 mg,批号:2220701、2220702、2230305);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-202292,效价:90 EU/支);动态显色法内毒素检测鲎试剂盒(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,检测限范围:50~0.005 EU·mL⁻¹,批号:23020110);动态显色法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,检测限范围:50~0.005 EU·mL⁻¹,批号:2302070);细菌内毒素检查用水(BET水)(湛江安度斯生物有限公司,批号:2011120);碱性调节剂(湛江博康海洋生物有限公司,批号:2211100);精密pH试纸(上海三爱思试剂有限公司,规格:pH 5.5~9.0,批号:20211103)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定

根据《中国药典》2020年版及药品使用说明书, $L = K/M$;每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量K为5 EU·(kg·h)⁻¹,注射用甲磺酸萘莫司他单次最大给药量M为50 mg·h⁻¹,人均体重按60 kg;注射用甲磺酸萘莫司他细菌内毒素计算限值为6 EU·mg⁻¹。为保障用药安全,对于需联合用药

的药品,严格至计算值的1/2,规定本品细菌内毒素限值为每1mg甲磺酸萘莫司他中含内毒素的量应小于3.0 EU。

2.2 供试品稀释浓度范围的确定

根据 $MVD = cL/\lambda$,c为样品浓度,制备得供试液初始浓度10 mg·mL⁻¹, λ 为鲎试剂标识灵敏度最低浓度0.005 EU·mL⁻¹,L为细菌内毒素限值3 EU·mg⁻¹,计算得MVD为6 000倍,即最大可稀释6 000倍。

2.3 标准曲线可靠性试验

按《中国药典》2020年版四部通则1143细菌内毒素检查法,经标准曲线的可靠性试验,所用的鲎试剂标准曲线的相关系数均 ≥ 0.980 ,阴性对照的反应时间大于标准曲线最低点(0.005 EU·mL⁻¹)的反应时间,且变异系数 $\leq 10\%$,均符合规定,可用于细菌内毒素检查。

2.4 预干扰试验

取供试品,加BET水溶解,制备得初始浓度为10 mg·mL⁻¹供试液(pH 3.5~4.0),用BET水稀释至4 000倍(pH 8.0~8.5)。在供试品稀释倍数500倍、1 000倍、2 000倍分别加碱性调节剂调节pH至8.5~9.0,在500倍作用3 min,1 000倍不作用,2 000倍作用5 min,同时进行碱性调节剂回收试验。结果表明,2230305批次样品回收不合格;2220701、2220702批次及碱性调节剂回收均合格。选择按上述方法,同时在1 000倍延长作用时间至5 min进行正式干扰试验。见表1。

表1 预干扰试验结果

Tab. 1 The interference pre-test results

批号 (batch)	稀释倍数 (dilution multiple)/倍	内毒素加入量 (endotoxin concentration)/(EU·mL ⁻¹)	T/s	CV/%	回收率 (recovery)/%
2220701	4 000		>7 065	0.00	
	4 000		>7 065		
	4 000	0.5	2 005	0.00	102.4
	4 000	0.5	2 005		
2220702	4 000		>7 065	0.00	
	4 000		>7 065		
	4 000	0.5	1 910	1.19	126.9
	4 000	0.5	1 878		
2230305	4 000		>7 065	0.00	
	4 000		>7 065		
	4 000	0.5	2 483	0.92	46.6
	4 000	0.5	2 451		
碱性调节剂(alkaline regulator)			5 824	2.40	
			5 633		
		0.5	1 782	1.26	153.4
		0.5	1 814		

2.5 方法学考察

2.5.1 碱性调节剂对细菌内毒素活性的影响 取碱性调节剂(调 pH 至 8.5~9.0),按预实验操作步骤稀释至相应 pH 作为碱性调节剂对照溶液;取细菌内毒素标准品,按预实验操作稀释至 0.5 EU·mL⁻¹作为碱性调节剂阳性对照溶液;取细菌内毒素标准品用 BET 水稀释至 5、0.5、0.05、0.005 EU·mL⁻¹系列浓度作为标准曲线系列溶液。

取微孔板,每孔分别加入上述制备的溶液 0.1 mL,每稀释浓度平行制备 2 孔。取混合均匀的鲎试剂分别加入上述加样孔,每孔 0.1 mL。加样应从阴性对照开始,终止于最高浓度的标准品溶液,将微孔板放置于预热至(37±1)℃酶标仪中,按试剂说明书进行。结果表明,2 个厂家的鲎试剂回收结果均符合规定,碱性调节剂调 pH 至 8.5~9.0 对细菌内毒素活性无影响,见表 2。

表 2 碱性调节剂对细菌内毒素活性的影响

Tab. 2 The interference of pH buffer(alkaline) on bacterial endotoxin activity

鲎试剂(TAL)	内毒素加入量(endotoxin concentration)/(EU·mL ⁻¹)	T/s	CV/%	回收率(recovery)/%
厦门鲎试剂(Xia Men Bioendo Technology)		4 320	0.99	
		4 260		
	0.5	1 410	1.52	149.7
	0.5	1 380		
安度斯(A&C Biological)		>4 379	0.00	
		>4 379		
	0.5	1 079	0.00	86.6
	0.5	1 079		

2.5.2 回收试验 取供试品,加含适量细菌内毒素标准品的 BET 水,制备得 10 mg·mL⁻¹供试液,按预实验操作步骤,在 500 倍作用 3 min,1 000 倍作用 5 min,2 000 倍作用 5 min,稀释至 4 000 倍((pH

8.0~8.5)),并含有 0.5 EU·mL⁻¹的内毒素标准品。分别采用 2 个鲎试剂厂家进行干扰试验,结果表明,2 个厂家的鲎试剂回收结果均在 50%~200%之间,结果均符合规定。内毒素回收结果见表 3。

表 3 回收试验

Tab. 3 The recovery results

鲎试剂(TAL)	内毒素加入量(endotoxin concentration)/(EU·mL ⁻¹)	T/s	CV/%	回收率(recovery)/%
厦门鲎试剂(Xia Men Bioendo Technology)		5 549	0.80	
		5 590		
	0.5	1 830	0.00	96.7
	0.5	1 830		
安度斯(A&C Biological)		>5 340	0.00	
		>5 340		
	0.5	1 110	3.66	78.6
	0.5	1 169		

2.5.3 干扰试验 取供试品,加 10 EU·mL⁻¹的细菌内毒素标准品溶液,制备得 10 mg·mL⁻¹供试液(含有 10 EU·mL⁻¹的细菌内毒素标准品溶液)。用 10 EU·mL⁻¹的细菌内毒素标准品溶液稀释至 200 倍,加碱性调节剂和 BET 水稀释至 500 倍(pH 8.5~9.0,作用 3 min)、1 000 倍(pH 8.5~9.0,作用 5 min)、2 000 倍(pH 8.5~9.0,作用 5 min),再用 BET 水稀释至 4 000 倍,并含有 0.5 EU·mL⁻¹的内

毒素标准品。分别采用 2 个鲎试剂厂家进行干扰试验,结果表明,阴性对照反应时间大于标准曲线最低点 0.005 EU·mL⁻¹的反应时间;标准曲线的相关系数 r 为 0.998 (≥ 0.980),且变异系数均 $\leq 10\%$,试验有效。采用 2 个厂家鲎试剂内毒素回收率均在 50%~200%之间,结果均符合规定。因此,按该供试液制备方式,稀释至 4 000 倍供试品溶液无干扰。样品内毒素回收结果见表 4。

表 4 正式干扰试验结果

Tab. 4 The interference test results

鲎试剂 (TAL)	批号 (batch)	稀释倍数 (dilution multiple)/ 倍	内毒素加入量 (endotoxin concentration)/ (EU · mL ⁻¹)	T/s	CV/%	回收率 (recovery)/ %	内毒素浓度 (measure value)/ (EU · mL ⁻¹)	内毒素含量 (Test product limits)/ (EU · mg ⁻¹)	
厦门鲎试剂(Xia Men Bioendo Technology)	2220701	4 000		>6 269	0.00		<0.005	<2	
		4 000		>6 269					
		4 000	0.5	1 770	0.00	107.2	0.5412		
		4 000	0.5	1 770					
	2220702	4 000		>6 269	0.00		<0.5798	<2	
		4 000		>6 269					
		4 000	0.5	1 739	0.00	115.0	0.6649		
		4 000	0.5	1 739					
		2230305	4 000		>6 269	0.00		<0.005	<2
			4 000		>6 269				
安度斯(A&C Biological)	2220701	4 000		2 279	0.00		<0.005	<2	
		4 000		2 279					
		4 000	0.5	630	0.00	61.0	0.310		
		4 000	0.5	630					
	2220702	4 000		1 859	0.00		<0.005	<2	
		4 000		1 859					
		4 000	0.5	599	0.00	77.0	0.390		
		4 000	0.5	599					
		2230305	4 000		1 679	2.48		<0.005	<2
			4 000		1 739				
		4 000	0.5	630	3.57	68.4	0.347		
		4 000	0.5	599					

2.5.4 细菌内毒素检查 采用厦门鲎试剂和安度斯鲎试剂各 1 批,供试液稀释至 4 000 倍,L 值按 3.0 EU · mg⁻¹,对上述 3 批注射用甲磺酸萘莫司他进行细菌内毒素检查(表 4)。结果表明,3 批样品均符合规定。

3 讨论

3.1 供试液处理方式选择

供试液中主药甲磺酸萘莫司他对鲎试剂具有较强干扰作用,溶液呈酸性(pH 约 5.5),在碱性条件下不稳定,同时易与电解质溶液反应析出,加热也可使其降解,分别选择加碱,加热或过滤等方式消除其干扰作用。通过研究发现,加碱方式操作简单,效果最好,因此选择加碱调节 pH 的方式。调节 pH 至 8.5 ~ 9.0 以消除供试品影响。一般供试品溶液和鲎试剂混合后溶液的 pH 值在 6.0 ~ 8.0 的范围内

为宜,碱性 pH 及作用时间对内毒素回收具有一定影响,但供试品必需经与碱反应消除其干扰特性,因此确定合适的反应时间尤为关键。综上,先选择较少加碱量及反应时间进行预干扰试验,结果表明不同批次结果差异较大,因此选择 3 步加碱并作用一定时间进行正式干扰试验。

3.2 稀释倍数及检测方法的选择

注射用甲磺酸萘莫司他临床溶解方法为用 5% 葡萄糖注射液溶解制得 10 mg · mL⁻¹ 供试液,因此本研究选择采用细菌内毒素检查用水制备得 10 mg · mL⁻¹ 供试液作为原液。本实验室条件下,经研究确定采用加碱方式消除其干扰作用后,甲磺酸萘莫司他原料的不干扰浓度为 3 μg · mL⁻¹,按 10 mg · mL⁻¹ 供试液折算不干扰稀释倍数为 3 333 倍,为确保正式干扰试验时,供试品对鲎试剂无干扰作用,选择 4 000 倍进行干扰试验。

因供试品的稀释倍数远超凝胶法稀释要求[凝胶法最大稀释倍数($D_{0.03}$)为1 000倍],同时光度法操作简便,特别在建立品种的内毒素检查法进行干扰试验时,能够获得直观的回收率趋势,对于研究性质的样品更有优势^[3,4],本试验选择动态显色法,采用灵敏度可达到 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 动态显色法鲎试剂进行相关实验。

3.3 其他检查

本研究确定注射用甲磺酸萘莫司他的不干扰稀释倍数为4 000倍,其采用的动态显色法鲎试剂检测区间最高灵敏度为 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,目前国内仅有2家符合该规格的鲎试剂要求,国内市面上常见的内毒素定量检测方法鲎试剂最高灵敏度多为 $0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,本法较易受限于试剂影响。因此除本方法外,可增加美洲鲎试剂厂家如龙沙生物制药有限公司、科德角国际生物医学科技(北京)有限公司等相关研究;或选择浊度法进一步优化本法降低稀释倍数;由于鲎资源的严重衰竭,亦可采用内毒素检查法的补充替代方法重组C因子法^[5]进行进一步研究。

参考文献

[1] 刘志艳,项倩,崔一民. 甲磺酸萘莫司他临床应用的研究现状

[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(15):2368.

LIU ZY, XIANG Q, CUI YM. Research status of clinical application of nafamostat mesilate [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(15):2368.

[2] 瞿飘飘,孙叶丹,朱社敏,等. 注射用甲磺酸萘莫司他热原检查方法学验证[J]. 中国药品标准,2015,16(3):194.

QU PP, SUN YD, ZHU SM, *et al.* Validation on the pyrogen test of nafamostat mesilate for injection[J]. Drug Stand China, 2015, 16(3):194.

[3] 王巨才,王雪. 动态显色法定量检测磺达肝癸钠注射液中的细菌内毒素[J]. 药物分析杂志,2021,41(1):180.

WANG JC, WANG X. Determination of bacterial endotoxin in fondaparinux sodium injection by kinetic chromogenic assay [J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(1):180.

[4] 谢美园,王尧尧,何跃芳. 动态显色法定量检测盐酸右美托咪定中细菌内毒素的含量[J]. 药物分析杂志,2020,40(9):1619.

XIE MY, WANG YY, HE YF. Quantitative determination of bacteria endotoxin in dexmedetomidine hydrochloride by kinetic chromogenic assay[J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(9):1619.

[5] 裴宇盛,蔡彤,陈晨,等. 中国药典2020年版细菌内毒素检查法补充方法应用研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(6):822.

PEI YS, CAI T, CHEN C. Study on the application of supplementary methods of bacteria endotoxin test in *Chinese pharmacopoeia* 2020 edition[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(6):822.

(收稿日期:2023-07-27)