

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 动态比浊法鲎试验; 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: $\log T = 2.79451 - 0.3113 \log C$, 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 $MVD = LC/\lambda$ (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, $MVD = 400$ 。)

干扰试验: 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 μ l 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: $\log T = 2.82417 - 0.3027 \log C$, 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	>3600	<0.0036
		>3600		
001103	PPC	777	896	0.3889 77.06
		935		
001106	S	>3600	>3600	<0.0036
		>3600		
001106	PPC	827	805	0.3844 76.17
		885		
010106	S	>3600	>3600	<0.0036
		>3600		
010106	PPC	847	888	0.3371 66.71
		886		

其标准曲线为: $\log T = 2.79451 - 0.3113 \log C$, 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 3661651 s, 而阴性对照管反应时间 > 3600 s, 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 Average (EU/ml)	PPC Average (EU/ml)	Recover Rate (%)	Endotoxin 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: $\log T = 2.79451 - 0.3113 \log C$, 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。

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 $0.0036 \times 100 = 0.36$ EU/ml。

2.5 pH 值试验

将头孢曲松钠 100, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.25 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 % = $(PPC \text{ 实测值} - NPC \text{ 实测值}) / \text{强化内毒素浓素} \times 100\%$, 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 mg per ml, 5, 2, 1, 0.5 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 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 endotoxin