

## 硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液细菌内毒素检查法的建立

王凡<sup>1</sup> 王小婷<sup>2</sup> 李艳华<sup>3</sup> 郭文欣<sup>1,\*</sup>

(1 黑龙江省兽药饲料监察所, 哈尔滨 150069; 2 大庆市大同区农业农村局, 大庆 163515; 3 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要:** **目的** 建立硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液细菌内毒素检查方法。**方法** 按照 2015 版《中国兽药典》附录 1143 “细菌内毒素检查法”项下凝胶法的要求, 根据干扰试验确定样品成分最小不干扰稀释倍数, 并进行方法学验证及 3 批中试产品细菌内毒素检查。**结果** 供试品最小不干扰倍数为 100 倍, 3 批中试产品细菌内毒素检查均符合要求。**结论** 建立的方法能够用于硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液细菌内毒素检查, 其细菌内毒素限制为 37.5EU/mL。

**关键词:** 硫酸庆大霉素; 盐酸林可霉素; 细菌内毒素; 鲎试剂

**中图分类号:** R917 **文献标志码:** A

## Establishment of a bacterial endotoxin test for gentamicin sulfate and lincomycin hydrochloride injection

Wang Fan<sup>1</sup>, Wang Xiao-ting<sup>2</sup>, Li Yan-hua<sup>3</sup> and Guo Wen-xin<sup>1</sup>

(1 Heilongjiang Veterinary Drug and Feed Supervision Institute, Harbin 150069; 2 Daqing Datong District Agricultural and Rural Bureau, Daqing 163515; 3 Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract Objective** To establish a bacterial endotoxin test method for gentamicin sulfate and lincomycin hydrochloride injection. **Methods** According to the requirements of the gel method under the “bacterial endotoxin test” in appendix 1143 of Chinese veterinary pharmacopoeia (2015 edition), the minimum non-interference dilution multiples of the sample components were determined based on the interference test, and the methodological verification and the bacterial endotoxin test of three batches of pilot products were carried out. **Results** The minimum non-interference multiple of the test product was 100 times, and the bacterial endotoxin test of the three batches of pilot products met the requirements. **Conclusion** The established method can be used in the bacterial endotoxin test of gentamicin sulfate and lincomycin hydrochloride injection, and the bacterial endotoxin limit is 37.5EU/mL.

**Key words** Gentamicin sulfate; Lincomycin hydrochloride; Bacterial endotoxin; Limulus reagent

硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液是由本实验室研制的主要治疗由链球菌、支原体、衣原体等感染引起的猪呼吸道疾病综合征的兽用复方注射液, 主要成分是硫酸庆大霉素和盐酸林可霉素, 两种药物分别作用于敏感菌核糖体的不同点位, 最终阻碍了细菌细胞合成蛋白质。由于两种药物单独使用不能有效治疗由混合细菌感染引起的呼吸道疾病, 且

耐药问题限制了两种药物在临床上的单独使用, 经过研究表明, 两种抗菌药物联合使用后主要表现为相加或协同作用, 同时减少细菌的耐药性<sup>[1-3]</sup>。因此, 开发硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液具有重要的临床价值。根据 2015 版《中国兽药典》制剂通则项下要求, 注射用药需进行细菌内毒素检查, 保证用药安全。本研究参考 2015 版《中国兽药典》附

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 国家科技支撑计划 (No. 2015BAD11B03-07)

作者简介: 王凡, 女, 生于 1979 年, 高级兽医师, 主要研究方向为兽用化学药品的质量控制, E-mail: fan.www@163.com

\* 通讯作者, E-mail: 876011707@qq.com

录 1143 “细菌内毒素检查法”项下凝胶法<sup>[4]</sup>的要求,对本品复方注射液细菌内毒素的限度设定和检查方法做了相关研究。

## 1 试验材料

### 1.1 仪器

DHG-9070 A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); XW-80 A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); TAL-40 型恒温试管仪(湛江安度斯生物有限公司)。

### 1.2 试药

硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液(批号: 20160401、20160402 及 20160403, 为河南牧翔动物药业有限公司生产的中试产品); 细菌内毒素工作标准品(批号: 1602010, 规格: 10EU/支, 湛江博康海洋生物有限公司); 鲎试剂 1(TAL, 批号: 1601091, 标示灵敏度: 0.125EU/mL, 湛江博康海洋生物有限公司); 鲎试剂 2(TAL, 批号: 1601105, 湛江安度斯生物科技有限公司, 标示灵敏度: 0.125EU/mL); 细菌内毒素检查用水(BET, 批号: 1601270, 规格: 10mL, 湛江安度斯生物有限公司)

## 2 方法与结果

### 2.1 样品细菌内毒素限值(L)的确定

参考 2015 版中国药典通则<sup>[5]</sup>, 根据公式  $L=K/M$ , 式中  $K=5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ,  $M$  为每人用每千克体重每小时的最高供试品剂量。然而, 兽药方面尚未建立完善的细菌内毒素限值确定方法。本研究中参考 2015 版《中国兽药典》<sup>[4]</sup>中硫酸庆大霉素注射液及盐酸林可霉素注射液细菌内毒素限值要求, 其规定庆大霉素中含内毒素的量应小于  $0.50\text{EU}/\text{mg}$ , 林可霉素中含内毒素的量应小于  $0.50\text{EU}/\text{mg}$ 。因本品为硫酸庆大霉素与盐酸林可霉素组成的复方注射液, 其含量为庆大霉素每毫升 150 万单位, 林可霉素  $75\text{mg}/\text{mL}$ 。因此, 为保障本品质量, 确保动物用药安全, 将本品的细菌内毒素限度制定为单方硫酸庆大霉素注射液和盐酸林可霉素注射液细菌内毒素限度所含最低值, 即按照本品中含量规格较小的盐酸林可霉素的限度要求(林可霉素中含内毒素的量应小于  $0.50\text{EU}/\text{mg}$ ), 则换算为硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液细菌内毒素的限值为注射液中细菌内毒素不超过  $37.5\text{EU}/\text{mL}$ 。

### 2.2 最大稀释倍数(MVD)确定

根据细菌内毒素最大稀释倍数计算公式:  $\text{MVD}=cL/\lambda$ , 其中  $L$  为细菌内毒素限值, 当  $L$  以  $\text{EU}/\text{mL}$  表示时, 则  $c=1.0\text{mL}/\text{mL}$ 。由此可以得出, 最大稀释倍数(MVD)为 300 倍。

### 2.3 TAL 灵敏复核试验

鲎试剂灵敏度复核按《中国兽药典》2015 年版附录 1143 “细菌内毒素检查法”<sup>[4]</sup>进行, 根据 TAL 灵敏度的标示值, 将细菌内毒素工作标准品用 BET 水溶解, 用封口膜封严, 在旋涡混合仪上充分混合 15min, 然后将混匀的细菌内毒素工作标准品溶液稀释成  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$  和  $0.25\lambda$  4 个浓度, 取复溶后的规格为每支  $0.1\text{mL}$  的 TAL 原安瓶 18 管, 其中 4 管加入  $0.1\text{mL}$  浓度为  $2\lambda$  的细菌内毒素标准溶液, 4 管加入  $0.1\text{mL}$  浓度为  $\lambda$  的细菌内毒素标准溶液, 4 管加入  $0.1\text{mL}$  浓度为  $0.5\lambda$  的细菌内毒素标准溶液, 4 管加入  $0.1\text{mL}$  浓度为  $0.25\lambda$  的细菌内毒素标准溶液; 另外 2 管加入  $0.1\text{mL}$  BET 水作为阴性对照。取不同厂家的

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 1 The results of limulus reagent sensitivity re-check

TAL	$\lambda(\text{EU}/\text{mL})$	细菌内毒素浓度 $\lambda$				NC	$\lambda(\text{EU}/\text{mL})$
		2.0	1.0	0.5	0.25		
1	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125
2	0.125	++++	++++	----	----	--	0.125

注: “+”表示阳性反应; “-”表示阴性反应; NC 为阴性对照

2 批鲎试剂分别进行试验, 结果见表 1。2 个厂家鲎试剂灵敏度均在  $0.5\sim 2.0\lambda$  范围内, 灵敏度均符合规定。

### 2.4 供试品干扰预试验

将 3 批供试品溶液分别用 BET 水稀释至原浓度的 1、50、100、200 和 300 倍。同时每一稀释度下均制备含有  $2\lambda$  浓度细菌内毒素的溶液作为供试品阳性对照系列(PPC)。另外取 4 支, 其中 2 支加  $0.2\text{mL}$  的检查用水, 记作 NC。另外 2 支分别加  $0.1\text{mL}$  的检查用水和  $0.1\text{mL}$  浓度为  $2\lambda$  内毒素标准溶液, 记作 PC。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。结果见表 2, 由结果可知, 本品注射液最小不干扰稀释倍数为 100 倍。

### 2.5 供试品干扰试验

按 TAL 灵敏度复核试验项下, 细菌内毒素标准溶液的配制方法, BET 水制成浓度分别为 2、1.0、0.5 和  $0.25\lambda$  4 种标准溶液。将 3 批硫酸庆大霉素盐酸林可霉素注射液稀释 100 倍, 用 100 倍稀释液将细菌内毒素标准品制成浓度为 2.0、1.0、0.5 和  $0.25\lambda$  4 种供试溶液。同时做阴性对照(NC)及供试品阴性对照(NPC), 按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。按公式  $E_s=\lg^{-1}(\sum X_s/4)$  和  $E_t=\lg^{-1}(\sum X_t/4)$ , 计算各系列反应终点内毒素浓度的绝对值。结果见表 3。由表 3 可见,  $E_s$  均在  $0.5\sim 2.0\lambda$  范围内, 且  $E_t$  在  $0.5\sim 2.0E_s$  范围内, 表明本注射液在 100 倍稀释下不干扰细菌内毒素检查。

### 2.6 供试品中细菌内毒素检查

表 2 干扰试验预试验  
Tab. 2 The results of preliminary interference test

鲎试剂	批号		稀释倍数					NC	PC
			1	50	100	200	300		
鲎试剂 1	20160401	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	+-	++	++	++		
	20160402	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	--	++	++	++		
	20160403	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	++	++	++	++		
鲎试剂 2	20160401	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	+-	++	++	++		
	20160402	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	+-	++	++	++		
	20160403	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	--	++	++	++	++		

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应；NPC 为供试品阴性对照；PPC 为供试品阳性对照；NC 为阴性对照；PC 为阳性对照

表 3 供试品干扰试验结果  
Tab. 3 The results of interference test

鲎试剂	批号	细菌内毒素浓度				NC	NPC	Es	Et
		2λ	λ	0.5λ	0.25λ				
鲎试剂 1	BET 水	++++	++++	+---	----	--		0.105	
	20160401	++++	++++	+---	----		--		0.105
	20160402	++++	++++	----	----		--		0.125
	20160403	++++	++++	+---	----		--		0.088
鲎试剂 2	BET 水	++++	++++	----	----	--		0.149	
	20160401	++++	++++	+---	----		--		0.105
	20160402	++++	++++	+---	----		--		0.105
	20160403	++++	++++	+---	----		--		0.105

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应；Es、Et 分别为用 BET 水、供试品溶液制成的细菌内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值；NC 为阴性对照；NPC 为供试品阴性对照

根据上述干扰试验结果，将 3 批样品均稀释 100 倍，用此稀释溶液配制浓度为 2λ 的溶液，作为供试品阳性对照 (PPC)。同时做阳性对照 (PC) 及阴性对照 (NC)。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作，对 3 批中试供试品进行细菌内毒素检查。结果见表 4，取两个厂家鲎试剂对 3 批中试注射液进行细菌内毒素检查，其结果全部小于预设限值，符合规定。

### 3 讨论

药品的细菌内毒检查法是一项快速、简便、标

表 4 供试品内毒素检验结果

Tab. 4 The results of bacterial endotoxin test

鲎试剂	批号	供试品	PPC	PC	NC	结果
鲎试剂 1	20160401	--	++	++	--	小于限值
	20160402	--	++	++	--	小于限值
	20160403	--	++	++	--	小于限值
鲎试剂 2	20160401	--	++	++	--	小于限值
	20160402	--	++	++	--	小于限值
	20160403	--	++	++	--	小于限值

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应；PPC 为供试品阳性对照；NC 为阴性对照；PC 为阳性对照

准化程度高的检测方法，《中国兽药典》2015 版附录 [4] 中利用鲎试剂来检测或量化细菌内毒素，并认定供试品中细菌内毒素是否符合限度要求。本品注射液中细菌内毒素检查方法为凝胶法，确定本品注射液细菌内毒素限值为 37.5EU/mL，最大稀释倍数为 300 倍。对两个厂家生产的鲎试剂进行灵敏度复核后，进行供试品预干扰试验和干扰试验，确定本品最小稀释倍数为 100 倍。通过两个厂家鲎试剂对 3 批中试注射液进行检查，结果显示其细菌内毒素均小于规定限值，本品注射液细菌内毒素符合规定，该方法操作简单、可靠，结果准确。

### 参考文献

- [1] 徐刚, 李晓云, 王敏, 等. 盐酸林可霉素和硫酸庆大霉素对猪链球菌体外联合抗菌试验 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(7): 70-72.
- [2] 王岳, 方金瑞. 抗生素 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 292.
- [3] 王春艳. 林可 - 庆大霉素复方注射液在猪体内的血药动力学特征 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [S]. 2015 年版一部. 北京: 中国农业出版社, 2016: 329-332.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2015 年版四部. 北京: 中国医药技术出版社: 154-157, 400-402.