

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.13.016

难溶性香菇多糖无菌原料药细菌内毒素定量检测方法建立

丁苏苏, 叶婵娟, 姚晶晶, 李倚云[△]

(江苏省扬州市食品药品检验检测中心, 江苏 扬州 225000)

摘要:目的 建立定量检测难溶性香菇多糖无菌原料药中细菌内毒素的动态浊度法。方法 参考2020年版《中国药典(四部)》通则1143细菌内毒素检查法,建立细菌内毒素检查标准曲线,通过干扰试验确定样品的质量浓度范围,并考察研磨法溶解样品的细菌内毒素回收率。结果 香菇多糖质量浓度在2.500 0 μg/mL及以下时不干扰试验,研磨法溶解样品的细菌内毒素回收率在50%~200%范围内,样品中内毒素含量可定量测定。结论 动态浊度法可定量检测香菇多糖无菌原料药中的细菌内毒素。研磨法操作方便,对细菌内毒素的生物活性无影响。

关键词:香菇多糖无菌原料药;细菌内毒素;动态浊度法;难溶性;研磨法;回收率

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)13-0070-04

Establishment of a Quantitative Determination Method for Bacterial Endotoxin in Insoluble Lentinan Aseptic API

DING Susu, YE Chanjuan, YAO Jingjing, LI Yiyun

(Yangzhou Center for Food and Drug Control, Yangzhou, Jiangsu, China 225000)

Abstract: Objective To establish a kinetic turbidimetric assay for quantitative determination of bacterial endotoxin in the insoluble lentinan aseptic active pharmaceutical ingredients (API). **Methods** According to the requirements of bacterial endotoxin test of general rule 1143 in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), standard curves for bacterial endotoxin test were established. The mass concentration range of samples was determined through the interference test, and the recovery rate of bacterial endotoxin in samples dissolved by the grinding method was investigated. **Results** There was no interference when the mass concentration of lentinan was not more than 2.500 0 μg/mL. The recovery rate of bacterial endotoxin in samples dissolved by the grinding method was in the range of 50% - 200%, and the content of bacterial endotoxin in samples could be quantitatively determined. **Conclusion** The kinetic turbidimetric assay can be used for the quantitative determination of bacterial endotoxin in the lentinan aseptic API. The grinding method is easy to operate and has no effect on the biological activity of bacterial endotoxin.

Key words: lentinan aseptic API; bacterial endotoxin; kinetic turbidimetric assay; insolubility; grinding method; recovery rate

香菇 *Lentinus edodes* 又称香蕈、冬菇,营养丰富,味道鲜美,被视为“菇中之王”,是我国久负盛名的珍贵食用菌,也是我国著名的药用菌,历代医药学家对香菇的药性及功效均有著述^[1-2]。香菇多糖提取自香菇子实体,是香菇的主要有效成分,具有抗肿瘤、增强免疫功

能、抗病毒、刺激干扰素形成等多种作用^[3-4]。作为免疫辅助药物,香菇多糖可抑制肿瘤的发生、发展与转移,提高肿瘤对化疗药物的敏感性,改善患者的身体状况,并延长其生命,治疗胃癌、膀胱癌、肺癌、肝癌等的疗效良好^[5-6]。本研究中参考2020年版《中国药典(四部)》

第一作者:丁苏苏,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为药物分析与生物安全性,(电子信箱)subarmy-82651@163.com。

[△]通信作者:李倚云,女,大学本科,主任药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)lyy169169@126.com。

1014-1020.

[8] 马虹颖,杨存美. 鞣酸软膏预防老年卧床患者失禁性皮炎的效果[J]. 中华现代护理杂志,2015,21(29):3595-3596.

[9] 曹健,王芳,张喆,等. 双波长反相高效液相色谱法测定口腔溃疡油中3组分含量[J]. 中国药业,2011,20(17):38-39.

[10] 王洪明,李漫漫,吕雪秀. HPLC法测定复方盐酸达克罗宁乳膏的含量[J]. 中国药师,2013,16(8):1263-1264.

[11] 于桂兰,杨建春,张琦,等. HPLC法同时测定敏宁搽剂中二组分含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):977-979.

[12] 王珏,吴秀华,徐汉琴. HPLC法同时测定复方达克罗宁含漱液中主要成分的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(6):1010-1012.

[13] 夏方亮. HPLC法测定复方醋酸氯己定漱口水中醋酸氯己定和甲硝唑的含量[J]. 解放军药学学报,2015,31(3):252-253.

[14] 韩俊,曾焯俊,唐宏锋. 高效液相色谱法测定康泰唑冲洗液中甲硝唑、醋酸氯己定和硝酸咪康唑的含量[J]. 药物分析杂志,1997,17(1):9-11.

[15] 李博,杨兴官,李红玉. HPLC同时测定复方替硝唑载体栓中3组分含量[J]. 中国现代应用药学,2012,29(11):1015-1018.

[16] 姜韧,柯可,刘刚,等. HPLC测定皮湿霜中苯佐卡因、地塞米松磷酸钠和醋酸氯己定含量[J]. 药物分析杂志,2005,25(11):1336-1338.

(收稿日期:2021-11-09;修回日期:2021-12-16)

通则 1143 细菌内毒素检查法^{[7]178-181},对香菇多糖无菌原料药中的细菌内毒素进行了动态浊度检查方法学^[8]研究,同时考察了研磨法溶解样品的干扰性及回收率,为该产品采用动态浊度法进行细菌内毒素检查提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

VERSA max 型酶标仪(美谷分子仪器 <上海>有限公司);XS205DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司,精度为 0.01 mg);ZH-2 型自动旋涡混合器(天津药典标准仪器厂)。研钵和试管均置金属容器中,于 250 °C 烘箱中放置至少 30 min,以去除可能存在的外源性内毒素。

1.2 试剂

香菇多糖无菌原料药(南京某制药有限公司,批号分别为 Y1904101, Y1904102, Y1905103, 灰棕色颗粒);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(BET)用水(批号为 1909250,规格为每瓶 50 mL),动态浊度法鲎试剂(批号为 1912090,规格为每支 1.25 mL,检测范围为 10~0.01 EU/mL),细菌内毒素检查反应板(批号为 190603-078),均购自湛江安度斯生物有限公司;动态浊度法鲎试剂(福州新北生化工业有限公司,批号为 19071812,规格为每支 0.5 mL,检测范围为 10~0.01 EU/mL)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)确定

临床治疗时,注射用香菇多糖的使用剂量为 1 周 2 次,每次 1 mg,用 2 mL 灭菌注射用水振摇溶解,加 250 mL 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液,静脉滴注。按公式 $L = K / (f \cdot M)$ 计算,其中, L 为供试品的细菌内毒素限值; K 为人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 K 为 5 EU / (kg·h); f 为安全系数,由于本品为抗肿瘤辅助治疗药,为保证用药安全,根据指导原则, f 取值为 3^{[7]516-517}; M 为人用每千克体质量每小时的最高供试品剂量,人均体质量按 60 kg 计算,则 L 为 100 EU / mg。

2.2 供试品最大有效稀释倍数(MVD)确定

香菇多糖无菌原料药为分子量较大的多糖物质,未经过制剂工艺处理时,在水中极微溶解^[5]。制备样品时,先在不热原研钵中将颗粒状香菇多糖无菌原料药轻轻压碎,研磨成细粉,加入适量 BET 用水,继续研磨至香菇多糖溶散于其中,形成透明、均匀的溶液后,再用 BET 用水稀释至质量浓度为 0.2 mg / mL 的供试品溶液。按公式 $MVD = C \cdot L / \lambda$ 计算,其中, L 为供试品

的细菌内毒素限值, λ 为标准曲线上最低的内毒素浓度, C 为供试品溶液的浓度。本品 L 为 100 EU / mg, λ 为 0.031 25 EU / mL, 则 MVD 为 640 倍。

2.3 标准曲线建立与可靠性试验

取细菌内毒素工作标准品 1 支,用 BET 用水溶解,并稀释成终浓度分别为 2.000 00, 0.500 00, 0.125 00, 0.031 25 EU / mL 的系列标准曲线溶液,取上述溶液各 0.1 mL,加至预先加有 0.1 mL 鲎试剂的细菌内毒素检查反应板内,每个浓度平行 3 管。同时,以 BET 用水作阴性对照,平行 2 管。采用酶标仪测定,以细菌内毒素浓度对数值($\lg C$)为横坐标、平均反应时间对数值($\lg T$)为纵坐标绘制标准曲线,2 批(安度斯,批号为 1912090;福州新北,批号为 19071812)动态浊度法鲎试剂回归方程分别为 $\lg T_{安} = 2.957 - 0.213 \lg C_{安}$, $r = -0.999 0$; $\lg T_{福} = 2.939 - 0.205 \lg C_{福}$, $r = -0.996 0$ 。结果阴性对照溶液反应时间均大于最低浓度标准曲线溶液反应时间,2 种鲎试剂所作标准曲线相关系数的绝对值均大于 0.980,平行管之间变异系数均小于 5%,表明细菌内毒素浓度在 0.031 25 ~ 2.000 00 EU / mL 范围内,其对数值与平均反应时间对数值的线性关系良好,细菌内毒素的标准曲线均成立。结果见表 1。

表 1 细菌内毒素标准曲线的可靠性试验结果

Tab. 1 Reliability test results of the standard curves of bacterial endotoxin

细菌内毒素浓度 (EU / mL)	平均反应时间(s)		变异系数(%)	
	安度斯	福州新北	安度斯	福州新北
2.00 000	704	773	3.4	3.0
0.500 00	950	987	3.0	3.0
0.125 00	1 227	1 274	1.2	2.3
0.031 25	1 655	1 827	0.9	1.6
0	> 3 600	> 3 600		

2.4 干扰试验

取 3 批(批号分别为 Y1904101, Y1904102, Y1905103)香菇多糖无菌原料药,各 10 mg,精密称定,分别放入去除热原的研钵中,压碎,研细,加入 BET 用水 2 mL,继续研磨,直至香菇多糖溶散于 BET 用水中,并呈透明、均匀溶液状,转移至试管中,用 BET 用水稀释至质量浓度为 0.2 mg / mL 的溶液,备用。再用 BET 用水将上述溶液稀释至质量浓度分别为 5.000 0, 2.500 0, 1.250 0, 0.625 0, 0.312 5 μ g / mL 的系列供试品溶液 A;选择靠近标准曲线中点的内毒素浓度(0.25 EU / mL)作为 λ_m ,制备与供试品溶液 A 有相同稀释倍数且含细菌内毒素浓度为 λ_m (0.25 EU / mL)的供试品溶液 B;另以 2.3 项下标准曲线溶液作阳性对照,记作溶液 C,每个浓度平行 3 管;以 BET 用水作阴性对照,记作溶液 D,平行 2 管。

表2 干扰试验结果

Tab. 2 Results of the interference test

批号	取样量 (mg)	质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	供试品溶液内毒素(EU/mL)		外加内毒素 (EU/mL)	实测内毒素(EU/mL)		回收率(%)	
			安度斯	福州新北		安度斯	福州新北	安度斯	福州新北
Y1904101	10.23	5.000 0	0.023	0.033	0.25	0.533	0.600	204.00	226.80
	10.23	2.500 0	0.013	0.015	0.25	0.301	0.292	115.20	110.80
	10.23	1.250 0	0.005	0.006	0.25	0.270	0.268	106.00	104.80
	10.23	0.625 0	0.002	0.002	0.25	0.240	0.227	95.00	90.00
	10.23	0.312 5	*	*	0.25	0.232	0.228	92.80	91.20
Y1904102	10.09	5.000 0	0.018	0.031	0.25	0.488	0.578	188.00	218.80
	10.09	2.500 0	0.008	0.014	0.25	0.278	0.274	108.00	104.00
	10.09	1.250 0	0.003	0.007	0.25	0.233	0.270	92.00	105.20
	10.09	0.625 0	0.001	0.003	0.25	0.214	0.238	85.20	94.00
	10.09	0.312 5	*	0.001	0.25	0.200	0.221	80.00	88.00
Y1905103	10.17	5.000 0	0.025	0.028	0.25	0.522	0.543	198.80	206.00
	10.17	2.500 0	0.013	0.015	0.25	0.273	0.268	104.00	101.20
	10.17	1.250 0	0.007	0.008	0.25	0.258	0.290	100.00	112.80
	10.17	0.625 0	0.003	0.004	0.25	0.243	0.225	96.00	88.40
	10.17	0.312 5	0.001	0.001	0.25	0.212	0.241	84.40	96.00

注:*指供试品溶液中内毒素浓度低于检测限,故按0计算回收率。

Note:* indicates that the concentration of endotoxin in the test solution is lower than the limit of detection (LOD), so the above concentration can be regarded as 0 when the corresponding recovery rate was calculated.

表3 研磨法回收率试验结果

Tab. 3 Results of the recovery test by grinding method

质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	供试品溶液内毒素(EU/mL)		外加内毒素 (EU/mL)	实测内毒素(EU/mL)		回收率(%)	
	安度斯	福州新北		安度斯	福州新北	安度斯	福州新北
5.000 0	0.038	0.040	0.25	0.528	0.510	196.00	188.00
2.500 0	0.020	0.019	0.25	0.268	0.282	99.20	105.20
1.250 0	0.009	0.011	0.25	0.244	0.244	94.00	93.20
0.625 0	0.005	0.006	0.25	0.230	0.218	90.00	84.80
0.312 5	0.002	0.003	0.25	0.220	0.223	87.20	88.00

分别取供试品溶液A、供试品溶液B各0.1 mL,加至预先加有0.1 mL鲎试剂的细菌内毒素检查反应板内,采用酶标仪测定,每个浓度重复2管。测定完成后,按标准曲线回归方程分别计算供试品溶液A、供试品溶液B的细菌内毒素含量 C_1 和 C_s ,并按公式 $R = (C_s - C_1) / \lambda_m \times 100\%$ 计算回收率。结果见表2。当供试品溶液A的质量浓度为5.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,部分供试品溶液B的回收率大于200%;当质量浓度分别为2.500 0,1.250 0,0.625 0,0.312 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,供试品溶液B的回收率均在50%~200%范围内,均符合要求。故质量浓度选择2.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下进行样品定量测定。

2.5 研磨法处理样品细菌内毒素回收率试验^[9-10]

样品为难溶于水的大分子物质,在供试品溶液制备过程中,进行了分次物理研磨处理,为验证研磨过程

对细菌内毒素生物活性的影响,取细菌内毒素工作标准品1支,加BET用水溶解,按2.3项下方法制备含细菌内毒素0.25 EU/mL的溶液,备用,记为 λ_m 。分别取香菇多糖无菌原料药(批号为Y1904101)10.12,10.10 mg,精密称定,按2.4项下方法分别制备溶液A、溶液B、溶液C、溶液D,采用酶标仪测定,并绘制标准曲线,分别得回归方程 $\lg T_{安} = 2.821 - 0.254 \lg C_{安}, r = -0.999 6$; $\lg T_{福} = 2.883 - 0.235 \lg C_{福}, r = -0.999 0$ 。计算样品中细菌内毒素含量,并计算研磨法细菌内毒素的回收率。由表3可知,当供试品溶液的质量浓度为0.312 5~5.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细菌内毒素回收率均在50%~200%范围内;当质量浓度为2.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下时,细菌内毒素回收率均在80%~120%范围内,均符合要求。故质量浓度选择2.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行样品定

量测定。

2.6 样品中细菌内毒素含量测定结果

取3批(批号分别为Y1904101, Y1904102, Y1905103)香菇多糖无菌原料药各10 mg, 精密称定, 分别用BET用水稀释成质量浓度为2.500 0 μg/mL的供试品溶液。按2.3项下方法制备标准曲线溶液和阴性对照溶液, 标准曲线及相关系数为 $\lg T = 2.911 - 0.203 \lg C$, $r = -0.999 0$ 。选择0.25 EU/mL作为 λ_m , 同时制备含上述供试品质量浓度及细菌内毒素浓度为 λ_m 的供试品阳性对照溶液, 取上述溶液各0.1 mL, 加至预先加有0.1 mL鲎试剂的细菌内毒素检查反应板内, 采用酶标仪测定, 每批样品重复2管。结果见表4。

表4 样品中细菌内毒素含量测定结果(安度斯)

Tab. 4 Results of content determination of bacterial endotoxin in samples (Zhanjiang A&C Biological Co., Ltd.)

批号	取样量 (mg)	供试品溶液内 毒素(EU/mL)	外加内毒素 (EU/mL)	实测内毒素 (EU/mL)	回收率 (%)
Y1904101	10.15	0.013	0.25	0.256	97.20
Y1904102	10.09	0.010	0.25	0.262	100.80
Y1905103	10.21	0.018	0.25	0.288	108.00

3 讨论

细菌内毒素的检查方法包括凝胶法和光度测定法^{[7]178-181}, 其中凝胶法是通过鲎试剂与内毒素产生凝集反应的原理进行细菌内毒素限度检测的方法; 光度测定法包括浊度法和显色基质法, 浊度法是利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化而定量测定内毒素含量的方法。相比于传统的凝胶法, 动态浊度法具有操作方便、快捷、检测范围宽、灵敏度高优点, 当样品中含有一定量的内毒素时, 动态浊度法可以通过回收率判定样品的干扰情况, 方便试验者对假阳性结果作出判断^[11]。

本研究中建立了定量检测香菇多糖无菌原料药中细菌内毒素的动态浊度法, 当样品质量浓度为0.312 5~2.500 0 μg/mL时, 对试验无干扰作用, 可选用质量浓度为2.500 0 μg/mL的供试品溶液进行定量测定。曾建立了检测香菇多糖无菌原料药中细菌内毒素的凝胶法^[12], 与本检测结果一致。

香菇多糖属大分子化合物, 难溶于水, 可溶于热水或稀碱。用热水或稀碱处理样品, 会对细菌内毒素的生物活性产生影响。温度低于70℃, 内毒素分子的破坏程度与时间呈正比^[13]; 碱溶液对细菌内毒素也有一定破坏作用, 且实际操作中, 碱溶解样品后, 需要用酸回调溶液的pH值至合适范围内^[14], 操作烦琐。本研究中采用物理研磨法增加了香菇多糖无菌原料药的溶解性, 以提升样品的溶解速度, 操作简便, 且3批香菇多糖无

菌原料药的细菌内毒素回收率均接近100%, 表明物理研磨法对细菌内毒素的生物活性无影响。

动态浊度法检测细菌内毒素在生产与临床上有良好的应用前景。反应曲线可直观显示反应过程, 快速、准确测定样品中的内毒素含量, 并考察样品受干扰情况, 有利于在生产过程中实时监控无菌原料药的污染情况, 降低生产风险^[15]。由于单位时间内人体仅可承受一定限值的细菌内毒素, 多种药物中细菌内毒素叠加, 如超过限值, 会导致危险^[16]。而本品为癌症辅助治疗药物, 与其他药物联用时, 动态浊度法能准确、快速测定各药品中细菌内毒素的量值, 可作为临床联合用药的参考。

参考文献

- [1] 周伟, 凌亮, 郭尚. 香菇食药价值综述[J]. 食药菌, 2020, 28(6): 461-465.
- [2] 芦笛. 晚清报刊所载稀见食药用菌史料选录[J]. 食用菌, 2017, 39(4): 69-71.
- [3] 李钦艳, 钟莹莹, 钟冬晖, 等. 香菇多糖的研究进展[J]. 食用菌, 2020, 42(5): 5-8.
- [4] 侯爱萍, 张树梅. 香菇多糖抗菌抗病毒普适性研究[J]. 药学研究, 2015, 34(4): 199-201.
- [5] 汲晨锋, 岳磊. 香菇多糖的化学结构及抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(18): 1536-1539.
- [6] 李勤, 张媛, 孟祥珍. 香菇多糖注射液结合吉非替尼对非小细胞肺癌疗效、肺功能、不良反应影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(4): 163-166.
- [7] 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, 2020.
- [8] 魏霞, 国明, 祝清芬, 等. 丹红注射液凝胶法和动态浊度法细菌内毒素检查[J]. 中国药事, 2012, 26(12): 1357-1359.
- [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] 郝敏, 矫建, 刘进朋. 度骨化醇细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药品标准, 2020, 21(6): 526-530.
- [11] 尹立平. 细菌内毒素检查法-动态浊度法[J]. 天津药学, 2014, 26(1): 50-52.
- [12] 丁苏苏, 马若群, 刘慧, 等. 香菇多糖原料药热原检查法和细菌内毒素检查法的建立与比较[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(15): 1896-1901.
- [13] 周素文, 李波. 细菌内毒素检查法常见问题[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(19): 1516-1518.
- [14] 马莉, 张崧, 王安航, 等. 细菌内毒素定量检测方法的常见问题剖析[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(9): 733-734.
- [15] 刘薇薇, 甘国峰. 动态浊度法测定醒脑静注射液中间产品细菌内毒素的含量[J]. 中国医药指南, 2015, 13(8): 42-43.
- [16] 詹云丽, 李楚云, 刘杜妙, 等. 小针剂配伍输液中细菌内毒素的定量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1181-1184.

(收稿日期: 2021-10-27; 修回日期: 2022-01-21)