

# 注射用阿奇霉素中细菌内毒素检验方法的优化

宗序玲<sup>1</sup>, 施炎炎<sup>2</sup>, 苏健<sup>2\*</sup>

(1. 如皋市人民医院药学部, 南通 226500; 2. 南通市食品药品监督检验中心, 南通 226000)

**摘要:目的** 排除细菌内毒素检查中部分厂家生产的注射用阿奇霉素对鲎试剂凝集的干扰, 使细菌内毒素检验方法切实可行。**方法** 采用《中华人民共和国药典》2020年版四部 1143 细菌内毒素检查一法凝胶法, 系列干扰实验证明, 采用一般方法细菌内毒素检查法时, 使用细菌内毒素检查用水溶解注射用阿奇霉素, 溶液干扰鲎试剂凝集, 而用细菌内毒素检查用水稀释样品的过程中使用适量 Tris 缓冲溶液, 通过干扰试验可见, 溶液对灵敏度为 0.06 EU/mL 鲎试剂无干扰。**结果** 实验表明, 按一般方法细菌内毒素检查法, 注射用阿奇霉素对鲎试剂凝集有干扰, 用细菌内毒素检查用水稀释注射用阿奇霉素的过程中使用适量 Tris 缓冲溶液可去除注射用阿奇霉素对鲎试剂凝集的实验干扰。**结论** 用细菌内毒素检查用水稀释注射用阿奇霉素的过程中使用适量 Tris 缓冲溶液和鲎试剂灵敏度 0.06 EU/mL, 方法准确可靠。

**关键词:** 注射用阿奇霉素; 凝胶法; 干扰试验

## 0 引言

注射用阿奇霉素属于抗生素, 可杀灭多种细菌, 用于治疗敏感病原菌株及沙眼衣原体等引起的感染, 如支气管炎、肺炎、盆腔炎<sup>[1]</sup>。《中华人民共和国药典》<sup>[2]</sup>2020年版二部标准规定细菌内毒素检查的限度为每 1 mg 阿奇霉素中含内毒素的量应小于 0.30 EU, 药检工作中总结: 部分药企的注射用阿奇霉素采用一般方法检验细菌内毒素, 实验过程中发现, 含供试品的阳性对照管未凝集, 而阳性对照管凝集, 不符合药典规定, 给产品出厂销售造成影响。笔者通过查阅资料, 对可能造成干扰的因素进行分析, 成功优化了注射用阿奇霉素的细菌内毒素检查方法<sup>[3]</sup>, 使该检查法可靠准确, 对于确保药品安全性和有效性至关重要, 保障了注射剂的品质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

et- 九六内毒素凝胶检测仪, 天津大学天发科技公司。DHG-9240A 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。CubicD-M10101002D 涡旋混合仪, 广州国睿科学仪器有限公司。经 250°C 30 min 干燥处理的试管。定量移液器。注射用阿奇霉素, 规格 250 mg, 批号 C2204222、

C2205112、C2207193, 浙江亚太药业股份有限公司。鲎试剂: ①灵敏度 0.25 EU/mL, 规格 0.1 mL, 批号 2406034, 湛江市博康海洋生物有限公司; ②灵敏度 0.125 EU/mL, 规格: 0.65 mL, 批号 2205250, 湛江市安度斯生物有限公司; ③灵敏度 0.06 EU/mL, 规格 0.1 mL, 批号 2311132, 湛江市博康海洋生物有限公司; ④灵敏度 0.03 EU/mL, 规格 0.65 mL, 批号 2304202, 湛江市安度斯生物有限公司; ⑤灵敏度 0.06 EU/mL, 规格 0.1 mL, 批号 2407012, 湛江市安度斯生物有限公司。细菌内毒素工作标准品: 批号 150601-202190, 每支装 70 EU, 中华人民共和国食品药品检定研究院。细菌内毒素检查用水(WBET), 批号 2302210, 每瓶装 50 mL, 湛江市安度斯生物有限公司。Tris 缓冲溶液: 湛江市安度斯生物有限公司, 批号 2403120, 规格 4 mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 复检鲎试剂灵敏度试验

按《中华人民共和国药典》2020年版四部 1143 细菌内毒素检查方法, 将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解为灵敏度的 2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ 四个浓度后与对应鲎试剂混合, 试验实验可见, 所有进行复核的各批次鲎试剂其复核值(λ<sub>c</sub>)全部在 0.5λ~2.0λ(包括 0.5λ 和 2.0λ)的对应范围内, 该鲎试剂灵敏度复核试验均符合药典规定<sup>[4]</sup>。

第一作者: 宗序玲, 副主任药师, 研究方向为药剂学。

\* 通信作者: 苏健, 副主任药师, 研究方向为药品质量检定及质量标准。E-mail: 850785660@qq.com

### 1.2.2 一般方法的干扰实验

采用灵敏度为 0.25、0.125、0.06、0.03 EU/mL 的鲎试剂, 用细菌内毒素检查用水将注射用阿奇霉素溶解, 按  $c=\lambda/L$ , 即对应的最小有效稀释浓度分别为 0.833, 0.417, 0.208, 0.104 mg/mL, 取这些稀释液将细菌内毒素工作标准品制备 2 $\lambda$ 、1 $\lambda$ 、0.5 $\lambda$ 、0.25 $\lambda$  浓度的梯度溶液 (共 64 份, 平行做四管), 进行干扰试验, 并做梯度溶液和检查用水的阴性对照<sup>[5]</sup>。

### 1.2.3 优化方法样品稀释液干扰试验

细菌内毒素检查用水溶解注射用阿奇霉素过程中添加适量的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲溶液<sup>[6-7]</sup>, 采用鲎试剂灵敏度为 0.06 EU/mL, 依据公式  $MVC=\lambda L^{-1}$ , 最低有效溶解浓度为  $0.06/0.3=0.2$  mg/mL, 同时制备组别梯度溶液 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mg/mL 后, 进行干扰实验 (NPC), 同时配制该组别梯度溶液的细菌内毒素 2 $\lambda$  样品溶液 (PPC), 使用两个生产企业的灵敏度为 0.06 EU/mL 的鲎试剂, 加入细菌内毒素检查用水将其溶解, 再与各组别梯度的 NPC 和 PPC 溶液反应, 并进行阴性对照 (NC) 和阳性对照 (PC), 37°C 60 min 后查看结果<sup>[8]</sup>。

### 1.2.4 正式干扰试验

使用灵敏度为 0.06 mg/mL 的鲎试剂 (两个不同企业生产), 用细菌内毒素检查用水溶解注射用阿奇霉素过程中添加适量的 Tris 缓冲溶液, 将注射用阿奇霉素稀释成 0.2 mg/mL 的溶液, 同时做样品溶液的阴性对照和阴性对照, 进行干扰试验, 结果表明, 各批号反应终点的几何平均值均在 0.5~2.0  $\lambda$  范围内, 判定供试品在该浓度时符合药典规定的干扰试验操作要求<sup>[9]</sup>。

将三个不同批号的注射用阿奇霉素用添加适量 Tris 缓冲溶液的细菌内毒素检查用水稀释为 0.2 mg/mL 的溶液, 用此浓度溶液将细菌内毒素稀释为 0.06、0.03、0.015、0.0075 mg/mL 四个浓度的溶液, 并且与灵敏度为 0.06 mg/mL 的鲎试剂 (两个不同企业生产) 进行反应,

同时做样品溶液的阴性对照和阴性对照, 进行多批次供试品和多批号鲎试剂的多次干扰试验, 结果表现为: 三个不同批号的样品溶液的反应终点的几何平均值都在 0.5~2.0 $\lambda$  范围内, 供试品阴性对照组和阴性组对照全部阴性<sup>[10]</sup>。

### 1.2.5 供试品检查

按《中华人民共和国药典》2020 年版四部 1143 细菌内毒素检查法, 随机取 3 批注射用阿奇霉素, 将注射用阿奇霉素用添加适量 Tris 缓冲溶液的细菌内毒素检查用水稀释为 0.2 mg/mL 的溶液, 用灵敏度为 0.06 mg/mL 的鲎试剂, 实验结果表明, 供试品阳性管正常凝聚, 其他各管均正常反应, 均为合格供试品, 结果满意。

## 2 结果与分析

正式干扰试验的结果表明, 两个不同厂家鲎试剂的 Et 值均在 0.5~2.0 Es 范围内, 判定供试品在该浓度时符合药典的干扰试验规定。三个不同批号的样品溶液的 Et 值都在 0.5~2.0 Es 范围内, 符合鲎试剂的试验要求, 供试品阴性对照组和阴性组对照全部阴性, 判定为此浓度下的溶液无干扰现象, 该方法切实可行。供试品检查显示对实验均无干扰, 重复性良好, 实验结果满意。灵敏度复核试验结果见表 1。

一般方法的干扰实验的细菌内毒素梯度浓度干扰实验结果可见: 供试品阴性对照和阴性对照为阴性, 细菌内毒素梯度溶液管中鲎试剂与对应内毒素溶液全未凝集, 与鲎试剂灵敏度的复核实验规定不符合, 判定为样品梯度稀释溶液均对实验有干扰, 有必要通过其他有效方法进行干预, 才能使实验顺利进行; 从表 2 结果可见, 细菌内毒素检查用水稀释注射用阿奇霉素过程中添加适量的 Tris 缓冲溶液, 将注射用阿奇霉素稀释成 0.2 mg/mL 以下浓度时, 无干扰鲎试剂凝集现象, 确定正式干扰试验用浓度为 0.2 mg/mL 的溶液进行试验, 见表 2。

表 1 复核鲎试剂灵敏度试验结果

鲎试剂灵敏度 标示值 EU/mL	批号	细菌内毒素浓度/(EU/mL)						NC	$\lambda/L$ (EU/mL)
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015		
0.25	2406034	++++	++++	-----	-----			---	0.25
0.125	2205250		++++	++++	-----	-----		---	0.125
0.06	2311132			++++	++++	-----	-----	---	0.06
0.06	2407012			++++	++++	-----	-----	---	0.06
0.03	2304202				++++	++++	-----	---	0.03

表 2 干扰预试验结果

鲎试剂批号	供试品批号	项目	供试品各稀释液浓度/(mg/mL)					NC/PC
			0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	
2311132	C2204222	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++
2311132	C2205112	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++
2311132	C2207193	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++
2407012	C2204222	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++
2407012	C2205112	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++
2407012	C2207193	NPC	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++

### 3 讨论与结论

本文通过对注射用阿奇霉素细菌内毒素检查方法的改进,发现了该注射剂的细菌内毒素检查按常规方法存在干扰,必须进行方法学的优化,才能使方法准确,以确保注射剂的安全性,减少药品上市的安全性风险,排除人民群众的用药安全隐患,从源头上严控药品质量,保证人民用药安全,建议新版的该检查项目的药品标准应进行改进,以优化的药品标准中欠缺之处。

Tris 缓冲溶液作为一种广泛使用的生物化学试剂,在实验室内发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。它是一种两性离子,具有良好的缓冲范围,在 pH 7~9 之间表现出稳定的缓冲性能,这使得 Tris 缓冲溶液在多种实验条件下都能维持溶液的稳定 pH 值,可以正常保持鲎试剂凝集时的 pH 6.0~8.0,以维持鲎试剂的有效凝集反应<sup>[12]</sup>。采用一般方法实验,注射用阿奇霉素影响细菌内毒素与多种标示灵敏度的鲎试剂的凝集反应,由正式干扰试验表明,采用在稀释注射用阿奇霉素的过程中添加 Tris 缓冲溶液为稀释剂,供试品稀释为 0.2 mg/mL 时对两生产企业的鲎试剂都没有影响作用,实验表明了此方法的可靠性,对于生产注射用阿奇霉素的企业要加强这方面的管控,以提升注射剂的生物安全性。

### 参考文献

[1] 路小丽. 注射用阿奇霉素治疗儿童肺炎的效果研究[J]. 中

国社区医师, 2023, 39(8): 22-24.

- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版四部[M]. 北京: 中华人民共和国医药科技出版社, 2020: 178-180.
- [3] 张昇昉, 葛泽勋, 刘畅, 等. 左乙拉西坦原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(6): 622-626.
- [4] 王燕妮, 蒋惠源, 罗亦灵, 等. 凝胶法检查地舒单抗注射液细菌内毒素的可行性研究[J]. 中国药品标准, 2024, 25(6): 590-595.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 614-620.
- [6] 黄宪, 莫玉焕. 盐酸维拉帕米(注射用)细菌内毒素检查方法建立[J]. 中国药业, 2025, 34(1): 73-77.
- [7] 周晓兵, 孙艳, 王羽凝, 等. 注射用阿奇霉素的细菌内毒素检查法[J]. 中国药业, 2008, 17(11): 32-33.
- [8] 陈青连, 姚振, 冯雅. 苯磺顺阿曲库铵注射液细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业, 2019, 28(9): 42-46.
- [9] 郝钢, 张莉芳, 武星, 等. 盐酸倍他司汀注射液细菌内毒素方法学研究[J]. 中国药品标准, 2024, 25(1): 82-89.
- [10] 钟俊杰. 用三羟甲基氨基甲烷缓冲液配制谷丙转氨酶基质溶液的探讨[J]. 江西医药, 1981, 16(1): 47.
- [11] 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): 340-344.
- [12] 苑艳飞, 刘广文, 张德奎, 等. 注射用三磷酸胞苷二钠细菌内毒素检查法的研究[J]. 食品与药品, 2024, 26(2): 162-165.