

注射用头孢西丁钠细菌内毒素检查法与热原检查法的比较

谢 东, 杨戒骄

(暨南大学附属第二医院 深圳市人民医院 药学部, 广东 深圳 518020)

[摘 要] 目的:通过细菌内毒素检查法与热原检查法的比较实验,建立注射用头孢西丁钠的细菌内毒素检查法。方法:通过家兔试验确定注射用头孢西丁钠的致热阈值、内毒素限值,选用鲎试剂灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品质量浓度设定为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;鲎试剂灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品质量浓度设定 $1.66 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 两种不同质量浓度为干扰实验质量浓度确定头孢西丁钠的试验质量浓度。结果:注射用头孢西丁钠对细菌内毒素的干扰作用可以通过稀释的方法排除,最后确定限度为每 1 mg 含细菌内毒素不高于 0.13 EU 。结论:注射用头孢西丁钠可用于细菌内毒素检查法代替家兔法进行热原检查。

[关键词] 注射用头孢西丁钠; 细菌内毒素检查; 致热阈值

[中图分类号] R37 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0207-03

注射用头孢西丁钠为半合成第二代头孢菌素,对革兰氏阴性菌有较强的抗菌作用,具有高度抗 β 内酰胺酶性质。采用家兔法检查热原,但在应用中家兔检查法有一定的局限性,如某些抗生素、血液制品、生物制品本身存在影响家兔正常体温的问题^[1]而这种方法本身就是一种限度试验,不能定量,无法标准化,人为影响很大,因此建立一种准确、规范的检查方法势在必行。本文通过家兔致热阈试验、干扰预试验、干扰试验等多项对比试验,以证明细菌内毒素检查法代替热原检查法的可行性。现将方法介绍如下。

1 材料

注射用头孢西丁钠为深圳市制药厂生产,批号:060401、060402、060403 (1.0 g/瓶)。细菌内毒素国家标准品:中国药品生物制品检定所,规格 $9\ 000 \text{ EU/支}$,批号 9805。鲎试剂:灵敏度 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,湛江安度斯生物有限公司,批号:050922;灵敏度 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,厦门鲎试剂厂,批号 051116;灵敏度 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 厦门鲎试剂厂,批号 051118;以上鲎试剂在使用前,均进行了灵敏度的复核测定,灵敏度在 $0.5 \sim 2\lambda$ 范围内符合规定。家兔为新西兰家兔由广东省实验动物厂提供。ZRY-2 型智能热原仪为天津大学无线电厂生产。涡旋混合器为天津大学无线电厂生产;恒温水浴箱为上海医疗器七厂生产。以下实验使用器具均经 250°C 干热灭菌去除内毒素。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定^[2-3]

按中国药典规定细菌内毒素限值(L),计算公式为 $L = K/M$, K 为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量;注射剂 K 为按规定的给药途径临床无任何不良反应的内毒素阈值剂量,静脉注射为 $5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$; M 为人用每公斤体重每小时最大剂量,人均质量按 60 kg 计算,注射时间小于 1 h ,按 1 h 计算。根据头孢西丁钠的用法用量,每次注射的最大剂量成人每日为 2 g 。折算成细菌内毒素限值(L)则为 $0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。如果按国家标准^[4]家兔法剂量折算细菌内毒素限值(L)则为 $0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。即按人用剂量折算注射用头孢西丁钠的细菌内毒素限值(L)应小于 $0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$;按热原检查法折算细菌内毒素限值(L)应小于 $0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。(按热原检查法折算内毒素限值 L : $L = 5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1}/50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$), (按人用剂量折算内毒素限值 L : $M = 2\ 000 \text{ mg}/60 \text{ kg} = 33.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $L = 5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1}/33.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$)

2.2 干扰试验有效浓度的计算^[3]

确定了内毒素限值后为了方便试验,还必须找出它不干扰本试验的有效浓度范围。根据目前用于药品检验的鲎试剂灵敏度一般在 $0.5 \sim 0.03 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,故按人用剂量细菌内毒素限值 $0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的进行细菌内毒素检查时的最高有效质量浓度 (ρ_{\max}) 和最低有效质量浓度 (ρ_{\min}) 应为: $3.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可知,该品若采用细菌内毒素检查方法有效质量浓度应控制在 $3.33 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其最大无干扰质量浓度不能低于 ρ_{\min} $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

如果按国家标准的家兔法折算后的细菌内毒素限值

0.1 EU · mg⁻¹计算,最高有效质量浓度(ρ_{\max})和最低有效质量浓度(ρ_{\min})应为:5.0 mg · mL⁻¹和0.30 mg · mL⁻¹。即采用细菌内毒素检查方法时有效质量浓度应控制在5.0 ~ 0.30 mg · mL⁻¹,其最大无干扰质量浓度不能低于0.30 mg · mL⁻¹。

按热原检查法折算的最高和最低有效质量浓度: $\rho_{\max} = \lambda_{\max}/L = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}/0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1} = 5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\rho_{\min} = \lambda_{\min}/L = 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}/0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1} = 0.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

按人用剂量折算的最高和最低有效质量浓度: $\rho_{\max} = \lambda_{\max}/L = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}/0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1} = 3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\rho_{\min} = \lambda_{\min}/L = 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}/0.15 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1} = 0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.3 干扰试验的预试验

为了准确、快速的确定试验质量浓度,对其进行预试验,根据文献[5]供试品的某一质量浓度对鲎试剂不存在干扰作用时,比该质量浓度低的浓度对鲎试剂也一定不存在干扰作用,如果确定的这一质量浓度不干扰,可以再对2、4、8倍于该质量浓度的供试品进行干扰试验,再高已无实际意义。取头孢西丁钠1支加入9.4 mL细菌内毒素检查用水(BET)振荡溶解得100 mg · mL⁻¹的溶液(按质量折算),从0.83 mg · mL⁻¹质量浓度开始将其制成2、4、8、10倍质量浓度的样品,分别用两个厂家不同灵敏度的鲎试剂,灵敏度(λ)为0.50 EU · mL⁻¹; λ 为0.25 EU · mL⁻¹; 灵敏度(λ)为0.125 EU · mL⁻¹; 进行预干扰试验结果见表1。

表1 供试品预干扰试验结果

鲎试剂灵敏度 /(EU · mL ⁻¹)	$\rho_{\text{供试}}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$						阴性 对照
0.125	0.83	1.66	3.33	6.66	13.33	原液	
(批号050922)	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-
0.25	1.66	3.33	6.66	13.33	26.66	原液	
(批号051116)	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-
0.5	3.33	6.66	13.33	26.66	53.33	原液	
(批号051118)	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-

从表1中可以看出头孢西丁钠原液和高质量浓度样品对细菌内毒素检查方法有明显的抑制作用;用0.5 EU · mL⁻¹鲎试剂其最高无干扰质量浓度为6.66 mg · mL⁻¹,用

0.25 EU · mL⁻¹的鲎试剂其最高无干扰质量浓度为3.33 mg · mL⁻¹;0.125 EU · mL⁻¹鲎试剂其最高无干扰质量浓度为1.66 mg · mL⁻¹,抑制作用才可能被排除。

2.4 干扰试验

为了使试验更稳定本组根据计算样品的人用剂量折算有效质量浓度应控制在3.33 ~ 0.20 mg · mL⁻¹。按家兔法折算后采用细菌内毒素检查方法时有效质量浓度应控制在5.0 ~ 0.3 mg · mL⁻¹,当鲎试剂灵敏度为0.5 EU · mL⁻¹时,样品质量浓度设定为3.33 mg · mL⁻¹;鲎试剂灵敏度为0.25 EU · mL⁻¹,样品质量浓度设定1.66 mg · mL⁻¹;鲎试剂灵敏度为0.125 EU · mL⁻¹,样品质量浓度设定0.83 mg · mL⁻¹不同质量浓度进行干扰试验。结果见表2、3。

表2 鲎试剂灵敏度为0.125 EU · mL⁻¹的干扰试验

项目	细菌内毒素剂量/(EU · mg ⁻¹)				阴性	反应终点 质量浓度
	0.5	0.25	0.125	0.0625		
内毒素 标准溶液	+	+	-	-	-	Es = 0.125
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
含0.83 mg · mL ⁻¹ 供试品的内 毒素溶液	+	+	-	-	-	Et = 0.125
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	-	-	-	-	

表3 鲎试剂灵敏度为0.25 EU · mL⁻¹的干扰试验

项目	细菌内毒素剂量/(EU · mg ⁻¹)				阴性	反应终点 质量浓度
	1.0	0.5	0.25	0.125		
内毒素 标准溶液	+	+	-	-	-	Es = 0.25
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
含1.66 mg · mL ⁻¹ 供试品的内 毒素溶液	+	+	-	-	-	Et = 0.25
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	-	-	-	-	

表4 鲎试剂灵敏度为0.5 EU · mL⁻¹的干扰试验

项目	细菌内毒素剂量/(EU · mg ⁻¹)				阴性	反应终点 质量浓度
	1.0	0.5	0.25	0.125		
内毒素 标准溶液	+	+	-	-	-	Es = 0.5
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
含3.33 mg · mL ⁻¹ 供试品的内 毒素溶液	+	+	-	-	-	Et = 0.42
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	
	+	+	-	-	-	

通过试验表明鲎试剂灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,样品质量浓度设定为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;鲎试剂灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,样品质量浓度设定 $1.66 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;鲎试剂灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时样品质量浓度设定 $3.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时均不存在干扰。经计算 E_s 在 $0.5 \sim 2.0\lambda$, E_t 均在 $0.5 \sim 2.0 E_s$,符合标准规定。

2.5 家兔致热阈试验

为了使试验更准确、直观。将准确定量稀释的细菌内毒素国家标准品加入注射用头孢西丁钠样品中,使头孢西丁钠样品中含细菌内毒素量分别为 0.5 、 1.0 、 1.25 、 $1.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$;并同时进行了细菌内毒素检查和热原检查^[3],比较发现:当细菌内毒素量为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,用灵敏度为 0.125 、 0.25 、 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂做细菌内毒素检查已为阳性,而家兔体温正常无任何不适。当细菌内毒素量为 $1.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时部分家兔才出现发热反应。结果见表5。

表5 家兔致热阈试验结果¹⁾

分组	酶活性(细菌内毒素)/(EU·mL ⁻¹)			
	0.5	1.0	1.25	1.5
第1组	0.68(3)合格	1.20(3)合格	1.24(3)合格	4.98(3)不合格
第2组	0.77(3)合格	0.84(3)合格	3.74(3)不合格	4.15(3)不合格
第3组	0.93(3)合格	1.37(3)合格	4.40(8)不合格	4.62(3)不合格
第4组	0.54(3)合格	0.92(3)合格	3.45(8)合格	3.94(3)不合格
第5组	0.61(3)合格	3.07(8)合格	1.36(3)合格	4.26(3)不合格
第6组	0.49(3)合格	1.01(3)合格	1.76(3)不合格	4.13(3) 不合格

1)表中所有括号内的数为使用家兔的只数

3 讨论

在实际工作中我们对中间体采用细菌内毒素检查,成品按热原法检查共进行123批的比对,均无一例结果不一致。

为了探求家兔的致热阈值,避免假阴性反应。进行了家兔致热阈试验,即通过将定量的细菌内毒素国家标准品注入到家兔体内,确定能引起家兔致热反应的阈值。试验进行了6组,当细菌内毒素量为 $1.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时部分家兔才出现发热反应,细菌内毒素量达 $1.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时全部家兔才出现发热反应。

本试验确定选用鲎试剂灵敏度为 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品质量浓度设定为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;鲎试剂灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品质量浓度设定 $1.66 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 两种不同质量浓度为干扰实验浓度是综合了人用剂量和兔剂量两者的有效范围。考虑到质量浓度太高接近干扰范围,易引起假阴性反应,质量浓度太低反复稀释易发生污染。在申报国家标准时将标准定为每1mg含细菌内毒素不高于 0.13 EU ,以方便计算。

注射用头孢西丁钠对鲎试剂与细菌内毒素的反应有抑制作用,但可通过稀释方式加以排除。由于该方法检验周期短,在实际工作中可随机对中间体关键环境进行质量监控,适合生产单位质量管理。

[参考文献]

[1] 夏振民,刘大英. 发展中的热原检查法[J]. 中国药事, 2003,17(1):48-49.

[2] 黄清泉,夏振民. 药品细菌内毒素检查的实验设计[J]. 中国药学杂志,1997,32(2):72.

[3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典2005年版二部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录85. XID~XIE.

[4] 中国药品生物制品检定. 中国药品检验操作规范[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005:287.

[责任编辑:陈咏梅]