

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)04-0101-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.04.018



微量动态显色法检测盐酸乌拉地尔注射液细菌内毒素含量*

李逢春, 杨海燕, 王 健, 郭 强, 周继春

(河南省药品医疗器械检验院, 河南 郑州 450003)

摘要:目的 探讨应用微量动态显色法对盐酸乌拉地尔注射液进行细菌内毒素定量检测的可行性。方法 使用微量动态显色法试剂,进行细菌内毒素标准曲线可靠性检测,通过干扰试验确定不干扰浓度,对6批盐酸乌拉地尔注射液进行细菌内毒素检测,并与凝胶法的结果比较。结果 标准曲线可靠性检测范围为0.05~5.0 EU/mL,两个厂家的微量动态显色法试剂回归方程分别为 $\lg T_1 = 2.9230 - 0.2832 \lg C_1$; $\lg T_2 = 2.9866 - 0.2229 \lg C_2$,相关系数分别为-0.9996及-0.9999。使用微量动态显色法试剂对盐酸乌拉地尔注射液进行细菌内毒素检测,盐酸乌拉地尔注射液稀释至0.15625 mg/mL及以下浓度时对微量动态显色法试剂与细菌内毒素的凝集反应无干扰作用,回收率在50%~200%之间。6批供试品的细菌内毒素检测结果与凝胶法一致,均符合规定。结论 微量动态显色法可用于盐酸乌拉地尔注射液细菌内毒素的定量检测,结果准确且灵敏度高。

关键词: 盐酸乌拉地尔注射液;微量动态显色法;定量检测;干扰试验;细菌内毒素

Determination of Bacterial Endotoxin Content in Urapidil Hydrochloride Injection by Micro - Kinetic Chromogenic Method

LI Fengchun, YANG Haiyan, WANG Jian, GUO Qiang, ZHOU Jichun

(Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility for quantitative determination of bacterial endotoxin in Urapidil Hydrochloride Injection by micro - kinetic chromogenic method. **Methods** Micro - kinetic chromogenic method of limulus amoebocyte lysate reagent was used to assess the reliability of the bacterial endotoxin standard curve. The interference test was conducted to determine the non - interference concentration. The bacterial endotoxins of six batches of Urapidil Hydrochloride Injection were detected, and the results were compared with those obtained by the gel method. **Results** The reliability detection range of standard curve was 0.05 - 5.0 EU / mL, the regression equation of micro - kinetic chromogenic method of limulus amoebocyte lysate reagents from the two manufacturers were $\lg T_1 = 2.9230 - 0.2832 \lg C_1$; $\lg T_2 = 2.9866 - 0.2229 \lg C_2$, respectively, with the correlation coefficients of -0.9996 and -0.9999, respectively. Micro - kinetic chromogenic method of limulus amoebocyte lysate reagent was used to detect the bacterial endotoxin in Urapidil Hydrochloride Injection. When Urapidil Hydrochloride Injection was diluted to the concentration of 0.15625 mg / mL or lower, there were non - interference with the agglutination reaction between micro - kinetic chromogenic of limulus amoebocyte lysate reagent and bacterial endotoxin, and the recovery rate was 50% - 200%. The endotoxin test results in six batches of test samples were consistent with the gel method, which all met the specified requirements. **Conclusion** Micro - kinetic chromogenic method can be used for the quantitative determination of bacterial endotoxin in Urapidil Hydrochloride Injection, and the results are accurate, and the sensitivity is high.

Key words: Urapidil Hydrochloride Injection; micro - kinetic chromogenic method; quantitative; interference test; bacterial endotoxin

乌拉地尔属新一代 α 受体拮抗剂,具有中枢和外周双重降压功能^[1],盐酸盐为其稳定形式,为临床一线降压药物^[2],2000年已被纳入《国家基本医疗保险药品目录》。盐酸乌拉地尔注射液主要用于手术前后,其产品质量对患者健康至关重要^[3]。《国家药品标准 新药转正标准》第41册收录有盐酸乌拉地尔注射液热原检查项。在《药品生产质量管理规范》(GMP)条件下,通常认为通过控制内毒素即可有效控制热原。注射剂作为使用原料药物或与适宜的辅料制成供注入体内的无菌

液体制剂^{[4]3-5},需严格控制细菌内毒素含量。内毒素检测技术的不断发展^[5-6],其中,微量动态显色法具有较高的灵敏度,可大幅减少试剂的使用量^[7-10],有效降低对试剂的依赖。2020年版《中国药典(四部)》通则9251规定:“建立品种的细菌内毒素检查法时,为验证样品和不同生产厂家试剂反应的一致性,应使用2个生产厂家的试剂对至少3批样品进行干扰试验”^{[4]178-181}。基于此,本研究中使用2个不同厂家的微量动态显色法试剂,对盐酸乌拉地尔注射

*基金项目:河南省市场监督管理局科技计划项目[2023sj59]。

第一作者:李逢春,男,硕士,副主任药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)lihyang@126.com。

液的细菌内毒素进行定量,并与凝胶法鲎试剂检测结果比较,以期建立该品种可行的细菌内毒素定量检测方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔<上海>仪器有限公司);BioProbe 细菌内毒素检测系统(湛江安度斯生物有限公司,V5.0);ZH-2型漩涡混合器(天津药典标准仪器厂)。

1.2 试剂

盐酸乌拉地尔注射液(天方药业有限公司,批号23060102X、23060103X、23060104X产品规格为5 mL:25 mg,批号23060105X、23060106X、23060107X产品规格为10 mL:50 mg);微量动态显色法鲎试剂1(湛江安度斯生物有限公司,批号为2109080,规格为0.35 mL,检测范围为20~0.01 EU/mL);微量动态显色法鲎试剂2(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,批号为23020116,规格为0.5 mL,检测范围为20~0.005 EU/mL);凝胶法鲎试剂(湛江博康海洋生物有限公司,批号为2312271,规格为0.5 mL,灵敏度为0.125 EU/mL);细菌内毒素检查用水(BET用水,批号为160006-201803,规格为30 mL),细菌内毒素工作标准品(批号为150601-202318,规格为80 EU/支),均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)确定

依据企业提供的盐酸乌拉地尔注射液药品说明书用法用量及给药方法,按照细菌内毒素限值计算公式: $L = K / M$ (式中, K 为给药途径对应阈值, M 为药品最大给药剂量,经计算 L 为2.5 EU/mg。按照2020年版《中国药典(四部)》通则9301规定,限值可适当严格(要求)为计算值的 $1/3 \sim 1/2$,以保证安全用药,故企业标准规定应小于1.0 EU/mg。

2.2 微量动态显色法标准曲线可靠性试验

取细菌内毒素工作标准品1支,加入0.8 mL BET用水,漩涡混匀15 min,得细菌内毒素工作标准品溶液(100 EU/mL);取适量,用BET用水稀释成5.0,0.5,0.05 EU/mL的内毒素标准品溶液,每个浓度平行3管。试验设阴性对照。参照微量动态显色法鲎试剂说明书,取微量动态显色法鲎试剂,每支加0.35 mL BET用水复溶,分别取25 μ L 鲎试剂加至96孔反应板上,分别取上述系列浓度细菌内毒素标准品溶液25 μ L及鲎试剂进行反应。检测系统预设吸光度(OD)值为0.1,反应时间(T)为3 600 s,温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,检测波长为405 nm。以 T 的对数(\lg)值为横坐标、浓度(C)的 \lg 值为纵坐标进行线性回归,计算相关系数(r)。根据微量动态

显色法鲎试剂说明书规定:标准曲线的 $|r| \geq 0.980$,变异系数(CV) $\leq 20\%$,试验方为有效。结果2个厂家的微量动态显色法鲎试剂回归方程分别为 $\lg T_1 = 2.923 0 - 0.283 2 \lg C_1$; $\lg T_2 = 2.986 6 - 0.222 9 \lg C_2$, $|r| > 0.980$,平行管 $CV < 20\%$,阴性对照的内毒素数值小于标准曲线最低浓度, $T > 3 600 \text{ s}$ 。表明标准曲线试验成立,线性可靠,鲎试剂符合要求。详见表1。

表1 标准曲线可靠性试验结果

Tab.1 Results of standard curve reliability test

待测试剂	回归方程	r	供试品	外加内毒素 (EU/mL)	T (s)	细菌内毒素实 测值(EU/mL)	CV (%)
微量动态	$\lg T_1 = 2.923 0 -$	$-0.999 6$	阴性对照	0	$>3 600$		
显色法	$0.283 2 \lg C_1$		阴性对照	0	$>3 600$	$<0.006 25$	0.00
鲎试剂1			阴性对照	0	$>3 600$		
			内毒素标准品	0.05	1986		
			内毒素标准品	0.05	1995	0.048 12	1.15
			内毒素标准品	0.05	1952		
			内毒素标准品	0.5	979		
			内毒素标准品	0.5	1009	0.539 74	1.61
			内毒素标准品	0.5	1004		
			内毒素标准品	5.0	525		
			内毒素标准品	5.0	542	4.811 65	1.88
			内毒素标准品	5.0	543		
微量动态	$\lg T_2 = 2.986 6 -$	$-0.999 9$	阴性对照	0	$>3 600$		
显色法	$0.222 9 \lg C_2$		阴性对照	0	$>3 600$	$<0.006 25$	0.00
鲎试剂2			阴性对照	0	$>3 600$		
			内毒素标准品	0.05	1879		
			内毒素标准品	0.05	1927	0.048 99	1.31
			内毒素标准品	0.05	1892		
			内毒素标准品	0.5	1102		
			内毒素标准品	0.5	1135	0.520 90	1.54
			内毒素标准品	0.5	1127		
			内毒素标准品	5.0	666		
			内毒素标准品	5.0	691	4.900 09	1.90
			内毒素标准品	5.0	684		

2.3 凝胶法鲎试剂灵敏度复核试验^[11]

根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ),将细菌内毒素标准品用BET用水溶解,漩涡混匀15 min,然后制成 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 系列浓度内毒素标准溶液,分别与等体积的鲎试剂溶液混合,每个浓度平行4管。试验设阴性对照。结果见表2。

2.4 供试品干扰试验预试验

取盐酸乌拉地尔注射液(5 mg/mL,批号为23060102X)适量,分别用BET用水稀释制成2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.312 5 mg/mL、0.156 25 mg/mL的供试品溶液,与1 EU/mL等体积内毒素标准品溶液混合,得终质量浓度为1.25 mg/mL、

表2 凝胶法鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 2 Recheck results of sensitivity of gel method of limulus amoebocyte lysate reagent

鲎试剂 批号	λ (EU/mL)	内毒素浓度(EU/mL)				阴性 对照	λ_s (EU/mL)	结论
		0.25	0.125	0.06	0.03			
2312271	0.125	++++	++++	++++	----	--	0.06	符合规定

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。表6同。

Note: + indicates positive reaction, - indicates negative reaction (for Tab. 2 and Tab. 6).

0.625 mg/mL、0.312 5 mg/mL、0.156 25 mg/mL、0.078 125 mg/mL的含内毒素为0.5 EU/mL的供试品阳性对照溶液,用微量动态显色法鲎试剂进行预试验。结果表明,盐酸乌拉地尔注射液稀释至0.156 25 mg/mL及以下质量浓度时,对内毒素与鲎试剂反应无干扰作用,且试验结果有效。详见表3。

表3 干扰试验预试验结果

Tab. 3 Pre-test results of interference test

质量浓度 (mg/mL)	原液细菌内毒素(EU/mg)		回收率 (%)	CV (%)
	理论值	实测值		
0.625	<0.080	0.140 26	27.50	1.18
0.312 5	<0.160	0.213 48	42.14	2.28
0.156 25	<0.320	0.343 96	68.21	0.78
0.078 125	<0.641	0.412 29	81.90	1.62

2.5 供试品干扰试验^{[4]515-520}

内毒素系列溶液(C溶液)制备:按2.2项下方法制备5.0、0.5、0.05 EU/mL的内毒素标准品溶液,分别记为 $E_{5.0}$ 、 $E_{0.5}$ 、 $E_{0.05}$ 。

供试品溶液(A溶液)制备:标准曲线最低点为0.05 EU/mL,结合供试品限值1.0 EU/mg,最大稀释倍数(MVD)计算值为100倍,在不超过MVD的情况下用BET水对供试品进行稀释,结合干扰试验预试验结果,选择盐酸乌拉地尔注射液稀释至0.156 25 mg/mL及以下浓度进行正式干扰试验。

供试品阳性对照溶液(B溶液)制备:取供试品原液适量,以BET用水稀释至质量浓度分别为0.156 25 mg/mL、0.078 125 mg/mL,然后与等体积的1 EU/mL内毒素溶液混合,即得质量浓度分别为0.078 mg/mL、0.039 mg/mL的含内毒素0.5 EU/mL的供试品阳性对照溶液。

与微量动态显色法鲎试剂反应:设3孔BET用水作为阴性对照(D溶液)。取25 μ L A、B、C溶液,及25 μ L微量动态显色法鲎试剂,均加至反应板,按2.2项下条件反应,每个浓度平行3孔。根据标准曲线,计算供试品溶液细菌内毒素含量(c_1)和供试品阳性对照溶液细菌内毒素含量(c_s),将0.5 EU/mL内毒素设为 λ_m ,按公式计算回收率 $[r, r = (c_s - c_1) / \lambda_m \times 100\%]$ 。无干扰浓度下回

收率应为50%~200%。采用两个厂家的微量动态显色法鲎试剂进行试验,盐酸乌拉地尔注射液稀释至0.156 25 mg/mL及以下浓度时,回收率均为50%~200%,表明供试品对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰。因此,可采用微量动态显色法对盐酸乌拉地尔注射液进行内毒素的定量检查。详见表4、表5。

表4 微量动态显色法干扰试验结果(微量动态显色法鲎试剂1)

Tab. 4 Interference test results of micro-kinetic chromogenic method(micro-kinetic chromogenic method of limulus amoebocyte lysate reagent 1)

批号	质量浓度 (mg/mL)	细菌内毒素(EU/mL)		回收率 (%)	CV (%)
		理论值	实测值		
阴性对照		-	<0.007 15		0.00
23060102X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.364 14	71.65	9.63
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.433 20	85.21	0.70
23060103X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.388 00	76.17	3.81
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.433 20	81.72	1.26
23060104X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.393 91	77.35	1.72
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.423 91	83.35	0.37
23060105X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.381 86	74.94	1.95
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.456 42	89.85	0.74
23060106X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.398 72	78.31	1.91
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.485 24	95.62	0.60
23060107X	0.078	-	<0.007 15		
		0.5	0.383 35	75.24	0.79
	0.039	-	<0.007 15		
		0.5	0.452 99	89.17	3.34

注:-为阴性对照。表5同。

Note:- indicates the negative control (for Tab. 4 - 5).

2.6 供试品溶液凝胶法内毒素检查

根据细菌内毒素限值1.0 EU/mg,按2020年版《中国药典(四部)》通则1143中凝胶法检查的要求,使用凝胶法鲎试剂,进行供试品细菌内毒素检查,结果均符合规定。详见表6。

3 讨论

目前,对于盐酸乌拉地尔注射液的质量研究较少,仅2020年版《中国药典(二部)》^[12]及《日本药典》(18版)

表5 微量动态显色法干扰试验结果(微量动态显色法鲎试剂2)
Tab.5 Interference test results of micro - kinetic chromogenic method(micro - kinetic chromogenic method of limulus ameobocyte lysate reagent 2)

批号	质量浓度 (mg / mL)	细菌内毒素(EU / mL)		回收率 (%)	CV (%)
		理论值	实测值		
阴性对照	-	-	0.002 06		0.00
23060102X	0.078	-	<0.001 90		
		0.5	0.289 57	57.21	0.71
		0.039	<0.002 13		
23060103X	0.078	0.5	0.434 30	84.54	1.30
		-	<0.002 31		
		0.039	<0.001 98		
23060104X	0.078	0.5	0.423 59	84.32	0.80
		-	<0.002 14		
		0.039	<0.002 07		
23060105X	0.078	0.5	0.427 57	85.10	0.38
		-	<0.002 10		
		0.039	<0.002 21		
23060106X	0.078	0.5	0.380 88	75.76	2.52
		-	<0.002 21		
		0.039	<0.002 11		
23060107X	0.078	0.5	0.434 81	86.52	1.32
		-	<0.002 06		
		0.039	<0.002 11		
23060107X	0.078	0.5	0.386 74	76.94	2.06
		-	<0.002 06		
		0.039	<0.002 11		
23060107X	0.078	0.5	0.532 20	106.02	0.84
		-	<0.001 83		
		0.039	<0.002 13		
23060107X	0.039	0.5	0.380 30	75.69	0.77
		-	<0.002 13		
		0.039	<0.002 13		
23060107X	0.039	0.5	0.488 21	97.22	2.08
		-	<0.002 13		
		0.039	<0.002 13		

表6 凝胶法细菌内毒素检查结果

Tab.6 Results of bacterial endotoxin test by gel method

供试品批号	阴性对照	阳性对照	供试品阳性对照	供试品	结论
23060102X	--	++	++	--	符合规定
23060103X	--	++	++	--	符合规定
23060104X	--	++	++	--	符合规定
23060105X	--	++	++	--	符合规定
23060106X	--	++	++	--	符合规定
23060107X	--	++	++	--	符合规定

收录有乌拉地尔原料及注射液。本研究采用微量动态显色法对6批盐酸乌拉地尔注射液进行了干扰试验,结果表明,当稀释至0.156 25 mg / mL及以下质量浓度时,外加内毒素回收率均为50%~200%,且供试品的内毒素含量均低于限值,表明方法准确可行。微量动态显色法作为光度法,相比传统的凝胶法,在风险评估、节约资源、方法灵敏度和数据可溯源性等方面具有优势。定量数据支持质量追溯,可准确评估产品在生产过程中的污染

趋势,有助于实现风险预警,满足数据完整性要求;由于微量动态显色法鲎试剂灵敏度更高(可为20~0.005 EU / mL),允许对高干扰样品进行更大倍数的稀释,可解决凝胶法无法排除的部分干扰难题;且通过回收率试验可直观判断样品对于检测体系的干扰程度。同时本研究中也采用凝胶法鲎试剂,对供试品进行细菌内毒素检查,实验均成立,凝胶法检查6批样品也均符合规定。

鲎试剂是从鲎的血液中提取出的变形细胞溶胞物冻干制剂,可与细菌内毒素发生凝集反应。现有的细菌内毒素检测技术极度依赖鲎试剂,但是由于过度捕捞及生存环境恶化,鲎资源急剧减少,我国更是将中华鲎列为二类保护动物,鲎试剂需求与鲎资源保护之间日益突出的矛盾,促进了内毒素检查替代补充方法的发展^[13-15]。目前,除了备受关注的C因子替代法,微量法也逐渐成为重要的研究方向,其中,微量动态显色法作为新兴检测技术,尤为值得关注。微量动态显色法作为一种内毒素定量检测的新方法,鲎试剂用量仅为25 μL,符合“3R”原则。该方法检测范围宽,灵敏度高,抗干扰能力强,可进行过程控制。需注意的是,微量动态显色法的加样体积、预设OD值、定制的细菌内毒素检查微孔反应板等,应参照试剂生产商的相关说明使用;微量法加样量仅为25 μL,易发生加样不准的情况,对人员和仪器的要求高;此外,微量法对实验操作环境的要求更高,实验人员应戴好口罩与手套,同时选择新开的枪头和BET水,防止外源性内毒素污染导致假阳性结果。

综上所述,微量动态显色法,既能满足数据可靠性的要求,又能减少鲎资源消耗,可用于盐酸乌拉地尔注射液细菌内毒性的定量检测。

参考文献

[1] 蔡洪流,付研,黄曼,等. 盐酸乌拉地尔注射液临床应用专家共识[J]. 中华急诊医学杂志,2013,22(9):960-966.
 [2] 闫肃,于洋. α₁-受体阻滞剂盐酸乌拉地尔在治疗充血性心力衰竭中的体会[J]. 吉林医学,2011,32(20):4149-4151.
 [3] 张淑英. 盐酸乌拉地尔注射液治疗高血压危象40例疗效观察[J]. 北京医学,2009,31(8):505.
 [4] 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.
 [5] MUROI M, OGURA N, MIZUMURA H, et al. Application of a recombinant three - factor chromogenic reagent, pyrosmart, for bacterial endotoxins test filed in the pharmacopeias [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(12) :2024 - 2037.
 [6] SHERABA NS, DIAB MR, YASSIN AS, et al. A validation study of the limulus ameobocyte lysate test as an end - product endotoxin test for polyvalent horse snake antivenom [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2019, 73(6) :562 - 571.
 [7] 裴宇盛,蔡彤,陈晨,等. 中国药典2020年版细菌内毒素检查法补充方法应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022,