

地塞米松磷酸钠注射液细菌内毒素检查法的干扰试验

王燕敏

国药集团容生制药有限公司 河南 焦作 454950

摘要：目的：通过开展地塞米松磷酸钠注射液的干扰试验研究，确定检查其细菌内毒素的相关方法。方法：依据2020年版《中华人民共和国药典》中细菌内毒素检测中的凝胶法进行相关检查，对3批自制制剂进行相应的干扰试验。结果：在地塞米松磷酸钠注射液稀释至24倍时，对其细菌内毒素检查方法未造成任何干扰作用，经检测，3批自制制剂的细菌内毒素检测均符合相关规定。结论：地塞米松磷酸钠注射液中的细菌内毒素检测可采用凝胶法进行。

关键词：地塞米松磷酸钠注射液；干扰试验；细菌内毒素

地塞米松，人工合成的长效糖皮质激素药物，在抗内毒素、糖代谢、抗过敏、抗风湿、加强应激反应及抗炎等方面具有作用，地塞米松与泼尼松相比较，其具备的抗炎和抗过敏等方面的作用较优，但在水、钠潴留以及促进钾排泄等方面的作用较弱，同时其使用过程中对局部刺激反应较弱，在治疗肌无力、高血压、水肿等疾病时所引起的不良反应较小。在血液科、消化内科、皮肤科、呼吸内科、风湿免疫科均有使用^{[1]-[3]}。

为避免地塞米松磷酸钠注射液因细菌内毒素污染而产生的严重性后果，确保其在使用的过程中的安全性，同时研发的生产处方及工艺因厂家不同而有所差别，因此要求企业应该按照自制产品的特色，建立相应的可行的细菌内毒素检测方法。细菌内毒素检测方法具有速度较快、灵敏度高且操作简单等优点^[4]，但同时其结果可能会因不同厂家鲎试剂、产品生产工艺、供试品稀释方式等诸多因素而易受干扰，所以有必要进行干扰试验^{[5]-[8]}。此试验通过开展其细菌内毒素检查方法的方法学验证，证明了此检查方法的科学可行性及合理性，为此后其细菌内毒素检测方案提供了理论基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ET-96内毒素凝胶法测定仪（天津市天大天发科技有限公司）、GZX-9146MBE电热鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司）、ZH-2型旋涡混合器（上海沪西医疗仪器厂），试验用玻璃器皿均经过高温灭菌处理（250℃下干热处理2h），目的在于采用干热处理的方法去除外源性的细菌内毒素。

1.2 检查用试药

第一作者：王燕敏，女，大学本科，副高级工程师，研究方向为医药管理

1.2.1 湛江博康海洋生物有限公司所制的规格为每支0.5毫升、生产批号为2004221、灵敏度为每毫升0.25 EU的鲎试剂（TAL）；

1.2.2 湛江安度斯生物公司所制的规格为每支0.5毫升、生产批号为2001150、灵敏度为每毫升0.25 EU的鲎试剂（TAL）；

1.2.3 湛江博康海洋生物公司所制的规格为每毫升10 EU、生产批号为2004071的细菌内毒素工作标准品；

1.2.4 江安度斯生物有限公司所制的规格为每毫升10 EU、生产批号为2004160的细菌内毒素工作标准品；

1.2.5 湛江博康海洋生物公司所制的规格为每支5毫升、生产批号为1910190的细菌内毒素检查用（BET）水；

1.2.6 湛江安度斯生物公司生产的规格为每支5毫升、生产批号为2001070的细菌内毒素检查用（BET）水；

1.2.7 国药集团容生制药有限公司自产的2102203、2102204、2102205三批地塞米松磷酸钠注射液。

2 检查的方法与结论

2.1 复核鲎试剂的灵敏度

其灵敏度依据2020年版《中华人民共和国药典》规定的方法^[9]进行灵敏度复核试验，结果表明均符合规定。

2.2 细菌内毒素限值（L）确定

按照《中华人民共和国药典》2020年版中相关应用指导原则的细菌内毒素检查法的相关要求，其限值通常是利用该公式 $L = K/M$ 计算而得到的，公式中的L：细菌内毒素限值；K：可接收的最高内毒素剂量（人每千克体重每小时），查阅地塞米松磷酸钠注射液的说明书，该药品临床可用于鞘内直接注射，鞘内注射剂量 $K = 0.2 \text{ EU} (\text{千克} \cdot \text{小时})^{-1}$ ；公式中M：最高供试品的量（人用每千克体重每小时），注射液的地塞米松磷酸钠在鞘内注射时，一般给药每次5mg，间隔1~3周注射一

次，依照中国人平均体重（60Kg）计算，可以得出 $M = 5\text{mg} \cdot (60\text{Kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ，计算得 $L = K/M = 2.4 \text{ EU/mg}$ ，规定其所含细菌内毒素的量应小于 1.2 EU/mg 。

2.3 相关MVD计算

最大有效稀释倍数 $MVD = CL/\lambda$ ，其表达式中C应为相关供试品溶液浓度，L为相关制剂细菌内毒素限值（每毫克 1.2 EU ）， λ 选择最高灵敏度鲎试剂 0.03 EU/ml 。则 $MVD = 5 \text{ mg/ml} \times 1.2 \text{ EU/mg} / 0.03 \text{ EU/ml} = 200$ ，即最大有效稀释倍数为200。

2.4 干扰预试验

将一支浓度为 10 EU/ml 的细菌内毒素工作标准品，加入BET水 1.0 ml 进行复溶，制备内毒素标准品溶液，浓度为每毫升 10 EU ，然后将其进行稀释，分别稀释为 1 EU/ml 、 0.5 EU/ml 的细菌内毒素标准品溶液。取3批编号为001、002、003的地塞米松磷酸钠注射液，分别用BET水稀释至6倍、12倍、24倍、48倍、96倍、192倍供试品溶液，其中12倍、24倍、48倍、96倍、192倍供试品溶液标

示成供试品阴性对照组（NPC），对应的稀释浓度分别为 0.42 mg/ml 、 0.21 mg/ml 、 0.105 mg/ml 、 0.052 mg/ml 、 0.026 mg/ml 。另取6倍、12倍、24倍、48倍、96倍系列供试品溶液分别与 1 EU/ml 细菌内毒素标准品的溶液等体积混合，作为供试品的阳性对照（PPC）。将细菌内毒素标准品溶液（浓度为 0.5 EU/ml ）标示成试验的阳性对照组。同时设置阴性对照。NPC供试品阴性对照5个样各2管、PPC供试品阳性对照5个样各2管、阴性对照2管、阳性对照2管， $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 保温60分钟。

结果得知，供试品的阴性对照（NPC）、阴性的对照均呈现阴性；阳性的对照均呈现阳性，证明该试验具有有效性；从下表中的结果可得出在PPC（供试品阳性对照）组中，本次试验样品的最高不干扰浓度为 0.42 mg/ml （对应稀释倍数为12），为了增加安全系数，通常会将试验中第二个阳性结果所代表的供试品的浓度作干扰试验，即得本次试验就可选浓度为 0.21 mg/ml 进行正式干扰试验。

表1 干扰预试验结果

鲎试剂	供试品批号	样品	供试品稀释浓度 (mg/ml)					阴性对照	阳性对照
			0.42	0.21	0.105	0.052	0.026		
	2102203	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+
2001150	2102204	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+
	2102205	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+
	2102203	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+
2004221	2102204	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+
	2102205	NPC	-	-	-	-	-	-	-
		PPC	+	+	+	+	+	-	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

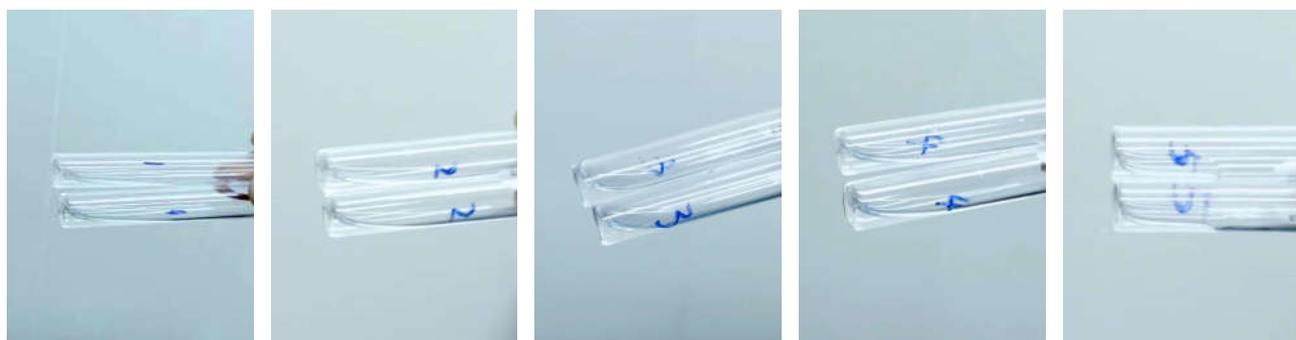


图1~5 为NPC（--）结果

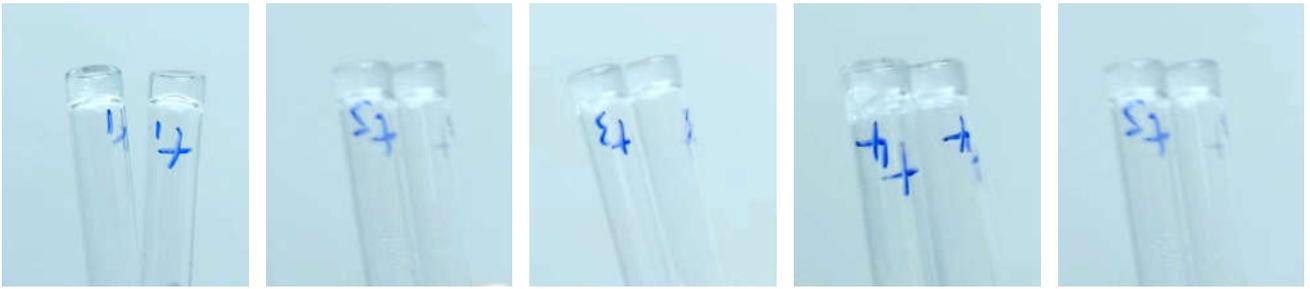


图6~10 为PPC (++) 结果

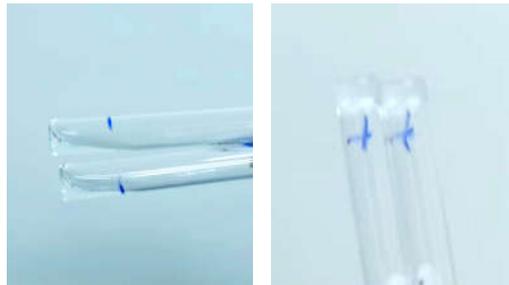


图11~12 为阴性对照 (- -)、阳性对照 (++) 结果

注：湛江安度斯生物有限公司、鲨试剂批号2001150，3批供试品的预试验结果均相同

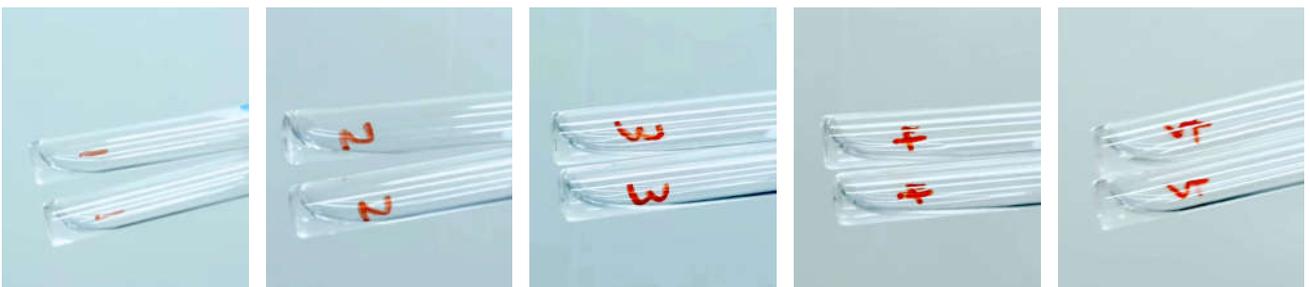


图13~17 为NPC (- -) 结果



图18~22 为PPC (++) 结果

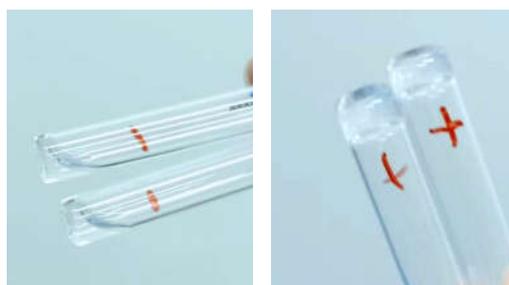


图23~24 为阴性对照 (- -)、阳性对照 (++) 结果

注：湛江博康海洋生物有限公司、鲨试剂批号2004221，3批供试品的预试验结果均相同

2.5 正式试验

为确定试验过程中是否有干扰抑制因素，选用0.25 EU/ml灵敏度的鲎试剂进行验证。取3批地塞米松磷酸钠注射液，用BET水将供试品进行12倍、24倍稀释，其中供试品阴性对照（NPC）组为24倍的稀释液。取细菌内毒素工作标准品10EU/ml一支，加BET水1.0 ml复溶，制得10 EU/ml内毒素标准品溶液，再分别稀释至1 EU/ml、0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml，用12倍供试品溶液与同一支标准品稀释的4个浓度（1 EU/ml、0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml）细菌内毒素标准

品溶液进行等体积混合，即得到含0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml内毒素的供试品溶液，作为供试品阳性对照（PPC）。阳性对照组为0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml的细菌内毒素溶液。同时设置阴性对照。

按照规定检测，干扰试验结果如表2，下表显示依法添加细菌内毒素的3批供试品溶液的反应结果均在0.5~2.0λ，说明该供试品在0.21 mg/ml浓度对两批鲎试剂均无干扰，在不大于此浓度的情况时，可以使用细菌内毒素相关检查方法进行相应的检查。

表2 干扰试验结果

鲎试剂	样品	含内毒素浓度 (EU/mL)				NPC	阴性对照	λ _c
		0.5	0.25	0.125	0.0625			
2001150	BET水	+ +	+ +	+ +	- -	/	- -	0.125
	PPC (2102203)	++++	++++	++++	----	- -	- -	0.125
	PPC (2102204)	++++	++++	++++	----	- -	- -	0.125
	PPC (2102205)	++++	++++	++++	----	- -	- -	0.125
2004221	BET水	+ +	+ +	- -	- -	/	- -	0.25
	PPC (2102203)	++++	++++	----	----	- -	- -	0.25
	PPC (2102204)	++++	++++	----	----	- -	- -	0.25
	PPC (2102205)	++++	++++	----	----	- -	- -	0.25

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“/”表示无。

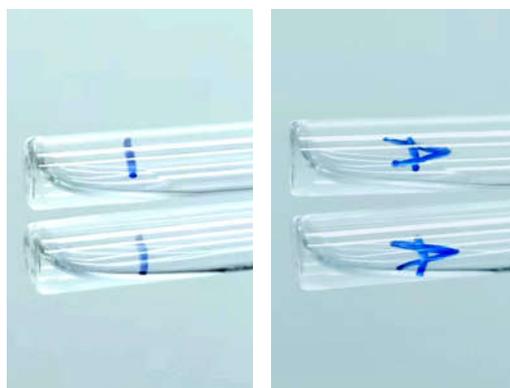


图25~26 为阴性对照（--）和NPC（--）结果



图27~30 为细菌内毒素溶液阳性对照结果（C₁++ C₂++ C₃++ C₄--）

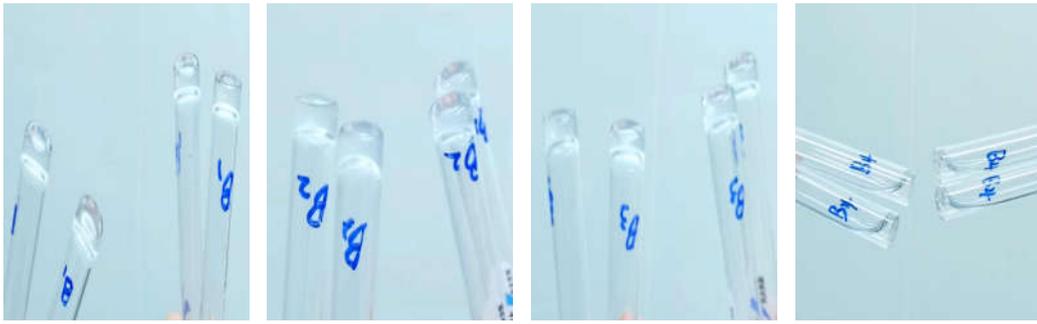


图31~34 为PPC结果(B₁++++ B₂++++ B₃++++ B₄----)

注: C₁、C₂、C₃、C₄依次对应0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml细菌内毒素阳性对照;

B₁、B₂、B₃、B₄依次对应含0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml细菌内毒素的PPC;

湛江安度斯生物有限公司、鲎试剂批号2001150, 3批供试品干扰试验结果均相同。

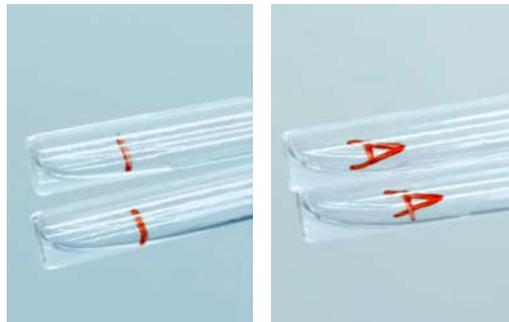


图35~36 为阴性对照(--) 和NPC(--) 结果

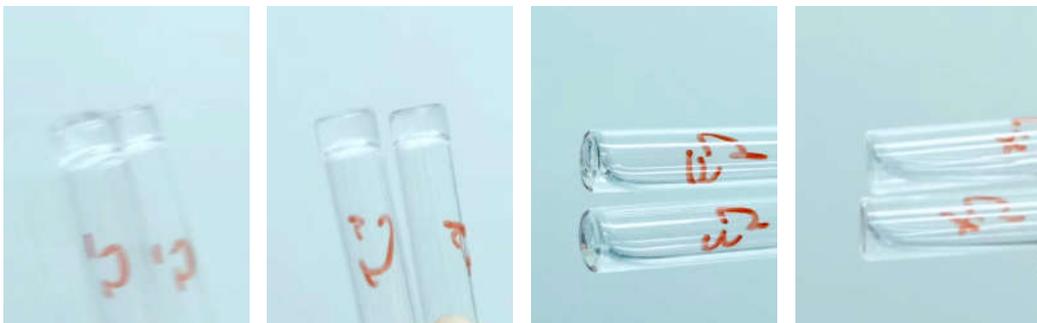


图37~40 为细菌内毒素溶液阳性对照结果(C₁++ C₂++ C₃-- C₄--)



图41~44为PPC结果(B₁++++ B₂++++ B₃---- B₄----)

注: C₁、C₂、C₃、C₄依次对应0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml细菌内毒素阳性对照;

B₁、B₂、B₃、B₄依次对应含0.5 EU/ml、0.25 EU/ml、0.125 EU/ml、0.0625 EU/ml细菌内毒素的PPC;

湛江博康海洋生物有限公司鲎试剂批号2004221, 3批供试品干扰试验均显出相同的结果。

2.6 地塞米松磷酸钠注射液的细菌内毒素检查

依据2020年版《中华人民共和国药典》中有关于其细菌内毒素的检查规定，分别取3个不同批号的地塞米松磷酸钠注射液，用BET水配制成浓度为0.21 mg/ml的稀释液（NPC），使用不同厂家的各一批其灵敏度都为每毫升0.25 EU的鲎试剂，分别对其开展其细菌内毒素的相关检查，同时试验时需制备地塞米松磷酸钠注射液阳性的对照（PPC）、阴性的对照和阳性的对照，3批自产样品均呈阴性结果，结果见下表3。

表3 样品细菌内毒素检查结果

鲎试剂	样品	NPC	PPC	阳性对照	阴性对照
2001150	001	- -	+ +	+ +	- -
	002	- -	+ +	+ +	- -
	003	- -	+ +	+ +	- -
2004221	001	- -	+ +	+ +	- -
	002	- -	+ +	+ +	- -
	003	- -	+ +	+ +	- -

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

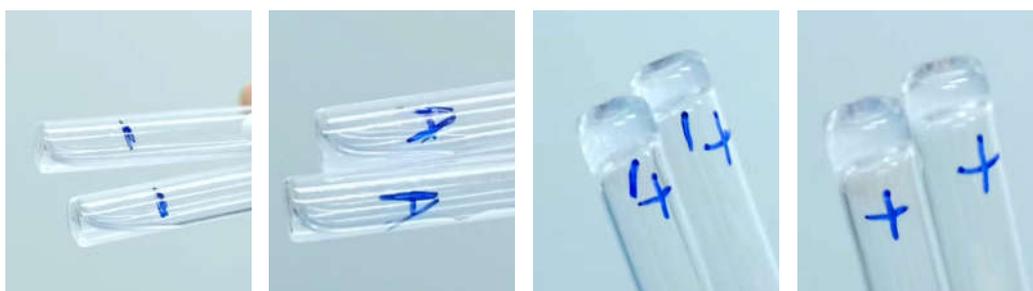


图45~48 为阴性对照（--），样品NPC（--），供试品阳性对照PPC（++），阳性对照（++）

注：湛江博康海洋生物有限公司鲎试剂批号2001150，3批供试品内毒素结果均相同

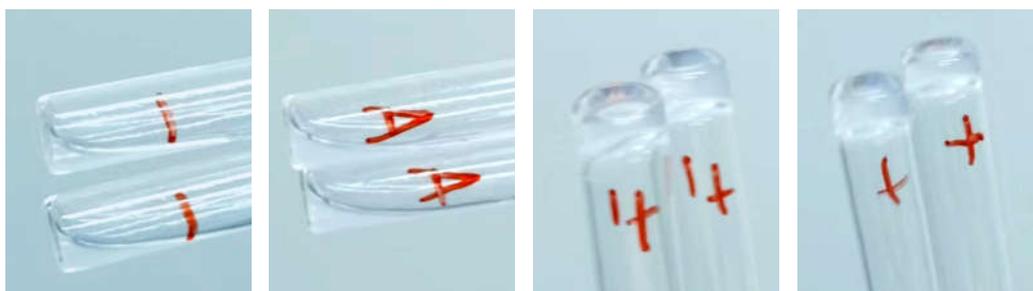


图49~52 为阴性对照（--），样品NPC（--），供试品阳性对照PPC（++），阳性对照（++）

注：湛江博康海洋生物有限公司鲎试剂批号2004221，3批供试品内毒素结果均相同

3 结论

此试验按照《中国药典》中的细菌内毒素检查法试验，通过研究地塞米松磷酸钠注射液对相应鲎试剂以及内毒素凝聚反应的干扰作用，将供试品浓度稀释至0.21 mg/ml，使用灵敏度均为每毫升0.25 EU的两个不同厂家生产的鲎试剂进行相关干扰试验时，最终在试验结果中可发现，注射液的地塞米松磷酸钠在24倍稀释倍数时对该品细菌内毒素的检查没有造成任何干扰，结果证明其细菌内毒素的检查方法具有科学性和可行性。

参考文献

[1]司永奇.地塞米松磷酸钠注射液治疗上呼吸道感染的临床效果与安全性[J].临床医学研究与实践,2022,7(12):48-51.
[2]余梦露.关于地塞米松磷酸钠注射液用于术前治疗急性化脓性中耳炎的效果[C].2019年浙江省医学会耳鼻喉头颈外科学学术大会论文汇编,2019:202-203.

[3]马忠辉.地塞米松磷酸钠注射液联合腰硬麻醉在高龄产妇分娩中的临床意义[J].医学理论与实践,2018,31(12):1811-1812.
[4]郑霞,赵毓梅.细菌内毒素检查法的应用进展[J].中国热带医学,2009,9(1):170-171.
[5]胡晓红.地塞米松磷酸钠注射液中细菌内毒素的检测[J].中国医药工业杂志,2005,36(05):302-303.
[6]吴露露,居红枫.地塞米松磷酸钠注射液的细菌内毒素检查法[J].药学与临床研究,2007,15(05):415-417.
[7]郑剑峰,王育红.注射用地塞米松磷酸钠中细菌内毒素的检测[J].电大理工,2011,(02):12-13.
[8]高岩,席时东.地塞米松磷酸钠注射液的细菌内毒素检查[J].安徽医药,2007,11(09):794-795.
[9]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，2020:159.