

显色基质法检测 6 种中药注射液内毒素含量

曹春雨, 刘婷, 郭静, 易艳, 郝然, 李春英, 赵雍, 高双荣, 回连强, 梁爱华*
(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显色基质法对 6 种中药注射液的内毒素含量进行检测, 探讨中药注射液检测过程中常见的干扰问题。方法: 采用特异性及非特异性显色基质法, 对不同批次的鱼腥草注射液、双黄连注射液、双黄连粉针剂、清开灵注射液、葛根素注射液、香丹注射液进行检测。结果: 检测结果发现, 用特异性显色基质法能有效的消除某些中药注射液, 如清开灵注射液、双黄连注射液、香丹注射液对检测的干扰。结论: 在检测中药注射液内毒素含量时, 用特异性鲎试剂代替非特异性鲎试剂为一种有效的干扰因素的祛除方法。

[关键词] 内毒素检测; 显色基质法; 特异性鲎试剂; 中药注射剂

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0088-04

Detection Content of Bacterial Endotoxin of Six Kinds of Traditional Chinese Medicine Injection by Chromogenic Technique

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

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

[Abstract] Objective: Discussion on interference problem of the content of bacterial endotoxin in six kinds of Traditional Chinese Medicine injection by nonspecific and specific chromogenic technique of limulus test. **Method:** Yuxingcao, Shuanghuanglian, Qingkailing, Gegensu, Xiangdan injections and Shuanghuanglian Fenzhenji were detected by nonspecific and specific chromogenic technique. **Result:** The interference during detective process can be removed effectively by using specific chromogenic technique, such as Qingkailing, shuanghuanglian, Xiangdan injections. **Conclusion:** Using Specific chromogenic technique of limulus test as a substitute for nonspecific chromogenic technique is a effective method in removing the detection interference.

[Key words] Detection of bacterial endotoxin; Chromogenic technique; Specific limulus test; TCM injection

内毒素是中药注射剂中的主要致热物质, 如果中药注射剂成品中含有一定量的内毒素, 轻者可引

起发热反应, 重者可危及生命, 甚至造成病人死亡。在中药注射剂的临床不良反应报道中, 发热占有较高比例, 总的比例约为 21%。双黄连注射液、清开灵注射液、葛根素注射液等均有发热不良反应报道^[1]。除了内毒素可以通过活化鲎变形细胞的 C 因子和 B 因子, 使凝固酶原转化成凝固酶产生凝集反应外, 葡聚糖成分也可以在无内毒素存在的情况下活化鲎变形细胞中的 G 因子, 产生凝集反应, 从而呈现假阳性^[2]。葡聚糖成分在真菌中普遍存在, 但其并非致热原。

中药注射剂原料药材在生产、包装、运输、贮藏的过程中, 极易污染真菌, 有文献报道^[3]对 294 份,

[收稿日期] 20100329(007)

[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团队建设(2008年度); 国家科技重大专项(20092X09301-005, 2009ZX09502)

[第一作者] 曹春雨, 博士, 助理研究员, 药理毒理研究, Tel: 010-84252805-2231, E-mail: chunyu.cao@gmail.com

[通讯作者] * 梁爱华, 博士, 研究员, 药理毒理研究, Tel: 010-84252805-2231, E-mail: liangaihua@sina.com

279 种常用中药饮片真菌污染情况调查, 污染率高达 97.6%。因而, 中药注射剂成品中带入葡聚糖的可能性是存在的。可见, 葡聚糖成分的干扰问题是中药注射剂内毒素检测中的关键问题之一。如何针对中药注射剂的特点, 解决检测过程中的干扰问题, 是目前中药注射剂检测过程中的一大难题。目前, 国内外均已研制了只与内毒素反应的特异性检测试剂。但这些试剂的灵敏性、可靠性如何, 对中药注射剂的检测是否适用, 目前尚未见研究报道。

1 材料

1.1 试剂 细菌内毒素工作品, 批号 071203, 080301; 鲎试剂, 批号 080415, 080109; 显色基质, 批号 080203; 反应中止液, 批号 080115, 080108; 偶氮化试剂 1, 批号 080116; 偶氮化试剂 2, 批号 080116; 偶氮化试剂 3, 批号 080117; G 因子抑制剂, 批号 080526。以上试剂均购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司。细菌内毒素检查用水 (BET 水), 批号 080201, 071228 (厦门市鲎试剂实验厂有限公司), 批号 20060012 (中国药品生物制品检定所)。

1.2 样品 鱼腥草注射液, 批号 080102, 080101, 080103, 福建三爱药业有限公司。葛根素注射液, 批号 08012101, 山东华信制药有限公司; 07062301, 山东瑞阳制药有限公司; 0801032, 山东方明药业股份有限公司。双黄连粉针剂, 批号 0712209, 0707216, 哈药集团中药二厂。双黄连注射液, 080237, 河南福森药业有限公司。香丹注射液, 批号 080514, 雅安三九药业有限公司; 0808019, 上海中西制药有限公司。清开灵注射液, 批号 811503A, 北京中医药大学药厂; 07081613, 河北神威药业有限公司。

1.3 仪器 Thermo 公司 Varioskan Flash 型多功能酶标仪 (美国产品)。

2 方法

2.1 非特异性显色基质法对 6 种中药注射液内毒素含量的检测^[3]

2.1.1 内毒素工作品标准曲线的绘制 取内毒素工作品, 10 EU/支, 加 1 mL BET 水溶解, 震荡 15 min, 用 BET 水配制成如下浓度 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01 EU·mL⁻¹, 同时设阴性对照管。取鲎试剂若干支, BET 水溶解。以上各管 37 °C 孵育 45 min。各管中加入显色基质液, 37 °C 孵育 6 min, 顺序加入偶氮化试剂 1、偶氮化试剂 2、偶氮化试剂 3, 充分混匀, 静置 5 min, 每个试管中取出 1 mL 液

体, 置于 48 孔板上, 多功能酶标仪于 545 nm 测吸光度值 (A), 计算标准管 A。以标准管 A 为纵坐标, 以标准管相对应的浓度为横坐标, 绘制标准曲线。标准曲线 $r > 0.98$, 实验有效。

标准管 A = 标准管实测 A - 阴性对照孔 A

2.1.2 样本内毒素含量的测定 准备一系列的试管于试管架中, 把试管架置于冰板上, 加入不同浓度的不同品种的中药注射液, 终体积为 100 μL, 作为供试样品的阴性对照管 (NPC)。同时设供试品的阳性对照管 (PPC), 各 PPC 管中除含有与 NPC 管终浓度相同的中药注射液外, 另均含终浓度为 0.05 EU·mL⁻¹ 的内毒素工作品, 终体积同 NPC 管, 混匀, 同 2.1.1 中所述方法于 545 nm 测 A。双黄连、香丹、清开灵注射液和双黄连粉针剂, 因为样本本身在 545 nm 处有吸收, 需增做试剂空白管: 取相应浓度的供试品 + BET 水 + 偶氮化试剂 1 + 偶氮化试剂 2 + 偶氮化试剂 3, 不需孵育, 于 545 nm 测 A。计算各样品管 A 将样品管 A 代入内毒素工作品标准曲线, 求出样品管的内毒素浓度, 以 EU·mL⁻¹ 表示; 同时按下列公式计算各样品管的回收率, 样本的无干扰浓度为回收率在 50% ~ 200% 的浓度, 见表 1。

样品管 A = 样品管实测 A - 阴性对照孔 A

有颜色的样品管 A = 样品管实测 A - 阴性对照孔 A - 试剂空白管的 A

回收率 = (PPC 样品管内毒素浓度 - NPC 样品管内毒素浓度) / 0.05 × 100%

2.2 特异性显色基质法对 6 种中药注射液内毒素含量的检测 按 2.1 中所述方法进行实验, 鲎试剂用 G 因子抑制剂溶解, 同上计算每个样本的内毒素含量及回收率, 见表 2。

3 结果

3.1 用非特异性显色基质法检测 6 种中药注射液内毒素含量 6 种中药注射剂: 鱼腥草注射液、葛根素注射液、双黄连粉针剂、双黄连注射液、香丹注射液、清开灵注射液在无干扰浓度时所测的内毒素含量均低于 0.1 EU·mL⁻¹。有些品种的注射液如清开灵注射液在最大有效稀释倍数 (MVD, 80 倍稀释) 时仍有干扰, 甚至有些批号在 600 倍稀释时回收率仍未能控制在 50% ~ 200%, 见表 1。

3.2 用特异性显色基质法检测 6 种中药注射液内毒素含量 采用特异性显色基质法对如上样本进行内毒素含量检测, 能有效解决非特异性显色基质法检测过程中某些注射液的干扰问题, 如双黄连、清开

表 1 6 种中药注射液内毒素含量(非特异性显色基质法)

注射液	MVD(以 =0.06 EU·mL ⁻¹ 计算)	批号	稀释倍数	回收率	结论	检测值 /EU·mL ⁻¹
鱼腥草	80	080102	16	160.0	无干扰	<0.01
		080101	16	-9.5	有干扰	
		080103	16	23.3	有干扰	
葛根素	1040	08032201	8	-20.8	有干扰	
			16	87.5	无干扰	0.02
		0801032	8	7.1	有干扰	
			16	87.1	无干扰	<0.01
		08012101	8	4.5	有干扰	
双黄连粉针剂(100 g·L ⁻¹)	200	0712209	16	-13.9	有干扰	
			40	95.9	无干扰	<0.01
		0707216	40	39.7	有干扰	
双黄连	200	080237	40	-44.2	有干扰	
			800	98.5	无干扰	0.02
香丹	400	080514	30	-37.1	有干扰	
			50	96.5	无干扰	0.03
		0808019	30	-2.7	有干扰	
			50	61.8	无干扰	0.04
清开灵	80	811503A	600	395.1	有干扰	
		07081613	600	74.7	无干扰	0.02

灵、葛根素、香丹、鱼腥草注射液的无干扰浓度分别从 800, 600, 16, 50 倍稀释减少到 40, 20, 8, 30 倍稀释, 使得某些品种的中药注射剂如清开灵注射液在最大有效稀释倍数之内能进行检测; 有些品种如鱼

腥草注射和双黄连粉针剂采用非特异性显色基质法检测结果不稳定, 在同样的稀释倍数, 有些批号的样本无干扰, 有些有干扰, 而特异性显色基质法的检测结果则更为稳定, 见表 2。

表 2 6 种中药注射液内毒素含量(特异性显色基质法)

注射液	MVD(以 =0.06 EU·mL ⁻¹ 计算)	批号	稀释倍数	回收率	结论	检测值 /EU·mL ⁻¹
鱼腥草	80	080102	16	79.7	无干扰	<0.01
		080101	16	178.5	无干扰	<0.01
		080103	16	58.0	无干扰	<0.01
葛根素	1040	0801032	8	79.4	无干扰	<0.01
		08012101	8	109.0	无干扰	<0.01
		07062301	8	71.3	无干扰	<0.01
双黄连粉针剂(100 g·L ⁻¹)	200	0707216	20	161.7	无干扰	<0.01
		0712209	20	94.9	无干扰	<0.01
双黄连	200	080237	40	52.9	无干扰	<0.01
香丹	400	080514	30	52.8	无干扰	<0.01
		0808019	30	98.2	无干扰	<0.01
清开灵	80	811503A	20	75.3	无干扰	<0.01
		07081613	20	59.7	无干扰	<0.01

4 讨论

Miyazaki T^[4] 报道 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -D 葡聚糖就会使常规的内毒素检查呈阳性; 阳离子蛋白如溶菌酶、核糖核酸酶 A 及免疫球蛋白 G 均能与内毒素形成细菌-内毒素蛋白复合体, 对细菌内毒素有显著的屏蔽作用而影响鲎试剂法测定结果^[5]; Twohy^[6] 曾报道注射液的 pH、二价阳离子浓度、盐浓度、防腐剂、原料来源等略有改变, 均会影响鲎试剂与药品的适应性。在对成分复杂的中药注射剂进行内毒素检测时, 这种情况就变得尤为明显。

采用特异性及非特异性显色基质试剂对上述 6 种中药注射剂进行检测, 结果发现, 无色的注射液如鱼腥草注射剂、葛根素注射剂, 其内毒素检测相对简单, 可变因素较小, 不同批号的可重复性较好, 无干扰稀释倍数在 1 ~2 倍的变化, 非特异性及特异性显色基质法对其无显著影响。而对非单一成分, 颜色较深的某些中药注射液, 如清开灵、香丹、双黄连注射液来说, 采用非特异性显色基质法检测, 其影响较大, 至最大有效稀释倍数 (MVD) 时其回收率均不在 50% ~200%, 而采用特异性显色基质试剂盒进行检测就能有效的消除这种干扰, 使其在 MVD 的范围内即能进行检测, 且不同批号之间的可重复性较好。

说明在检测成分复杂的中药注射液内毒素含量时, 用特异性鲎试剂代替非特异性鲎试剂为一种有效的干扰因素的祛除方法。

[参考文献]

- [1] 李丽, 刘日升, 周祥富, 等. 355 例中药注射剂不良反应文献分析[J]. 中国药业, 2004, 13(3): 61.
- [2] 夏振民, 刘大英. 特异鲎试剂研究进展[J]. 药物分析杂志, 1997, 17(5): 66.
- [3] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 : 81.
- [4] 张秋实, 郭朝辉, 张晓明. 中药饮片霉菌污染状况的调查[J]. 甘肃中医学院学报, 1998, 15(2): 62.
- [5] Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Limulus test (factor G) and polysaccharides from fungus[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1992, 66(8): 1030.
- [6] 苑庆华, 唐元泰. 细菌内毒素与鲎试剂法[J]. 中国药检药理工作通讯, 1997, 8(1): 32.
- [7] Twohy C W, Duran A P, Munson T E. Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the limulus amoebocyte lysate method[J]. J Parenter Sci Technol, 1984, 38(5): 190.

[责任编辑 邹晓翠]