

动态浊度法检测三种自制注射液中的细菌内毒素

吴 激, 孙 燕, 王云川, 焦 琳, 张 莉 (兰州军区乌鲁木齐总医院药剂科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:通过考察含糖平衡盐、替硝唑葡萄糖和氧氟沙星葡萄糖注射液对鲎试剂的干扰作用,探讨以细菌内毒素检查法中的凝胶法取代热原检查法检查含糖平衡盐等3种自制注射液细菌内毒素限值的可行性。**方法:**采用动态浊度法,用EDS-99细菌内毒素测定仪对含糖平衡盐、替硝唑葡萄糖和氧氟沙星葡萄糖注射液进行干扰试验并用凝胶法进行验证。**结果:**用两个厂家生产的鲎试剂以动态浊度法检测3个不同批号的含糖平衡盐和替硝唑葡萄糖注射液,样品不经稀释,其细菌内毒素回收率均在50%~200%范围内,标准曲线的相关系数绝对值大于0.980,表明含糖平衡盐、替硝唑葡萄糖注射液对鲎试剂反应无干扰作用,3批样品同时用凝胶法检查,其结果均为阴性;氧氟沙星葡萄糖注射液对鲎试剂有干扰,稀释4倍可消除干扰。**结论:**含糖平衡盐、替硝唑葡萄糖注射液对鲎试剂反应无干扰作用,凝胶法可作为生产含糖平衡盐和替硝唑葡萄糖注射液时日常检查其细菌内毒素限值的方法;氧氟沙星葡萄糖注射液稀释4倍后可用凝胶法检查。

关键词 含糖平衡盐注射液;替硝唑葡萄糖注射液;氧氟沙星葡萄糖注射液;动态浊度法;细菌内毒素;凝胶法

中图分类号:R927.12

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2005)-0018-03

Determination of endotoxin in three intravenous mixed injection by kinetic turbidimetric assay

WU Ji, SUN Yan, WANG Yun-chuan, JIAO Ling, ZHANG Li (Department of Pharmacy, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To approach the feasibility of replacing pyrogen test with bacterial endotoxin test (BET) by analysing the interference of balance salts containing glucose, tinidazole and glucose, ofloxacin and glucose injection to limulus amoebocyte lysate (LAL). **Methods:** The kinetic turbidimetric assay (KTA) was used to determinate the bacterial endotoxin and did an interfering test by using of the EDS-99 bacterial endotoxin systems, in the same time gel-clot method was used to test and verify. **Results:** The experiment shows the balance salts containing glucose, tinidazole and glucose injection have no interference to LAL, ofloxacin and glucose injection has no interference to LAL when is diluted four times. **Conclusion:** The gel-clot method can be used as a daily examination to analyse balance salts containing glucose, tinidazole and glucose, ofloxacin and glucose injection.

KEY WORDS balance salts containing glucose injection; tinidazole and glucose injection; ofloxacin and glucose injection; bacterial endotoxin; kinetic turbidimetric assay; gel-clot method

为简化医院自制制剂的药检工作,确保制剂质量,作者用细菌内毒素检查法中的凝胶法取代热原检查法检查自制制剂(含糖平衡盐、替硝唑葡萄糖和氧氟沙星葡萄糖注射液)细菌内毒素限值,从而避免使用繁琐的热原检查法,但必需用干扰实验证明其可行性。依照《中国药典》2000年版附录收载的细菌内毒素检查法应用指导原则^[1],采用定量检测细菌内毒素的动态浊度法,检查含糖平衡盐等3种注射液对鲎试剂的干扰作用,如果没有干扰即可直接用凝胶法检查,否则要通过干扰实验来确定能否用

稀释法消除干扰和稀释倍数,再用凝胶法检查^[2,3]。

1 实验材料

含糖平衡盐注射液(规格:500 mL,内含氯化钠2.925g、氯化钾0.15g、氯化钙0.1255g、葡萄糖25g,批号020927、021105、021203);替硝唑葡萄糖注射液(规格:250mL,内含替硝唑0.4g、葡萄糖12.5g,批号021009、030117、030418);氧氟沙星葡萄糖注射液(规格:250mL,内含氧氟沙星0.2g、葡萄糖12.5g,批号021024、030117、030418)以上3种注射液均为本院自制。鲎试剂(规格1.25mL,灵敏度0.06EU/mL,批号0105151;规格1.25mL,灵敏度0.015EU/

mL,批号 0101120;均为湛江安度斯公司生产。规格 2.2mL,灵敏度 0.06EU/mL,批号 020713;规格 0.1mL,灵敏度 0.5EU/mL,批号 010501;均为福州新北生化公司生产)。细菌内毒素工作标准品(中国药品生物制品检定所,批号 2000-3)。细菌内毒素检查用水(天津一瑞化学制品有限公司,批号 010528,内毒素含量小于 0.001EU/mL)。EDS-99 细菌内毒素测定仪、漩涡混合器(北京金山川公司)。恒温水浴锅。

2 方法与结果

2.1 方法 按《中国药典》2000 年版附录收载的细菌内毒素检查法应用指导原则进行,所有在实验中接触试液的玻璃仪器都经 250℃ 烘烤 2h。

2.1.1 细菌内毒素限值的确立^[1] 按公式 $L = K/M$,K 是最小致热阈值为 5.0 EU/kg,M 为家兔给药剂量,计算得含糖平衡盐注射液内毒素限值为 0.5EU/mL,替硝唑葡萄糖为 0.625 EU/mL,氧氟沙星葡萄糖为 0.5 EU/mL。

2.1.2 标准曲线制作及可靠性^[1] 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品进行稀释,使其最终内毒素浓度分别为 8、2、0.5、0.125、0.0312 和 16、4、1、0.25、0.0625EU/mL,各取 0.1mL 分别加到预先加有 0.1mL 鲎试剂反应管内,轻摇混匀,插入 EDS-99 内毒素测定仪内进行检测,其中每一浓度平行做 3 支,并设 2 支阴性对照。

指导原则规定,阴性对照反应时间应比回归方程中最低浓度 0.0312EU/mL 或 0.0625EU/mL 反应时间长,平行组的 CV < 10%,再将内毒素标准曲线经线性回归分析,其相关系数(r)的绝对值应 ≥ 0.980,则标准曲线成立,否则重新实验^[1]。

2.1.3 干扰试验

2.1.3.1 样品稀释倍数计算^[1] 按公式 $MVD = LC/\lambda_1$,L 为含糖平衡盐等 3 种注射液内毒素限值,C 为含糖平衡盐等 3 种注射液浓度,由于 L 以 EU/mL 表示,C 为 1.0mL/mL, λ_1 为标准曲线的最低浓度, λ_1 为 0.0312EU/mL 和 0.0625EU/mL,计算得含糖平衡盐试验时最大有效稀释倍数为 16 倍,替硝唑葡萄糖为 10 倍,氧氟沙星葡萄糖为 8 倍。

2.1.3.2 干扰试验及回归方程 用含糖平衡盐等 3 种注射液原液作样品,用含糖平衡盐等 3 种注射液加入 16 倍 λ_1 的细菌内毒素标准液作为样品阳性对照。将上述实验品加入到预先加有 0.1mL 鲎试剂的反应管内,混匀,插入测定仪内进行检测,每个批号样品和阳性对照平行做 3 支。回收率(%) = (阳性对照液内毒素值 - 样品液内毒素值)/16 λ_1 × 100%。

测得含糖平衡盐注射液回归方程为 $LgT = 3.05 - 0.32LgC, r = -0.995$ (鲎试剂规格 1.25mL,灵敏度 0.015EU/mL,批号 0101120,湛江安度斯公司生产)和 $LgT = 2.86 - 0.26LgC, r = -0.9998$ (鲎试剂规格 2.2mL,灵敏度 0.06EU/mL,批号 020713,福州新北生化公司生产)。替硝唑葡萄糖注射液回归方程为 $LgT = 2.8 - 0.21LgC, r = -0.993$ (鲎试剂规格 1.25mL,灵敏度 0.015EU/mL,批号 010551,湛江安度斯公司生产)和 $LgT = 2.87 - 0.26LgC, r = -0.998$ (鲎试剂规格 2.2mL,灵敏度 0.06EU/mL,批号 020713,福州新北生化公司生产)。氧氟沙星葡萄糖注射液回归方程为 $LgT = 2.92 - 0.26LgC, r = -0.998$ (鲎试剂规格 2.2mL,灵敏度 0.06EU/mL,批号 020713,福州新北生化公司生产)。LgT = 2.80 - 0.21LgC, r = -0.993 (鲎试剂规格 1.25mL,灵敏度 0.015EU/mL,批号 010551,湛江安度斯公司生产)和 $LgT = 2.92 - 0.26LgC, r = -0.998$ (鲎试剂规格 2.2mL,灵敏度 0.06EU/mL,批号 020713,福州新北生化公司生产)。

《中国药典》2000 年版附录指导原则规定:用 2 个以上不同厂家的鲎试剂做实验,内毒素的回收率都在 50% ~ 200% 之间时,供试品在该试验条件下不存在干扰因素,否则须通过稀释来消除干扰,但稀释倍数不得超过最大有效稀释倍数^[1]。

2.1.4 凝胶法 按《中国药典》2000 年版附录收载的细菌内毒素检查法应用指导原则进行,鲎试剂用 0.1mL 细菌内毒素检查用水溶解加入 0.1mL 样品,放入 37℃ 恒温水浴箱中反应 1h,取出慢慢翻转 180°,凝胶不流动为阳性否则为阴性,同时设阴性和阳性对照。

2.2 结果 根据细菌内毒素检查法应用指导原则的要求作者使用上述 2 家公司生产的鲎试剂对含糖平衡盐等 3 种注射液分别进行了干扰试验,并用凝胶法进行了验证。含糖平衡盐注射液实验结果见表 1,替硝唑葡萄糖注射液结果见表 2,氧氟沙星葡萄糖注射液结果见表 3、表 4。

表 1 含糖平衡盐注射液干扰实验和凝胶法实验结果

批号	加入内毒素的 量(EU)	平行组变异 系数 CV (%)	内毒素实测 值(EU/mL)	回收率 (%)	凝胶法实 验结果
020927	0.5	2.63	<0.046	63	-
021105	0.5	9.99	<0.040	93	-
021203	0.5	5.26	<0.043	81	-
020927	0.5	5.04	<0.0022	64	-
021105	0.5	3.64	<0.0022	96	-
021203	0.5	0.63	<0.004	88	-

表2 替硝唑葡萄糖注射液干扰实验和凝胶法实验结果

批号	加入内毒素 的量(EU)	平行组变异 系数 CV (%)	内毒素实测 值(EU/mL)	回收率 (%)	凝胶法实 验结果
021009	1	4.52	<0.004 6	95	-
030117	1	9.50	<0.005 8	101	-
030418	1	2.36	<0.005 7	97	-
021009	1	4.69	<0.015 7	80	-
030117	1	2.34	<0.030 6	129	-
030418	1	0.68	<0.06	97	-

表3 氧氟沙星葡萄糖注射液干扰实验结果

稀释 倍数	加入内毒素 的量(EU)	平行组变异 系数 CV (%)	内毒素实测 值(EU/mL)	内毒素实测 值(EU)	回收率 (%)
1	1	5.81	<0.005 5	0.013	0.75
4	1	4.68	<0.003 6	0.52	51
8	1	2.53	<0.003 6	1.03	102

表4 氧氟沙星葡萄糖注射液稀释4倍干扰实验和凝胶法实验结果

批号	加入内毒素 的量(EU)	平行组变异 系数 CV (%)	内毒素实测 值(EU/mL)	回收率 (%)	凝胶法实 验结果
030418	1	3.12	<0.046	98	-
030117	1	1.26	<0.040	112	-
021028	1	5.93	<0.043	81	-
030418	1	2.61	<0.06	96	-
030117	1	1.91	<0.06	93	-
021028	1	0.39	<0.04	79	-

实验结果表明:3个批号含糖平衡盐和替硝唑葡萄糖注射液原液用2个厂家鲎试剂所做的干扰实验的回收率都在规定范围内,内毒素含量小于其内毒素限值,凝胶法检查为阴性,说明含糖平衡盐和替

硝唑葡萄糖注射液原液对鲎试剂反应无干扰,可直接用凝胶法控制其细菌内毒素限值。氧氟沙星葡萄糖注射液原液对鲎试剂有强干扰,稀释4倍可消除,所以氧氟沙星葡萄糖注射液稀释4倍后即可用凝胶法进行检查。

3 讨论

3.1 以定量的动态浊度法检测样品是否有干扰并确定稀释多少倍可以消除干扰,再用简便的凝胶法来完成药品中内毒素检查,提高了反应灵敏度、节省了时间。

3.2 动态浊度法虽可直接测出样品中的内毒素含量但必须同时做标准曲线,所用试剂量大且较贵,适用于干扰试验等前期工作;凝胶法虽是限量检查,但操作简便、价廉可用于日常工作。

3.3 不同厂家生产的鲎试剂所做的内毒素标准曲线差别较大,同时鲎试剂反应快慢差异也较大,所以应根据情况选择适当的稀释比例和反应临界值。

3.4 由于含糖平衡盐不是标准制剂,所以参考与含糖平衡盐组份类似的乳酸钠林格氏液的家兔给药剂量10mL/kg计算含糖平衡盐最大稀释倍数,但实验表明含糖平衡盐不需稀释可直接用凝胶法检查。

参考文献:

- [1] 中国药典2000年版[S]. 二部. 附录,2000;204.
- [2] Cooper JF, Thoma LA. Screening extemporaneously compounded intraspinal injections with the bacterial endotoxins test [J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2002,59(24):2426.
- [3] 孙燕,吴激,韩文斌,等. 动态浊法定量检测大蒜注射液中细菌内毒素[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(2):57.

收稿日期:2003-07-22

复方苦参素胶囊中苦参碱的含量测定及稳定性研究

丁青龙¹, 恽宏伟² (1. 中国人民解放军第102医院药剂科, 江苏 常州 213003; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要 目的:建立复方苦参素胶囊中苦参碱的含量测定方法。方法:采用薄层-紫外分光光度法和经典恒温法测定。结果:线性范围为1.512~7.560 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加样回收率为97.29%,RSD为2.84%,苦参碱的有效期为1.2年。结论:该法简便准确,可以用于复方苦参素胶囊中苦参碱的含量测定和质量控制,结果显示复方苦参素胶囊中苦参碱比较稳定。

关键词 薄层-紫外分光光度法;苦参碱;复方苦参素胶囊;经典恒温法

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2005)-0020-05

作者简介:丁青龙(1953-),男,副主任药师,硕士生导师。

Tel:(0519)8123781,E-mail: DingQL2004@163.com