

## 诺氟沙星葡萄糖注射液细菌内毒素检查法研究

王璐, 刘勤, 王玮

(云南省食品药品监督检验研究院, 昆明 650106)

**摘要 目的:**建立凝胶法和光度法测定诺氟沙星葡萄糖注射液中细菌内毒素的方法。**方法:**按《中国药典》2015年版四部1143检查法,采用凝胶限量法和动态浊度法进行实验和结果判断。**结果:**拟定每1 mg诺氟沙星中含内毒素的量应小于0.75 EU,诺氟沙星葡萄糖注射液24倍稀释后对细菌内毒素检查法无干扰作用,即最大不干扰浓度为 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:**该品种采用细菌内毒素检查法代替热原检查法控制质量,方法可行。

**关键词:**诺氟沙星葡萄糖注射液;细菌内毒素;质量标准提高

**中图分类号:**R 921.2      **文献标识码:**A      **文章编号:**1009-3656(2019)-6-0000-0

**doi:**10.19778/j.chp.2019.06.00?

## Research on bacterial endotoxin test of norfloxacin and glucose injection

WANG Lu, LIU Qin, WANG Wei

(Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106, China)

**Abstract Objective:** To establish the gel-clot method and photometric method for bacterial endotoxin test in Norfloxacin and Glucose Injection. **Methods:** As per ChP 2015. Vol IV:1143, the test was carried on and the result as judged by the gel clot method and kinetic turbidimetric method. **Results:** The limit was set as 0.75 EU per 1 mg Norfloxacin. There was no interference in the bacterial endotoxin test when Norfloxacin and Glucose Injection was diluted 24 times. Maximum non-interference concentration of Norfloxacin and Glucose Injection for bacterial endotoxins test was  $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . **Conclusions:** It is feasible to substitute pyrogen test with bacterial endotoxin test for quality control of Norfloxacin and Glucose Injection.

**Key words:** Norfloxacin and Glucose Injection; bacterial endotoxins; standard improvement

诺氟沙星葡萄糖注射液由诺氟沙星和葡萄糖两种成分组成的复方制剂,该剂型为我国独有剂型,适用于敏感菌所致的呼吸道感染、尿路感染、淋病、前列腺炎、肠道感染和伤寒及其他沙门菌感染,该品种是2018年我院承担的国家评价性抽验品种,目前市场上仅有一家生产企业的产品流通。诺氟沙星葡萄糖注射液现行标准为WS<sub>1</sub>-(X-088)-2002Z,其中收载了热原检查项,但细菌内毒素检查法与热原检查法相比较具有灵敏度高、重现性好、标准化实验过程

短,可完成多批次样品检测,且符合3R原则等优点<sup>[1-2]</sup>,本研究进行了细菌内毒素干扰实验,探讨是否能将热原检查法转化为细菌内毒素检查法。

### 1 试验材料

#### 1.1 试药

##### 1.1.1 鲎试剂

鲎试剂(tachypleusamebocyte lysate TAL)批号1801171, $\lambda = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,规格0.1 L/Amp;批号

1805191,  $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格 0.1 mL/Amp, 批号 1712141,  $\lambda = 0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格 0.1 mL/Amp 湛江博康海洋生物有限公司; 批号 1804021,  $\lambda = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格 0.1 mL/Amp; 批号 1611182, 检测范围: 10 ~ 0.03  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格 1.25 mL/Amp 湛江安度斯生物有限公司, 鲎试剂的灵敏度用  $\lambda$  表示。

### 1.1.2 细菌内毒素

检查用水细菌内毒素检查用水 (water for bacterial endotoxins test WBET) 批号 1804090, 规格 50 mL/瓶, 湛江安度斯生物有限公司; 批号 1803230, 规格 50 mL/瓶, 湛江博康海洋生物有限公司。

### 1.1.3 细菌内毒素

工作标准品细菌内毒素工作标准品 (control standard endotoxin CSE) 批号 201478, 规格 80 EU/Amp; 批号 201478, 规格 80 EU/Amp 中国食品药品检定研究院。

### 1.1.4 供试品

诺氟沙星葡萄糖注射液, 规格 100 mL: 诺氟沙

星 0.2 g 与葡萄糖 5 g, 湖南科伦制药有限公司, 批号分别为 K17110501、K17080201、K17100902、K17100901、K17010802、K18022002、K17080202、K17100903、K18032601、K18032602、K18010802、K18022001、K18022004。

### 1.2 仪器

电热恒温鼓风干燥箱, 德国 Binder; ZH-2 型旋涡混合器, 天津药典标准仪器厂; SUB 28 型恒温水浴, Grant Instruments Ltd; BET-72 细菌内毒素测定仪, 天津市天大天发科技有限公司。

## 2 试验方法与结果

### 2.1 细菌内毒素检查凝胶法研究<sup>[3-4]</sup>

#### 2.1.1 TAL 灵敏度复核

按《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版四部 1143 细菌内毒素检查法“鲎试剂灵敏度复核试验”项下规定进行, 结果均符合规定, 结果见表 1, 阴性对照 (negative control NC)。

表 1 TAL 灵敏度复核结果

Tab. 1 Test results of confirmation of labeled lysate sensitivity

鲎试剂批号 (TALbatch)	$\lambda$ ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	细菌内毒素浓度 (bacterial endotoxin concentration) / ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					C	结果 (result) / ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
		0.062 5	1	0.5	0.25	0.125		
1804021	0.5	++++	++++	----	----		--	0.5
1801171	0.5	++++	++++	----	----		--	0.5
1805191	0.25		++++	++++	----	----	--	0.25

### 2.1.2 细菌内毒素限值 L 的确立及最大有效稀释倍数 (Maximum valid dilution, MVD) 的计算<sup>[5]</sup>

诺氟沙星葡萄糖注射液内毒素限值 L 的确定: 本品临床用法为静脉滴注, 最大用量为一次 0.2 ~ 0.4g, 一日 2 次, 故 L 值计算如下:

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5 \text{ EU/kg} \cdot \text{h}}{400 \text{ mg}/60 \text{ kg} \cdot \text{h}} = 0.75 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$$

按公式  $MVD = CL/\lambda$  计算,  $L = 0.75 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,  $\lambda$  为 TAL 标示灵敏度, 以  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  表示, 目前常用 TAL 最高灵敏度为  $0.03125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 诺氟沙星葡萄糖注射液的浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 则试验时诺氟沙星葡萄糖注射液的 MVD 为 48 倍。

### 2.2 干扰试验预试验

用 WBET 对 2 批诺氟沙星葡萄糖注射液分别进行稀释, 使稀释倍数分别为 1.5、3、6、12、24、48 倍得到供试品阴性对照 (negative product control NPC, 只含相应浓度的供试品), 取相应浓度样品稀释液

加入  $4\lambda$  及  $0.5\lambda$  内毒素溶液等比混合, 得到供试品阳性对照 (positive product control PPC), 内毒素浓度为  $2\lambda$  和  $0.25\lambda$  的供试品溶液), 取 TAL (批号 1801171,  $\lambda: 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与上述系列溶液进行反应, 每一浓度重复 2 管。结果见表 2。

通过对这 2 批样品进行干扰实验预实验, 由表 2 干扰试验预试验结果可初步了解, 供试品液稀释到 24 倍后加入  $2\lambda$  内毒素液的各实验管均呈阳性, 加入  $0.25\lambda$  内毒素液的各实验管均呈阴性, 表明本品 24 倍稀释后即可能对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用, 此时供试品溶液浓度为  $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 可选择不高于此浓度进行正式干扰实验, 故正式干扰实验选择供试品 24 倍稀释液进行。

### 2.3 正式干扰试验

按《中国药典》2015 年版四部 1143 细菌内毒素检查法“供试品干扰试验”项下规定进行, 将湖南科伦制药有限公司的 4 批诺氟沙星葡萄糖注射液分别

用 WBET 稀释 24 倍,将中间 12 倍供试品稀释液与细菌内毒素标准品溶液  $4\lambda$ 、 $2\lambda$ 、 $1\lambda$ 、 $0.5\lambda$  等比混合,得到含细菌内毒素浓度为  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$ 、 $0.25\lambda$  的供试品 24 倍稀释液,用鲎试剂(批号 1804021,  $\lambda$  为

$0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行实验,结果见表 3,用鲎试剂(批号 1805191,  $\lambda$  为  $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行实验,供试液反应终点浓度的几何平均值用  $E_t$  表示,鲎试剂反应终点浓度的几何平均值用  $E_s$  表示,结果见表 4。

表 2 干扰试验预试验测定结果

Tab. 2 The interference pretest results

供试品批号 (sample batch)		稀释倍数(dilution times)				
		3	6	12	24	48
K18010802	PPC( $2\lambda$ )	--	++	++	++	++
	PPC( $0.25\lambda$ )	--	--	--	--	--
	NPC	--	--	--	--	--
K18032601	PPC( $2\lambda$ )	--	--	--	++	++
	PPC( $0.25\lambda$ )	--	--	--	--	--
	NPC	--	--	--	--	--

表 3 正式干扰试验结果

Tab. 3 The interference test results

鲎试剂批号 (TALbatch)	细菌内毒素浓度(bacterial endotoxin concentration)/( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				NPC	NC	结果(result) ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
	1.0	0.5	0.25	0.125			
K17100903	++++	++++	-----	-----	--	--	0.5( $E_t$ )
K17080201	++++	++++	-----	-----	--	--	0.5( $E_t$ )
K18032601	++++	-----	-----	-----	--	--	1( $E_t$ )
K18010802	++++	++++	-----	-----	--	--	0.5( $E_t$ )
WBET	++++	++++	-----	-----	--	--	0.5( $E_s$ )

表 4 正式干扰试验结果

Tab. 4 The interference test results

鲎试剂批号 (TALbatch)	细菌内毒素浓度(bacterial endotoxin concentration)/( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )				NPC	NC	结果(result) ( $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
	0.5	0.25	0.125	0.0625			
K17100903	++++	++++	-----	-----	--	--	0.25( $E_t$ )
K17080201	++++	++++	-----	-----	--	--	0.25( $E_t$ )
K18032601	++++	-----	-----	-----	--	--	0.5( $E_t$ )
K18010802	++++	++++	-----	-----	--	--	0.25( $E_t$ )
WBET	++++	++++	-----	-----	--	--	0.25( $E_s$ )

正式干扰实验结果:鲎试剂  $E_s$  均在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$  范围内,诺氟沙星葡萄糖注射液作 24 倍稀释后,对两个不同批号不同厂家的的鲎试剂  $E_t$  均在  $0.5E_s \sim 2E_s$  范围内,可认为本品 24 倍稀释后对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用。

### 3 诺氟沙星葡萄糖注射液细菌内毒素检查

#### 3.1 凝胶限量法

分别取 8 个批号的诺氟沙星葡萄糖注射液,用鲎试剂(批号 1712141,  $\lambda = 0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),按《中国药典》2015 年版四部 1143 细菌内毒素检查法,按限值  $0.75 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$  进行检查,阳性对照(positive control PC),结果见表 5,8 批样品均符合规定。

#### 3.2 细菌内毒素检查定量法研究

细菌内毒素限值 L 的确立及最大有效稀释倍

数(MVD)的计算同上述凝胶法。把细菌内毒素工作标准品稀释为0.24、0.12、0.06、0.03 EU·mL<sup>-1</sup>四个浓度,做4个点的标准曲线,相关系数大于0.98,变异系数小于10%时符合要求,实测内毒素均低于检测限。用WBET对6批诺氟沙星葡萄糖注射液做48倍稀释,取中间24倍稀释液与浓度为0.24 EU·mL<sup>-1</sup>的细菌内毒素标准品溶液等比混合得供试品阳性溶液,即加入已知的内毒素为标准曲线的中间浓度0.12 EU·mL<sup>-1</sup>,结果见表6,结果显示,样品稀释48倍时回收率在75%~98%之间(药典规定回收率应在50%~200%之间),即获得了较为理想的回收率。

表6 定量法细菌内毒素检查结果

Tab. 6 The test results of bacterial endotoxin by kinetic turbidmetric method

批号 (batch)	稀释倍数 (dilution factor)	内毒素浓度 (endotoxin concentration)/ (EU·mL <sup>-1</sup> )	CV/ %	回收率 (recovery) / %	实测内毒素 (actual determination endotoxin) / (EU·mL <sup>-1</sup> )	结果 (result) / (EU·mg <sup>-1</sup> )
1 K18032601	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	3.47	98	0.117 8	
2 K18032602	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	7.49	76	0.091 4	
3 K18010802	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	3.61	93	0.1123	
4 K18022001	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	1.19	80	0.097	
1 K18022002	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	4.18	75	0.091	
1 K18022004	48	/	/	/	<0.03	<0.75
	48	0.12	4.72	82	0.099 3	

## 4 讨论

### 4.1 分析

细菌内毒素检查法是用鲎试剂与细菌内毒素产生凝聚反应的机制,以判断供试品中细菌内毒素是否符合规定的一种方法。目前,美国药典绝大多数品种已完成内毒素检查替代热原检查的修订。英国、日本也正在收集这一替代过程数据,我国也在加速进行实验研究,以建立更多药品注射液的细菌内毒素检查方法。细菌内毒素检查法药典收载有凝胶法和光度法两种。凝胶法是一限量实验,操作简便,主要为检验机构判定供试品细菌内毒素限值是否合格的检验手段。光度法是一定量实验,主要为药品生产企业采用,可定量供试品中含有的细菌内毒素值,以提高生产质量用。诺氟沙星葡萄糖注射液目

表5 凝胶法细菌内毒素检查结果

Tab. 5 The test results of bacterial endotoxin by gel-clot method

批号 (batch)	供试品 (test sample)	PPC	PC	NC
K17110501	--	++	++	--
K17080201	--	++		
K17100902	--	++		
K17100901	--	++		
K17010802	--	++		
K18022002	--	++		
K17080202	--	++		
K17100903	--	++		

前市场上只有湖南科伦制药有限公司产品流通,现行质量标准中热原检查项家兔的注射剂量为12 mL·kg<sup>-1</sup>,即不符合3R原则<sup>[2]</sup>又使得实验较麻烦,我们对国家评价性抽验中该企业不同批号的4批样品,使用不同生产产家和不同灵敏度的鲎试剂进行了干扰试验,结果显示,诺氟沙星葡萄糖注射液高浓度对于鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应有干扰(抑制)作用,经稀释后可以排除。正式干扰实验结果显示,对诺氟沙星葡萄糖注射液作24倍稀释后,Es均在0.5λ~2λ范围内,且Et也均在0.5Es~2Es范围内,即24倍稀释后供试品浓度对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰作用。除采用凝胶法进行细菌内毒素检查,亦可在450 nm波长处用分光光度法进行细菌内毒素检查。我们对6批样品采用分光光度

法进行细菌内毒素检查,8批样品采用凝胶法进行细菌内毒素检查,所有检查结果与热原检查结果一致,均符合规定。

#### 4.2 结论

该药采用细菌内毒素检查法代替热原检查法,方法可行。拟定标准为:【细菌内毒素】取本品,依法检查(通则 1143),每 1 mg 诺氟沙星中含内毒素的量应小于 0.75 EU。

#### 参考文献

- [1] 甄晓兰,崔晓燕,郭永辉. 苯巴比妥钠注射液细菌内毒素检查法标准研究[J]. 中国药品标准 2017,18(5):394  
ZHEN XL, CUI XY, GUO YH. Study on bacterial endotoxin test of Phenobarbital Sodium injections [J]. Drug Stand China, 2017, 18(5):394
- [2] 张虞婷,丁苏苏,李倚云. 细菌内毒素的研究进展及其检查法的应用[J]. 天津药学,2015, 27(5):69  
ZHANG YT, DING SS, LI YY. The research progress and application in the test of bacterial endotoxin [J]. Tianjin Pharm, 2015, 27(5):69
- [3] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:1143  
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015:1143
- [4] 中国药品生物制品检定所中国药品检验总所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:310  
National Institutes for Drug and Biologic Control. Standard Operating Norms of Chinese Drug Control [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010:310
- [5] 唐元泰. 关于注射剂细菌内毒素检查限值的确定[J]. 中国药品标准,2003,4(4):5  
TANG YT. Establishment of limit to bacterial endotoxin in injections [J]. Drug Stand China, 2003, 4(4):5

(收稿日期:2019-03-12)