

中图分类号: R917; R977.4

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)05-0073-04

doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.017



盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素检查法的研究

黄 逴, 谢 鹏[△]

(广西壮族自治区食品药品检验所, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素的检测方法。方法 按2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法,采用凝胶法对样品进行干扰试验和细菌内毒素检查,采用动态浊度法定量检测样品中细菌内毒素的含量。结果 Tris缓冲液稀释供试品,调节pH值在6.0~8.0范围内,可有效消除盐酸赖氨酸(注射用)对细菌内毒素的干扰。凝胶法和动态浊度法试验均符合规定,动态浊度法的回收率为84.75%~96.12%,在50%~200%范围内。结论 所建立的方法可行,可用于盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素的检查。

关键词: 盐酸赖氨酸(注射用);细菌内毒素;凝胶法;动态浊度法

Bacterial Endotoxin Test of Lysine Hydrochloride (for Injection)

HUANG Lu, XIE Peng

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish a bacterial endotoxin test method of Lysine Hydrochloride (for Injection). Methods According to the bacterial endotoxin test in the general rule 1143 of the Chinese Pharmacopoeia (Edition 2020, Volume IV), the interference test and bacterial endotoxin test were carried out on the samples by the gel method, and the content of bacterial endotoxin in the sample was quantitatively detected by the dynamic turbidimetry. Results Diluting the test sample with Tris buffer and adjusting the pH value within the range of 6.0 - 8.0 could effectively eliminate the interference of Lysine Hydrochloride (for Injection) on bacterial endotoxins. The tests of the gel method and dynamic turbidimetry could meet the requirements. The recovery rate of dynamic turbidimetry was in the range of 84.75% - 96.12%, which was in the range of 50% - 200%. Conclusion The established method can be used for the bacterial endotoxin test of Lysine Hydrochloride (for Injection).

Key words: Lysine Hydrochloride (for Injection); bacterial endotoxin; gel method; dynamic turbidimetry

赖氨酸是人体8种必需氨基酸之一,能改善人类膳食营养,促进人体的健康发育,增强免疫力,提高中枢神经功能^[1-3],临床主要用于颅脑外伤、慢性脑组织缺血及缺氧性疾病的神经元保护^[4-5],可提高血脑屏障通透性,帮助药物进入脑细胞。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出来,极微量内毒素进入人体即可产生发热反应^[6],大量内毒素易导致休克、多器官衰竭甚至死亡^[7-9]。发热是盐酸赖氨酸的不良反应^[10],以盐酸赖氨酸(注射用)作为注射剂的原料药时必须严格控制其生产质量及细菌内毒素含量。细菌内毒素按2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法^[11]检测,通常采用鲎试剂试验法^[12]检测,包括凝胶法及光度测定法。其中,凝胶法是检测细菌内毒素最常用的方法,光度测定法包括浊度法和显色基质法。细菌内毒素动态浊度法是以凝胶试验为基础发展起来的细菌内毒素定量检测方法^[13-14],通过标准曲线对样品中的内毒素含量进行定量检测^[15],利用细菌内毒素在鲎试剂形成凝胶过程中的浊度变化定量

测定细菌内毒素。本研究中参照2020年版《中国药典(四部)》通则1143项下方法,采用凝胶法和动态浊度法进行盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素检查。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Multiskan ET型酶标仪(定量内毒素专用,美国Thermo Fisher公司);ME204型电子天平(精度为万分之一),Seven excellence型多参数测定仪,均购于Mettler Toledo公司;GR110DR型高压蒸汽灭菌锅(致微<厦门>仪器有限公司);VORTEX型周围振荡器(德国IKA公司);DKB-8A型电热恒温槽(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂

盐酸赖氨酸(注射用,广西南宁邕江药业有限公司,批号分别为22060701,22060801,22060901);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为2105281,效价为每支10 EU);鲎试剂(KTA,灵敏度为

第一作者:黄逴,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品、药包材、保健食品检验检测,(电子信箱)13877181060@163.com。

[△]通信作者:谢鹏,女,壮族,硕士,主管药师,研究方向为药品检验与药理学,(电子信箱)cpuxiepeng@163.com。

10~0.005 EU/mL,规格为每支1.25 mL,批号为2203090),鲎试剂(TAL-1,灵敏度为0.25 EU/mL,规格为每支0.1 mL,批号为2012101),细菌内毒素检查用水(BET,批号为2105140,规格为每瓶50 mL),Tris缓冲液(批号为2104210,规格为每支4.0 mL),均购于湛江安度斯生物有限公司);鲎试剂(TAL-2,湛江博康海洋生物有限公司,批号为2011203,灵敏度为0.25 EU/mL,规格为每支0.1 mL)。

2 方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素限值(L)确定

按规定, $L=K/M$,其中K为人最大可接受的内毒素剂量[EU/(kg·h)],盐酸赖氨酸(注射用)供生产注射剂使用,注射剂K为5 EU/(kg·h);M为人用最大供试品剂量[mg/(kg·h)],盐酸赖氨酸(注射用)临床1次最大使用剂量为3.0 g,则成人的最大剂量M为50 mg/(kg·h)。故L为0.1 EU/mg。根据注射剂安全性检查的从严原则,确定盐酸赖氨酸(注射用)限值为“每1 mg盐酸赖氨酸中含内毒素的量应小于0.01 EU”,与2020年版《中国药典》的要求一致,即拟订L为0.01 EU/mg。

2.2 凝胶法

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核

用BET溶解细菌内毒素工作标准品,并制成2λ,λ,0.5λ,0.25λ 4个浓度的溶液。按《中国药典》规定,对鲎试剂的灵敏度进行复核,结果2批鲎试剂的测定灵敏度(λ_c)与标示灵敏度(λ)一致。详见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab.1 Verification results of the sensitivity of tachypleus ameobocyte lysate

鲎试剂	细菌内毒素浓度(EU/mL)				NC	λ (EU/mL)	λ _c (EU/mL)
	0.5	0.25	0.125	0.0625			
TAL-1	++++	++++	----	----	--	0.25	0.25
TAL-2	++++	++++	----	----	--	0.25	0.25

2.2.2 干扰预试验

干扰试验一:根据公式计算最小有效稀释浓度(MVC),公式 $MVC=\lambda/L$ 。其中,L为细菌内毒素限值0.01 EU/mg;λ为鲎试剂标示灵敏度。常用的鲎试剂灵敏度为0.03~0.5 EU/mL,则供试品对应有效稀释浓度为 $C_{0.5}=0.5/0.01=50\text{ mg/mL}$, $C_{0.03}=0.03/0.01=3\text{ mg/mL}$ 。故选择灵敏度为0.25 EU/mL的鲎试剂进行干扰预试验。取样品(批号为22060701)0.25 g,加BET 5.0 mL溶解成质量浓度为50 mg/mL的溶液,用BET稀释成质量浓度分别为25,12.5,6.25,3.125 mg/mL的系列溶液,作为鲎试剂标识灵敏度阳性对照(NPC);分别在上述系列溶液中加入细菌内毒素标准溶液,制成含2λ细菌内毒素的系列溶液,作为供试品阳性对照

(PPC);以BET为阴性对照(NC);以含2λ细菌内毒素的溶液为阳性对照(PC)。取鲎试剂TAL-1和TAL-2,分别与NPC,PPC,PC反应,各浓度平行2管,观察各管的凝胶反应。结果供试品质量浓度低于6.25 mg/mL时对细菌内毒素标准品与鲎试剂反应无干扰,供试品的其他浓度均干扰较大,试验无效。详见表2。考虑到用BET溶解后供试品的pH约为5.4,在最佳测试的(pH 6.0~8.0)。因此,选择碱性的Tris缓冲液稀释供试品,提高供试品pH值,进行干扰预试验二。

表2 盐酸赖氨酸(注射用)干扰预试验一结果

Tab.2 Results of the interference preparatory test I of Lysine Hydrochloride (for Injection)

鲎试剂	系列	盐酸赖氨酸(注射用)质量浓度(mg/mL)					PC	NC
		50	25	12.5	6.25	3.125		
TAL-1	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++		
TAL-2	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	--	--	++	++		

干扰预试验二:取样品(批号为22060701)0.25 g,加Tris缓冲液5.0 mL溶解,制成质量浓度为50 mg/mL的溶液(pH为7.12),其余操作同干扰预试验一,观察各管的凝胶反应。结果样品质量浓度在3.125~50 mg/mL范围内均无干扰。详见表3。

表3 盐酸赖氨酸(注射用)干扰预试验二结果

Tab.3 Results of the interference preparatory test II of Lysine Hydrochloride (for Injection)

鲎试剂	系列	盐酸赖氨酸(注射用)质量浓度(mg/mL)					PC	NC
		50	25	12.5	6.25	3.125		
TAL-1	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++	++	++		
TAL-2	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	++	++	++	++	++		

2.2.3 干扰试验

选择质量浓度为50 mg/mL的供试品,灵敏度为0.25 EU/mL的鲎试剂进行试验。用BET溶解并稀释细菌内毒素工作标准品,得最终浓度为0.5,0.25,0.125,0.0625 EU/mL系列溶液。取3批供试品(批号分别为22060701,22060801,22060901)0.25 g,分别加Tris缓冲液5.0 mL溶解,制成质量浓度为50 mg/mL的溶液(pH分别为7.10,7.18,7.13)。设溶剂系列和样品系列,取不同浓度的细菌内毒素溶液各100 μL,分别加入100 μL鲎试剂水溶液或100 μL鲎试剂样品溶液,每个浓度平行4管。阴性对照(NC)和鲎试剂标示灵敏度对照(NPC)各设2个平行管,反应结果按公式 $E_s=\text{antilg}(\sum X_s/4)$ 和 $E_t=\text{antilg}(\sum X_t/4)$ 计算。其中, X_s 和 X_t 分别为溶剂系列、

样品系列各反应终点细菌内毒素浓度的对数值。反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后1个呈阳性结果的浓度。结果 E_s 和 E_t 均为0.25 EU/mL,表明质量浓度为50 mg/mL时,3批样品均无干扰,可采用凝胶法进行检查。详见表4。

表4 盐酸赖氨酸(注射用)质量浓度为50 mg/mL时的干扰试验结果

Tab. 4 Results of the interference test of Lysine Hydrochloride (for Injection) with mass concentration of 50 mg/mL								
鲎试剂	批号	细菌内毒素浓度(EU/mL)				NC	效价 (EU/mL)	E_s/E_t
		0.5	0.25	0.125	0.0625			
TAL-1	水	++	++	--	--	--	$E_s=0.25$	
	22060701	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	22060801	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	22060901	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	TAL-2 水	++	++	--	--	--	$E_s=0.25$	
TAL-2	22060701	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	22060801	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0
	22060901	++++	++++	----	----	--	$E_t=0.25$	1.0

2.2.4 样品细菌内毒素检查

按2020年版《中国药典(四部)》通则1143 细菌内毒素检查法,使用2个不同厂家、灵敏度为0.25 EU/mL的鲎试剂,对质量浓度为50 mg/mL的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均符合规定。详见表5。

表5 盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素检查结果

Tab. 5 Results of the bacterial endotoxin test of Lysine Hydrochloride (for Injection)					
鲎试剂	批号	供试品	PPC	PC	NC
TAL-1	22060701	--	++	++	--
	22060801	--	++	++	--
	22060901	--	++	++	--
TAL-2	22060701	--	++	++	--
	22060801	--	++	++	--
	22060901	--	++	++	--

2.3 动态浊度法

2.3.1 标准曲线建立和可靠性分析

用BET溶解并稀释细菌内毒素工作标准品,得浓度为0.12,0.06,0.03,0.015 EU/mL的系列溶液,每次稀释于漩涡混合器中混匀30 s,每个浓度平行3管。用BET作阴性对照,平行2管。精密量取上述标准溶液及阴性对照溶液各100 μ L,分别加入含100 μ L 鲎试剂的光度法检测用试管中,混匀,采用细菌内毒素测定仪测定。测定条件为温度(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C,检测波长405 nm,反应时间3 600 s。以细菌内毒素标准品浓度的对数($\lg C$)为横坐标、反应时间的对数($\lg t$)为纵坐标进行线性回

归,回归方程 $\lg t = 2.8696 - 0.2895 \lg C$, $r = -1.0000$ ($n = 4$),平行管间的变异系数(CV)为0.56%~1.89%,均小于2%,阴性对照管反应时间大于规定检测时间,故细菌内毒素标准曲线成立。详见表6。

表6 盐酸赖氨酸(注射用)标准曲线可靠性分析结果

Tab. 6 Results of the reliability test of the standard curve of Lysine Hydrochloride (for Injection)		
内毒素浓度(EU/mL)	平均反应时间(s)	CV(%)
0.015	2 457.5	1.89
0.03	2 280.1	0.56
0.06	2 065.9	1.23
0.12	1 888.3	0.78

2.3.2 样品溶液配制及干扰试验

按规定,最大有效稀释倍数按 $MVD = CL/\lambda$ 公式计算。式中, L 为细菌内毒素限值0.01 EU/mg, λ 为标准曲线细菌内毒素最低浓度0.015 EU/mL,得到试验最大稀释倍数为66.7倍。

取样品(批号为22060701)0.50 g,加Tris缓冲液5.0 mL溶解制成质量浓度为100 mg/mL的溶液(pH为6.98),用BET将上述溶液稀释成1,2,4,16,64倍的系列溶液(A液)。根据标准曲线,制备含细菌内毒素浓度为0.06 EU/mL的上述浓度的供试品溶液(B液);细菌内毒素浓度为0.12,0.06,0.03,0.015 EU/mL的标准曲线溶液(C液);以BET为阴性对照溶液(D液)。取上述溶液100 μ L,分别加入含100 μ L 鲎试剂的光度法检测用试管中,混匀,采用细菌内毒素测定仪测定。每个浓度平行2管,计算回收率。回收率(%) = $(C_s - C_t)/\lambda_m \times 100\%$ 。其中, C_t 为供试品溶液中内毒素含量, C_s 为含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量, λ_m 为0.06 EU/mL。标准曲线回归方程为 $\lg t = 2.8106 - 0.3064 \lg C$, $r = 0.9995$ ($n = 5$)。结果样品在稀释倍数为1,2,4,16,64倍条件下试验的干扰性降低,回收率在50%~200%范围内,均符合规定;且当供试品的稀释倍数为1,2,4倍时的回收率较好,且稀释倍数较小,引入误差小。故选择100,50,25 mg/mL质量浓度进行测定。详见表7。

表7 盐酸赖氨酸(注射用)干扰试验结果

Tab. 7 Results of the interference test of Lysine Hydrochloride (for Injection)				
供试品质量浓度(mg/mL)	C_t (EU/mL)	C_s (EU/mL)	回收率(%)	阴性对照溶液(EU/mL)
100	0.00389	0.05437	84.13	<0.00107
50	0.00346	0.05689	89.05	<0.00107
25	0.00361	0.06092	95.52	<0.00107
6.25	0.00322	0.07197	114.58	<0.00107
1.5625	0.00353	0.09730	156.28	<0.00107

2.3.3 样品中细菌内毒素含量测定结果

取3批样品(批号分别为22060701, 22060801, 22060901)各0.5 g,分别加Tris缓冲液5.0 mL溶解,成质量浓度为100 mg/mL的溶液(pH分别为7.01, 7.06, 7.03),用BET将上述溶液稀释成1,2,4倍的系列溶液。按2.2.2项下方法制备标准曲线溶液和阴性对照溶液,选择0.06 EU/mL作为 λ_m ,制备含细菌内毒素浓度为 λ_m 的上述供试品浓度的溶液。分别取100 μ L,加入含100 μ L鲎试剂的光度法检测用试管中,混匀,采用细菌内毒素测定仪测定,每个浓度平行2管。标准曲线回归方程为 $\lg t = 2.8465 - 0.3064 \lg C, r = 0.9979 (n = 3)$ 。结果回收率符合要求,准确稳定,表明供试品在选取的稀释浓度下对试验无干扰。详见表8。

表8 盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素检查结果

Tab. 8 Results of the bacterial endotoxin test of Lysine Hydrochloride (for Injection)

供试品批号	供试品质量浓度(mg/mL)	回收率(%)	实测值(EU/mg)
22060701	100	84.75	<0.004
	50	88.86	<0.004
	25	94.89	<0.004
22060801	100	85.23	<0.004
	50	90.24	<0.004
	25	96.12	<0.004
22060901	100	85.07	<0.004
	50	89.71	<0.004
	25	95.46	<0.004

3 讨论

盐酸赖氨酸(注射用)水溶液呈微酸性,pH值为5.4,已超过细菌内毒素检查法的适宜范围。预试验中,采用细菌内毒素检查用水稀释样品,凝胶法试验干扰较强,动态浊度法试验结果显示回收率均不理想。通过过滤、中和、透析、加热等方法对样品进行处理,以避免干扰。考虑pH值的影响,本研究中采用Tris缓冲液稀释样品,保证样品pH值为7.0,符合细菌内毒素检查法的适宜范围。结果凝胶法的干扰较小,且动态浊度法的试验回收率均在50%~200%范围内,可见上述处理方法能消除干扰因素对细菌内毒素检查的影响。本研究中建立了检测盐酸赖氨酸(注射用)中细菌内毒素的凝胶法和动态浊度法,结果表明,凝胶法试验中盐酸赖氨酸(注射用)的 L 为0.01 EU/mg,质量浓度稀释至50 mg/mL时,对鲎试剂与细菌内毒素工作标准品的反应无明显干扰;动态浊度法试验中,质量浓度为100,

50,25 mg/mL时,回收率为84.75%~96.12%,该系列浓度下对试验无干扰。在凝胶法中,样品稀释较小倍数,可消除干扰,试验有效;在动态浊度法中,较高质量浓度可排除干扰,测得定量数据。凝胶法和动态浊度法所选择的稀释倍数均低于现行标准中的稀释倍数,操作方便快捷,具有检测范围宽、灵敏度高的优点。

综上所述,所建立的检测盐酸赖氨酸(注射用)细菌内毒素的凝胶法和动态浊度法均可行,可用于其细菌内毒素的质量控制。

参考文献

[1] 陆志范,周全保. 赖氨酸的药用功能[J]. 药学实践杂志, 1996,14(4):255-256.

[2] FLODIN NW. The metabolic roles, pharmacology and toxicology of lysine[J]. J Am Coll Nutr, 1997,16(1):7-21.

[3] 左云龙,王兴勇. 口服L-赖氨酸对小儿生长发育及营养影响的临床研究[J]. 现代医药卫生,2004,20(19):1960-1961.

[4] 李红琴,王建龙,高震,等. 盐酸赖氨酸与七叶皂苷钠对脑出血大鼠脑内TNF- α ,IL-6表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(3):688-690.

[5] 林茂晖,林日天. 盐酸赖氨酸(注射用)原料药治疗100例轻中型脑损伤疗效观察[J]. 福建医药杂志,2002,24(6):152-153.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 钱明明,刘益庆. 动态浊度法检测复方蒲公英注射液中细菌内毒素[J]. 中国药业,2021,30(4):53-55.

[9] HIRATA N, YANAGAWA Y, SATOH M, et al. Dendritic cell-derived TNF α is responsible for development of IL-10 producing CD4⁺ T cells[J]. Cell Immunol,2010,261(1):37-41.

[10] 丘萌,郭晓涛,安涛,等. 盐酸赖氨酸致新生儿药物热1例[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(4):254.

[11] 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,2020:178.

[12] 张虞婷,丁苏苏,李倚云. 细菌内毒素的研究进展及其检查应用[J]. 天津药学,2015,27(5):66-69.

[13] 杨晨曦. 细菌内毒素试验凝胶定性法与动态浊度定量法的比较[J]. 临床血液学杂志,2010,23(6):366-368.

[14] 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.

[15] 朱佳丽,段鹏,曹慧,等. 动态浊度法定量测定碘克沙醇中细菌内毒素的含量[J]. 中国药师,2016,19(2):384-386.

(收稿日期:2023-04-14;修回日期:2023-11-10)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊
《中国药业》杂志 特别欢迎重点科研、基金项目论文投稿!