

中图分类号: R917; R991 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)15-0073-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.15.018



微量凝胶法测定细菌内毒素探讨

程 宾, 苏 雯, 王红艳, 王 莉[△]

(云南省食品药品监督检验研究院, 云南 昆明 650106)

摘要:目的 建立测定样品中细菌内毒素的微量凝胶法。方法 按2020年版《中国药典(四部)》1143 细菌内毒素检查法进行试验, 通过预试验确定适合试验的试管内径(4, 8 mm)及加样量(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ L)后, 再进行完整的鲎试剂灵敏度复核试验及样品细菌内毒素检查试验, 并与药典收载现行凝胶法进行比较。结果 预试验结果显示, 确定采用内径为8 mm的平底玻璃试管, 加样量为40 μ L或50 μ L进行微量凝胶法试验。对鲎试剂进行灵敏度复核, 微量凝胶法灵敏度复核结果与药典收载现行凝胶法一致, 均在灵敏度合格范围内。对样品进行细菌内毒素检查, 微量凝胶法试验结果与药典收载现行凝胶法一致。结论 该微量凝胶法可作为药典收载现行凝胶法的补充或替代方法, 鲎试剂缺乏的情况下可用于灭菌制剂的细菌内毒素检查。

关键词:微量凝胶法; 细菌内毒素检查; 鲎试剂; 补充替代方法

Determination of Bacterial Endotoxin by the Micro - Gel Method

CHENG Bin, SU Wen, WANG Hongyan, WANG Li

(Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China 650106)

Abstract: Objective To establish a micro - gel method for the determination of bacterial endotoxin in samples. **Methods** Test

第一作者: 程宾, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品及生物制品质量标准, (电子信箱)46049141@qq.com。

[△]通信作者: 王莉, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物检验与药理学, (电子信箱)liwangmail@163.com。

物碱^[14-15], 以盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱作为质控指标。全方四味药配合有度, 故选择白头翁皂苷B₄、菊苣酸、绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱作为质控指标性成分建立指纹图谱。

3.3 色谱条件选择

曾考察乙腈-磷酸溶液(0.2%, 0.5%), 乙腈-磷酸二氢钾溶液(0.02, 0.05 mol/L), 乙腈-0.1%磷酸溶液(每100 mL加十二烷基磺酸钠0.1 g)等流动相体系, 以及不同提取溶剂(甲醇、75%甲醇溶液、50%甲醇溶液), 不同检测波长(203, 210, 280, 323 nm), 不同柱温(25, 30, 35 $^{\circ}$ C), 不同流速(0.1, 0.3, 0.5 mL/min), 不同进样量(1, 2, 3 μ L)等色谱条件对色谱峰的影响。最终确定2.1项下色谱条件, 该色谱条件下检出的色谱峰对称因子和分离度均符合检测要求。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简单、结果准确, 可客观评价白蒲黄胶囊的质量, 后续研究中将继续验证5号峰的成分。建议生产企业将白头翁皂苷B₄、菊苣酸、绿原酸3个指标性成分纳入白蒲黄胶囊的内部质量控制标准, 建立全面、稳定的质量标准体系。

参考文献

[1] WS-10571(ZD-0571)-2002, 国家中成药标准汇编中成药地方标准上升国家标准[S].
[2] 魏婷婷, 金苗苗, 甘晓芳, 等. UPLC-MS/MS法同时测定白蒲黄胶囊中12种有效成分[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(1):97-101.
[3] 李军鸽, 王永春, 孟珈同, 等. 黄连解毒汤中盐酸小檗碱、黄

芩苷、黄柏碱、栀子苷的含量测定[J]. 人参研究, 2021, 33(5):19-24.
[4] 阮仁余, 邓祥敏, 王朝, 等. UPLC法同时测定蒲地蓝消炎口服液中9种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(2):194-197.
[5] 贾娅倩, 马琪, 张晓松, 等. 白头翁汤中6种指标成分含量测定[J]. 动物医学进展, 2019, 40(8):55-61.
[6] 陆绍铭, 徐鑫, 薛倩倩, 等. 基于超高效液相色谱-紫外检测定量指纹图谱结合化学模式识别的复方金钱草颗粒质量评价[J]. 色谱, 2022, 40(12):1102-1110.
[7] 李林杰, 谢谭芳, 王昱涵, 等. 壮药金母颗粒的指纹图谱建立、化学计量学分析及多组分含量测定[J]. 中国药房, 2022, 33(4):439-446.
[8] 袁进, 张丽峰, 高红伟, 等. 白头翁皂苷B₄药理作用研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(7):2229-2233.
[9] 宋聚才, 巩跃生, 刘全林. 白头翁汤对结肠直肠癌小鼠肠道菌群、炎症因子及HER-2表达的影响[J]. 中医药信息, 2022, 39(3):20-24.
[10] 秦聪聪, 杜沁圆, 张义敏, 等. 蒲公英的本草考证[J]. 中国药房, 2022, 33(20):2556-2560.
[11] 任汉书, 朱文卿, 郑媛媛, 等. 蒲公英的功能性成分及生物活性研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(2):4-12.
[12] 黄玉普, 吴大章, 王森. 黄芩的药理作用及其药对研究进展[J]. 中国药业, 2022, 31(15):1-5.
[13] 任正肖, 车萍, 李紫薇, 等. 黄芩化学成分和药理作用的研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(3):65-67.
[14] 王玲, 杜潇, 祝华莲, 等. 黄柏有效成分的药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2022, 54(4):77-81.
[15] 许海健, 朱倩, 丁康, 等. 黄芩苷治疗炎症性肠病的作用机制研究进展[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(1):219-223.

(收稿日期:2023-06-02;修回日期:2024-03-03)

was conducted according to 1143 bacterial endotoxin test method in the *China Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), the tube diameter (4, 8 mm) and sample volume (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μL) suitable for the test were determined through pre-test, and then the sensitivity check test of tachypleus amebocyte lysate (TAL) and the bacterial endotoxin test of samples were conducted and compared with the current gel method collected in the *China Pharmacopoeia*. **Results** The pre-test results showed that the flat glass test tube with the inner diameter of 8 mm and the sample volume of 40 μL or 50 μL were determined to be used for the micro-gel method. The sensitivity check test of TAL was conducted and the sensitivity check result of micro-gel method was consistent with the current gel method in the *China Pharmacopoeia*, and they were within the acceptable range of sensitivity. The bacterial endotoxin test of samples was conducted, and the result of the micro-gel method test was consistent with the current gel method in the *China Pharmacopoeia*. **Conclusion** The micro-gel method can be used as a supplement or alternative to the current gel method in the *China Pharmacopoeia*, which can be used for the bacterial endotoxin test of sterilized preparations in the absence of TAL.

Key words: micro-gel method; bacterial endotoxin test; tachypleus amebocyte lysate; supplemental or alternative method

鲎试剂作为检测灭菌制剂细菌内毒素污染的重要指标,在灭菌制剂的安全性检查中起不可替代的作用。由于环境的恶化、过度捕捞等,鲎资源日益枯竭,我国已将中国鲎和圆尾蝎鲎列入国家二级保护动物名录^[1-5],我国鲎试剂的产量已难以满足灭菌制剂细菌内毒素检测的需求。为此,本研究中在原细菌内毒素检查法凝胶法的基础上不改变试验方法,通过减小反应试管内径而减少鲎试剂用量,以节约鲎试剂,保护鲎资源。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

FD115型电热鼓风干燥箱(德国Binder公司);ZH-2 BLENDER型旋涡混合器(天津药典标准仪器厂);TW20型恒温水浴箱(德国Julabo公司)。

1.2 试药

鲎试剂[规格为每瓶0.1 mL;湛江博康海洋生物有限公司,批号分别为2003052,2004061,1911181,灵敏度(λ)分别为0.03,0.06,0.125 EU/mL;湛江安度斯生物有限公司,批号分别为2009021,2010281, λ 分别为0.03,0.06 EU/mL;福州新北生化工业有限公司,批号分别为20081602,20050612, λ 分别为0.03,0.06 EU/mL];细菌内毒素检查用水(WBET,规格为每瓶50 mL;湛江博康海洋生物有限公司,批号为2004210;湛江安度斯生物有限公司,批号为1911070;福州新北生化工业有限公司,批号为20100120);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为150601-202088,规格为每瓶60 EU);维生素C注射液(云南白药集团股份有限公司,批号分别为ZAA2125,ZAA2103,ZCA2104,规格为每支5 mL:1 g);注射用头孢曲松钠(昆明积大制药有限公司,批号分别为190104,190105,190106,规格为每瓶1.0 g);甲硝唑氯化钠注射液(昆明南疆制药有限公司,批号分别为B20090201AS,B20090202AS,B20090203AS,规格为每瓶100 mL)。

2 方法与结果

2.1 预试验确定试管内径与加样量

用WBET将细菌内毒素工作标准品制成内毒素浓度为2 λ 的阳性溶液,以WBET为阴性溶液,溶解若干支鲎试剂,合并,混匀,再分别取内径为4, 8 mm的除内毒素平底玻璃试管,试管中加入不同加样量鲎试剂,再等量加入阳性溶液或阴性溶液,其中内径为4 mm试管的加样量分别为10, 20, 30, 40 μL ,内径为8 mm试管的加样量分别为10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μL ,置37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中保温60 min,结果判断与2020年版《中国药典(四部)》1143 细菌内毒素检查法规定的凝胶法一致,各浓度重复2管,结果见表1。可见,试管内径为4 mm时,复溶后的鲎试剂有一定黏度及液体表面张力,阳性溶液、阴性溶液结果均为阳性,不适合该试验;试管内径为8 mm时,加样量为30 μL 及以上时阳性溶液、阴性溶液结果与药典收载现行凝胶法结果一致,且方便观察。故进一步的方法对比试验选择内径为8 mm的试管,加样量为40, 50 μL 。

表1 预试验测定结果

Tab. 1 Results of the pre-test

试管内径	溶液	鲎试剂(批号为191181)加样量						
		10 μL	20 μL	30 μL	40 μL	50 μL	60 μL	70 μL
4 mm	阳性溶液(2 λ)	++	++	++	++			
	阴性溶液	++	++	++	++			
8 mm	阳性溶液(2 λ)	++	++	++	++	++	++	++
	阴性溶液	++	++	--	--	--	--	--

2.2 方法对比试验

使用不同厂家、不同灵敏度的鲎试剂,按2020年版《中国药典(四部)》1143 细菌内毒素检查法“鲎试剂灵敏度复核试验”项下规定进行试验,采用药典收载现行凝胶法与2.1项下确定方法进行平行试验,计算鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c),并对比试验结果。由表2可知,3个厂家(7个批号)的鲎试剂加样量不同,但微量凝胶

法灵敏度复核结果与药典收载现行凝胶法一致,均在灵敏度合格范围内,故以标示灵敏度使用。

表2 不同加样量鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 2 Results of the sensitivity check test of samples with different volume of TAL

鲎试剂 批号	加样量 (μL)	细菌内毒素浓度(EU/mL)						λ_c
		0.25	0.125	0.0625	0.03	0.015	0.0075	
1911181	100	++++	++++	----	----			0.125 000
	50	++++	++++	----	----			0.125 000
	40	++++	+++ -	----	----			0.148 651
20040601	100		++++	++++	+---	----		0.052 556
	50		++++	++++	+---	----		0.052 556
	40		++++	++++	++--	----		0.044 194
2003052	100			++++	++++	+---	----	0.026 278
	50			++++	++++	+---	----	0.026 278
	40			++++	++++	----	----	0.031 250
2010281	100		++++	++++	+++ -	----	----	0.037 163
	50		++++	++++	++--	----	----	0.044 194
	40		++++	++++	++--	----	----	0.044 194
2009021	100			++++	++++	++++	----	0.015 625
	50			++++	++++	++++	----	0.015 625
	40			++++	++++	++++	----	0.015 625
20050612	100		++++	++++	----	----	----	0.062 500
	50		++++	+++ -	----	----	----	0.074 325
	40		++++	++++	----	----	----	0.062 500
20081602	100			++++	++++	----	----	0.031 250
	50			++++	++++	----	----	0.031 250
	40			++++	++++	----	----	0.031 250

使用维生素C注射液、注射用头孢曲松钠、甲硝唑氯化钠注射液进行细菌内毒素凝胶法的检验,采用40, 50 μL 的加样量和药典收载现行凝胶法进行结果比对。由表3可知,采用药典收载现行凝胶法和2.1项下确定方法对3个品种(9批样品)进行细菌内毒素检查的结果均为阴性,提示样品合格,表明加样量为40 μL 或50 μL 的微量凝胶法试验均可替代药典收载现行凝胶法进行细菌内毒素检查。

3 讨论

2020年版《中国药典(四部)》新增的细菌内毒素检查法应用指导原则^[6]中除常规的凝胶法、光度法外,还收载了重组C因子法、微量凝胶法等方法。其中,重组C因子法是利用重组C因子试剂与内毒素反应过程中的荧光变化而测定内毒素含量,属终点荧光法^[7];微量凝胶法是一种采用微量鲎试剂和微量样品反应检测细菌内毒素的方法,操作方法与药典收载现行凝胶法基本相同,但加样量仅为1/10,节省了鲎试剂。由于加样量很小,对应的反应容器和结果判断方法也不相同^[8]。重

表3 不同加样量鲎试剂细菌内毒素检查结果

Tab. 3 Results of the bacterial endotoxin test of samples with different volume of TAL

生产厂家	药品名称	批号	鲎试剂加样量		
			100 μL	40 μL	50 μL
云南白药集团股份 有限公司	维生素C 注射液	ZAA2125	--	--	--
		ZAA2103	--	--	--
		ZCA2104	--	--	--
昆明积大制药 有限公司	注射用头孢 曲松钠	190104	--	--	--
		190105 190106	--	--	--
昆明南疆制药 有限公司	甲硝唑氯化钠 注射液	B20090201AS	--	--	--
		B20090202AS	--	--	--
		B20090203AS	--	--	--

组C因子法和微量凝胶法的目的均在于减少或替代鲎试剂的使用,但均处于研究阶段。与药典收载现行凝胶法相比,新方法需新的试验技术和仪器设备,且暂未收载入药典通则成为法定的检验方法。本研究中参考文献[9-14],采用微量凝胶法进行内毒素检查,并与药典收载现行凝胶法比较。结果显示,微量凝胶法可替代药典收载现行凝胶法进行细菌内毒素检查,操作方法、使用试剂与仪器设备、试验结果判断方法均一致,较药典收载现行凝胶法可节省约50%试剂用量,可作为药典收载现行凝胶法的补充或替代方法。在鲎试剂缺乏的情况下,微量凝胶法可用于灭菌制剂的细菌内毒素检查。

参考文献

- [1] 国家林业和草原局,农业农村部.《国家重点保护野生动物名录》(2021年2月1日修订)[J]. 野生动物学报, 2021, 42(2): 605-640.
- [2] 朱俊华,吴 雷,冯炳斌,等. 全球中华鲎资源保护现状及对策建议[J]. 生物多样性, 2020, 28(5): 621-629.
- [3] 顾晓勇,钟金香,关杰耀,等. 基于鲎试剂需求的中国鲎资源保护的迫切性研究[J]. 中国渔业经济, 2020, 39(2): 109-116.
- [4] 黄文静,张 敬,崔林青,等. 海洋活化石-鲎的研究进展[J]. 生物资源, 2022, 44(4): 344-354.
- [5] 陈晓佳,林金海,丁友玲. 动态浊度法检测细菌内毒素方法的改进[J]. 上海医药, 2023, 44(21): 62-65.
- [6] 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: 178-515.
- [7] 裴宇盛,陈 晨,蔡 彤,等. 微量动态浊度法检测细菌内毒素方法的建立与验证[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(7): 918-921.
- [8] 裴宇盛,蔡 彤,高 华. 细菌内毒素检查新方法进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 392-395.
- [9] 甄晓兰,施 麟,王 冰,等. 重组C因子法检测双黄连注射液细菌内毒素的方法学研究[J]. 时珍国医国药, 2021,