

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.16.013

大豆磷脂酰胆碱细菌内毒素检查方法考察

肖婧薇, 王文佳, 何华红, 李 薇

(广东省广州市药品检验所医疗器械及药包材<药理>室, 广东 广州 510610)

摘要:目的 建立大豆磷脂酰胆碱细菌内毒素的检查方法。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则1143“细菌内毒素检查法”, 分别采用凝胶法与显色基质法考察大豆磷脂酰胆碱细菌内毒素检查的可行性。结果 大豆磷脂酰胆碱质量浓度在62.5 g/L及以下时, 对凝胶法和显色基质法的鲎试剂反应均无干扰作用。结论 凝胶法与基质显色法均可用于大豆磷脂酰胆碱的细菌内毒素检查。

关键词:大豆磷脂酰胆碱; 细菌内毒素检查; 凝胶法; 显色基质法

中图分类号: R917; R979.9

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)16-0041-04

Bacterial Endotoxin Test for Soybean Phosphatidylcholine

XIAO Jingwei, WANG Wenjia, HE Huahong, LI Wei

(Medical Devices and Pharmaceutical Packaging <Pharmacology> Room, Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510610)

Abstract: Objective To establish the endotoxin test method for soybean phosphatidylcholine. **Methods** According to the bacterial endotoxin test in the general rule 1143 of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV), the feasibility of bacterial endotoxin test for soybean phosphatidylcholine was investigated by gel method and chromogenic substrate method. **Results** There was no interference between the gel method and chromogenic substrate method when the concentration of soybean phosphatidylcholine was at or less than 62.5 g/L. **Conclusion** Both gel method and chromogenic substrate method can be used for the bacterial endotoxin test of soybean phosphatidylcholine.

Key words: soybean phosphatidylcholine; bacterial endotoxin test; gel method; chromogenic substrate method

大豆磷脂酰胆碱是大豆磷脂的主要活性成分, 大豆磷脂作为天然乳化剂、增溶剂、分散剂广泛应用于药物注射剂中^[1-2], 故大豆磷脂酰胆碱也是一种用于注射剂的药用辅料。注射剂直接注入人体, 其细菌内毒素的含

量或限值有严格规定, 所用辅料也必须符合相应规定。2015年版《中国药典》尚未将大豆磷脂酰胆碱作为药用辅料收载, 本研究中参照2015年版《中国药典(四部)》通则1143^[3] 154-157“细菌内毒素检查法”, 全面考察了

第一作者: 肖婧薇, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药理学及毒理学, (电话)020-81744947(电子信箱)0213rainy@163.com。

每膜600 mL时, 仍未能有效中和、去除注射用甲磺酸左氧氟沙星对细菌的抑菌性。喹诺酮类抗菌药物能螯合细菌所需的镁离子、钙离子等金属元素, 故在最后少许冲洗液中加入MgSO₄, 并作用20 min, 结果有效中和、去除了该药品的抑菌性^[13]。

综上所述, MgSO₄较聚山梨酯80更能有效中和、去除甲磺酸左氧氟沙星对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌的抑菌性, 更适合用作喹诺酮类抗菌药物的抑菌剂和中和剂, 在无菌检查过程消除药品的抑菌性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 苏德模, 马绪荣. 药品微生物学检验技术[M]. 北京: 华龄出版社, 2007: 218-220.
- [3] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1747-1751.
- [4] 杨晓莉, 李 辉, 绳金房, 等. 2015年版《中国药典》无菌检查法解读[J]. 中国药业, 2015, 24(24): 7-11.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京:

中国医药科技出版社, 2017: 537-563.

- [6] 胡昌勤. 实用药品微生物检验检测技术指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 63.
- [7] 夏蕴琼, 刘 将. 盐酸氨溴索葡萄糖注射液无菌检查方法验证[J]. 安徽医药, 2012, 16(5): 603-604.
- [8] 闵 红, 裴小龙, 杨晓莉. 3种规格注射用头孢地嗪钠无菌方法学验证[J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 764-766.
- [9] 陈立光, 雷震山, 梁明泉, 等. ¹⁸F-FDG注射液的无菌检查及方法学验证[J]. 包头医学院学报, 2018, 34(7): 99-101.
- [10] 张少锋, 鄢 丹, 唐慧英, 等. 微量量热法研究增溶性辅料吐温80对红细胞生理活性的影响[J]. 化学学报, 2010, 68(20): 2119-2124.
- [11] 郑小玲, 李 珏, 张联珍, 等. 西罗莫司胶囊微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药业, 2011, 20(21): 33-34.
- [12] 闵 红, 杨晓莉, 李 翠, 等. 复方氟己定地塞米松膜微生物检查方法学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 881-886.
- [13] 郑小敏, 舒德忠. 硫酸镁与乳酸左氧氟沙星注射液配伍稳定性分析[J]. 临床合理用药, 2010, 3(23): 17-18.

(收稿日期: 2018-12-18)

大豆磷脂酰胆碱的细菌内毒素检查方法,以进一步控制注射剂质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:TW12 型六孔恒温水浴(德国 Julabo 公司);MS3 basic 型旋涡混合器(德国 IKA 公司);LKL164-03 型内毒素定量仪(英国 Lab Kinetics 公司);2-16KL 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司)。

试剂:大豆磷脂酰胆碱(德国 Lipoid GmbH,批号为 579010-1150055-13,579010-1160058-15,579010-1160059-05,规格为原料,含量为 98%);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为 150601-201580,规格为每支 80 EU);细菌内毒素检查用水(BET 用水,批号为 1606290,规格为每支 100 mL),鲎试剂 A(TAL,批号分别为 1606142,1607201,规格为每支 0.1 mL,灵敏度分别为 0.25 EU/mL 和 0.06 EU/mL),鲎试剂 C(KCA,批号为 1709140,规格为每支 1.25 mL,灵敏度为 50~0.005 EU/mL),均购自湛江安度斯生物有限公司;鲎试剂 B(TAL,福州新北生物有限公司,规格为每支 0.1 mL,批号分别为 16031712,16020712,灵敏度分别为 0.25 EU/mL 和 0.06 EU/mL)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值

各国药典均未收载该品种,而在厂家所附标准中,细菌内毒素限值为每 1 g 大豆磷脂酰胆碱含内毒素的量应小于 6 EU。该品种是大豆磷脂的主要活性成分,其在药物制剂中的功能和用途与大豆磷脂相似,2015 年版《中国药典(四部)》收载的大豆磷脂(供注射用)^{[3]468-470}的细菌内毒素限值为每 1 g 大豆磷脂含内毒素的量应小于 2.0 EU。综合考虑,本研究限值确定为 2.0 EU/g。

2.2 细菌内毒素含量检测(凝胶法)

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143“细菌内毒素检查法”进行鲎试剂标示灵敏度(λ)复核。结果 4 批鲎试剂 λ_c 为 0.5~2.0 λ ,符合进行细菌内毒素检查的规定。详见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核试验结果(凝胶法)

TAL (批号)	λ (EU/mL)	细菌内毒素浓度				NC	λ_c (EU/mL)
		2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ		
A(1606142)	0.25	++++	----	----	----	--	0.50
A(1607201)	0.06	++++	++++	----	----	--	0.06
B(16031712)	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
B(16020712)	0.06	++++	++++	----	----	--	0.06

注:表中“+”为有菌,“-”为无菌。NC 表示阴性对照管;表 2 至表 4 同。

2.2.2 干扰预试验

最小质量浓度计算:最小有效稀释浓度 $C = \lambda/L$, $L = 2.0 \text{ EU/g}$ 。目前用于药品检验的市售鲎试剂灵敏度一般为 0.25~0.03 EU/mL,因此相对应的最小有效质量浓度为 125.00,62.50,31.25,15.62 g/L。

溶液制备:取 3 批样品,用 BET 用水溶解制成质量浓度为 125 g/L 的供试品溶液,置旋涡振荡器振荡 5 min 使充分混匀,再稀释成 3 个质量浓度梯度的系列溶液,标记为供试品管(NPC 系列);取 NPC 系列溶液,加入细菌内毒素,制得每个稀释度中含 2 λ 细菌内毒素的供试品溶液,标记为供试品阳性对照管(PPC 系列)。

操作步骤:取灵敏度为 0.25 EU/mL 的 2 个不同厂家的 TAL,每个质量浓度的 NPC 和 PPC 各做 2 管,同时做细菌内毒素阳性对照(PC)和 BET 用水阴性对照(NC)各 2 管。结果 3 批样品质量浓度在 62.5 g/L 及以下时对 2 个厂家鲎试剂与细菌内毒素的反应均无干扰作用。详见表 2。

表 2 样品干扰预试验结果(凝胶法)

TAL(批号)	样品批号	项目	样品质量浓度(g/L)				NC	PC
			125.00	62.50	31.25	15.62		
A(1606142)	579010-11	NPC	--	--	--	--	--	
	50055-13	PPC	+-	++	++	++		++
	579010-11	NPC	--	--	--	--		
	60058-15	PPC	++	++	++	++		
	579010-11	NPC	--	--	--	--		
	60059-05	PPC	++	++	++	++		
B(16031712)	579010-11	NPC	--	--	--	--	--	
	50055-13	PPC	--	++	++	++		++
	579010-11	NPC	--	--	--	--		
	60058-15	PPC	++	++	++	++		
	579010-11	NPC	--	--	--	--		
	60059-05	PPC	+-	++	++	++		

注: NPC 为供试品管, PPC 为供试品阳性对照管, PC 为阳性对照管。表 4 同。

2.2.3 正式干扰试验

取 3 批样品适量,分别用 BET 用水制成质量浓度为 62.5 g/L 的溶液,并制成含 2 λ , 1 λ , 0.5 λ , 0.25 λ 细菌内毒素的供试品溶液,取灵敏度为 0.25 EU/mL 的 2 个厂家的鲎试剂,按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143 中的“干扰试验”项下方法试验。以 BET 用水进行对照。结果内毒素标准溶液反应终点浓度的几何平均值(E_s)和供试品溶液反应终点浓度的几何平均值(E_t)均在 0.5 λ ~2.0 λ 范围内,3 批样品质量浓度为 62.5 g/L 时对 2 个厂家鲎试剂与细菌内毒素的反应均无增强或抑制的干扰作用。故大豆磷脂酰胆碱(94%)的最大不干扰质量浓度为 62.5 g/L。详见表 3。

表3 样品干扰试验结果(凝胶法)

TAL(批号)	样品批号	内毒素浓度(EU/mL)				NC	E_s	E_t
		0.500	0.250	0.125	0.062			
A(1606142)	BET水	++	--	--	--	--	0.50	
	579010-1150055-13	++++	----	----	----	--		0.50
	579010-1160058-15	++++	+	----	----	--		0.42
	579010-1160059-05	++++	----	----	----	--		0.50
	BET水	++	+-	--	--	--	0.35	
	579010-1150055-13	++++	+	----	----	--		0.42
B(16031712)	579010-1160058-15	++++	++	----	----	--		0.30
	579010-1160059-05	++++	+	----	----	--		0.42

2.2.4 样品细菌内毒素检查

按2015年版《中国药典(四部)》通则1143中的“细菌内毒素检查法”,用灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂分别对3批样品进行细菌内毒素检查,结果3批样品的细菌内毒素检查结果均符合规定。详见表4。

表4 样品细菌内毒素检查结果(凝胶法)

TAL(批号)	样品批号	质量浓度(g/L)	NPC	PPC	NC	PC
A(1607201)	579010-1150055-13	31.25	--	++	--	++
	579010-1160058-15	31.25	--	++		
	579010-1160059-05	31.25	--	++		
B(16020712)	579010-1150055-13	31.25	--	++	--	++
	579010-1160058-15	31.25	--	++		
	579010-1160059-05	31.25	--	++		

2.3 细菌内毒素含量检测(显色基质法)

2.3.1 标准曲线的可靠性试验

取1支细菌内毒素工作标准品,加入1 mL BET用水溶解,再稀释成浓度分别为10,1,0.1,0.01 EU/mL的系列溶液,各取0.1 mL,分别与0.1 mL鲎试剂混匀,每个浓度平行做3支管,置内毒素定量仪中,在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下进行检测。以BET用水作阴性对照。结果回归方程为 $\lg Tg = 2.8813 - 0.3080 \lg C$ ($r = -0.9996$),阴性对照的反应时间大于标准曲线最低点的反应时间,各反应点平行管之间的变异系数(CV)均小于10%,表明标准曲线可靠,试验方法成立。详见表5。

表5 标准曲线可靠性试验结果(显色基质法)

试样	标准内毒素(EU/mL)	平均达限时间(s)	变异系数(%)	实测值(EU/mL)
阴性对照	0	>3600	0.00	<0.0064
内毒素标准品	0.01	3208	0.07	0.0094
内毒素标准品	0.10	1522	1.30	0.1053
内毒素标准品	1.00	739	0.43	1.0979
内毒素标准品	10.00	384	0.80	9.2353

2.3.2 干扰试验

标准曲线最低点的浓度为0.01 EU/mL,故最小有效稀释质量浓度为5 g/L。取3批样品适量,用BET用

水溶解成质量浓度为125 g/L的溶液,置旋涡振荡器振荡5 min,稀释成质量浓度为62.5,31.25,15.6 g/L的系列梯度溶液,作为供试品溶液(A液);取A液,加入细菌内毒素,制成含0.5 EU/mL细菌内毒素的供试品溶液(B液),充分振荡,215 × 1 g离心5 min,立即取上清液,分别取0.1 mL与0.1 mL鲎试剂混匀,每个质量浓度平行做2支管,于内毒素定量仪中进行检测。结果3批样品质量浓度在62.5 g/L及以下时,细菌内毒素的回收率在50%~200%之间,表明样品对动态显色法下鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。详见表6。

表6 样品干扰试验结果(显色基质法, $n=2$)

样品批号	A液质量浓度(g/L)	平均达限时间(s)	变异系数(%)	实测值(EU/mL)	A液回收率(%)
579010-1150055-13	62.50	3304	6.40	0.0085	
	62.50	1046	8.85	0.3554	69.38
	31.25	3035	3.63	0.0112	
	31.25	960	5.45	0.4698	91.72
	15.62	3087	5.31	0.0106	
	15.62	989	2.14	0.4265	83.18
579010-1160058-15	62.50	>3600	0.00	<0.0064	
	62.50	999	7.22	0.4128	81.28
	31.25	>3600	0.00	<0.0064	
	31.25	973	4.07	0.4502	88.76
	15.62	>3600	0.00	<0.0064	
	15.62	934	3.26	0.5145	101.62
579010-1160059-05	62.50	3477	3.21	0.0072	
	62.50	1025	2.90	0.3796	74.48
	31.25	>3600	0.00	<0.0064	
	31.25	1003	2.11	0.4078	80.28
	15.62	>3600	0.00	<0.0064	
	15.62	950	5.36	0.4862	95.96

2.3.3 内毒素回收试验

3批样品各称取4份,分别用含细菌内毒素0,0.1,0.2,0.4 EU/mL的BET用水溶解成质量浓度为110 g/L的溶液(每1 g大豆磷脂酰胆碱对应的内毒素含量为0,0.9,1.8,3.6 EU),充分振荡5 min,用BET用水稀释1倍,振荡均匀,215 × 1 g离心5 min,立即取上清液进行检测。结果3批大豆磷脂酰胆碱均未检出细菌内毒素,内毒素加入量为0.05,0.10,0.20 EU/mL时的回收率均为75%~112%,表明供试品溶液制备过程中的离心处理不会影响细菌内毒素的检出。详见表7。

3 讨论

近年来,由于药用辅料的问题导致的药品严重不良反应或影响用药安全的事件层出不穷^[4-6],究其原因主

表7 回收试验结果(显色基质法)

样品批号	加入量 (EU/mL)	平均达限 时间(s)	变异系数 (%)	实测值 (EU/mL)	回收率 (%)
579010-1150055-13	0	3 235	5.81	0.009 1	
	0.05	1 770	4.50	0.064 5	111.08
	0.10	1 474	5.72	0.116 7	107.60
	0.20	1 232	5.03	0.209 3	100.10
579010-1160058-15	0	>3 600	0.00	<0.006 4	
	0.05	1 969	3.35	0.045 6	78.40
	0.10	1 536	7.98	0.102 1	95.70
	0.20	1 267	1.83	0.190 9	92.25
579010-1160059-05	0	>3 600	0.00	<0.006 4	
	0.05	1 993	4.26	0.043 9	75.00
	0.10	1 593	7.25	0.090 8	84.40
	0.20	1 305	4.44	0.173 4	83.50

要为质量标准不完善、使用方法不规范^[7]。2015年版《中国药典》中药用辅料标准收载量仅270种,其中供注射药用辅料23种,与美国药典、欧洲药典中1 000多种的收载量比相差较大,因此,药用辅料质量标准的提高和完善迫在眉睫。大豆磷脂酰胆碱作为药用辅料的新品种,其质量标准的研究和制订更应受到重视。对注射剂常用药用辅料应进行相应的安全性检查,而细菌内毒素检查是其安全性检查中必不可少的一项^{[3]400-402}。

2015年版《中国药典》收载的细菌内毒素检查法包括凝胶法和光度测定法,供试品检测时可使用其中任意一种方法,但当结果有争议时凝胶法为仲裁方法^{[3]154-157},因此本研究中首先采用凝胶法考察大豆磷脂酰胆碱细菌内毒素检查的可行性。结果表明,大豆磷脂酰胆碱质量浓度在62.5 g/L及以下时对2个厂家生产的鲎试剂无干扰作用,但使用灵敏度为0.125~0.03 EU/mL的凝胶法鲎试剂对该品种的细菌内毒素进行定性检查,且限值可定为2.0 EU/g。

细菌内毒素检查法的光度测定法包括浊度法和显色基质法,结果可准确反映细菌内毒素的含量,对生产过程和最终产品的质量控制意义重大。大豆磷脂酰胆碱不能完全溶于水,在本试验浓度下,样品与水只能形成混悬液。混悬液的反应体系对2.2项试验反应并无影响,但对2.3项试验中吸光度的检测有一定影响,因此将供试品溶液离心,取上清液进行检测。为了考察萃取处理是否会影

响细菌内毒素的检出,在配制供试品时添加细菌内毒素标准品进行外加内毒素回收试验^{[3]154-157}。在该情况下,一般会采取特殊方法来制备供试液,如增溶^[8]、萃取^[9-10]、过滤^[11]等,再进行外加内毒素回收试验,以考察处理方法是否会影响内毒素的检出。本研究中,前期曾尝试过加入乙醇以增加溶解性,但效果不佳,也曾尝试过微膜滤过去除混悬液中的颗粒,但极易堵塞滤头。最后经试验证实,采用振荡混匀并离心取上清液的操作可行。但得到的供试液并非澄清透明,仍有轻度混浊,会影响浊度法中浊度的测定,而显色基质法是通过测定呈色团的吸光度来反应内毒素的含量,因此不会影

响检测结果,可进一步进行干扰试验和回收试验。经考察,大豆磷脂酰胆碱在质量浓度62.5 g/L及以下时对试验结果无干扰作用,且供试液制备过程中的萃取操作不会对供试品本底细菌内毒素造成影响,可采用动态显色法鲎试剂对该品种进行细菌内毒素的定量检测。

参考文献:

- [1] 张宁,吕慧怡,范青. 丹参酮微乳制备工艺的初选及优化[J]. 实用药物与临床,2010,13(5):339-340.
- [2] 张会丽. 氨溴索注射乳剂的处方及工艺研究[J]. 中国药业,2014,23(13):33-36.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 杨锐,孙会敏,于丽娜,等. 药用辅料对药品安全性的影响[J]. 药物分析杂志,2012,32(7):1309-1314.
- [5] 谢华,袁海玲,陈玉芳,等. 含辅料注射剂的临床合理用药[J]. 中国现代应用药学,2016,33(4):488-492.
- [6] 凌云,张沂. 从二甘醇事件看药用辅料的重要性[J]. 海军总医院学报,2007,20(4):228-230.
- [7] 谢正福,王森,孙慧妹. 药用辅料生产使用现状及问题[J]. 中国药业,2013,22(14):4-5.
- [8] 潘卫松,周永标,张讷敏,等. 多西他赛脂质体热原和细菌内毒素检查方法的研究[J]. 药物分析杂志,2013,33(2):326-330.
- [9] 胡宇驰,李娜,周建平. 十一酸睾酮注射液细菌内毒素检查方法学研究[J]. 药物分析杂志,2010,30(12):2425-2429.
- [10] 杨赞昀,胡宇驰,曹春然. 碘化油注射液细菌内毒素检查方法学的建立[J]. 中国药师,2012,15(12):1809-1811.
- [11] 宋海辉,马仁杰,易俊杰. 明胶海绵细菌内毒素检测研究[J]. 中国药事,2016,30(9):937-940.

(收稿日期:2018-12-03)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办