

喷替酸原料药细菌内毒素限值确定及检查方法学研究

沈娟, 田瑛, 倪明, 刘炬, 于蒙蒙

Study on bacterial endotoxin limit value and the detection methodological investigation for the active pharmaceutical ingredient of pentetic acid

SHEN Juan, TIAN Ying, NI Ming, LIU Ju, YU Mengmeng

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202508061>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

UPLC-MS/MS法测定小鼠血浆中紫杉醇脂肪酸酯前药及其药代动力学研究

Determination and pharmacokinetics investigation of prodrugs of paclitaxel fatty acid esters in mouse plasma by UPLC-MS/MS

药学实践与服务. 2024, 42(8): 341-345 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404082

山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202307052

紫杉醇棕榈酸酯的合成及其脂质体的制备与处方研究

Synthesis of paclitaxel palmitate and the formulation optimization of its liposomes

药学实践与服务. 2024, 42(9): 379-384, 410 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404062

钾离子竞争性酸阻滞剂的药学特征研究进展

Progress on pharmaceutical characteristics of potassium-competitive acid blocker

药学实践与服务. 2024, 42(7): 278-284 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202306040

麝香接骨胶囊的HPLC特征图谱的研究及7种成分含量测定

Study on the characteristic chromatogram of Shexiang Jiegu Capsule and determination of seven components by HPLC

药学实践与服务. 2025, 43(8): 395-399 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202307059

侧流免疫层析定量检测方法的研究进展

Research progress on quantitative detection methods of lateral flow immunochromatography assay

药学实践与服务. 2024, 42(7): 273-277, 284 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202307037



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

喷替酸原料药细菌内毒素限值确定及检查方法学研究

沈娟¹, 田瑛², 倪明¹, 刘炬¹, 于蒙蒙¹ (1. 联勤保障部队药品仪器监督检验总站, 北京 100166; 2. 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

[摘要] **目的** 探索建立喷替酸原料药的细菌内毒素限值及检查方法, 并进行方法学考察。**方法** 用 3 批喷替酸建立细菌内毒素测定方法, 并进行干扰试验研究。以市售碱性调节剂溶解样品至 4 mg/ml 及以下浓度, 用细菌内毒素检查用水进行稀释; 选用灵敏度为 0.125 EU/ml 及以上的鲎试剂, 用市售的镁离子缓冲液复溶; 用凝胶法进行内毒素检查。**结果** 喷替酸原料药的细菌内毒素限值确定为 <0.125 EU/mg。**结论** 建立的细菌内毒素检查方法可用于喷替酸原料药中细菌内毒素的控制。

[关键词] 喷替酸; 内毒素限值; 方法学研究

[文章编号] 2097-2024(2025)12-0607-03

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202508061

Study on bacterial endotoxin limit value and the detection methodological investigation for the active pharmaceutical ingredient of pentetic acid

SHEN Juan¹, TIAN Ying², NI Ming¹, LIU Ju¹, YU Mengmeng¹ (1. General Station for Drug & Instrument Supervision and Control, Joint Logistics Support Force, PLA, Beijing 100166, China; 2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective** To explore and establish the bacterial endotoxin limit value and testing method of the active pharmaceutical ingredient (API) of pentetic acid, and conduct methodological investigation. **Methods** Three batches of pentetic acid were used to establish the method for the determination of bacterial endotoxin, and interference test was conducted simultaneously. The sample was dissolved with commercially available alkaline regulator to a concentration of 4 mg/ml or lower, and then diluted with water for bacterial endotoxin test. Limulus reagent with sensitivity of 0.125 EU/ml or higher was selected and redissolved with commercially available magnesium ion buffer solution. And the endotoxin test was performed by gel method. **Results** The endotoxin limit of API of pentetic acid was determined as: less than 0.125 EU/mg. **Conclusion** The method established could be used for the control of bacterial endotoxin in API of pentetic acid.

[Key words] pentetic acid; endotoxin limit; methodological investigation

喷替酸^[1](DTPA), 又名二亚乙基三胺五乙酸, 为氨基酸类化合物, 微溶于冷水, 溶于热水和碱溶液, pH 2~3(在 20℃ 的饱和溶液中)化学性质稳定。其三钠钙盐和三钠锌盐于 2004 年 8 月由美国 FDA 批准上市^[2], 用于放射性核素沾染后的治疗, 是广谱的放射性核素促排药物, 是目前应用最广、效果最好的氨基酸络合剂。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)历版中均未收载喷替酸的质量标准, 美国药典(USP)自第 32 版起, 历版药典均收载了喷替酸的质量标准^[3-4], 但标准中未设置细菌内毒素检查项。在某项以喷替酸为原料药研制注射剂的项目中, 在该注射剂的质量标准中设置了细

菌内毒素检查项, 按照审评的要求, 为了做好全生命周期管理, 应从源头起做好质量控制, 故对原料药同步设置细菌内毒素检查项。基于此, 本试验拟对喷替酸原料药的细菌内毒素限值进行确定, 同时对其鲎试剂凝胶法检查方法进行研究, 探索建立喷替酸原料药内毒素检验的质量标准。

1 材料

1.1 试剂

细菌内毒素工作标准品(批号: 150601-202190, 每支 70 EU, 中国食品药品检定研究院); 细菌内毒素检查用水(批号: 160006-201510, 每支 5 ml, BET 水, 中国食品药品检定研究院); 鲎试剂(批号: 21030312, 0.1 ml/支, TAL 0.125 EU/ml, 福州新北生化工业有限公司; 批号: 2211211, 0.1 ml/支, 湛江安度斯生物有限公司); 镁离子缓冲液(批号:

[作者简介] 沈娟, 免疫学专业硕士, 副主任药师, 研究方向: 药毒理研究及药物检测, Email: wxfsj@163.com

[通信作者] 于蒙蒙, 微生物学硕士, 副主任药师, 研究方向: 药品审评及生物安全防控类药品检验, Email: Mellisah@126.com

2203020, 每支 4 ml, 湛江安度斯生物有限公司); 碱性调节剂(2 ml/支, 湛江博康海洋生物有限公司)。

1.2 供试品

喷替酸(批号: 220501、220502、220503, 装量: 10.0 mg/支, 某药品生产单位)。

1.3 仪器及器具

SSW-600-2S 电热恒温水浴箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 微量移液器(规格: 200 μ l、1000 μ l, Eppendorf 公司); MS 3 数字漩涡振荡器(德国 IKA 公司); 无热原吸头; 经 250 $^{\circ}$ C 干烤 1 h 的试管。

2 方法

2.1 限值的确定

本品拟研制的注射剂最大给药剂量为 800 mg/(60 kg·h)。根据《中国药典》(四部)2020 年版通则 1143^[5], 计算出限值 $L=0.375$ EU/mg。根据《中国药典》(四部)2020 年版《注射剂安全性检查法应用指导原则》^[5], 为保证用药安全, 将限值严格至计算值的 1/3, 即以 0.125 EU/mg 为限值进行细菌内毒素方法的可行性考察。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验

按照《中国药典》(四部)2020 年版通则 1143^[5] 进行鲎试剂灵敏度(λ_c)复核。2 批鲎试剂灵敏度测定值均符合要求, 见表 1。

2.3 干扰试验预试验

2.3.1 喷替酸最大有效稀释倍数

根据最大有效稀释倍数(MVD)公式 $MVD=cL/\lambda$; L 为 0.125 EU/mg; c 为拟配制供试品浓度 4 mg/ml。常用市售鲎试剂灵敏度 λ 范围 0.5 ~ 0.03 EU/ml, 0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 EU/ml 的鲎试剂分别对应的供试品溶液有效稀释倍数: 1、2、4、8、16 倍, 分别对应有效稀释浓度: 4、2、1、

0.5、0.25 mg/ml。

拟用 0.125 EU/ml 灵敏度(对应的供试品有效稀释浓度为 1 mg/ml)的鲎试剂进行测定。

2.3.2 试验操作及结果

首先探索用市售的镁离子缓冲液将供试品旋涡混合溶解并稀释进行试验。

分别用镁离子缓冲液 2.5 ml 将 10.0 mg 供试品旋涡混合溶解成 4 mg/ml, 用镁离子缓冲液进一步稀释成 2、1、0.5、0.25 mg/ml 浓度的供试液, 此系列浓度溶液记为 A。

另制备含有 2 λ (0.25 EU/ml)细菌内毒素的 2、1、0.5、0.25 mg/ml 浓度的供试液, 此系列溶液记为 B。

取灵敏度为 0.125 EU/ml 的鲎试剂, 用镁离子缓冲液 0.1 ml 复溶, 分别与上述 A 和 B 进行反应, 设置复管, 并设阳性(PC)和阴性对照(NC), 结果见表 2。

表 2 结果表明: 供试品用镁离子缓冲液溶解并稀释, 鲎试剂用镁离子缓冲液复溶, 对鲎试剂和内毒素的凝集反应存在干扰。

考虑到供试品 pH 在 2 ~ 3, 继续探索使用市售的碱性调节剂将供试品旋涡混合溶解成 4 mg/ml 供试品溶液, 再用 BET 水稀释。按表 2 同样的方法进行操作, 结果见表 3 和表 4。

表 3 和表 4 结果表明: 供试品预先用碱性调节剂溶解成 4 mg/ml 并用 BET 水稀释, 在 1 mg/ml 及以下浓度溶液对试验无干扰。1 mg/ml 浓度与 0.125 EU/ml 灵敏度的鲎试剂对应。故选用灵敏度为 0.125 EU/ml 鲎试剂进行正式干扰试验。

2.4 正式干扰试验

用湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化工业有限公司两个厂家的鲎试剂对 3 批供试品进行正式干扰试验。

制备含有 0.25、0.125、0.06 和 0.03 EU/ml 内毒

表 1 鲎试剂灵敏度复核

鲎试剂批号	标示灵敏度(λ_c , EU/ml)	内毒素浓度(EU/ml)					实测 λ_c (EU/ml)
		0.25	0.125	0.06	0.03	阴性对照	
2211211	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
21030312	0.125	++++	++++	----	----	--	0.150

表 2 喷替酸细菌内毒素检测干扰预试验一(鲎试剂批号: 2211211, $\lambda=0.125$ EU/ml)

供试品批号	A(供试品稀释液)				B(供试品稀释液+内毒素)				NC(W)	PC($E_{2\lambda}$)
	S_2	S_1	$S_{0.5}$	$S_{0.25}$	$S_2E_{2\lambda}$	$S_1E_{2\lambda}$	$S_{0.5}E_{2\lambda}$	$S_{0.25}E_{2\lambda}$		
220501	--	--	--	--	--	--	+	+		
220502	--	--	--	--	--	--	+	+	--	++
220503	--	--	--	--	--	--	+	+		

注: S_2 表示供试品浓度为2 mg/ml稀释液, 下标表示溶液浓度; $E_{2\lambda}$ 表示内毒素的浓度为2倍 λ 浓度(0.25 EU/ml); W为细菌内毒素检查用水。

表 3 喷替酸细菌内毒素检测干扰预试验二 (鲎试剂批号: 2211211, $\lambda=0.125$ EU/ml)

供试品批号	A(供试品稀释液)				B(供试品稀释液+内毒素)				NC(W)	PC($E_{2\lambda}$)
	S_2	S_1	$S_{0.5}$	$S_{0.25}$	$S_2E_{2\lambda}$	$S_1E_{2\lambda}$	$S_{0.5}E_{2\lambda}$	$S_{0.25}E_{2\lambda}$		
220501	--	--	--	--	++	++	++	++		
220502	--	--	--	--	++	++	++	++	--	++
220503	--	--	--	--	++	++	++	++		

表 4 喷替酸细菌内毒素检测干扰预试验三 (鲎试剂批号: 21030312, $\lambda=0.125$ EU/ml)

供试品批号	A(供试品稀释液)				B(供试品稀释液+内毒素)				NC(W)	PC($E_{2\lambda}$)
	S_2	S_1	$S_{0.5}$	$S_{0.25}$	$S_2E_{2\lambda}$	$S_1E_{2\lambda}$	$S_{0.5}E_{2\lambda}$	$S_{0.25}E_{2\lambda}$		
220501	--	--	--	--	--	++	++	++		
220502	--	--	--	--	--	++	++	++	--	++
220503	--	--	--	--	--	++	++	++		

素浓度的 1 mg/ml 的供试品溶液, 设 4 复管; 用 BET 水制备 0.25、0.125、0.06 和 0.03 EU/ml 内毒素溶液, 设 2 复管; 并分别设 1mg/ml 的供试品溶液(A) 2 复管和阴性对照(NC)2 复管, 鲎试剂灵敏度为 0.125 EU/ml, 用镁离子缓冲液复溶。按《中国药典》(四部)2020 年版通则 1143^[5]进行干扰试验, 结果见表 5。

由表 5 可知: 阴性对照溶液 NC、供试品溶液 A 的所有平行管均为阴性, 内毒素溶液系列的结果

$\lambda_c(0.125, 0.18)$ 在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 范围内, 试验有效。干扰试验系列的结果(E_t)在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 范围内, 符合规定。表明供试品用碱性调节剂溶解成 4 mg/ml 并用 BET 水稀释, 在 1 mg/ml 及以下浓度对试验无干扰。

2.5 供试品检查

用 0.125 EU/ml 灵敏度的鲎试剂, 将供试品用本研究建立的方法进行细菌内毒素检查, 结果见表 6。

表 5 喷替酸细菌内毒素检测干扰试验

鲎试剂批号	溶液名称	内毒素浓度(EU/ml)				A	NC	λ_c, E_t
		0.25	0.125	0.06	0.03			
2211211	BET水	++	++	--	--	--	--	$\lambda_c=0.125$
	A0001	++++	++++	----	----	--	--	$E_t=0.125$
	A0002	++++	++++	----	----	--	--	$E_t=0.125$
	A0003	++++	++++	----	----	--	--	$E_t=0.125$
	BET水	++	+	--	--	--	--	$\lambda_c=0.18$
21030312	A0001	++++	----+	----	----	--	--	$E_t=0.21$
	A0002	++++	----	----	----	--	--	$E_t=0.25$
	A0003	++++	----	----	----	--	--	$E_t=0.25$

注: $\lambda_c=\log^{-1}(\sum X_s/2)$ 、 $E_t=\log^{-1}(\sum X_t/4)$ 。其中: X_s 为 BET 水的反应终点浓度的对数值; X_t 为干扰试验溶液(即 3 批供试品)的反应终点浓度的对数值^[6]; A0001、A0002、A0003 分别为用供试品批号为 220501、220502、220503 配制而成的溶液。

表 6 喷替酸细菌内毒素检查

鲎试剂批号	供试品批号	B	A	PC	NC
2211211	220501	++	--	++	--
	220502	++	--	++	--
	220503	++	--	++	--
21030312	220501	++	--	++	--
	220502	++	--	++	--
	220503	++	--	++	--

注: A 为 1 mg/ml 喷替酸溶液; B 为 1 mg/ml 喷替酸溶液含有 2λ 浓度细菌内毒素; PC 为含有 2λ 浓度细菌内毒素的阳性对照。

3 结果与讨论

本试验对喷替酸原料药细菌内毒素限值进行确定并对其检查方法进行考察。结果表明: 喷替酸适合采用《中国药典》(四部)2020 年版通则 1143^[5] 中的凝胶法进行细菌内毒素检查。喷替酸以市售的碱性调节剂溶解并以 BET 水稀释至 4 mg/ml

及以下浓度, 选用 0.125 EU/ml 及以上灵敏度的鲎试剂, 用市售的镁离子缓冲液复溶后, 进行细菌内毒素检查, 限值为小于 0.125 EU/mg。

因我国目前尚无喷替酸原料药检验的国家标准, 而在药品的研发中对其质量标准提出了需求,

(下转第 624 页)

- for resected EGFR-mutated stage IB-III A non-small-cell lung cancer: updated results from the phase III randomized ADAURA trial[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(10): 1830-1840.
- [14] TSUBOI M, HERBST R S, JOHN T, et al. Overall survival with osimertinib in resected EGFR-mutated NSCLC[J]. 2023, 389(2): 137-147.
- [15] CHENG Y, HE Y, LI W, et al. Osimertinib versus comparator EGFR TKI as first-line treatment for EGFR-mutated advanced NSCLC: FLAURA China, a randomized study[J]. *Target Oncol*, 2021, 16(2): 165-176.
- [16] POPAT S, AHN M J, EKMAN S, et al. Osimertinib for EGFR-mutant non-small-cell lung cancer central nervous system metastases: current evidence and future perspectives on therapeutic strategies[J]. *Target Oncol*, 2023, 18(1): 9-24.
- [17] SHI P Y, ZHANG S, ZHU L, et al. The third-generation EGFR inhibitor, osimertinib, promotes c-FLIP degradation, enhancing apoptosis including TRAIL-induced apoptosis in NSCLC cells with activating EGFR mutations[J]. *Transl Oncol*, 2019, 12(5): 705-713.
- [18] NAM Y W, SHIN J H, KIM S, et al. Correction: EGFR inhibits TNF- α -mediated pathway by phosphorylating TNFR1 at tyrosine 360 and 401[J]. *Cell Death Differ*, 2025, 32(6): 1180.
- [19] 刘心怡, 陈文. 奥希替尼用于 EGFR+晚期非小细胞肺癌患者一线治疗的药物经济学评价 [J]. *世界临床药物*, 2021, 42(2): 135-142.
- [收稿日期] 2024-11-21 [修回日期] 2025-05-19
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 609 页)

故探索了喷替酸原料药内毒素检查的限值, 并对其检查的方法学进行了考察。经过试验摸索, 发现用市售的镁离子缓冲液溶解喷替酸并稀释, 无法去除其对鲎试剂与内毒素反应的干扰。将喷替酸用市售的碱性调节剂溶解成 4 mg/ml, 再用 BET 水稀释至合适浓度, 鲎试剂用镁离子缓冲液复溶, 则能消除对试验的干扰, 方法简便可行, 为建立喷替酸及其制剂标准提供了参考。

【参考文献】

- [1] BUCKINGHAM J, MACDONALD F. Anonymous Pentetic Acid. In the Dictionary of Organic Compounds[M]. Sixth Edition. Florida: CRC Press, 1996: 1188.
- [2] U. S. Food and Drug Administration. NDA 21-751 Pentetate zinc trisodium injection [EB/OL]. (2004-08-11)[2023-07-25]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/021751lbl.pdf.
- [3] 药品标准查询数据库. Pentetic Acid[DB/OL].(2008-11-01)[2023-07-25]. https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m62300.html.
- [4] 药品标准查询数据库. Pentetic Acid[DB/OL].(2024-01-06)[2024-02-12]. <https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP2024/download.aspx?filename=Pentetic%20Acid>.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)2020 年版 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 178-181, 516-520.
- [6] 沈娟, 芦佳月, 罗晓茹, 等. 高浓度维生素 B₆ 注射液细菌内毒素检查方法学验证 [J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(1): 67-70.
- [收稿日期] 2025-08-26 [修回日期] 2025-11-20
[本文编辑] 陈盛新