

盐酸左氧氟沙星注射液中细菌内毒素的检测

谭侃, 凌海燕, 虞和永 (浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要:目的 建立快速检测盐酸左氧氟沙星注射液中细菌内毒素的方法。方法 以不同厂家的鲎试剂对3批盐酸左氧氟沙星注射液分别进行干扰试验。结果 盐酸左氧氟沙星注射液稀释至0.25mg/mL时可消除对试验的干扰。3批盐酸左氧氟沙星注射液细菌内毒素检查结果均符合规定。结论 盐酸左氧氟沙星注射液的热原检查可用细菌内毒素检查法替代家兔升温法。
关键词:盐酸左氧氟沙星注射液; 细菌内毒素; 鲎试剂; 干扰试验
中图分类号: R927.12 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693 (2006) 07-0655-03

Detection of bacterial endotoxins in the levofloxacin hydrochloride by limulus test

TAN Kan, LIN Hai-yan, YU He-yong (*Obstetric and Gynecology Hospital, Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method for assaying bacterial endotoxins in levofloxacin hydrochloride injection. **METHODS** The interference test of 3 batches of levofloxacin injection with 2 kinds of limulus test agent was studied. **RESULTS** The interference between the samples and limulus test agents was eliminable (below 0.25mg/mL). The detection results were up to standard. **CONCLUSION** The bacterial endotoxin in sample can be examined by limulus test instead of pyrogen test in rabbits. **KEY WORDS:** levofloxacin hydrochloric injection; bacterial endotoxin; limulus test agent; interference test

盐酸左氧氟沙星注射液是目前临床应用十分广泛的抗生素, 可对抗由敏感菌引起的呼吸系统、泌尿生殖系统、消化系统及皮肤软组织等的急、慢性感染。细菌内毒素检查法较之家兔法更快速、灵敏、准确, 且重现性良好, 正逐渐取代家兔法热原检查。本文对以鲎试剂检测左氧氟沙星注射液中细菌内毒素的可行性进行了考察。

1 仪器与试剂

WH-861 旋涡混合器 (北京科尔德科贸有限公司); 101 中国现代应用药学杂志 2006 年 7 月第 23 卷第 7 期

-OA 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); HH SY21 - Ni 型恒温水浴锅 (上海申生科技有限公司); 细菌内毒素工作标准品 (CSE, 湛江博康海洋生物有限公司, 批号 051007, 规格 15EU/支); 鲎试剂 (TAL, 湛江安度斯生物有限公司, 以下简称安度斯, 批号 0509020, 规格 0.06EU/mL; 批号 0509020, 规格 0.125EU/mL; 批号 0508011, 规格 0.25EU/mL); 鲎试剂 (TAL, 湛江博康海洋生物有限公司, 以下简称海洋, 批号 050815, 规格 0.06EU/mL; 批号 050815, 规格 0.125EU/mL);

批号 050818,规格 0.25EU/mL);细菌内毒素检查用水(BET水,湛江海洋生物制品厂,批号:050902,规格 100mL/瓶);左氧氟沙星注射液(扬子江药业集团有限公司,规格:100mL:0.2g,批号 05041001,05042301,05051801)。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素理论限值(L)和最大有效稀释倍数(MVD)的确定^[1]

2.1.1 样品细菌内毒素理论限值(L)的计算 采用公式 $L = K/M$,其中 K 为人每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,以 EU/(kg·h)表示。注射剂 $K = 5EU/(kg·h)$ 。M 为人用每公斤体重每小时的最大给药剂量[本品成人每日最大给药剂量为 0.6g,分两次静滴,若人均体重按 60kg 计算,注射时间若不足 1h,按 1h 计算,则 $M = 300/60 = 5mg/(kg·h)$];故 $L = K/M = 5/5 = 1EU/mg$ 。

2.1.2 样品最大有效稀释倍数(MVD)的确定 根据最大有效表 1 鲎试剂灵敏度复核实验结果

Tab 1 Check results of the sensitivity of limulus test agent

批号	标示灵敏度 λ (EU/mL)	细菌内毒素浓度(EU/mL)					λ _c
		2λ(4管)	λ(4管)	0.5λ(4管)	0.25λ(4管)	NC(2管)	
0508011	0.25(安度斯)	++++	++++	++++	----	--	0.125
050818	0.25(海洋)	++++	++++	+++	----	--	0.15
0509020	0.06(安度斯)	++++	++++	++++	----	--	0.03
050815	0.06(海洋)	++++	++++	+++	----	--	0.038

灵敏度复核实验结果表明:当 λ_c 在 0.5λ~2λ(包括0.5λ和 2λ)时,所用 4 批鲎试剂灵敏度均符合规定,可用于细菌内毒素检查。

2.3 干扰试验

2.3.1 干扰初筛试验 用细菌内毒素检查用水(BET)将盐酸左氧氟沙星注射液分别稀释 2、4、8 倍,进行供试品阴性对照(NPC)和供试品的阳性对照(PPC)两个系列反应。NPC 系列:分别取灵敏度 λ=0.25,0.125,0.06EU·mL⁻¹的 TAL,加 BET 水溶解,分别加入 0.1mL 于 8 支反应管中,再加原液和上述稀释好的供试品溶液 0.1mL,每一供试品浓度重复两反应管。PPC 系列:分别取鲎试剂,用上述 4 种浓度的供试品溶液溶解,分别加入 0.1mL 于 8 支反应管中,再加上上述稀释好的 2λ 的内毒素工作标准品 0.1mL,每一供试品浓度重复两反应管。将两系列反应管置于 37℃±1℃的恒温器中,保温(60±2)min 后观察,结果见表 2。

表 2 干扰初筛实验结果

Tab 2 Results of preliminary test

类别	样品批号	标示灵敏度 λ	供试品浓度(mg/mL)				
			原液	2 倍稀释	4 倍稀释	8 倍稀释	
PPC 管	05041001	0.25(2管)	--	--	--	++	
		0.125(2管)	--	--	--	++	
		0.06(2管)	--	--	--	++	
NPC 管	05041001	0.25(2管)	--	--	--	--	
		0.125(2管)	--	--	--	--	
		0.06(2管)	--	--	--	--	

效稀释倍数 $MVD = CL/\lambda$,对应于灵敏度(λ) 0.25,0.125,0.06EU·mL⁻¹的 TAL,盐酸左氧氟沙星注射液的最大稀释倍数分别为 8、16、32 倍。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验

按《中华人民共和国药典》2005 版规定方法进行试验,根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ),将 λ=0.25EU·mL⁻¹和 λ=0.06EU·mL⁻¹的鲎试剂进行复核。用 BET 水把 CSE 稀释成 0.5、0.25、0.125、0.06EU/mL 和 0.12、0.06、0.03、0.015 EU/mL 的系列浓度备用,每稀释一步均在旋涡混合器上混匀 30s。每一批次均取复溶后的 0.1mL/支规格的鲎试剂原安瓿 18 支,其中 16 管分别加入 0.1mL 不同浓度的内毒素标准溶液,每一个内毒素浓度平行做 4 管;另外 2 管加入 0.1mL 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入 37℃±1℃的恒温器中,保温(60±2)min 后观察,结果详见表 1。

通过初筛实验可得,可以使用灵敏度 λ≥0.25EU·mL⁻¹的鲎试剂来检测。需将样品稀释 8 倍或更高,以排除干扰。

2.3.2 干扰试验 将批号分别为(05041001、05042301、05051801),三批供试品溶液分别稀释 8 倍。用 BET 水和以上浓度的供试品溶液把 CSE 分别稀释成 0.5、0.25、0.125、0.06EU/mL 的系列浓度备用,取灵敏度为 0.25EU/mL 两个生产厂家(分别为安度斯和海洋)的 TAL 按《中国药典》2005 年版二部附录细菌内毒素检查法对供试品进行干扰试验。样品配制见表 3,表中 A 为 NPC 管系列,B 为 PPC 管系列,C 为 PC 管系列,D 为 NC 管系列。

表 3 干扰试验样品配制表

Tab 3 Confect of samples for interference test

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液	-	-	-	2
B	2λ/供试品溶液	供试品溶液	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/检查用水	检查用水	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
D	无/检查用水	-	8	0.25λ	4
			-	-	2

供试品干扰实验表明,所有供试品的 NPC 管系列均为阴性,NC 管也为阴性。PC 管及 PPC 管结果见表 4。

表 4 PC 管及 PPC 管试验结果(盐酸左氧氟沙星注射液)

Tab 4 Results of PC and PPC(levofloxacin hydrochloride injection)

鲎试剂	供试品浓度 mg/mL	供试品批号	细菌内毒素浓度(EU/mL)				
			0.5	0.25	0.125	0.06	Et
0.25EU/mL 0508011 安度斯	BET		++++	++++	++++	----	Es = 0.03
		05041001	++++	++++	+++ -	----	0.038
	0.25	05042301	++++	++++	+++ -	----	0.038
		05051801	++++	++++	++++	----	0.030
0.25EU/mL 050818 海洋	BET		++++	++++	+++ -	----	Es = 0.038
		05041001	++++	++++	+++ -	----	0.038
	0.25	05042301	++++	++++	++++	----	0.030
		05051801	++++	++++	+ + - -	----	0.045

由表可见,使用安度斯和海洋的各 2 个规格的鲎试剂,所测盐酸左氧氟沙星注射液均在 2Es – 0.5Es 之间,所以可以确定,以上浓度的供试品对细菌内毒素检测均没有干扰。

2.4 供试品的细菌内毒素检测

将 3 批供试品分别按表 5 制备溶液。使用的供试品的稀释倍数为 8 倍,使用 2 个生产厂家的鲎试剂,按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 5 样品干扰试验溶液的制备

Tab 5 Preparation of interference test for samples

系列	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	平行管数
NPC	无/供试品溶液	2
PPC	2λ/供试品溶液	2
PC	2λ/检查用水	2
NC	无/检查用水	2

保温 60min ± 2min 后观察结果,结果见表 6。
结果表明,3 批供试品均符合规定。

3 讨论

通过初步试验确定,盐酸左氧氟沙星注射液样品浓度小于 0.25mg/mL 时,进行鲎试剂干扰实验,该浓度对 0.25EU/mL 的鲎试剂不存在增强抑制效果,故采用鲎试剂法对其进

表 6 盐酸左氧氟沙星注射液干扰试验结果

Tab 6 Results of interference test for levofloxacin hydrochloride injection

鲎试剂	供试品浓度 (mg/mL)	供试品 批号	类别			
			NPC 管	PPC 管	PC 管	NC 管
0.25EU/mL 0508011 (安度斯)	0.25	05041001	- -	++	++	- -
		05042301	- -	++	++	- -
		05051801	- -	++	++	- -
0.25EU/mL 050818 (海洋)	0.25	05041001	- -	++	++	- -
		05042301	- -	++	++	- -
		05051801	- -	++	++	- -

行细菌内毒素检测是可行的。

本试验按中国药典 2005 版附录细菌内毒素法的规定,采用凝胶法,用两个厂家共 6 批鲎试剂,研究了三批盐酸左氧氟沙星注射液细菌内毒素检查的干扰情况。试验结果表明,本品可以用细菌内毒素法为质量标准来控制其质量,可以选用灵敏度为 0.25EU/mL 或灵敏度更高的鲎试剂进行试验。