

# 注射用头孢噻吩钠细菌内毒素检查法的研究

张 辉 (海南省药品检验所, 海南 海口 570216)

**摘要:**目的 建立注射用头孢噻吩钠的细菌内毒素检查法。方法 计算注射用头孢噻吩钠的细菌内毒素限值, 通过干扰试验, 确定其最大无干扰浓度。结果 注射用头孢噻吩钠的细菌内毒素限值为  $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 最大无干扰浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 注射用头孢噻吩钠可用细菌内毒素检查法控制热原。

**关键词:**注射用头孢噻吩钠; 细菌内毒素; 干扰试验

**中图分类号:**R927.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-8783(2005)05-0537-02

## Study on bacterial endotoxin test of cefalotin sodium for injection

ZHANG Hui (Hainan Provincial Institute for Drug Control, Haikou 570216, China)

**Abstract: Objective** To establish the bacterial endotoxin test method for cefalotin sodium for injection. **Methods** To calculate the bacterial endotoxin limit of cefalotin sodium for injection. **Results** The bacterial endotoxin limit of cefalotin sodium for injection is  $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ . The maximum noninterference concentration of cefalotin sodium for injection is  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . **Conclusion** The bacterial endotoxin test method can be used for the controlling of cefalotin sodium for injection.

**Key words:** Cefalotin sodium for injection; bacterial endotoxin; interference test

注射用头孢噻吩钠为第一代头孢菌素, 抗菌谱广, 对革兰氏阳性菌的活性较强, 适用于耐青霉素金葡菌(甲氧西林耐药者除外)和敏感革兰氏阴性菌所致的呼吸道感染、软组织感染、尿路感染、败血症等, 尤其对金葡菌有较强活性<sup>[1]</sup>。本品的热原控制, 中国药典 2000 年版采用家兔法, 规定本品热原检查家兔注射量  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )<sup>[2]</sup>, 该法成本高、繁琐、费时, 美国药典收载有该品种的细菌内毒素检查法<sup>[3]</sup>, 目前以细菌内毒素检查法替代家兔法的研究国内尚未见报道, 我们对本品进行了细菌内毒素的检测研究。

## 1 实验材料

### 1.1 受试药物

注射用头孢噻吩钠(批号: 041104、041105、041106, 规格:  $1.0 \text{ g}$ , 海南斯达制药有限公司)。

### 1.2 试剂

细菌内毒素工作标准品(简称 CSE, 批号: 2003-3, 效价  $150 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$ , 中国药品生物制品检定所); 鲎试剂(简称 TAL, 湛江安度斯生物有限公司生产, 批号: 0408065, 规格  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\lambda = 0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批号: 0412132, 规格  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 厦门鲎试剂厂生产, 批号: 0405142, 规格  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\lambda = 0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批号: 0412076, 规格  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 细菌内毒素检查用水(简

称 BET 水, 湛江安度斯生物有限公司生产, 批号: 0412120, 规格  $2 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ )。

### 1.3 仪器及器具

MM-2 型快速旋涡诊断器(江苏省姜堰市沈高康健生化器具厂), DK-S24 电热恒温水浴锅(上海金宏实业有限公司), 无热原吸头(湛江安度斯生物有限公司生产, 批号: 0408020), 无热原空安瓿(湛江安度斯生物有限公司生产, 规格  $5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ , 批号: 0409130), 其他玻璃器具均经  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  干烤 1 h 进行除细菌内毒素处理。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 细菌内毒素限值的确定

按中国药典 2000 年版二部附录 XIX F 以及本品说明书中[用法用量]“成人肌内或静脉注射, 1 次  $0.5 \sim 1 \text{ g}$ , 每 6 h 1 次。严重感染病人的 1 日剂量可加大至  $6 \sim 8 \text{ g}$ 。……成人一日最高剂量不超过  $12 \text{ g}$ ……供静脉滴注时, 先将  $4 \text{ g}$  本品溶于  $20 \text{ mL}$  灭菌注射用水中, 然后再适量稀释。”成人每日单次最大剂量为  $4 \text{ g}$ , 计算出细菌内毒素限值为  $L = K/M = [5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})]/[4000 \text{ mg}/(60 \text{ kg} \cdot \text{h})] = 0.075 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 为保证临床用药安全, 拟将本品的细菌内毒素限值定为  $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

### 2.2 灵敏度复核试验

按中国药典 2000 年版二部附录 XI E 细菌内毒素检查法进行操作, 复核灵敏度  $\lambda_c$  在  $0.5 \sim 2.0 \lambda$  间, 表明试验用两个生产厂家的三批鲎试剂灵敏度标示符合规定。结果见表 1。

作者简介: 张辉(1969-), 男, 主管药师, 主要从事药品检验工作。

表1 鲎试剂的灵敏度复核试验  
Tab.1 Sensitivity of Tachypleus ameobocyte lysate

批号	灵敏度/ (EU · mL <sup>-1</sup> )	$\rho$ (内毒素)/(EU · mL <sup>-1</sup> )						阴性 对照	$\lambda c$ / (EU · mL <sup>-1</sup> )
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015		
0412132	0.25	++++	++++	----	----			--	0.25
0412076	0.25	++++	++++	----	----			--	0.25
0408065	0.06			++++	++++	----	----	--	0.06
0405142	0.06			++++	++++	----	----	--	0.06

2.3 最大可稀释倍数的计算

取本品,加 BET 水制成每 1 mL 中含 100 mg 的溶液,按公式  $MVD = CL/\lambda$  计算,对应于市售灵敏度为 1.0、0.5、0.25、0.125、0.06 EU/mL 的鲎试剂,样品溶液可选择最大稀释倍数分别为 6、12、24、48、100 倍。

2.4 干扰试验

2.4.1 预干扰试验

取本品,加 BET 水制成每 1 mL 中含 100 mg 的溶液(称为原液),对应于不同的灵敏度,按最大稀释倍数用 BET 水将原液作 BET 水系列(称 NPC 系列)稀释,同时每一稀释度下均制备含有 2 $\lambda$  浓度 CSE 的供试品溶液(称 PPC 系列);以鲎试剂(灵敏度为 0.25 EU · mL<sup>-1</sup>),与 NPC 以及 PPC 系列反应,同时作阴性(NC)、阳性(PC)对照,结果见表 2。

表2 注射用头孢噻吩钠预干扰试验结果

Tab.2 Results of preliminary interference test for cefalotin sodium for injection

鲎试剂批号	样品批号	系列	$\rho$ (样品)/(mg · mL <sup>-1</sup> )					PC	NC
			16.67	8.3	4.17	2.08	1.0		
0412132	041101	NPC	--	--	--	--	--	++	--
		PPC	--	--	--	++	++		
	041105	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		
	041106	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	--	++	++		

由表 2 结果可见,高浓度样品溶液抑制鲎试剂与细菌内毒素的凝胶反应,将样品溶液稀释成 2.08 mg · mL<sup>-1</sup>(48 倍稀释)后,此抑制作用消除。为保证试验结果的准确可靠,我们拟对样品溶液作更高倍数(100 倍)稀释,制成浓度为 1.0 mg · mL<sup>-1</sup>的样品溶液,选用标示灵敏度为 0.06 EU · mL<sup>-1</sup>的鲎试剂进行干扰试验。

2.4.2 干扰试验

用 BET 水以及浓度为 1.0 mg · mL<sup>-1</sup>的样品稀释液分别将 CSE 制成浓度为 0.12、0.06、0.03、0.015 EU · mL<sup>-1</sup>的溶液(分别称为 BET 水系列及样品系列),参照中国药典 2000 年版二部附录 XI E,采用两个厂家的 TAL 进行干扰试验,同时作样品阴性对照以及阳性对照,结果见表 3。

表3 注射用头孢噻吩钠干扰试验测定结果

Tab.3 Results of interference test for cefalotin sodium for injection

鲎试剂批号	样品批号	系列	$\rho$ (内毒素)/(EU · mL <sup>-1</sup> )				NPC	结果 (EU · mL <sup>-1</sup> )
			0.12	0.06	0.03	0.015		
0408065	041104	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_s$ :0.06
		样品	++++	++++	----	----	--	$E_t$ :0.06
	041106	样品	++++	++++	----	----	--	$E_t$ :0.06
		BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_s$ :0.06
0405142	041104	BET 水	++++	++++	----	----	--	$E_t$ :0.06
		样品	++++	++++	----	----	--	$E_t$ :0.06
	041105	样品	++++	++++	----	----	--	$E_t$ :0.06
		041106	样品	++++	++++	----	----	--

试验结果表明, $E_s$  为 0.06,在 0.5 $\lambda$  ~ 2.0 $\lambda$  之间; $E_t$  为 0.06,亦在 0.5 $E_s$  ~ 2.0 $E_s$  之间,依照干扰试验的结果判断,故认为浓度为 1.0 mg · mL<sup>-1</sup>的样品稀释液无干扰作用,可用于细菌内毒素检查。

2.4.3 细菌内毒素检测结果

1.0 mg · mL<sup>-1</sup>溶液,采用两厂家标示灵敏度为 0.06 EU · mL<sup>-1</sup>的鲎试剂,按照中国药典 2000 年版附录细菌内毒素检查法进行细菌内毒素检查,同时设立阳性、供试品阳性、阴性对照。结果供试品中的内毒素含量均在 0.06 EU · mL<sup>-1</sup>以下,符合规定。结果见表 4。

用 BET 水将 3 批注射用头孢噻吩钠溶解并稀释成

(下转第 542 页)

**2.4 样品溶液的制备** 取奥硝唑分散片 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取细粉适量 (约相当于奥硝唑 20 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加水适量, 超声处理使溶解, 静置, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 0.20 mL 的替硝唑内标储备液 (1 mg/mL), 加水稀释至刻度, 即得。

**2.5 空白辅料溶液的制备** 取相当量的空白辅料 (约 15 mg), 同样品溶液的配制方法制成空白辅料溶液, 在上述色谱条件下, 取 20  $\mu$ L 进样, 其色谱图见图 1。

**2.6 回收率试验** 精密称取干燥至恒重的奥硝唑对照品 50 mg, 用水溶解后定容于 50 mL 量瓶, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液适量, 依标准曲线项下操作, 配成三种不同浓度溶液, 按上述色谱条件进样, 根据标准曲线进行计算, 回收率测定结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ( $n=5$ )

Tab. 1 Result of recovery test.

浓度	$\rho$ (加入量)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$\rho$ (测得量)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回收率/ %	$\bar{x}$ / %	RSD/ %
低	9.812	9.682	98.7		
中	19.62	19.89	101.4	100.4	1.54
高	39.25	39.76	101.3		

**2.7 精密度试验** 取回收率测定项下中浓度样品, 一日内重复测 5 次, 其日内 RSD 为: 0.55%。样品重复测 5 d, 其日间 RSD 为 0.67%。

**2.8 样品测定** 取 3 个批号的奥硝唑分散片, 经溶解、稀释、微孔滤膜过滤等处理, 最终稀释至含奥硝唑

约为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度, 按上述色谱条件进样, 根据标准曲线进行计算, 结果见表 2。

表 2 奥硝唑分散片测定结果 ( $n=5$ )

Tab. 2 Assay results of ornidazole

批号	奥硝唑标示量/%
20040513	101.2 $\pm$ 2.21
20040608	99.87 $\pm$ 0.95
20040818	100.8 $\pm$ 1.25

### 3 讨论

**3.1** 目前国家药品监督管理局标准 (试行) 对奥硝唑片含量测定采用紫外分光光度法, 该法专属性不强。国内未见采用 HPLC 法测定奥硝唑分散片含量的文献报道, 经反复试验, 在本文确定的色谱条件下, 本法的专属性强, 样品不需特殊处理, 经简单溶解、过滤即可直接进样, 测定时间短, 只需 10 min 即可完成测定。

**3.2** 本法采用的流动相简单、毒性低, 方法准确、重现性好、精密度高, 可用于奥硝唑分散片的质量控制。

参考文献:

- [1] 朱声荣, 陈卫民, 彭志翔, 等. 奥硝唑治疗牙周及冠周化脓性感染的临床研究[J]. 口腔医学纵横, 2001, 17(2): 141.
- [2] 梁小庆, 石涛. 奥硝唑注射液的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(2): 93.
- [3] 陈蒂芳, 易爱纯, 张顺芝. UV 法测定奥硝唑分散片的含量[J]. 中国药事, 2004, 18(1): 44.

(收稿日期: 2005-05-28; 修回日期: 2005-06-02)

(上接第 538 页)

表 4 注射用头孢噻吩钠细菌内毒素检测结果

Tab. 4 Results of bacterial endotoxin test for cefalotin sodium for injection

样品批号	供试品管	阴性对照	阳性对照	供试品阳性对照
041104	-	-	+	+
041105	-	-	+	+
041106	-	-	+	+

### 3 讨论

以上试验结果表明, 较高浓度的头孢噻吩钠溶液对本品的细菌内毒素检查有干扰, 存在抑制作用, 通过

将样品溶液作一定倍数的稀释, 制成 1.0 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的溶液可排除干扰作用, 并选用适宜灵敏度的鲎试剂, 即可控制本品的热原。因此, 本品的细菌内毒素检查法是可行的, 可代替热原检查法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 临床用药须知[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001, 4.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 195.
- [3] USP XXVI[Z]. 2002. 230

(收稿日期: 2005-07-08)