

注射用甲磺酸加替沙星细菌内毒素检查法研究

田静¹, 姚治² (1. 杭州市第六人民医院, 杭州 310014; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要:目的 建立注射用甲磺酸加替沙星细菌内毒素检测方法。方法 用不同厂家的鲎试剂对不同批号的注射用甲磺酸加替沙星分别进行干扰试验, 考察确立注射用甲磺酸加替沙星细菌内毒素检测方法。结果 注射用甲磺酸加替沙星稀释液 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $83.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对细菌内毒素检测无干扰。结论 注射用甲磺酸加替沙星可用细菌内毒素检查方法取代家兔热原检查法。

关键词: 注射用甲磺酸加替沙星; 细菌内毒素; 鲎试剂

中图分类号: R927.12; R978.26

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2008)06-0545-03

The Bacterial Endotoxins Test of Gatifloxacin Mesylate for Injection Experimental Study

TIAN Jing¹, YAO Zhi² (1. The Sixth People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the bacterial endotoxin test for gatifloxacin mesylate for injection using tachypleus amebocyte lysate. **METHODS** By interfering test, the inhibition/enhancement action of gatifloxacin mesylate for injection with limulus lysate was studied. **RESULTS** The interference between the sample and the relative TAL was eliminable when the sample was diluted $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or $83.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The result of bacterial endotoxin test of gatifloxacin mesylate for injection is the same as that of the pyrogen test with healthy mature rabbits.

KEY WORDS: gatifloxacin mesylate for injection; tachypleus amebocyte lysate; bacterial endotoxin test

加替沙星 (gatifloxacin) 是第四代氟喹诺酮类抗生素, 其抗菌作用强, 抗菌谱广, 临床用于治疗呼吸系统感染、泌尿及生殖系统感染、皮肤及软组织感染。注射用甲磺酸加替沙星经静脉注射直接进入血液循环, 分布于血清、组织和体液中, 未见肝脏、心脏毒性, 是一种安全有效的新型抗感染药物。笔者按中国药典 2005 年版 (二部) 附录细菌内毒素检查法对注射用甲磺酸加替沙星的细菌内毒素检查法进行了研究, 建立了其细菌内毒素检查质量标准。

1 实验材料

鲎试剂 (TAL): 福州新北生化工业有限公司 (批号: 030416, 标示灵敏度: $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 规格: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$); 湛江安度斯生物有限公司 (批号: 0310102, 标示灵敏度: $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 规格: $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$)。细菌内毒素检查用水 (BET): 湛江安度斯生物有限公司 (规格: $5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$, 批号: 0309160)。内毒素工作标准品: 中国药品生物制品检定所 (规格: $150 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$, 批号: 2003-3)。注射用甲磺酸加替沙星, 杭州爱大制药有限公司生产, 规格: $0.2 \text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1}$ (以加替沙星计), 批号: 030914, 030915, 030916, 经热原检查 (家兔法) 均合格。实验所用玻璃器皿均用 250°C 干热灭菌 2 h, 除去可能存在的外源性内毒素。

2 实验方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核^[1]

将内毒素工作标准品用 BET 水溶解, 然后制成 2λ , 1λ , 0.5λ , 0.25λ 的细菌内毒素工作标准溶液, 每稀释一步均在涡旋混合器上混合 30 s。每一浓度平行做 4 支, 每支加入待复核的鲎试剂 0.1 mL 和内毒素标准溶液 0.1 mL 。同时用 BET 水做 2 支阴性对照管, 共 18 管, 轻轻混合后, 封闭管口, 垂直放入 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水浴中, 保温 $(60 \pm 2) \text{ min}$ 。结果显示, $0.5\lambda < \lambda < 2\lambda$, 该实验用的 2 批鲎试剂灵敏度符合规定, 可用于实验。

2.2 供试品内毒素理论限值 (L) 的确定及最大有效稀释浓度倍数 MVD 的计算^[2]

2.2.1 供试品内毒素理论限值 (L) 的确定 本品临床使用剂量为 $400 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$, 成人体重按 60 kg 计, 人体致热阈值 (K) 为 $5.0 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$, 则 $L = K/M = 5.0 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1} \div (400 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \div 60 \text{ kg}) = 0.75 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2.2 最大有效稀释浓度倍数 MVD 的计算 取本品 1 瓶供试品, 加入细菌内毒素检查用水 5 mL 稀释成 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为原液。根据公式 $MVD = CL/\lambda$ 计算。 $MVD(\lambda = 0.25) = 40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \times 0.75 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1} \div 0.25$

EU· mL⁻¹ =120倍 ,MVD(λ =0. 06) =40 mg· mL⁻¹ ×0. 75
EU· mg⁻¹ ÷0. 06 EU· mL⁻¹ =500倍。

2.3 供试品干扰试验^[1]

2.3.1 干扰预试验 为排除供试品本身对 TAL与细菌内毒素凝胶反应可能存在干扰,取供试品 (030914)原液,分别按表 1,表 2的所列的稀释倍数稀释,制成供试品溶液系列。并制备含 2λ内毒素的供试品稀释液 (PPC)进行干扰预试验。同时作阳性和阴性对照。结果见表 1,表 2。

表 1 干扰预试验结果 (鲎试剂 0310102)

Tab 1 Screen test of inhibition or enhancement test for gatifloxacin mesylate for injection(0310102)

供试品 稀释倍数	030914	
	供试品	PPC
原液	- -	- -
30	- -	- -
60	- -	++
120	- -	++

注: +:阳性, - :阴性
Note: ++: positive, - : negative

表 2 干扰预试验结果 (鲎试剂 030416)

Tab 2 Screen test of inhibition or enhancement test for gatifloxacin mesylate for injection (030416)

供试品 稀释倍数	030914	
	供试品	PPC
原液	- -	- -
20	- -	- -
40	- +	- -
80	++	++
160	- -	++
320	- -	++
480	- -	++

注: +:阳性, - :阴性
Note: ++: positive, - : negative

表 3 干扰试验结果 (1:80稀释液,鲎试剂 0310102)

Tab 3 Results of interference test for 80-fold dilution gatifloxacin mesylate for injection (achypleus amebocyte lysate 0310102)

供试品批号	内毒素工作标准品浓度 (EU· mL ⁻¹)				实测灵敏度	Et /Es
	0. 5	0. 25	0. 125	0. 062 5		
BET水	++++	++++	----	----	0. 25(Es)	
03091 4	++++	+- - -	----	----	0. 42 (Et)	1. 7
03091 5	++++	+- - -	----	----	0. 35 (Et)	1. 4
03091 6	++++	+- - -	----	----	0. 42 (Et)	1. 7

注: +:阳性, - :阴性
Note: ++: positive, - : negative

表 4 干扰试验结果 (1:480稀释液,鲎试剂 030416)

Tab 4 Results of interference test for 480-fold dilution gatifloxacin mesylate for injection (achypleus amebocyte lysate 030416)

供试品批号	内毒素工作标准品浓度 (EU· mL ⁻¹)				实测灵敏度	Et/Es
	0. 12	0. 06	0. 03	0. 015		
BET水	++++	++++	----	----	0. 06(Es)	
03091 4	++++	++++	+- - -	----	0. 042(Et)	0. 71
03091 5	++++	++++	+- - -	----	0. 042(Et)	0. 71
03091 6	++++	++++	+- - -	----	0. 050(Et)	0. 84

注: +:阳性, - :阴性
Note: ++: positive, - : negative

表 1 结果显示,对于 0310102TAL,甲磺酸加替沙星原液、1:30稀释液对 TAL凝胶反应存在抑制作用,1:60、1:120稀释液则无干扰。表 2结果显示,对于 030416TAL,甲磺酸加替沙星原液、1:20稀释液对 TAL凝胶反应存在抑制作用,1:80稀释液对 TAL凝胶反应存在增强作用,1:160、1:320、1:480稀释液则无干扰。

2.3.2 干扰确证试验 通过比较 TAL在内毒素水溶液和内毒素供试品溶液中反应的差异程度,来确定供试品在该浓度下是否对细菌内毒素检查有干扰。将内毒素工作标准品用 BET水溶解,然后制成 2λ、1λ、0. 5λ、0. 25λ的细菌内毒素工作标准溶液。根据预试验结果,对 0310102批鲎试剂,将供试品原液稀释 80倍 (500 μg· mL⁻¹)制备 0. 5、0. 25、0. 125、0. 0625 EU· mL⁻¹内毒素供试品溶液进行干扰确证试验;对 030416批鲎试剂,将供试品原液稀释 480倍 (83. 3 μg· mL⁻¹)制成 0. 12、0. 06、0. 03、0. 015 EU· mL⁻¹内毒素供试品溶液进行干扰确证试验,每一浓度平行做 4支。另取供试品和 BET水各做两只阴性对照,按细菌内毒素检查法操作。结果见表 3,表 4。

干扰试验结果表明,最大浓度 2. 0λ管均为阳性,最低浓度 0. 25λ管均为阴性,阴性对照管均为阴性,用 BET水和供试品溶液制成的内毒素溶液的反应终点浓度几何平均值 Es在 2. 0λ~0. 5λ,Et在 0. 5Es~2. 0Es范围内,说明本品在该浓度下对两批鲎试剂均无干扰,可进行细菌内毒素检查。

2.4 供试品细菌内毒素检查

取甲磺酸加替沙星三批 (批号为 030914、030915、030916)原液稀释至 500 μg· mL⁻¹,或稀释至 83. 3 μg· mL⁻¹后用以上两种鲎试剂分别按中国药典 (2005版)二部附录细菌内毒素检查法进行细菌内毒素检查,结果供试品管和阴性对照管均呈阴性,供试品阳性管和阳性对照管均呈阳性。3个批号供试品的内毒素检查均符合规定,与家兔法检查结果一致。

3 讨论

3.1 甲磺酸加替沙星原液对 TAL 凝胶反应存在抑制作用。通过干扰预试验确定供试品 1:60 稀释液对灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂、1:160 稀释液对灵敏度为 $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂不存在增强抑制效果^[2]。

3.2 作为方法学研究,本实验采用 1:80 或 1:480 稀释倍数进行实验得到理想结果,表明供试品在该稀释倍数下使用灵敏度更高的鲎试剂均不会对实验产生干扰作用。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005: Appendix 85-88.
- [2] HUANG Q Q, XIE Z M. Experiment design of Bacterial endotoxin detection in drugs[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1997, 32 (2): 72-74.

收稿日期: 2007-11-26