

定量法(动态比浊法)测定注射用头孢曲松钠中细菌内毒素的研究

林秋晓, 劳海燕^{*}, 李智辉, 欧 杨^{**}

(广东省人民医院药学部 广州 510080)

关键词 动态比浊法试验; 头孢曲松钠; 细菌内毒素; 干扰试验

中图分类号: TQ455.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)02-0260-03

注射用头孢曲松钠(Ceftriaxone for injection)为长效、广谱的头孢菌素类抗生素,它对大多数革兰氏阴性杆菌具有高效的抗菌活性。目前无任何一种抗生素在对奇异变性杆菌的杀菌活性方面,可以和头孢曲松钠相比。2000版中国药典收载的方法为凝胶法,此法为限量检查法,不能准确测定样品中的内毒素含量,而定量法则可提供更灵敏而准确的内毒素检测方法。本文采用定量法(动态比浊法)来测定注射用头孢曲松钠的细菌内毒素含量。

1 材料与仪器

细菌内毒素检查用水 Lot. No. 0012270,规格 50 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司;动态比浊法鲎试验 Lot. No. 000131L, $\lambda=0.015$ EU/ml, 1.2 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司;细菌内毒素国家参考标准品 Lot. No. 981, 9000 EU/Amp, 中国药品生物制品检定所;注射用头孢曲松钠(头孢三嗪钠), Lot. No. 001103, 001106, 010106, 规格 1000 mg/Amp 广药集团广州天心药业股份有限公司;EDS-99 细菌内毒素检测仪,北京金山川科技发展有限公司。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值的确立

查 USP 24 版及《中国药典》2000 版二部,头孢曲松钠内毒素限值 $L=0.20$ EU/mg^[1]。

2.2 标准曲线制作及可靠性^[2]

用细菌内毒素检查用水对细菌内毒素国家参考

标准品 981 进行稀释,使其细菌内毒素最终浓度分别为 5.00, 0.50, 0.05 EU/ml,各取 0.100 ml 分别加到预先加有 0.100 ml 鲎试剂反应管内,混合均匀,插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测,其中每一浓度重复 3 管,并同时作阴性对照 3 管。实验数据按最小二乘法进行统计分析,其标准曲线为: $\text{Log}T=2.79451-0.3113\text{Log}C$, 其相关系数 $r=-0.99959$, $|r|=0.99959>0.980$, 反应时间在 3661651 s, 而阴性对照管反应时间 >3600 s, 故标准曲线成立。

2.3 干扰试验

样品稀释倍数的计算^[3]:最大的有效稀释倍数 $\text{MVD}=\text{LC}/\lambda$ (动态比浊法鲎试验: λ 为标准曲线最低点浓度,本试验中 $\lambda=0.05$ EU/ml, C : 样品溶液浓度,注射用头孢曲松钠用 10 ml 注射用水溶解作为样品原溶液 100 mg/ml, $\text{MVD}=400$ 。)

干扰预试验:头孢曲松钠最大的有效稀释倍数为 400。将头孢曲松钠(Lot. No. 001103)制备成 10, 5, 2, 1, 0.5 mg/ml 等 5 个浓度系列(稀释度分别为 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200),每个浓度下分别取 0.100 ml 样品加 0.100 ml 鲎试剂作为样品检查(S 或 NPC);取 0.100 ml 样品加 0.100 ml 鲎试剂在加入 5.00 EU/ml 的内毒素溶液 10.0 μl 作为样品阳性对照(PPC),PPC 中强化的内毒素浓度为 0.500 EU/ml,处在标准曲线的中点浓度。将溶液分别平行 2 组,插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进

行检测, 另外还按“标准曲线制作方法”制备标准曲线及阴性(NC), 结果见表 1。

Tab 1. Inhibition or enhancement test of ceftriaxone (Lot. No. 001103)

Speciment (mg/ml)	Test Content	Reaction t/ s	Endotoxin Concentration (EU/ml)	Recovery Rate (%)
10	S	2465	0. 0118	
		2649		
10	PPC	1173	0. 1354	24. 71
		1272		
5	S	3196	0. 0058	
		3145		
5	PPC	984	0. 2994	58. 71
		939		
2	S	> 3600	< 0. 0038	
		> 3600		
2	PPC	822	0. 4473	88. 70
		880		
1	S	> 3600	< 0. 0038	
		> 3600		
1	PPC	841	0. 4917	97. 57
		813		
0. 5	S	> 3600	< 0. 0038	
		> 3600		
0. 5	PPC	860	0. 4877	96. 79
		797		

其标准曲线为: $\text{Log}T=2.82417-0.3027\text{Log}C$, 相关系数 $r=-0.99736, |r|>0.980$, 内毒素浓度范围为 0.055.00 EU/ml, 反应时间在 4071809 s, 而阴性对照管反应时间>3600 s, 故标准曲线成立。

结果可见, 头孢曲松钠 10 mg/ml 浓度仍有干扰作用, 头孢曲松钠 5 mg/ml 浓度以下其干扰试验添加内毒素的回收率均在有效范围 50%~200% 之间, 表明头孢曲松钠 5 mg/ml 浓度稀释开始干扰, 在日常检查中选用 1 mg/ml 浓度。

干扰试验: 为确证头孢曲松钠 1 mg/ml 的有效性, 进行 3 个批号头孢曲松钠 (Lot. No. 001103,

001106, 010106) 的正式干扰试验, 头孢曲松钠浓度为 1 mg/ml, 其他具体操作参照预试验。将溶液分别平行 3 组, 插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测, 结果见表 2。

Tab 2. Inhibition or enhancement test of ceftriaxone

Sample Lot No	Test Content	Reaction t/ s	Endotoxin Concentration (EU/ml)	Recovery Rate (%)
001103	S	> 3600	< 0. 0036	
		> 3600		
		> 3600		
001103	PPC	777	0. 3889	77. 06
		896		
		935		
001106	S	> 3600	< 0. 0036	
		> 3600		
		> 3600		
001106	PPC	827	0. 3844	76. 17
		805		
		885		
010106	S	> 3600	< 0. 0036	
		> 3600		
		> 3600		
010106	PPC	847	0. 3371	66. 71
		888		
		886		

其标准曲线为: $\text{Log}T=2.79451-0.3113\text{Log}C$, 相关系数 $r=-0.99959, |r|>0.980$, 内毒素浓度范围为 0.055.00 EU/ml, 反应时间在 3661651s, 而阴性对照管反应时间>3600s, 故标准曲线成立。

结果可见, 3 个批号头孢曲松钠 1 mg/ml 浓度其干扰试验添加标准内毒素回收率均在有效范围 50%~200% 之间, 对鲎试剂没有干扰作用。

2.4 定量检查

根据以上干扰试验对三个批号头孢曲松钠 1 mg/ml 浓度进行定量检查, 结果见表 3。

Tab 3. Results of the kinetic turbidimetric limulus test assay

Sample Lot No.	Specimen (mg/ml)	S	PPC	Recover	Endotoxin
		Average (EU/ml)	Average (EU/ml)	Rate (%)	Concentration (EU/ml)
001103	1	< 0. 0036	0. 3889	77. 06	< 0. 36
001106	1	< 0. 0036	0. 3844	76. 17	< 0. 36
010106	1	< 0. 0036	0. 3371	66. 71	< 0. 36

其标准曲线为: $\text{Log}T=2.79451-0.3113\text{Log}C$, 相关系数 $r=-0.99959$, $|r|>0.980$, 内毒素浓度范围为 $0.055.00\text{ EU/ml}$, 反应时间在 3661651 s , 而阴性对照管反应时间 $>3600\text{ s}$, 故标准曲线成立。

样品原溶液 100 mg/ml , 经 $1/100$ 稀释成为样品测定溶液 1 mg/ml , 故样品原溶液的内毒素值为 $0.0036\times100=0.36\text{ EU/ml}$ 。

2.5 pH 值试验

将头孢曲松钠 $100, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25\text{ mg/ml}$ 浓度系列用 ORION 420A 型 pH 计测定其 pH 值, 结果是 $7.22, 6.55, 6.33, 6.07, 5.88, 5.76, 5.66$ 。

3 讨 论

1)计算公式: 回收率 $\%$ =(PPC 实测值-NPC 实测值)/强化内毒素浓素 $\times100\%$, 动态比浊法干扰试验, 是以样品的添加内毒素平均回收率来判断, 若回收率在 $50\%200\%$ 范围内, 表明样品溶液对鲎试验反应无干扰影响^[4]。

2)pH 值接近 6.8 范围内, “除非有特殊的要求,

否则在各论中样品和鲎试剂在检测混合物 pH 值范围为 $6.08.0^{[5]}$, 由于鲎试剂本身具备一定的缓冲能力, 故在本试验中 pH 值不是干扰鲎试验主要因素。

3)由于头孢曲松钠对鲎试验有较大的干扰作用, 10 mg/ml 溶液回收率为 24.71% , 有干扰; 5 mg/ml 溶液回收率为 58.71% , 开始无干扰作用。

4)结论 注射用头孢曲松钠稀释成 5 mg/ml 用定量法(动态比浊法)进行细菌内毒素检查是可行的。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国药典委员会编. 中华人民共和国药典. 2000 年版, 二部[S]. 174.
[2] 中华人民共和国药典委员会编. 中华人民共和国药典. 2000 年版. 二部[S]. 附录 204-205.
[3] 夏振民(Xia ZM). 药品细菌内毒素检查的限值[J]. 药物分析杂志(Chin J Pharm Anal), 1995, 15(3): 54
[4] EP Supplement[P]. 1999. 41.
[5] USP. 23 版[S].

Application of the Kinetic Turbidimetric Limulus Test to Determine Ceftriaxone for Injection

LIN Qiu-Xiao, LAO Hai-Yan, LI Zhi-Hui, OU Yang

Pharmaceutical Department of Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080

ABSTRACT **AIM** The kinetic turbidimetric limulus test was used in the endotoxin assay of Ceftriaxone for injection. **METHODS** The validation test was fulfilled, when the amount of endotoxin spiked in Ceftriaxone for injection sample (Lot. No. 001103) whose concentration of its diluted solution was $10\text{ mg per ml}, 5, 2, 1, 0.5\text{ mg/ml}$. They were recovered in $24.71\%, 58.71\%, 88.70\%, 97.57\%, 96.79\%$; with the amount of endotoxin spiked in Ceftriaxone sample (Lot. No. 001103, 001106, 010106), their 1 mg/ml dilution was recovered in $77.06\%, 76.17\%$ and 66.71% . **RESULTS** The standard endotoxin working curve is $5.00, 0.500, 0.0500\text{ Eu/ml}$. The 1 mg/ml solution to Ceftriaxone is effective to eliminate the interference in Limulus test. **CONCLUSION** The kinetic turbidimetric Limulus test provides a new way to the detection of endotoxin in Ceftriaxone for injection.

KEY WORDS Kinetic turbidimetric limulus test; Ceftriaxone; Inhibition enhancement test; Bacterial endoxin