

注射用头孢噻肟钠细菌内毒素检查方法的研究

陈吉生(广州 510080 广州铁路中心医院)

摘要 目的:研究注射用头孢噻肟钠的细菌内毒素检查方法。方法:通过干扰试验证明注射用头孢噻肟钠对细菌内毒素检查有抑制作用。结果:使用 $\lambda = 0.5$ 或 0.25 Eu/ml 的鲎试剂将样品稀释至浓度为 2.5 或 1.25 mg/ml , 可消除其对检查的干扰。结论:注射用头孢噻肟钠可以用细菌内毒素检查法取代热原检查法。

关键词 头孢噻肟钠;细菌内毒素检查;鲎试剂;干扰试验

Study of bacterial endotoxin test for cefotaxime sodium for injection

Chen Jisheng(Chen JS) (Guangzhou Railway Central Hospital, Guangzhou 510080)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate bacterial endotoxin test for cefotaxime sodium for injection. **METHOD:** By interfering test, to study the inhibitive action of cefotaxime sodium for injection in bacterial endotoxin test. **RESULTS:** All the samples were diluted to 2.5 or 1.25 mg/ml with 0.5 or 0.25 Eu/ml of TAL the interference was eliminated. **CONCLUSION:** Cefotaxime sodium for injection can be examined by bacterial endotoxin test method instead of the pyrogen test method.

KEY WORDS cefotaxime, bacterial endotoxin test, TAL, interfering test

头孢噻肟钠 (Cefotaxime) 是第 3 代头孢菌素类药物,疗效较好,其临床应用广泛,且多为静脉给药。该注射剂中国药典 95 版规定的检查项是用家兔法做热原检查,文献迄今未见有用细菌内毒素检查的报道。本文通过实验探讨以细菌内毒素检查法取代热原检查法检测注射用头孢噻肟钠的可行性。

1 材 料

注射用头孢噻肟钠(哈尔滨制药厂,1g/瓶);鲎试剂:0.1 ml/支, $\lambda = 0.5 \text{ Eu/ml}$,批号:980421; $\lambda = 0.25 \text{ Eu/ml}$,批号:980409; $\lambda = 0.125 \text{ Eu/ml}$,批号:980123; $\lambda = 0.06 \text{ Eu/ml}$,批号:980109; $\lambda = 0.03 \text{ Eu/ml}$,批号:980109(湛江安度斯生物有限公司);0.1 ml/支, $\lambda = 0.5 \text{ Eu/ml}$ (厦门东方鲎试剂厂,批号:980421);细菌内毒素工作标准品(厦门东方鲎试剂厂,批号:980105,效价 10Eu/支;湛江安度斯生物有限公司,批号:980227,效价 12Eu/支);细菌内毒素检查用水(中国药品生物制品检定所,批号:960125,10 ml/支)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度(λ_0)复核

按中国药典 1995 年版二部方法进行的操作^[1],结果见表 1。

2.2 初筛试验

2.2.1 内毒素限值(L)的确定 采用公式 $L = K/M$ (M 见表 1 鲎试剂灵敏度复核结果)

TAL 批号	标示灵敏度/ λ_0	复核灵敏度/ λ_0
	/Eu·ml ⁻¹	/Eu·ml ⁻¹
980220(厦门)	0.5	0.5
980421(湛江)	0.5	0.71
980409(湛江)	0.25	0.25
980123(湛江)	0.125	0.149
980109(湛江)	0.06	0.06
980314(湛江)	0.03	0.04

值是以成人每公斤体重每小时给药的最大剂量来计算),本品人用最大剂量为 12g/日,分 3 次静脉滴注^[2],4g/次,滴注 500 ml 按 2.5 h 计算,中国人平均体重按 60 kg 计算,则 $M = 4 \times 1000 / (2.5 \times 60) = 26.7 \text{ mg/kg} \cdot \text{h}^{-1}$,故本品的细菌内毒素的理论限值为 $L = 5 / 26.7 = 0.19 \text{ Eu/mg}$ 。另参考美国药典(XXIII 版)注射用头孢噻肟钠内毒素限值为 0.2Eu/mg^[3],与计算结果基本一致,为方便稀释,我们把注射用头孢噻肟钠的内毒素限值定为:0.2Eu/mg。

2.2.2 样品最大有效稀释浓度(C_{MVD}) 以鲎试剂灵敏度 0.5Eu/ml 为基准,按 $C_{MVD} = N/L = 0.5/0.2 = 2.5 \text{ mg/ml}$,并以此为样品的基准稀释浓度,用细菌内毒素

检查用水以基准稀释浓度为起点,将样品往下倍比稀释,得样品的浓度系列溶液,加上半最大有效稀释浓度(C_{HMVD})的溶液,即 5.0,2.5,1.25,0.625,0.313 和 0.157 mg/ml,记此系列溶液为 S。

2.2.3 取灵敏度 λ_0 为 0.5,0.25,0.125,0.06 和 0.03Eu/ml 的鲎试剂,取同厂家内毒素工作标准品,按规定分别稀释成 $2\lambda_0$ 的浓度,每个浓度做 2 管,按下面操作:①NPC 系列:0.1 ml 细菌内毒素检查用水加入鲎试剂中,按不同灵敏度分别加入对应的 S 系列 0.1 ml。②PPC 系列:0.1 ml 含 $2\lambda_0$ 细菌内毒素标准液加入鲎试剂中,按不同灵敏度分别加入对应的 S 系列 0.1 ml。结果见表 2。

表 2 注射用头孢噻肟钠初筛试验结果

鲎试剂 (湛江)	项 目	样品稀释浓度/mg·ml ⁻¹					
		5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157
NPC	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+
灵敏度(Eu/ml)		0.5	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03

2.3 干扰试验

由表 2 的结果可知,NPC 系列全为阴性,PPC 系列在样品浓度为 5.0 mg/ml(C_{HMVD})时为阴性,在稀释浓度为 2.5 mg/ml(C_{MVD})处开始出现全阳性结果,表明此样品对鲎试无干扰的有效浓度在 2.5 mg/ml 以下,在此有效浓度范围内,可以选择 λ_0 高于 0.5Eu/ml 的鲎试剂对相应的样品稀释浓度作干扰试验。我们选取灵敏度 $\lambda_0 = 0.5 \text{ Eu/ml}$ 和 0.25Eu/ml 的鲎试剂,将样品用细菌内毒素检查用水稀释至浓度为 2.5 mg/ml 和 1.25 mg/ml 来做干扰试验。干扰试验按中国药典 1995 年版细菌内毒素检查法的供试品干扰试验项进行,实验结果见表 3,4。

2.4 样品细菌内毒素检查

取 5 批注射用头孢噻肟钠分别用细菌内毒素检查用水稀释至 0.25 mg/ml,使用 $\lambda_0 = 0.5 \text{ Eu/ml}$ 的鲎试剂按细菌内毒素检查法进行检查,同时增加 1 管阳性产品对照管(PPC 管,即 0.1 ml 鲎试剂 + 0.1 ml 含 $2\lambda_0$ 浓度内毒素的样品稀释液。此反应结果应为阳性,否则检查无效);将上述 5 批样品分别稀释至 1.25 mg/ml,使用 $\lambda_0 = 0.25 \text{ Eu/ml}$ 的鲎试剂,按上法作细菌内毒素检查,结果见表 5。

3 讨 论

3.1 细菌内毒素限值的确定,不仅对保证被检物品的安全使用十分重要,而且关系到正确判断产品的合格与否,故计算细菌内毒素限值十分重要,因家兔剂量往

表 3 注射用头孢噻肟钠干扰试验结果

鲎试剂	样品批号	内毒素浓度/ Eu·ml ⁻¹				阴性对照	λ_c / Eu·ml ⁻¹
		1.0	0.5	0.25	0.125		
980220	970501	++++	++++	++++	----	-	0.25
$\lambda_0 = 0.5$	971104	++++	+++ -	----	----	-	0.59
(厦 门)	980208	++++	++++	----	----	-	0.5
980421	970501	++++	++++	+ - - -	----	-	0.42
$\lambda_0 = 0.5$	971104	++++	++++	+ + - -	----	-	0.35
(湛 江)	980208	++++	+ - - -	----	----	-	0.84

表 4 注射用头孢噻肟钠干扰试验结果

鲎试剂	样品批号	内毒素浓度/ Eu·ml ⁻¹				阴性对照	λ_c / Eu·ml ⁻¹
		0.5	0.25	0.125	0.06		
980409	970501	++++	++++	----	----	-	0.25
$\lambda_0 = 0.25$	971104	++++	++++	+ - - -	----	-	0.21
(湛 江)	980208	++++	+ + + -	----	----	-	0.30

表 5 5 批注射用头孢噻肟钠细菌内毒素检查结果

鲎试剂	注射用头孢噻肟钠		细菌内毒素检查				
	批号	λ_0	批号	样品稀释浓度	S	S	PC NC PPC
980421	970501	0.5	970809	2.5 mg/ ml	-	-	+ - +
	971104		971206		-	-	+ - +
	980208		970501		-	-	+ - +
	970809		971104		-	-	+ - +
	980208		971206		-	-	+ - +
980409	970501	0.25	970809	1.25 mg/ ml	-	-	+ - +
	971104		971206		-	-	+ - +
	980208		970501		-	-	+ - +
	970809		971104		-	-	+ - +

注:PC为阳性对照管;NC为阴性对照管;S为样品管;PPC为阳性产品对照管

往高于人用最大剂量的几倍甚至 10 倍,如以家兔剂量计算细菌内毒素限值,必然会造成对产品内毒素要求太严格,使很多合格产品被判为不合格或使药品的生产成本增加,所以美国药典、英国药典和欧洲药典热原检查改为细菌内毒素检查法,一般都是以人用最大剂量而不是以家兔剂量来计算细菌内毒素限值。如注射用头孢噻肟钠按中国药典 1995 年版规定的热原检查剂量 100 mg/kg 计算,其内毒素限值应为 0.05 Eu/ mg,与美国药典的限值要求 0.2 Eu/ mg 比较有 4 倍的差距,而用人用最大剂量计算,其限值为 0.19 Eu/ ml,与美国药典的限值要求十分接近。

3.2 初筛试验只是一种预试验,最终要经干扰试验验证,其目的是评价样品浓度对鲎试剂与内毒素凝集反

应的干扰程度及干扰性质,以便初步筛选出对检查无干扰的样品浓度范围及相应的鲎试剂灵敏度,从而为干扰试验提供必要的参数,避免鲎试剂的浪费。从表 2 结果可看出,样品对细菌内毒素检查的干扰性质为抑制作用。样品对鲎试剂无干扰的有效浓度范围在 2.5 mg/ ml 以下,在此有效浓度范围内,可以选择灵敏度为 $\lambda_0 = 0.5$ Eu/ ml 以上的鲎试剂对相应的样品稀释浓度作干扰试验。本文选择灵敏度为 0.5 和 0.25 Eu/ ml 的鲎试剂进行干扰试验,表 3、4 干扰试验结果验证了初筛试验的结果。

3.3 不同厂商生产的鲎试剂在生产工艺、配方、质量参数等各方面都有一定的差异,这就影响到鲎试剂的抗干扰能力,即不同厂家生产的鲎试剂其抗干扰能力存在差别。故本文采用不同厂家的鲎试剂对 3 个批号的样品进行干扰试验,由干扰试验结果可看出,3 批样品分别使用不同厂家的鲎试剂,将样品稀释至 2.5 mg/ ml,其 λ_c 都在 0.5 ~ 2 λ_0 范围内,按照 95 版中国药典干扰试验的判断方法,可认为样品在该浓度下不干扰细菌内毒素的检查。

3.4 实验结果表明,注射用头孢噻肟钠可以由细菌内毒素检查取代热原检查,同时在作日常细菌内毒素检查时,只需增加 1 管阳性产品对照管(PPC 管),将样品稀释至浓度为 2.5 mg/ ml 或 1.25 mg/ ml,使用灵敏度为 0.5 或 0.25 Eu/ ml 的鲎试剂检查。

参考文献

1 中国药典,1995:附录 77.
2 中华人民共和国药典委员会编.临床用药须知.化学工业出版社,1995:458.

3 美国药典(XXIII版) .1995: 300 .

收稿日期 :1998 - 07 - 06