

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.04.014

动态浊度法检测复方蒲公英注射液中细菌内毒素

钱明明, 刘益庆

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 建立检测复方蒲公英注射液中细菌内毒素的动态浊度法。方法 确定样品细菌内毒素限值(L)为25 EU/mL, 建立细菌内毒素的标准曲线, 考察供试品对细菌内毒素检查的干扰情况, 分析不同稀释倍数下细菌内毒素的回收率, 并进行验证。结果 回归方程为 $\lg T = 2.785\ 68 - 0.324\ 68 \lg C$ ($|r| > 0.999$), 细菌内毒素浓度线性范围为0.005~0.500 EU/mL; 供试品稀释100~1 000倍时, 细菌内毒素回收率均在50%~200%范围内; 方法准确度及精密度的变异系数均小于10% ($n=3$); 3批样品的细菌内毒素含量均小于检测限, 回收率在99%~103%范围内。结论 该方法快速简便, 灵敏度高, 抗干扰性强, 可用于复方蒲公英注射液中细菌内毒素的定量检测。

关键词:动态浊度法; 复方蒲公英注射液; 细菌内毒素; 定量检测

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)04-0053-03

Detection of Bacterial Endotoxin in Compound Pugongying Injection by Kinetic Turbidimetric Assay

QIAN Mingming, LIU Yiqing

(Lianyungang Inspection Testing Center of Food and Drug, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: **Objective** To establish a kinetic turbidimetric assay (KTA) for the detection of bacterial endotoxin in Compound Pugongying Injection. **Methods** The limit (L) of bacterial endotoxin was determined to be 25 EU/mL, the standard curve for detection of bacterial endotoxin by KTA was plotted, the interference of samples on the detection of bacterial endotoxin was investigated, the recovery rate of the bacterial endotoxin at different dilution multiples was analyzed, and the validation test was carried out. **Results** The regression equation was as follows: $\lg T = 2.785\ 68 - 0.324\ 68 \lg C$ ($|r| > 0.999$). The linear range of bacterial endotoxin concentration was 0.005–0.500 EU/mL. When the test sample was diluted by 100 to 1 000 multiples, the recovery rate of bacterial endotoxin was in the range of 50%–200%, the coefficients of variation (CV) of accuracy test and precision test were less than 10% ($n=3$). The content of bacterial endotoxin in three batches of samples was less than the limited value, and the recovery rate was in the range of 99%–103%. **Conclusion** The method is rapid, simple, sensitive and anti-interference, which can be used for the quantitative detection of bacterial endotoxin in Compound Pugongying Injection.

Key words: kinetic turbidimetric assay; Compound Pugongying Injection; bacterial endotoxin; quantitative detection

内毒素是革兰阴性菌的细胞壁成分, 细菌死亡或自溶后释放, 极微量进入人体即可引起发热反应^[1], 大量时可导致休克、多器官衰竭甚至死亡^[2-4]。因此需严格控制注射液中的内毒素, 以保证用药安全。复方蒲公英注射液由蒲公英、鱼腥草及野菊花经提取加工制成, 具

有清热解毒、疏风止咳功效, 多用于治疗风热感冒、肺胃热盛、发热头痛、咳嗽痰黄等症。该药现行质量标准为《卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)》(WS₃-B-3917-98), 肌肉注射, 考虑到注射剂的安全性, 故有必要增设细菌内毒素或热原检查项。相对于热原检查法,

第一作者: 钱明明, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)qianmingming2012@163.com。

- [14] 程轩轩, 陈亮元, 郑诗嘉, 等. 广金钱草多糖指纹图谱的建立、含量测定及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J]. 中国药房, 2020, 31(2): 183–189.
- [15] 敖 娇, 鲍家科, 夏玉吉. 金钗石斛中生物碱与多糖含量的测定[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1736–1739.
- [16] 闫旭宇, 李 玲. 水提醇沉法提取薏米多糖及其对羟自由基的清除作用[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 1–5.
- [17] 李俊萍, 郭盛磊, 王谦博, 等. 不同产地刺五加中多糖含量测定、聚类分析及其超声提取工艺优化[J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2541–2545.

- [18] WENG JY, ZHOU JK, LIANG LQ, et al. UHPLC/QTOF-MS-based metabolomics reveal the effect of melastoma dodecandrum extract in type 2 diabetic rats[J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 807–816.
- [19] 王占一, 赵 静, 朱天顺, 等. 纤维素酶辅助提取藕节多糖工艺优化及其动力学、热力学研究[J]. 中成药, 2020, 42(4): 836–842.
- [20] 罗云云, 杜伟锋, 应泽茜, 等. 响应面法协同正交试验设计优化薏苡仁多糖提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4847–4851.

(收稿日期: 2020-05-29; 修回日期: 2020-07-25)

细菌内毒素检查法具有快速、灵敏、简便、重复性好、成本低等优点,同时从动物伦理学方面考虑,本研究中依据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1143“细菌内毒素检查法”项下动态浊度法的基本原理及试验设计^[5],建立复方蒲公英注射液细菌内毒素的检测方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BET-72 型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);涡旋振荡器(天津药典标准仪器厂);200 μ L 及 1 000 μ L 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂

复方蒲公英注射液(江西天施康中药股份有限公司,批号分别为 19020303,19030520,19040316,规格为每支 2 mL);鲎试剂(TAL,湛江安度斯生物有限公司,批号为 1904260,规格为每支 1.25 mL,检测范围 0.005 ~ 50 EU/mL);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为 150601-201987,规格为每支 80 EU);细菌内毒素检查用水(BET 用水,湛江安度斯生物有限公司,批号为 1910180,规格为每支 30 mL)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)确定

公式为 $L = K/M^{[5]}$, K 为人体每 1 kg 体质量每 1 h 可接受内毒素的最大剂量,注射剂 $K = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h})$; M 为人用每 1 kg 体质量每 1 h 的最大供试品剂量,按复方蒲公英注射液说明书规定,单次最大注射剂量为 4 mL,按 60 kg 体质量计,则 $M = 0.067 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 。 $L = 75 \text{ EU/mL}$,由于该药涉及儿童用药,为保障安全用药,根据注射剂安全性检查法应用指导原则,可将限值严格至计算值的 1/2 ~ 1/3,故最终确定 L 为 25 EU/mL。

2.2 标准曲线可靠性试验

取细菌内毒素工作标准品 1 支(80 EU),加入 1.0 mL BET 用水复溶,制成浓度为 80 EU/mL 的贮备液,用 BET 用水分别稀释成浓度为 0.005,0.050,0.500 EU/mL 的系列标准内毒素溶液,每个浓度设 3 个平行管。用 BET 用水作阴性对照,设 2 个平行管。精密量取上述标准溶液及阴性对照溶液各 100 μ L,分别加入预先加有 100 μ L TAL 的试管中,混匀,采用细菌内毒素测定仪测定。测定条件,温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,检测波长为 405 nm,反应时间为 3 600 s。以细菌内毒素标准品浓度的对数($\lg C$)为横坐标,以反应时间的对数($\lg T$)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $\lg T = 2.78568 - 0.32468 \lg C$ ($|r| = 0.9992$)。细菌内毒素浓度线性范围为 0.005 ~ 0.500 EU/mL;各组平行管变异系数(CV)小于 10%,阴性对照反应时间长于标准曲线最低浓度的反应时间,表明试验方法有效。结果见表 1。

表 1 标准曲线可靠性试验结果($n = 3$)

Tab. 1 Results of reliability test($n = 3$)

内毒素浓度(EU/mL)	平均反应时间(s)	CV(%)
阴性对照	> 3 600	
0.005	3 351	4.56
0.050	1 672	3.53
0.500	752	1.79

2.3 供试品最大有效稀释倍数(MVD)计算

根据 $MVD = cL/\lambda$,其 $c = 1.0 \text{ mL/mL}$, λ 为标准曲线的最低浓度 0.005 EU/mL,则 $MVD = 5 000$ 倍。

2.4 干扰试验

设 0.050 EU/mL 为 λ_m ,用 BET 用水将样品(批号为 19020303)分别稀释为 100,200,500,1 000 倍的溶液,记为 A 液;制备含标准内毒素 0.050 EU/mL 的 A 液,记为 B 液;取 A 液、B 液各 100 μ L,分别加入预先加有 100 μ L TAL 试剂反应试管中,每个浓度设 2 个平行管,混匀,采用细菌内毒素测定仪测定^[5]。结果样品及其外加细菌内毒素稀释 100,200,500,1 000 倍时,回收率均在 50% ~ 200% 范围内,表明样品在该系列稀释倍数下无干扰作用。结果见表 2。

表 2 干扰试验结果($n = 2$)

Tab. 2 Results of interference test($n = 2$)

稀释倍数	外加内毒素浓度 (EU/mL)	反应时间 (s)	内毒素实测值 (EU/mL)	回收率 (%)
100		> 3 600	< 检测限	
		> 3 600	< 检测限	
	0.050	1 630	0.048 6	97.03
	0.050	1 607	0.050 7	101.06
200		> 3 600	< 检测限	
		> 3 600	< 检测限	
	0.050	1 563	0.055 3	110.11
	0.050	1 547	0.057 1	114.03
500		> 3 600	< 检测限	
		> 3 600	< 检测限	
	0.050	1 692	0.043 3	86.16
	0.050	1 728	0.040 6	93.25
1 000		> 3 600	< 检测限	
		> 3 600	< 检测限	
	0.050	1 529	0.059 1	118.19
	0.050	1 519	0.060 3	121.23

2.5 准确度试验

取样品(批号为 19020303)1 支,稀释 100 倍,分别加入 0.005,0.050,0.500 EU/mL 的标准内毒素,平行测定 3 次。结果供试品的平均回收率均在 50% ~ 200% 范围内,且 CV 均小于 10%,表明该方法准确度较好。详见表 3。

表3 准确度试验结果($n=3$)

Tab. 3 Results of accuracy test($n=3$)

稀释倍数	加入量 (EU/mL)	测得量 (EU/mL)	平均回收率 (%)	CV (%)
100	0.005	0.0048 ± 0.0003	96.15	6.25
100	0.050	0.0506 ± 0.0018	101.26	3.56
100	0.500	0.4972 ± 0.0133	99.02	2.67

2.6 精密度试验

取2.2项下0.005, 0.050, 0.500 EU/mL的系列标准内毒素溶液, 采用细菌内毒素测定仪检测, 平行测定3次。结果3个浓度的标准内毒素溶液检测结果的CV均小于10%, 表明该方法精密度良好。详见表4。

表4 精密度试验结果($n=3$)

Tab. 4 Results of precision test($n=3$)

内毒素浓度 (EU/mL)	测得量(EU/mL)			CV(%)
	1	2	3	
0.005	0.0049	0.0053	0.0055	4.25
0.050	0.0534	0.0602	0.0578	4.36
0.500	0.4987	0.5123	0.5203	1.04

2.7 样品检测

以所建动态浊度定量检测法检测3批样品的细菌内毒素含量。结果回收率均在50%~200%范围内, CV均小于10%, 3批样品内毒素含量均小于检测限(0.005 EU/mL)。详见表5。

表5 样品细菌内毒素检测结果

Tab. 5 Results of detection of bacterial endotoxin in the samples

批号	稀释 倍数	加入量 (EU/mL)	反应时间 (s)	回收率 (%)	CV (%)	测得量 (EU/mL)
19020303	100		>3600			<检测限
		0.050	1619	99.12	4.02	0.0496
19030520	100		>3600			<检测限
		0.050	1602	102.23	3.89	0.0512
19040316	100		>3600			<检测限
		0.050	1597	103.06	3.16	0.0517

3 讨论

复方蒲公英注射液现行质量标准无热原或细菌内毒素检查项, 根据2015年版《中国药典(四部)》注射剂安全性检查法应用指导原则, 对生产工艺易污染细菌内毒素的肌肉注射用注射剂, 应考虑设细菌内毒素检查项。本研究中参考文献[6-10], 采用动态浊度法验证复方蒲公英注射液细菌内毒素检测方法, 结果表明, 内毒素标准品浓度线性范围为0.005~0.500 EU/mL, 样品稀释100倍及以上, 回收率均在50%~200%范围内, 表明该系列稀释倍数下供试品无干扰作用, 测

得的细菌内毒素数值真实、有效, 样品稀释100倍时, 回收率最接近100%, 故后续供试品细菌内毒素含量检测采用该稀释倍数。随后对该方法的准确性及精密性进行验证, 结果回收率均在50%~200%范围内, 且CV均小于10%, 表明该方法结果准确。在方法的初步应用中, 3批样品细菌内毒素含量均低于检测限, 表明该厂家目前对其细菌内毒素含量控制较好。

与传统定性凝胶法比较, 动态浊度法检测结果由仪器自动执行, 且能直观显示供试品中内毒素的含量, 灵敏度更高, 重复性更好, 能大范围定量, 数据具有可追溯性, 可避免主观因素影响结果的判断^[11], 更适用于生产过程中对供试品质量的监控。

综上所述, 本研究所建动态浊度法操作简便, 准确性及精密度良好, 灵敏度高, 抗干扰能力强, 能快速定量供试品细菌内毒素, 可用于复方蒲公英注射液生产过程中细菌内毒素的定量检测。

参考文献

- [1] 党京丹. 细菌内毒素的研究及临床应用[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(7): 771-773.
- [2] 孙哲. 细菌内毒素检验[J]. 世界最新医学信息文摘, 2012, 12(9): 128-130.
- [3] 汤秋华. 动态浊度法测定血液透析液的细菌内毒素含量[J]. 海峡药学, 2013, 25(9): 76-78.
- [4] HIRATA N, YANAGAWA Y, SATOH M, et al. Dendritic cell derived TNF alpha is responsible for development of IL-10 producing CD4⁺ T cells[J]. Cell Immunol, 2010, 261(1): 37-41.
- [5] 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: 154-157.
- [6] 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): 66-69.
- [7] 张娟, 祝清芬, 范治云, 等. 动态浊度法测定阿奇霉素中细菌内毒素含量[J]. 中国药业, 2014, 23(22): 47-49.
- [8] 李慧, 张彦丽, 崔晓燕, 等. 动态浊度法测定注射用阿莫西林钠克拉维酸钾细菌内毒素含量[J]. 中国药业, 2017, 26(9): 26-28.
- [9] 陈莉, 张啸, 刘永革, 等. 动态浊度法测定注射用盐酸大观霉素中细菌内毒素的含量[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(6): 45-48.
- [10] 朱昱, 郭娇梅, 张军霞, 等. 定量检测茵栀黄注射液细菌内毒素方法的建立及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(5): 525-528.
- [11] 张磷, 张继鹏, 赵一欢, 等. 静注人免疫球蛋白细菌内毒素定量检测方法的探讨[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(2): 28-32.

(收稿日期: 2020-04-22; 修回日期: 2020-07-25)