

动态浊度法检测 5 种中药注射液的内毒素含量

郝然,刘婷*,易艳,曹春雨,回连强,李春英,赵雍,高双荣,郭静,孟浩,梁爱华,张毅
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] **目的:**通过特异性及非特异性鲎试剂(TAL)动态浊度法对 5 种中药注射液的内毒素含量进行检测,探讨该方法对中药注射液检测的适用性。**方法:**采用特异性及非特异性动态浊度试剂盒,对不同批次的鱼腥草注射液、双黄连注射液、清开灵注射液、葛根素注射液、香丹注射液进行检测。**结果:**无色的中药注射剂如鱼腥草注射剂、葛根素注射剂对检测干扰较少,非特异性及特异性动态比浊法对其无显著影响;对非单一成分,颜色较深的中药注射液,如清开灵、香丹、双黄连注射液,采用动态比浊法进行检测,干扰大,检测结果不稳定;清开灵注射剂采用特异性试剂盒进行检测能有效的消除干扰,但香丹、双黄连注射液仍不能消除干扰。**结论:**用特异性或非特异性动态浊度法可以检测鱼腥草和葛根素注射液中的内毒素含量,采用特异性动态浊度法可以检测清开灵注射液中内毒素含量,双黄连和香丹注射液的检测结果不稳定。

[关键词] 内毒素检测;动态浊度法;特异性鲎试剂;中药注射剂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0120-04

Detection of Bacterial Endotoxin for Five Traditional Chinese Medicine Injections by Kinetic Turbidimetric Assay

HAO Ran, LIU Ting*, YI Yan, CAO Chun-yu, HUI Lian-qiang, LI Chun-ying, ZHAO Yong,
GAO Shuang-rong, GUO Jing, MENG Hao, LIANG Ai-hua, ZHANG Yi

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the applicability of the detection of bacterial endotoxin in five kinds of traditional Chinese medicine injections by nonspecific and specific tachypleus amebocyte lysate (TAL) of kinetic turbidimetric assay. **Method:** Yuxingcao, Shuanghuanglian, Qingkailing, Gegensu, and Xiangdan injections were detected by nonspecific and specific TAL lysate of kinetic turbidimetric assay. **Result:** There were less interferences during detective process of achromaticity injections such as Yuxingcao and Gegensu, on the other hand, there were more interference of multi-component and dark color such as Shuanghuanglian, Qingkailing, and Xiangdan injections using TAL of kinetic turbidimetric assay, interference was big and the result was instable. The interference could be removed effectively by using specific TAL of kinetic turbidimetric assay, such as the case of Qingkailing. However, the interference for shuanghuanglian, Xiangdan injections could not be eliminated interference using this method. **Conclusion:** It is feasible to perform the bacterial endotoxin test on Yuxingcao and Gegensu injection using normal TAL and specific TAL through kinetic turbidimetric assay, using specific TAL of kinetic turbidimetric assay as a substitute for nonspecific is a effective method in removing the interference for Qingkailing injection, the detection result of Shuanghuanglian and Xiangdan injection are instable.

[Key words] detection of bacterial endotoxin; kinetic turbidimetric assay; specific tachypleus amebocyte lysate; traditinal Chinese medicine injections

[收稿日期] 2011-07-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(90709043);科技部国家科技攻关计划项目(2006BAI14B05);中国中医科学院自选课题项目(z02097)

[通讯作者] *刘婷,副研究员,Tel:010-84252805-2231,E-mail:liutingbit@163.com

内毒素是革兰阴性细菌细胞壁上的脂多糖,具有广泛而强烈的生物活性。 $2\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ 内毒素 iv 就可以引起人体发热反应^[1]。当较高量内毒素进入血液时,可能引起高热、内毒素休克、多脏器功能衰竭、死亡等严重反应。由于细菌广泛存在于中药材的生长环境(包括土壤、水等)中,中药材不可避免地会受到细菌内毒素污染。由于内毒素具有水溶性、不挥发性、耐热性、可吸附性等特点,致使中药注射剂工艺中脱除内毒素难度加大^[2]。中药注射剂内毒素检测方法的灵敏性和可靠性至关重要。

动态浊度法(动态比浊法)是通过测定凝胶形成过程中的浊度变化,由浊度变化和内毒素浓度间定量关系来确定内毒素含量的方法。此法灵敏度高,操作简便,快速,但目前该方法多用于疫苗及注射用抗生素产品等的检测^[3-4],检测中药注射剂则较少。本研究采用动态浊度法对5种中药注射剂内毒素含量进行检测,探讨非特异性鲎试剂以及排除了G因子干扰的只与B因子反应的特异性鲎试剂对中药注射剂的适用性。

1 材料

1.1 试剂 细菌内毒素检查用水(厦门市鲎试剂实验厂有限公司,批号080514,50 mL/瓶),细菌内毒素检查用水(中国药品生物制品检定所,批号W2008-4,10 mL/支),细菌内毒素工作对照品(冻干,中国药品生物制品检定所,厦门市鲎试剂实验厂有限公司提供,批号150601-200758,140 EU/支)。非特异性动态浊度法鲎试剂(批号090409,0.5 mL/支,检测限 $0.01\sim 10\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$)、特异性动态浊度法鲎试剂(批号100430,0.5 mL/支,检测限 $0.01\sim 10\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$,购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司)。

1.2 检测样品 鱼腥草注射液(福建三爱药业有限公司,批号080102,0910303,0910304;正大青春宝药业有限公司,批号0809091,0809092)。葛根素注射液(山东华信制药有限公司,批号08032201,09040301;山东方明药业股份有限公司,批号0801032)。双黄连粉针剂(哈药集团中药二厂,批号0712209,0707216,0812218)。双黄连注射液(河南福森药业有限公司,批号080237),香丹注射液(雅安三九药业有限公司,批号0805146;上海中西制药有限公司,批号0808019;上海北杰集团关东药业有限公司,批号20080410)。清开灵注射液(北京中医药大学药厂,批号811503A,080137;广州白云山制

药厂,批号071220;山西太行药业有限公司,批号080820)。

1.3 仪器 BET-72 细菌内毒素测定仪、EasyBET 分析软件(版本v3.6)、内毒素定量检测专用试管(管径8 mm)(均为天津市天大天发科技有限公司),DHG-9075A,OL-901 Vortex 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 非特异性动态浊度法测定内毒素含量

2.1.1 标准曲线的制备 取内毒素工作品1支,加入1 mL BET 水,使用涡旋振荡器振荡15 min,制成 $140\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内毒素对照溶液。用BET水配制成1,0.5,0.25,0.1,0.05,0.025,0.01 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$,同时设阴性对照管。取非特异性鲎试剂若干支,每支加入BET水,轻轻摇动,使充分溶解。取动态浊度法专用光度测定管若干,每管加入BET水溶解的鲎试剂100 μL ,在冰浴下添加内毒素对照溶液,每管加100 μL ,每个浓度梯度设2个平行管。采用反应时间法,所有管进行反应时间(T)测定。浊度测定条件:温度(37 ± 0.2) $^{\circ}\text{C}$;检测波长660 nm;预设A值0.02;零化期时间260 s。

判断标准:在阴性对照的反应时间大于对照曲线最低浓度的反应时间的前提下,将 $\lg T$ 和 $\lg C$ 进行线性回归分析,标准曲线的相关系数(r)的绝对值 > 0.980 ,标准曲线有效。

2.1.2 供试品的干扰试验 准备一系列试管于试管架中,将供试品用BET水稀释成不同的稀释倍数备用。取非特异性鲎试剂若干支,每支加入BET水500 μL 使溶解。取动态浊度法专用光度测定管若干,每管加入BET水溶解的鲎试剂100 μL 。之后在冰浴下,加入不同稀释倍数的供试液50 μL ,BET水50 μL ,平行2支作为阴性对照管(NPC);加入供试液50 μL , $0.5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内毒素对照溶液50 μL ,平行2支作为阳性对照管(PPC)。各管进行反应时间(T)测定。按标准曲线所得线性回归方程分别计算出NPC和PPC样品管内毒素浓度 C_1 和 C_s ,按下式计算该试验条件下的回收率(R),无干扰浓度管为回收率在50%~200%的供试品。

$$R = (C_s - C_1) / 0.25 \times 100\%$$

2.1.3 供试品内毒素含量的测定 依照干扰试验所确定的稀释浓度进行检查,测定方法同干扰试验。将样品管A代入标准曲线,求出样品管的内毒素浓

度,以 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示。

2.2 特异性动态浊度法测定内毒素含量 按 2.1 所述方法进行,不同的是鲎试剂用 G 因子抑制剂溶解,同上计算样本的内毒素含量及回收率。

3 结果

3.1 非特异性动态浊度法对 5 种注射液内毒素含量的检测 从表 1 可见,无色的中药注射液如鱼腥草、葛根素注射液对检测的干扰较小,在较低的稀释倍数下即可进行检测,注射液内毒素含量均低于 $0.1 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$,检测结果稳定,不同批号之间的差异也不大,该方法可以作为日常检测使用;对非单一成分,颜色较深的中药注射液,如香丹、双黄连注射液,检测结果不稳定,不同批号之间的检测结果不尽一致,如不同批号的双黄连注射液,在相同的稀释倍数,其内毒素含量相差约 10 倍,而有的批

号香丹注射液 15 倍稀释即可消除干扰,有的在 100 倍稀释时仍不能消除干扰;清开灵注射液根据前期摸索在最小无干扰浓度下可进行检测,检测结果也较稳定,但其稀释倍数已超出最大稀释倍数 MVD。

3.2 特异性动态浊度法对 5 种注射液内毒素含量的检测结果 从表 2 中可见,对检测干扰较小的鱼腥草、葛根素注射液,用特异性鲎试剂代替非特异性鲎试剂进行检测,其检测结果基本相同,检测值略低于非特异性动态浊度法检测值;但有些品种如双黄连粉针剂、香丹注射液干扰较非特异性方法严重,用特异性试剂检测不能祛除干扰;有些品种如清开灵注射液用特异性方法进行能大大提高稀释倍数,远远低于 MVD 下即可进行检测,检测结果也较稳定可靠。

表 1 5 种注射液内毒素含量的检测——非特异性动态浊度法

品种	MVD	药品批号	稀释倍数	回收率 /%	结论	检测值 / $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$
鱼腥草注射液	80	080102	2	135	无干扰	0.060 8
		0809091	2	112	无干扰	<0.01
		0809092	2	74	无干扰	0.013 9
葛根素注射液	1 040	08032201	16	45	有干扰	
			32	85	无干扰	<0.01
		09040301	16	74	无干扰	<0.01
双黄连粉针剂 / $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	200	0812218	40	-74	有干扰	
			40	-311	有干扰	
			80	93	无干扰	0.72
		0712209	20	387	有干扰	
			40	12	有干扰	
双黄连注射液	200	080237	80	156	无干扰	0.070 2
			40	113	无干扰	0.060 2
			80	144	无干扰	<0.01
香丹注射液	400	0805146	15	54	无干扰	0.582 2
		20080410	15	77	无干扰	0.186 6
		0808019	15	40	有干扰	
			15	-931	有干扰	
			20	-1417	有干扰	
			40	-28	有干扰	
			40	-91	有干扰	
清开灵注射液	80	811503A	100	306	有干扰	
			200	224	有干扰	
			400	149	无干扰	<0.01
			400	172	无干扰	<0.01
		080137	400	166	无干扰	<0.01

注:MVD 以 $\lambda = 0.06 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 计算(表 2 同)。

4 讨论与结论

采用特异性及非特异性鲎试剂对上述 5 种注射剂检测,结果发现,无色的中药注射剂如鱼腥草注射

剂、葛根素注射剂对检测干扰较少,无干扰稀释倍数为 1~2 倍,采用非特异性及特异性动态比浊法对其无显著影响,检测值均较低($<0.1 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$),一般

表2 5种注射液内毒素含量的检测——特异性动态浊度法

品种	MVD	药品批号	稀释倍数	回收率/%	结论	检测值 /EU·mL ⁻¹
鱼腥草注射液	80	080102	2	95	无干扰	0.031 2
		0809091	2	63	无干扰	<0.01
		0809092	2	67	无干扰	<0.01
葛根素注射液	1 040	08032201	16	56	无干扰	0.009 5
		09040301	8	26	有干扰	
			16	88	无干扰	<0.01
			32	142	无干扰	<0.01
双黄连粉针剂 (100 g·L ⁻¹)	200	0812218	5(g·L ⁻¹)	-1 068	有干扰	
			2.5(g·L ⁻¹)	-6	有干扰	
			1.25(g·L ⁻¹)	-123	有干扰	
			0.625(g·L ⁻¹)	-44	有干扰	
		0712209	5(g·L ⁻¹)	2737	有干扰	
			2.5(g·L ⁻¹)	947	有干扰	
			1.25(g·L ⁻¹)	-182	有干扰	
双黄连注射液	200	080237	20	40	有干扰	
			40	55	无干扰	0.049 4
			60	229	有干扰	
			80	160	无干扰	1.415 5
			80	155	无干扰	0.037 8
香丹注射液	400	0805146	15	454	有干扰	
			30	333	有干扰	
			60	229	有干扰	
			80	160	无干扰	1.415 5
		20080410	10	-25	有干扰	
			20	161	无干扰	0.730 9
			40	192	无干扰	0.210 5
			80	177	无干扰	0.360 6
清开灵注射液	80	811503A	5	-285	有干扰	
			10	131	无干扰	0.076 6
			20	168	无干扰	0.019 5
		080137	10	103	无干扰	0.179 4
			080820	10	238	有干扰
			20	71	无干扰	0.029 3

在检测限(0.01 EU·mL⁻¹)以下,均可做为日常检测方法使用。非单一成分、颜色较深的中药注射液,如清开灵、香丹、双黄连注射液,采用动态比浊法进行检测,干扰大,检测结果不稳定。清开灵注射剂采用特异性试剂盒进行检测能有效消除干扰,检测结果稳定可靠,重复性好,与显色基质法及凝胶法的检测结果相一致^[5-6],检测该品种可用特异性动态浊度法代替非特异性动态浊度法。香丹、双黄连注射液采用特异性动态浊度法检测不能祛除干扰,应结合显色基质法或凝胶法等方法进行综合检测分析。

[参考文献]

[1] 苑庆华编译. 细菌内毒素检查法——定量法[M]. 天津,天津药品检验所,1999:120.

- [2] 邵英光,李京华,魏桂林,等. 内毒素的去除策略[J]. 广州化学,2003,28(2):38.
- [3] Ogikubo Y, Norimatsu M, Noda K, et al. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines[J]. Biologicals, 2004, 32(2):88.
- [4] Nakao R, Kida T, Suzuki K. Factors affecting quality control of [18F] FDG injection; bacterial endotoxins test, aluminum ions test and HPLC analysis for FDG and CIDG[J]. Appl Radiat Isot, 2005,62(6):889.
- [5] 高双荣,刘婷,郭静,等. 凝胶法检测2种中药注射液中内毒素含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(11):1405.
- [6] 曹春雨,刘婷,郭静,等. 显色基质法检测6种中药注射液内毒素含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):88.

[责任编辑 何伟]