

注射用头孢菌素类抗生素细菌内毒素 动态比浊定量法的研究

劳海燕^{1*}, 林秋晓¹, 冯聚锦²

(¹广东省人民医院药学部, 广州 510080; ²湛江安度斯生物有限公司, 湛江 524022)

【摘要】 目的: 应用动态比浊定量法研究头孢菌素类抗生素细菌内毒素。方法: 通过对样本中定量添加标准内毒素的干扰预试验, 将头孢菌素类抗生素制备成 5 种浓度系列, 测得回收率, 并筛选出最佳检测浓度, 最后进行 3 个批号的试验。结果: 内毒素的回收率分别为 92.48% (头孢曲松钠舒巴坦钠), 111.1% (头孢拉定), 99.39% (头孢他啶), 73.31% (头孢曲松钠), 111.9% (头孢唑肟), 109.2% (头孢噻肟钠), 133.3% (头孢哌酮钠舒巴坦钠), 133.6% (头孢硫脒)。头孢菌素类抗生素浓度小于等于 1 mg/mL 的条件下, 对动态比浊定量法无干扰作用, 可用于有效的日常细菌内毒素检查。结论: 动态比浊定量法为头孢菌素类抗生素的细菌内毒素的定量检测提供了一种全新的、高效的方法。

【关键词】 动态比浊定量法; 头孢菌素类抗生素; 细菌内毒素; 干扰试验

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000—5048(2005)03—0234—04

头孢菌素类抗生素是以冠头孢菌培养得到的天然头孢菌素 C 作原料, 经半合成改造其侧链而得到的。按其发明年代和抗菌性能的不同而分为一~四代。尤其是第三代头孢菌素, 随着抗菌谱扩大和耐酶的性能增强, 是临床重要的抗感染用药之一。《中国药典》2000 版收载头孢菌素类抗生素大多为热原检查, 本文采用浊度法建立注射用头孢菌素类抗生素的细菌内毒素定量检查法, 旨在为输液的热原反应监督提供一种更灵敏而准确的方法。

1 材料

细菌内毒素检查用水 (No. 0012270, 规格 50 mL/Amp, 湛江安度斯生物有限公司); 动态比浊法试剂 (No. 000131 L, $\lambda = 0.015$ EU/mL, 1.2 mL/Amp, 湛江安度斯生物有限公司); 细菌内毒素标准品 (No. 981, 9 000 EU/Amp, 中国药品生物制品检定所); EDS-99 细菌内毒素检测仪 (北京金山川科技发展有限公司); 反应试管 (10×75 mm)、吸管均经 250 °C, 2 h 干热除热原。

2 方法与结果

供试品: 注射用头孢曲松钠舒巴坦钠 (头孢哌酮 1.0 g+舒巴坦 0.5 g, 批号: 990806, 000701, 001204, 湖北威尔曼制药有限公司); 头孢拉定注射液 (500 mg/瓶, 批号: 0008721, 0008722, 0009721, 中美上海施贵宝制药有限公司); 注射用头

孢他啶 (1.0 g/瓶, 批号: 010103, 010104, 010202, 广药集团广州天心药业股份有限公司); 注射用头孢曲松钠 (1 000 mg/瓶, 批号: 001103, 001106, 010106, 广药集团广州天心药业股份有限公司); 注射用头孢唑肟 (750 mg/瓶, 批号: C018205, C023053, C023355, 葛兰素威康集团); 注射用头孢噻肟钠 (1.0 g/瓶, 批号: 990408, B001001, B001005, 德国赫斯特集团); 注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠 (9 000 EU/瓶, 头孢哌酮 0.5 g+舒巴坦 0.5 g, 批号: 20001101, 20001107, 20001109, 铃兰欣, 哈药集团制药总厂); 注射用头孢硫脒 (0.5 g/瓶, 批号: 0010071, 0101011, 0101021, 白云山制药总厂)。

2.1 试验参数的确定

本试验按“供试品干扰试验”方法进行^[1], 各试验参数如下^[2]:

根据《美国药典》24 版及《中国药典》2000 版二部, 查得头孢菌素类抗生素内毒素限值^[3], 见表 1。

2.2 标准曲线的制备^[1]

用细菌内毒素检查用水对细菌内毒素国家参考标准品 Lot No. 981 进行稀释, 使其细菌内毒素最终浓度分别为 5.00, 0.50, 0.0500 EU/mL, 各取 0.1 mL 分别加到预先加有 0.1 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: $\text{Log } T = a + b \text{Log } C$, 其相关系数 $|r| > 0.980$ 而阴性对照管反应时间大于 3 600 s。

*【收稿日期】 2004-11-10 【*通讯作者】 Tel: 020—83827812—42517 E-mail: laohyan@21cn.com

【基金项目】 广东省重点科技攻关资助项目 (No. 2KM 05063)

Tab. 1 Endotoxin limit

Drugs	Endotoxin limit ^[3] (EU/mg)	MVD ^a	Specimen (mg/ mL)	Dilution times	Concent ration (mg/mL)
Ceftriaxone sodium and sulbactam sodium for injection	0. 20	400	100	100	1
Cephradime injection	0. 20	400	100	100	1
Ceftazidime injection	0. 10	200	100	100	1
Ceftriaxone for injection	0. 20	400	100	100	1
Cefuroxime for injection	0. 10	100	50	50	1
Cefotaxime injection	0. 20	400	1 00	333	0 3
Cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection	0. 20	400	100	20	5
Cephalthiamidiaum	0. 15	150	50	100	0 5

^aMVD; maximum validate dilution

2 3 干扰试验

最大的有效稀释倍数(MVD)的计算公式如下:

$$MVD=L \cdot P \cdot \lambda^{-1}$$

式中:λ 为标准曲线最低点浓度, 本试验中λ 为 0 05 EU/mL; P 为样品溶液浓度; L 为头孢菌素类抗生素内毒素限值, 根据《美国药典》24 版及《中国药典》2000 版二部查得。

头孢菌素类抗生素内毒素最大的有效稀释倍数见表 1。

干扰预试验: 将头孢菌素类抗生素制备成一系列浓度的溶液。每个溶液下分别取 0 100 mL 样品加 0 1 mL 鲎试剂作为样品检查(S 或 NPC); 再取 0 1 mL 含标准内毒素的样品(在样品的稀释过程中加入标准内毒素使样品中内毒素浓度为 0 500 EU/mL)加 0 1 mL 鲎试剂作为样品阳性对照(PPC)。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, 另外还按标准曲线制作方法制备标准曲线及阳性对照(NC), 结果见 2。

结果可见, 头孢呋辛钠^[4]、头孢噻肟钠^[5]、头孢曲松钠^[6]、头孢他啶^[7]、头孢拉啶^[8]、头孢曲松钠配舒巴坦钠(新菌必治)、头孢硫脒、注射用头孢哌酮

钠舒巴坦钠分别在 5, 1. 5, 10, 5. 2, 2. 5. 5 mg/mL 以下的浓度溶液其干扰试验添加内毒素的回收率均在有效范围 50%~200% 之间, 表明该浓度以下浓度的溶液开始无干扰, 在日常检查中分别选用内毒素的回收率较好稀释浓度作为验证浓度, 如头孢呋辛钠 1 mg/mL、头孢噻肟钠 0. 3 mg/mL、头孢曲松钠 1 mg/mL、头孢他啶 1 mg/mL、头孢拉啶 1 mg/mL、头孢曲松钠配舒巴坦钠 1 mg/mL、头孢硫脒 0. 5 mg/mL、头孢哌酮钠舒巴坦钠 5 mg/mL 溶液, 进行正式干扰试验。

浊度法干扰试验, 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剂反应无干扰影响^[1]。

计算公式如下:

标准内毒素的回收率(%)=(含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量-供试品溶液内毒素含量)/ 强化内毒素浓度×100%

Tab. 2 Pre-interference experiments for cephalosporins

Drugs	Specimen (mg/mL)	Endotoxin recovery (%)
Ceftriaxone sodium and sulbactam sodium for injection	10	39. 62
	5	38. 09
	2	57. 57
Cephradime for injection	1	96. 50
	10	18. 15
	5	64. 78
	2	83. 46
	1	119. 3
Ceftazidime for injection	0. 5	108. 8
	10	60. 08
	5	82. 90
	2	85. 22
	1	94. 00
Ceftriaxone for injection	0. 5	92. 67
	10	24. 71
	5	58. 71
	2	88. 70
	1	97. 57
Cefuroxime for injection	0. 5	96. 79
	10	49. 43
	5	73. 42
	2	92. 91
	1	116. 67
Cefotaxime for injection	0. 5	98. 99
	10	17. 22
	5	31. 74
	2	48. 27
	1	52. 25
Cefoperazon sodium and sulbactam sodium for injection	0. 5	63. 12
	0. 3	119. 1
	20	60. 28
	5	118. 0
	2	175. 6
Cephalthiamidiaum	50	—
	10	26. 82
	2. 5	82. 91
	1	96. 24
	0. 5	106. 7

干扰试验: 为确证该浓度的有效性, 每个品种选用了 3 个批号正式干扰试验, 其他具体操作参照预试验。将该浓

Tab. 3 Inhibition or enhancement test for cephalosporins

Drugs	Batch No.	Endotoxin recovery (%)	Drugs	Batch No.	Endotoxin recovery (%)
Ceftriaxone sodium and sulbactam sodium for injection	990806 000701 001204	96.08 91.10 90.25	Cephadrime for injection	0008721 0008722 0009721	125.7 103.2 104.4
Ceftazidime for injection	010103 010104 010202	109.9 101.7 86.56	Ceftriaxone for injection	001103 001106 010106	77.06 76.17 66.71
Cefuroxime for injection	C018025 C023053 C023355	121.2 114.4 99.95	Cefotaxime for injection	990408 B001001 B001005	131.3 119.1 77.30
Cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection	20001101 20001107 20001109	138.5 118.0 143.3	Cephathiamidiam	0010071 0101011 0101021	133.5 138.7 128.5

结果可见, 3 个批号头孢菌素类抗生素干扰试验的回收率均在有效范围 (50% ~ 200%) 之内, 对鲎试验没有干扰作用。

2.4 定量检查

根据以上干扰试验结果对 3 个批号头孢菌素类抗生素溶液进行定量检查, 结果见表 4。

Tab. 4 Results of the dynamic turbidimetric limulus test assay

Drugs	Endotoxin limit (EU/mg)
Ceftriaxone sodium and sulbactam sodium for injection	0.20
Cephadrime for injection	0.20
Ceftazidime for injection	0.10
Ceftriaxone for injection	0.20
Cefuroxime for injection	0.10
Cefotaxime for injection	0.20
Cefoperazone sodium and sulbactam sodium for injection	0.20
Cephathiamidiam	0.15

3 讨论

1) 头孢曲松钠舒巴坦钠主要成分是头孢曲松钠 1 g 配舒巴坦钠 0.5 g。湖南省药品标准 (1996) 第 069012 号收载凝胶法鲎试验作为热原检查。《中国药典》2000 版头孢曲松钠内毒素限值 $L=0.20\text{ EU/mg}$ ^[3]; 舒巴坦钠: 注射用水制成 20 mg/mL 按 1 mL/kg 剂量用家兔法; 本文采用 $L=0.20\text{ EU/mg}$ 作为头孢曲松钠舒巴坦钠内毒素限值。即采用主药中更严格的内毒素限值作为复方制剂的限值。同样, 头孢哌酮钠舒巴坦钠也采用头孢哌酮钠的内毒素限值。头孢哌酮钠、头孢唑肟钠、头孢曲松钠、头孢拉定《中国药典》2000 版收载凝胶法鲎试验作为热原检查 (它们内毒素限值 L 与《美国药典》23 版相同); 头孢噻肟钠、头孢他啶《中国药典》2000 版采用家兔法以及头孢硫脒《中国药典》2000 版尚未收载,

度溶液分别平行 3 组, 插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测, 结果见表 3。

故其内毒素限值我们采用《美国药典》23 版提供的数据^[3]。

2) 本实验 8 种头孢菌素类抗生素均为粉针剂, 用规定的注射用水溶解后, 每个针剂按本实验要求的 5 种系列浓度测定 pH 值。头孢噻肟钠 pH 值在 4.87 ~ 5.22 范围, 头孢唑肟钠 (pH 值 5.87 ~ 7.15)、头孢曲松钠 (pH 值 5.66 ~ 7.22)、头孢拉定 (pH 值 7.65 ~ 8.18)、头孢曲松钠舒巴坦钠 (pH 值 5.43 ~ 6.24)、头孢他啶 (pH 值 6.50 ~ 7.95)。由于鲎试剂本身具备一定的缓冲能力, 检测时样品和鲎试剂的混合后, 最终的 pH 值在范围 6.0 ~ 8.0, 故 pH 值不是干扰浊度法的主要因素。

3) 有些头孢菌素类针剂溶解后呈深浅不一, 是否对浊度法的检测光源 (405 nm) 产生吸收干扰。将上述测定 pH 值的系列溶液用岛津 UV-2401 型紫外分光光度计测定 405 nm 波长处吸收值, 得一系列吸收值。当溶液为 1 mg/mL 时, 头孢噻肟吸收值 0.06, 头孢唑肟吸收值 0.011, 头孢曲松钠吸收值 0.05, 头孢拉定吸收值 0.038, 头孢曲松钠舒巴坦钠吸收值 0.027, 头孢他啶吸收值 0.04。可见头孢菌素类抗生素对检测光源 405 nm 处的吸收很弱, 排除了对浊度法检测光源处产生吸收干扰的可能性。

4) 结果表明头孢菌素类抗生素药物对细菌内毒素检查法干扰作用为抑制作用。随着药物浓度从 10 mg/mL 开始稀释, 内毒素回收率逐步回升, 表明干扰强度逐步减少, 一般 1 mg/mL 以下内毒素回收率较理想, 可选为验证浓度。另外, 头孢哌酮钠舒巴坦钠仅 5 mg/mL 溶液, 可达较为理想的内毒素回收率。

【参考文献】

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部 [S]. 2000. 附录 204

[2] 夏振民 (Xia ZM). 药品细菌内毒素检查的限值 [J]. 药物分析杂志, 1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- 志(*China J Pharm Anal*), 1995, **15**(3): 54—55
- [3] US Pharmacopeia, 23 rd [S]. 1995, Appendix: 1 969.
- [4] 劳海燕(Lao HY), 罗宇芬(Luo YF), 林秋晓(Ling QX), 等. 注射用头孢呋辛钠(西力欣)中细菌内毒素定量法(动态比浊法)的研究[J]. 中国抗生素杂志(*Chin J Antibiotics*), 2002, **27**(5): 283—86
- [5] 劳海燕(Lao HY). 动态比浊法测定头孢噻肟(凯福隆)注射液细菌内毒素含量[J]. 沈阳药科大学学报(*J Shenyang Pharm Univ*), 2002, **19**(2): 125—128.
- [6] 林秋晓(Lin QX), 劳海燕(Lao HY), 李智辉(Li ZH), 等. 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[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2002, **33**(3): 260—262
- [7] 劳海燕(Lao HY), 罗宇芬(Luo YF), 林秋晓(Li QX). 注射用头孢他啶(新天欣)细菌内毒素定量法的研究[J]. 中国药理学通报(*Chin Pharmacol Bull*), 2002, **18**(1): 305—308.
- [8] 劳海燕(Lao HY), 罗宇芬(Luo YF), 林秋晓(Li QX). 头孢拉啶细菌内毒素定量法(动态比浊法)的研究[J]. 药物分析杂志(*China J Pharm Anal*), 2001, S42—S45.
- [9] 黄清泉(Huang QQ), 夏振民(Xia ZM). 药品细菌内毒素检查的实验设计[J]. 中国药学杂志(*Chin Pharma J*), 1997, **32**(2): 72—74.

Dynamic Turbidimetric Limulus Test of Cephalosporins for Injection

LAO Hai-Yan¹, LIN Qiu-Xiao¹, FENG Ju-Jin²

¹Department of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080;

²Zhanjiang A & C Biological Ltd, Zhanjiang 524022, China)

【ABSTRACT】 AIM: To study the dynamic turbidimetric limulus test used for endotoxin assay in cephalosporins for injection. **METHODS:** In the pre-interference experiments, the amount of endotoxin was added to 5 different concentrations of cephalosporins to get the recovery rates. And the optimum concentration was screened out. Under this condition, the interference experiments were conducted in three batches of cephalosporins(≤ 1 mg/mL). **RESULTS:** In the interference tests, the recovery rates of exdotoxin were 92.48% (ceftriaxone sodium and sulbactam sodium), 111.1% (cephradimeinjection), 99.39% (ceftazidimeinjection), 73.31% (ceftriaxone), 111.9% (cefuroxime), 109.2% (cefotaxime), 133.3% (cefoperazon sodium and sulbactam sodium for injection), 133.6(cephathiamidiaum), respectively. It showed that solution of cephalosporins (≤ 1 mg/mL) didn't interfere with limulus test. **CONCLUSION:** The dynamic turbidimetric limulus test could be conveniently used for endotoxin assay in cephalosporins for injection.

【KEY WORDS】 Dynamic turbidimetric limulus test; Cephalosporins; Bacterial endotoxin; Interference experiment

。校园信息。

中国药科大学 2005 年招生信息

中国药科大学多年来一贯重视学生的素质教育,坚持把培养学生综合素质作为根本的办学方向,发挥专业优势,及时把握时代脉搏,把“内强素质、外塑形象”的大学生“风采工程”作为培养学生综合素质的基本途径,形成了鲜明的办学特色。由于强化素质教育,毕业生的敬业精神、专业技术、操作能力、管理水平等综合素质良好,受到用人单位的好评和欢迎。学校抓住机遇,适应社会需要,大力培养高素质复合型人才,也进一步有效地扩展了学校发展和学生就业空间。中国药科大学毕业生就业率持续多年蝉联江苏省高校榜首,是教育部直属院校就业率较高的院校之一。

根据学校发展的总体规划,在充分保证教学质量的基础上,2005 年中国药科大学本科生招生总数比去年有所增加,在全国 31 个省、直辖市、自治区的招生数也相应增加,本科计划数为 1 800 名(含第二学士学位生),专科计划数(高等职业教育)500 名。

(招生办公室)