

动态浊度法测定注射用比阿培南细菌内毒素的含量

苏静*,张艳,苗佩宏,厉青(武警浙江省总队医院药剂科,浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2134-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.43

摘要 目的:建立测定注射用比阿培南细菌内毒素含量的方法。方法:采用动态浊度法,确定细菌内毒素检查的标准曲线及稀释倍数,通过干扰试验确定样品质量浓度测定范围,并对样品的细菌内毒素进行定量测定。结果:比阿培南质量浓度在0.062 5~0.25 mg/ml范围内对试验无干扰,细菌内毒素的回收率在50%~200%之间,比阿培南中的内毒素含量可定量测定。结论:动态浊度法可用于注射用比阿培南细菌内毒素的定量检测。

关键词 注射用比阿培南;细菌内毒素;动态浊度法

Content Determination of the Bacterial Endotoxin of Biapenem for Injection by Kinetic Turbidimetric Limulus Test

SU Jing, ZHANG Yan, MIAO Pei-hong, LI Qing (Dept. of Pharmacy, Zhejiang Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the content of bacterial endotoxin of Biapenem for injection. METHODS: Kinetic turbidimetric method was adopted to determine the standard curve and dilution of test sample. The interference test was used to determine the testing range of samples' concentration and the quantification. RESULTS: There was no interference when the concentration of biapenem was in the range of 0.062 5-0.25 mg/ml, the recovery of endotoxin was 50%-200% and the content of endotoxin could be quantitatively determined. CONCLUSIONS: Kinetic turbidimetric limulus test can be used for the quantitative determination of bacterial endotoxin of Biapenem for injection.

KEYWORDS Biapenem for injection; Bacterial endotoxin; Kinetic turbidimetric limulus test

比阿培南是新型碳青霉烯类抗菌药物,可通过抑制细菌细胞壁的合成而发挥抗菌作用,对革兰阳性、革兰阴性的需氧和厌氧菌有广谱抗菌活性。比阿培南耐受性好、不良反应少,临床用于治疗由敏感细菌所引起的败血症、肺炎、肺脓肿,慢性呼吸道疾病引起的继发感染,复杂性膀胱炎,肾盂肾炎,腹膜炎,子宫旁结缔组织炎等^[1-3]。目前,我国药典尚未收载比阿培南,其热原或细菌内毒素的检查方法也未见报道。笔者参照2010年版《中国药典》(二部)中细菌内毒素检查法中的动态浊度法^[4],对注射用比阿培南的细菌内毒素进行定量检测,通过预干扰试验和回收率试验,探索比阿培南的细菌内毒素定量检测法,以期实现对本品科学、快捷、灵敏的质量检测。

1 材料

BET-32细菌内毒素检测仪(天大天发科技有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);注射用比阿培南(正大天晴药业集团股份有限公司,批号:121228、130127、130130,规格:300 mg/支);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:201220,规格:160 EU/支);细菌内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司,批号:1212010,规格:5 ml/支);动态比浊法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1203020,规格:1.25 ml/支,可测内毒素范围0.01~10 EU/ml)。

2 方法与结果^[4-6]

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0573-83600280。
E-mail:su7611@126.com

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定

根据药品的L的计算公式, $L=K/M$,式中 $K=5 \text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, $M=$ 人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量,成人质量按60 kg计算。参照比阿培南药品说明书^[7],注射用比阿培南临床使用最大剂量为10 mg/(kg·h)。据此计算,注射用比阿培南的L为0.5 EU/mg。

2.2 最大有效稀释倍数(MVD)的确定

取注射用比阿培南1支,加细菌内毒素检查用水5 ml溶解后,得比阿培南质量浓度(c)为60 mg/ml。根据2010年版《中国药典》(二部)附录^[4]要求制备细菌内毒素工作标准品稀释液,选择4倍稀释,即标准曲线浓度为2.0、0.5、0.125、0.031 25 EU/ml,标准曲线最低浓度(λ)为0.031 25 EU/ml。供试品的 $MVD=L\times c/\lambda=(0.5 \text{ EU}/\text{mg}\times 60 \text{ mg}/\text{ml})/0.031 25 \text{ EU}/\text{ml}=960$ 倍,即最小有效稀释质量浓度为0.062 5 mg/ml。

2.3 细菌内毒素标准曲线的建立和可靠性分析

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,使其最终细菌内毒素浓度分别为2.0、0.5、0.125、0.031 25 EU/ml。各取0.1 ml,分别置于预先加有0.1 ml鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入BET-32型细菌内毒素检测仪内进行检测,每个浓度重复3管;同时做阴性对照(NC)。以细菌内毒素质量浓度的对数(lgc)为横坐标、平均反应时间的对数(lgt)为纵坐标绘制标准曲线,得细菌内毒素的回归方程为 $\lg t=-0.269 3 \lg c+2.848 1$ ($r=-0.991 2$,绝对值应大于0.980),平行管之间的RSD均小于10%,阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,细菌内毒素标准曲线成立,结果见表1。

表1 细菌内毒素标准曲线及可靠性(n=3)

Tab 1 Standard curve and validity of bacterial endotoxin (n=3)

细菌内毒素浓度, EU/ml	反应时间, s	平行管RSD, %
2.0	585	2.38
0.5	850	2.77
0.125	1234	5.93
0.031 25	1792	5.15
NC	>3 600	0

2.4 预干扰试验

根据标准曲线细菌内毒素浓度的设置,选择0.25 EU/ml作为 λ_m (标准曲线中点浓度)。取样品(批号:121228)适量,加细菌内毒素检查用水溶解并制成质量浓度为60 mg/ml的溶液,再进一步稀释120、240、480、960倍,即得相应质量浓度分别为0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml的溶液,作为供试品溶液(A液);同时制备含上述供试品质量浓度及含细菌内毒素浓度为 λ_m (0.25 EU/ml)的溶液(B液)。分别取上述A、B液各0.1 ml,置于预先加有0.1 ml鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入BET-32细菌内毒素检测仪内进行测定,每个浓度重复2管。测定结束后,按标准曲线回归方程分别计算A液和B液细菌的内毒素含量,并计算该试验条件下的回收率(R)。

结果显示,A液质量浓度为0.5 mg/ml时,B液回收率低于50%;A液质量浓度为0.25、0.125、0.062 5 mg/ml时,B液回收率分别为101%、93%、88%,均在50%~200%范围内。故选用质量浓度为0.25 mg/ml的供试品液进行样品定量测定。

2.5 供试品细菌内毒素测定

取3批样品,按照上述预干扰试验下的方法制备质量浓度为0.25 mg/ml的A液和B液,每个浓度平行2管,依法检查,根据标准曲线计算回收率和样品中细菌内毒素含量。结果,B液的回收率均在50%~200%范围内,3批样品中细菌内毒素平均含量为0.042 EU/mg,检查结果符合规定,详见表2。

表2 3批样品预干扰试验及样品细菌内毒素含量测定结果

Tab 2 Results of interference test and the content determination of bacterial endotoxin in 3 batches of samples

批号	样品质量浓度, mg/ml	A液测定值, EU/ml	样品细菌内毒素含量, EU/mg	B液测定值, EU/ml	B液回收率, %
121228	0.5	0.013 4	0.006 8	0.148 8	27
	0.25	0.012 6	0.050 4	0.265 4	101
	0.125	0.007 2	0.057 6	0.240 1	93
	0.062 5	0.002 8	0.044 8	0.221 9	88
121228	0.25	0.011 5	0.046 0	0.259 8	99
130127	0.25	0.009 7	0.038 8	0.268 5	104
130130	0.25	0.010 3	0.041 2	0.251 2	96

3 讨论

药品细菌内毒素检查是一种限度试验,首先必须确定供试品中的L。当供试品中的细菌内毒素高于这个限值时,就会

引起热原反应。因此,各国药典对于药品细菌内毒素检查限值的计算均进行了明确规定。我国目前细菌内毒素检查所使用的方法多为凝胶限值法,其检验结果可判断产品中的细菌内毒素含量是否超标,但无法测定准确的含量。随着鲎试验方法的测定仪器的不断改进,细菌内毒素测定已向微量量化的方向发展^[8]。

动态浊度法是最常用的定量测定方法之一,通过测定反应溶液达到规定浊度所需的时间或测定溶液自身的浊度变化率来定量测定样品中细菌内毒素含量。该方法操作简单、快捷、灵敏度高、检测范围宽。动态浊度法的干扰试验以样品中外加的细菌内毒素的回收率进行判断,若回收率在50%~200%之间,可认为样品溶液对试验无干扰。本研究采用动态浊度法对注射用比阿培南中的细菌内毒素进行了测定,结果表明,样品质量浓度在0.062 5~0.25 mg/ml时对试验无干扰作用;选用质量浓度为0.25 mg/ml的供试品液进行定量测定,3批样品的细菌内毒素平均含量为0.042 EU/mg,检查结果符合规定。因此,用动态浊度法来定量测定注射用比阿培南中细菌内毒素含量的方法是可行的。

参考文献

- [1] Malanoski GJ, Collins L, Wennersten C, et al. In vitro activity of biapenem against clinical isolates of Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(9): 2 009.
- [2] Motohiro T, Handa S, Yamada S, et al. Bacteriological, pharmacokinetic and clinical studies on biapenem (L-627) in the pediatric field[J]. *Jpn J Antibiot*, 1994, 47(12): 1 728.
- [3] Kurihara Y, Kizu J, Hori S. Simple and rapid determination of serum carbapenem concentrations by high-performance liquid chromatography[J]. *J Infect Chemother*, 2008, 14(1): 30.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录99.
- [5] 李树徐. 注射用顺苯磺酸阿曲库铵细菌内毒素检测动态浊度法的研究[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(2): 340.
- [6] 祝清芬, 魏霞. 动态浊度法测定多西他赛注射液细菌内毒素的含量[J]. *中国药房*, 2011, 22(1): 54.
- [7] 正大天晴药业集团股份有限公司. 注射用比阿培南说明书[S]. 2010-11-02.
- [8] 郭萌, 李冠民, 黄清泉. 细菌内毒素研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 397.

(收稿日期: 2014-06-12 修回日期: 2014-08-21)

(编辑: 余庆华)