

动态显色法定量检测卡前列素氨丁三醇注射液中的细菌内毒素

方韵¹,郝刚¹,陈卫¹,顾炳仁¹,李煜²

(1. 苏州市药品检验检测研究中心,江苏 苏州 215104;2. 中国药科大学,江苏 南京 210000)

摘要:目的 建立动态显色法测定卡前列素氨丁三醇注射液中细菌内毒素含量的方法。**方法** 建立动态显色法测定细菌内毒素的标准曲线,通过干扰预试验及干扰验证试验测定回收率以确定样品最佳稀释倍数及检测范围,并定量测定样品内毒素含量。**结果** 标准曲线回归方程: $\lg T = -0.28 \lg C + 5.65$, $r = 0.998$,相关系数的绝对值($|r|$) > 0.980 ,细菌内毒素浓度在 $0.01 \sim 1.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时线性关系良好,标准曲线成立;样品稀释 4 ~ 50 倍时,细菌内毒素回收率在 50% ~ 200% 范围内,均无干扰作用;干扰验证试验进一步证明样品稀释 20 倍时,其回收率均接近 100%,无干扰作用,所测样品的细菌内毒素含量均小于 $0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论** 该方法专属性强、精密性和准确性良好,能快速定量检测样品中内毒素含量,可用于卡前列素氨丁三醇注射液中细菌内毒素含量的测定。

关键词:动态显色法;细菌内毒素;卡前列素氨丁三醇注射液

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.12.008

Determination of bacterial endotoxin in Carboprost Tromethamine Injection by kinetic chromogenic assay

FANG Yun¹,HAO Gang¹,CHEN Wei¹,GU Bingren¹,LI Yu²

(1. Suzhou Institute For Drug Control, Suzhou, Jiangsu 215104, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

Abstract: Objective To establish a kinetic chromogenic assay (KCA) for quantitative detection of bacterial endotoxins in Carboprost Tromethamine Injection. **Methods** The standard curve of bacterial endotoxins by KCA was established, the recovery rates were measured by interference preliminary text and interference verification text to confirm the best dilution multiple and the concentration range of sample detection, and the bacterial endotoxins content of sample was determined quantitatively in these tests. **Results** The regression equation of standard curve was as follows: $\lg T = -0.28 \lg C + 5.65$, $r = 0.998$, $|r| > 0.980$. The calibration curve was linear over the concentration ranges of bacterial endotoxins from 0.01 to $1.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, which indicated the validity of standard curve. There was no interference effect when sample was diluted by 4 to 50 multiples with recovery ranged from 50% to 200%. Interference verification test further proved that the recovery was close to 100% when the sample was diluted 20 multiples, and there was no interference effect. The content of bacterial endotoxins in the samples was less than $0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusions** The KCA method was proved to be specific, sensitive and accurate, which can be applied to determine the endotoxin content in samples rapidly and quantitatively. It is suitable for quality control of Carboprost Tromethamine Injection.

Key words: Kinetic chromogenic assay; Bacterial endotoxin; Carboprost Tromethamine Injection

卡前列素氨丁三醇注射液适用于妊娠期为 13 ~ 20 周的流产,以及常规处理方法救治无效的子宫收缩弛缓、胎盘位置不正、软产道裂伤引起的产后出血^[1-3]。目前在医药行业中细菌内毒素是最常见和最主要的外源性致热原,是革兰阴性(G^-)菌的细胞壁上特有结构,其主要化学成分为脂多糖中的类脂 A 成分,可激活中性粒细胞,使之产生肿瘤坏死因子、凝血素、干扰素及白细胞介素等多种细胞因子,少量内毒素可引起机体发热、心动过速,过

量时可致内毒素性休克^[4-5]。因此,为确保患者用药安全,有必要对卡前列素氨丁三醇注射液中的细菌内毒素进行含量限定。卡前列素氨丁三醇注射液中细菌内毒素检测尚无国家标准。2015 版《中国药典(四部)》通则中规定,静脉用注射剂应设细菌内毒素(或热原)检查项^[6]。鲎试剂凝胶法试验是目前我国检测细菌内毒素最常用的方法,而随着鲎试剂灵敏度的不断提高及检测仪器的不断完善,细菌内毒素含量测定正向着微量定量检测方向发展。其中动态显色法(最高灵敏度达 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)是所有鲎试剂检测方法中最灵敏的,能更好地消除

实验中带来的干扰^[7-8]。目前采用动态显色法对细菌内毒素进行检测的报道在国内尚不多见,本文将按照 2015 版《中国药典(四部)》通则^[6]中细菌内毒素检查法,探讨采用动态显色法定量测定卡前列素氨丁三醇注射液中细菌内毒素含量的可行性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 内毒素检测仪(ELX808IV, BioTek Instruments, Inc);可调速漩涡混匀器(TZL-5009, 苏州珀西瓦尔实验设备有限公司);细菌内毒素检查反应板(湛江安度斯生物有限公司, 批号:1702140);1 000、200、100 μL 移液枪(德国 eppendorf)及无热原枪头,无热原空安瓿(2、5 mL)。

1.2 试剂 细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院, 规格:每支 80 EU, 批号:150601-201681);鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, 规格:每支 1.25 mL, 灵敏度:0.005 ~ 10 EU · mL⁻¹, 批号:1607220);细菌内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司, 规格:每瓶 30 mL, 批号:1701170);卡前列素氨丁三醇注射液(常州四药股份有限公司, 规格:250 mg · L⁻¹;批号:201605042、201605072、201605122、201609181、201609182、201609201)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素标准曲线的可靠性验证 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素标准品进行稀释,使其终浓度分别为 1.25、0.25、0.05、0.01 EU · mL⁻¹。将 4 个不同浓度(1.25、0.25、0.05、0.01 EU · mL⁻¹)的标准品溶液各取 0.1 mL 加入细菌内毒素检查反应板中,每个浓度设 3 个平行孔,并以细菌内毒素检查用水作为阴性对照(NC),设两个孔,再将复溶后的动态显色法鲎试剂加入上述各孔,每孔各 0.1 mL,放入细菌内毒素检测仪中,进行自动混匀与检测,反应温度为(37 ± 1) °C,检测波长为 405 nm,检测时间为 1 h。反应结束后仪器自动显示回归方程、相关系数、反应时间、实测值等数据。根据《中国药典》和鲎试剂使用说明书对光度测定法的规定:当阴性对照的吸光度或透光率小于标准曲线最低点的检测值或反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,变异系数(CV) ≤ 10%,标准曲线的相关系数的绝对值|*r*| ≥ 0.980,试验方为有效。经检测,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*)为纵坐标绘制标准曲线线性回归方程 lg*T* = -0.28lg*C* + 5.65, *r* = 0.998, |*r*| > 0.980,标准曲线线性关系较好,且阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度(0.01 EU · mL⁻¹)的反应时间,各复孔的 CV 均 < 10%,标准曲

线成立。结果见表 1。

表 1 动态显色法标准曲线的可靠性试验结果(*n* = 3)

标准内毒素浓度/EU · mL ⁻¹	反应时间/s	CV/%
1.25	396	1.889
	412	
	405	
0.25	663	3.847
	715	
	699	
0.05	1 020	1.218
	1 045	
	1 035	
0.01	1 560	2.496
	1 635	
	1 575	
阴性	> 3 600	
	> 3 600	

2.2 最大有效稀释倍数(MVD)的计算 按公式 MVD = *L* × *c* / λ 计算,式中 *L* 为供试品细菌内毒素限值,为 20 EU · mg⁻¹(参考企业内部标准中细菌内毒素限值);*c* 为卡前列素氨丁三醇注射液的浓度:250 mg · L⁻¹;λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度(EU · mL⁻¹)或光度测定法中标准曲线上最低的内毒素浓度^[6],本实验采用的是动态显色法标准曲线上最低点浓度:0.01 EU · mL⁻¹。经计算, MVD = (20 × 250) / 0.01 = 500(倍),供试品的 MVD 为 500 倍。与凝胶法的最低检测限相比,定量法可选择更大的稀释倍数以排除样品带来的干扰。

2.3 干扰预试验 根据 2015 年版《中国药典(四部)》通则中细菌内毒素检查法规定^[6],选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度设为 λ_m,本试验选择 0.25 EU · mL⁻¹ 设为 λ_m,作为添加到供试品中的标准内毒素浓度。选择批号为 201605042 的卡前列素氨丁三醇注射液,用细菌内毒素检查用水将供试品稀释 4、20、100、500 倍,作为供试品溶液(A 液);同时制备含上述供试品浓度并含细菌内毒素浓度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的溶液,作为供试品细菌内毒素阳性溶液(B 液)。按“2.1”项下方法,将配制好的溶液加入细菌内毒素检测板中,放入细菌内毒素检测仪自动检测。结果如表 2 所示,供试品外加细菌内毒素的平均回收率符合 2015 版《中国药典(四部)》通则中细菌检查法规定,均在 50% ~ 200% 范围内,表明卡前列素氨丁三醇注射液在稀释 4 ~ 500 倍时对试验均无干扰。经分析比较,选择无干扰且回收率接近 100% 的 20 倍稀释倍数,设为最小无干扰稀释倍数,并做进一步测定。

表 2 干扰预试验结果($n=3$)

稀释 倍数	内毒素浓度/ EU · mL ⁻¹	供试品溶液中内毒素 实测值/ EU · mL ⁻¹	平均回收 率/%	CV/%
4	0.25	0.127	56.809	2.891
		0.134		
		0.165		
20	0.25	0.227	101.535	3.092
		0.242		
		0.292		
100	0.25	0.220	96.302	2.249
		0.234		
		0.268		
500	0.25	0.234	104.084	2.439
		0.261		
		0.292		

2.4 干扰试验的验证 为确证卡前列素氨丁三醇注射液 20 倍稀释的有效性,进行 3 个批号卡前列素氨丁三醇注射液正式干扰试验。对 3 个批号样品稀释 20 倍,按干扰预试验方法进行检测,计算回收率。结果如表 3 所示,样品平均回收率均在 50% ~ 200% 范围内,且均接近 100%,符合 2015 版《中国药典(四部)》通则细菌内毒素检查法规定,表明在该稀释倍数下样品对实验无干扰,且测得的内毒素数值真实、有效。

表 3 干扰试验的验证结果($n=2$)

批号	外加内毒素/ EU · mL ⁻¹	平均反应 时间/s	实测内毒素/ EU · mL ⁻¹	平均回收 率/%
阴性对照	0	>3 600	0	—
201605042	0	>3 600	0	—
	0.25	830	0.257	102.84
201605072	0	>3 600	0	—
	0.25	842	0.243	96.69
201605122	0	>3 600	0	—
	0.25	837	0.248	99.32

注:“—”此项无数据。

2.5 精密性与准确性验证

2.5.1 精密性 用该方法检测标准曲线中 4 个浓度(1.25、0.25、0.05、0.01 EU · mL⁻¹)的标准内毒素,每个浓度重复检验 3 次,计算 CV^[7],CV 值均 < 10%,表明该方法精密性较好,具体数据见表 4。

2.5.2 准确性 在 3 批供试品(批号:201609181、201609182、201609201)中分别加入 4 个浓度(1.25、0.25、0.05、0.01 EU · mL⁻¹)的标准内毒素,每个浓度连续测定 3 次,计算回收率及 CV^[7],3 批供试品检测结果的回收率在 86% ~ 116% 之间,均在 50% ~ 200% 范围内,且 CV 值均 < 10%,方法准

确性较好,具体数据见表 5。

表 4 动态显色法检测标准内毒素的精密性

标准内毒素浓度/ EU · mL ⁻¹	检测结果/EU · mL ⁻¹			CV/%
	1 次	2 次	3 次	
1.25	1.235	1.329	1.268	3.734
0.25	0.267	0.242	0.257	4.928
0.05	0.052	0.048	0.049	4.191
0.01	0.011	0.010	0.011	5.413
标准曲线相关系数(R^2)	0.997	0.997	1.000	

表 5 动态显色法检测供试品内毒素含量的准确性($n=3$)

供试品批号	供试品 稀释 倍数	外加标准内 毒素浓度/ EU · mL ⁻¹	检测结果/ EU · mL ⁻¹	平均回 收率/ %	CV/ %
201609181	20	1.25	1.115 ± 0.095	89	8.481
	20	0.25	0.272 ± 0.011	109	4.176
	20	0.05	0.055 ± 0.001	110	1.818
	20	0.01	0.009 ± 0.001	93	6.185
201609182	20	1.25	1.245 ± 0.049	99	3.922
	20	0.25	0.291 ± 0.018	116	6.047
	20	0.05	0.057 ± 0.002	113	3.674
	20	0.01	0.009 ± 0.001	86	6.662
201609201	20	1.25	1.267 ± 0.015	101	1.185
	20	0.25	0.275 ± 0.014	110	4.919
	20	0.05	0.054 ± 0.002	108	3.704
	20	0.01	0.009 ± 0.001	87	6.662

2.6 显色法定量检测与传统凝胶法检测结果比较 采用所建方法检测 6 批次卡前列素氨丁三醇注射液的细菌内毒素含量,并与凝胶法测定的同批样品比较。显色法检测的 6 批卡前列素氨丁三醇注射液的细菌内毒素含量均小于标准曲线的最低限值(0.01 EU · mL⁻¹),且回收率均符合规定,经凝胶法检出的细菌内毒素量也均小于其限值 $L=20$ EU · mg⁻¹(即 $L=5$ EU · mL⁻¹),结果符合规定,具体数据见表 6。

3 讨论

细菌内毒素检查在制药工艺、药品检验及临床医学等领域是一项重要的质控技术,目前已被许多国家的药典标准收载^[8-9]。我国药典亦对细菌内毒素检查做了相关规定与指导,即采用鲎试剂法对细菌内毒素进行体外检测,检测方法有凝胶法和光度法,后者包括浊度法和显色基质法,其中显色基质法根据检测原理,分为终点显色法和动态显色法^[6]。

本实验通过参考国内及国外文献资料^[8-12],采用动态显色法对卡前列素氨丁三醇注射液细菌内毒素的检测方法进行验证,结果表明,标准细菌内

表 6 动态显色法定量检测与凝胶法检测比较

供试品批号	稀释倍数	外加标准内毒素 浓度/EU·mL ⁻¹	平均反应 时间/s	平均回收 率/%	实测值/ EU·mL ⁻¹	CV/%	结果比较/EU·mL ⁻¹	
							显色法	凝胶法
201605042	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	855	90.398	0.226	1.956		
201605072	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	825	104.387	0.261	4.582		
201605122	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	803	116.688	0.292	3.662		
201609181	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	851	92.013	0.231	1.026		
201609182	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	832	101.050	0.253	4.479		
201609201	20	—	>3 600	—	< 检测限	—	合格	合格
	20	0.25	844	95.353	0.238	3.185		

注：“—”表示此项无数据。

毒素的浓度在 0.01 ~ 1.25 EU·mL⁻¹ 范围内,标准曲线线性关系良好,|r| > 0.980,样品加入 4 个浓度的标准内毒素,其回收率在 50% ~ 200% 范围内,CV 均 < 10%,表明该方法具有较好的准确性和精密性。此外,对样品进行 20 倍稀释时,其回收率最接近 100%,表明该稀释倍数下样品对实验无干扰,且测得的内毒素数值真实、有效。动态显色法试验结果显示该产品实际内毒素含量较低,低于检测限 0.01 EU·mL⁻¹,表明目前该厂家的内毒素控制工艺满足要求,对卡前列素氨丁三醇注射液中的细菌内毒素含量控制较好。

与传统的凝胶法相比较,6 批卡前列素氨丁三醇注射液检测结果一致,均符合企业内部标准规定。但动态显色法的检测过程及结果处理均由仪器执行,能直观反映样品中细菌内毒素的含量,与凝胶法是一种定性的检测法相比,其具有更高的灵敏度、重复性好、操作简便,并能大范围定量,且数据具有可追溯性,还避免了主观判断结果等影响因素^[13]。此外,动态显色法试剂是基于显色基质颜色的变化速率来定量检测内毒素,因此对于有些干扰凝胶形成或浊度测定的因素不会产生影响^[9,14]。

综上所述,本实验所建方法专属性强、精密性和准确性良好,抗干扰能力强,能快速定量检测样品中的细菌内毒素含量,可用于卡前列素氨丁三醇注射液生产过程中细菌内毒素的质控。

参考文献

[1] BAI J,SUN Q,ZHAI H. A comparison of oxytocin and carboprost tromethamine in the prevention of postpartum hemorrhage in high-risk patients undergoing cesarean delivery [J]. Exp Ther Med,

2014,7(1):46-50.
[2] 周洁,姜宏,姚静,等. HPLC-UV-CAD 同时测定卡前列素氨丁三醇注射液中主要成分含量[J]. 中国新药杂志,2015,24(1):22-26.
[3] 吴惠琰,屈慧敏,胡孟彩,等. 卡前列素氨丁三醇注射液预防前置胎盘剖宫产后出血临床观察[J]. 中国新药杂志,2013,22(5):577-579.
[4] 田祥学. 细菌内毒素检查法及其在药学检验中的应用[J]. 中国医药指南,2015,13(23):278-279.
[5] 孔雯雯,张明森,林秀菁,等. 动态显色法检测注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子中内毒素的含量[J]. 中国当代药学,2014,21(7):12-14.
[6] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[7] 邓杰,张珂,袁涛,等. 动态显色法检测白喉毒素突变体 CRM197 的细菌内毒素含量[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(12):1835-1839.
[8] 张虞婷,丁苏苏,李倚云. 细菌内毒素的研究进展及其检查法的应用[J]. 天津药学,2015,27(5):66-69.
[9] 马莉,张崧,王安航,等. 细菌内毒素定量检测方法的常见问题剖析[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(9):733-734.
[10] FINGOLA FF,ALBERTINO SR,ABRANTES SDE M,et al. Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-biothropic serum[J]. J Pharm Biomed Anal,2013,85:93-98.
[11] 夏博,郭锋. 动态显色法定量测定加替沙星原料药中细菌内毒素含量[J]. 中国药物评价,2015,32(5):273-276.
[12] 李树徐. 注射用顺苯磺酸阿曲库铵细菌内毒素检测动态浊度法的研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):340-344.
[13] 张磷,张继鹏,赵一欢,等. 静注人免疫球蛋白细菌内毒素定量检测方法的探讨[J]. 微生物学免疫学进展,2013,41(2):28-32.
[14] 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.

(收稿日期:2017-05-03,修回日期:2017-06-13)