昆明学院学报　2018，40（6）：100～104　ISSN 1674－5639　CN 53－1211/G4
Journal of Kunming University

凝胶法与动态浊度法测定痰热清注射液细菌内毒素

牛杰振[1]，何漫漫[2]，刘丽霞[1]，马跃新[1]，李应才[3]，刘　黔[1]
（1．昆明市食品药品检验所 药品检验中心，云南 昆明 650032；
2．昆明理工大学 生命科学与技术学院，云南 昆明 650500；
3．昆明市食品药品检验所 食品检验中心，云南 昆明 650032）

摘要：为探索痰热清注射液细菌内毒素检查方法，依据《中华人民共和国药典：四部》（2015 年版），确定痰热清注射液中细菌内毒素限值，同时运用凝胶法和动态浊度法测定其内毒素的含量．结果表明，采用凝胶法需要将其稀释至 48 倍及以上才能消除对鲎试剂的干扰作用，而动态浊度法则需稀释至 240 倍及以上，此时后者外加细菌内毒素的回收率在合理范围内，为 50%～200%．因此，两种方法均可用于其内毒素含量的测定．

关键词：痰热清注射液；细菌内毒素；凝胶法；动态浊度法；干扰作用
中图分类号：R927.1　**文献标识码**：A　**文章编号**：1674－5639（2018）06－0100－05
DOI：10.14091/j.cnki.kmxyxb.2018.06.020

Test of Bacterial Endotoxin for Tanreqing Injection by Gel-clot Method and Kinetic Turbidity Method

NIU Jiezhen[1]，HE Manman[2]，LIU Lixia[1]，MA Yuexin[1]，LI Yingcai[3]，LIU Qian[1]
（1．Institute for Drug Control，Kunming Institute for Food and Drug Control，Kunming，Yunnan，China　650032；
2．College of Life Science and Technology，Kunming University of Science and Technology，Kunming，Yunnan，China　650500；
3．Institute for Food Control，Kunming Institute for Food and Drug Control，Kunming，Yunnan，China　650032）

Abstract：To explore the method for the determination of bacterial endotoxin in tanreqing injection，according to *Pharmacopeia of PRC*：*Volume IV*（2015 edition），the limit for bacterial endotoxin was determined and at the same time，Adopt gel-clot and kinetic turbidity method for the determination of the bacterial endotoxin in the tanreqing injection were applied. The result showed that the interference effect to the limulus amoebocyte lysate test was excluded in the gel-clot method，when the samples were diluted to 48 times or more，but in the kinetic turbidity method，the samples should be diluted 240 times or more，and the recovery of the added endotoxin in the samples was within the reasonable range（50%—200%）．Both methods are suitable for bacterial endotoxin test of tanreqing injection.

Key words：tanreqing injection；bacterial endotoxin；gel-clot method；kinetic turbidity method；interference effect

由黄芩、熊胆粉、金银花等按“君臣佐使”配伍而成的痰热清注射液，其药理作用为清热解毒、化痰止咳、宣肺平喘等，尤其是对流行性出血热疗效较为显著[1]．但由于其有效成分复杂多变[2]，因此热原反应多发[3]．目前，该产品的现行质量标准采用家兔法进行热原检查，但该方法存在检测成本高、时间长、灵敏度低等缺点[4-5]．于是，林颖等[6]尝试运用鲎试剂法代替家兔法的可行性研究，但该研究未对同一批次的样品同时采用两种及以上的方法进行验证．而仅采用一种方法，有一定的局限性，如：仲裁使用的凝胶法，虽然操作简单，但是只能定性；而动态浊度法虽可定量检测，但操作繁琐[7]．因此，本文拟同时采用凝胶法和动态浊度法进行干扰实验，以期为控制临床热

收稿日期：2017－11－10
作者简介：牛杰振（1986—），男，河南郸城人，助理工程师，微生物检验技术初级师，硕士，主要从事药品微生物检验研究．

原反应的发生提供技术参考.

1　仪器与材料

1.1　仪器

ZH-2-1 型旋涡混合器（天津药典标准仪器厂）；HWS-26 型电热恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司）；BET-72 型细菌内毒素测定仪（天津市天大天发科技有限公司）.

1.2　药品与试剂

痰热清注射液（上海凯宝药业股份有限公司，批号：1604117，1612321，1612205，规格：10 mL/瓶）；细菌内毒素工作标准品（中国食品药品检定研究院，批号：150601-201681，规格：80 EU/支，记为 CSE）；鲎试剂 1（批号：1609222，标示灵敏度 λ_1：0.125 EU/mL，规格：0.1 mL/支，记为 TAL1）、鲎试剂 2（批号：1507011，标示灵敏度 λ_2：0.03 EU/mL，规格：0.6 mL/支，记为 TAL2）、细菌内毒素检查用水（批号：1609210，规格：50 mL/瓶，内毒素含量 <0.003 EU/mL，记为 BET 水），均购自湛江博康海洋生物有限公司；耐热器皿均经 250℃干热灭菌 120 min 以上，其他器具均经无热源处理.

2　方法与结果

2.1　细菌内毒素理论限值(L)的确定

由《中华人民共和国药典：四部》（2015 年版）[8]可知：$L = K/M$，其中，K 为成人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量，是临床无任何不良反应的内毒素阈值，注射剂的 K 为 5 EU/(kg·h)；M 为供试品成人每千克体质量每小时的最大剂量，注射时间不足 1 h 的按 1 h 计. 人均体质量以 60 kg 计. 痰热清注射液成人用每次最大剂量为 40 mL. 加入 5% 葡萄糖注射液或 0.9% 氯化钠注射液 50 ~ 500 mL 静脉滴注，滴数控制在 60 滴/min 以内（以 20 滴/mL 计），约 3 h 滴完. 据此可知痰热清注射液临床最大使用剂量为：$M = 40/(60 \times 3) = 0.22$ mL/(kg·h). 其中，5% 葡萄糖注射液和 0.9% 氯化钠注射液的 L 均为 0.5 EU/mL[9]. 因此，可得允许本品带入内毒素最大值为：

$$L = \{[5/(40/(60\times3))]\times40 - 500\times0.5\}/40 = 16.25 \text{ EU/mL}.$$

鉴于本品特点、临床用药安全和企业生产实际[10]，L 拟定为每毫升中含有内毒素的量应小于 16.25 EU/mL.

2.2　凝胶法

2.2.1　最大有效稀释倍数的确定

TAL1 和 TAL2 灵敏度复核均符合现行《中华人民共和国药典》[8]要求. 由 1.2 项下与 2.1 项下可知，TAL1 和 TAL2 最大有效稀释倍数（MVD）分别为 130 和 541.

2.2.2　干扰预实验

用 BET 水将供试品（批号：1604117）分别稀释为 6，12，24，36，48，60，72 倍系列溶液，作为供试品溶液，记为 NPC. 按上述方法制备含有 $2\lambda_1$(0.25 EU/mL)内毒素的上述系列溶液，作为供试品阳性对照，记为 PPC；以含 $2\lambda_1$ 内毒素标准溶液作为阳性对照，记为 PC；以 BET 水作为阴性对照，记为 NC[10]. NPC 与 PPC 系列溶液每个含量均做 2 支平行管，PC 与 NC 亦做 2 支平行管. 各取上述溶液与 0.1 mL TAL1 溶液反应，37℃保温 60 min. 结果见表 1.

表 1　凝胶法干扰预实验结果（$n = 2$）

系列溶液	稀释倍数								PC	NC
	原液	1:6	1:12	1:24	1:36	1:48	1:60	1:72		
NPC	− −	− −	− −	− −	− −	− −	− −	− −	+ +	− −
PPC	− −	− −	− −	+ −	+ −	+ +	+ +	+ +		

注：1）“+”表示形成凝胶，不变形，不从管壁滑落；2）“−”表示未形成凝胶或凝胶不坚实从管壁滑落. 表 2 同.

从表 1 可知，供试品中可能含有抑制 TAL 凝固的物质，对 TAL 的干扰作用存在；稀释 48 倍后，干扰作用消除. 因此，采用凝胶法时最小不干扰稀释倍数为 48，可据此进行正式干扰实验.

2.2.3　干扰实验

依据预干扰实验结果，取供试品 3 批，用 BET 水稀释成 48 倍后备用. 取 1 支 CSE，用 BET 水溶解，混匀后使用供试品的 20 倍稀释液将 CSE

依次稀释成终含量为 2.00，1.00，0.50，0.25λ_1，作为供试品阳性对照溶液．取 1 支 CSE，用 BET 水稀释成 4 个含量的标准溶液，即 2.00，1.00，0.50，0.25λ_1．以 BET 水作为阴性对照，记为 NC．上述系列溶液每个含量做 4 支平行管，阴性对照做 2 支平行管．如表 2 所示．

表 2　凝胶法干扰实验结果（$n=4$）

反应液类别	外加细菌内毒素的终含量				NC
	2.00λ_1	1.00λ_1	0.50λ_1	0.25λ_1	
BET 水	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −
1604117	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −
1612321	+ + + +	+ + + +	+ − − −	− − − −	− −
1612205	+ + + +	+ + + +	+ + − −	− − − −	− −

从表 2 可以看出，NC 均呈阴性，BET 水的结果与 TAL1 灵敏度复核结果一致．供试品稀释 48 倍后，对鲎试剂反应干扰作用消除，其结果均低于 L，符合标准规定．

2.3　动态浊度法

2.3.1　细菌内毒素标准曲线的建立及可靠性分析

取 1 支 CSE，用 BET 水溶解、混匀并稀释成终含量为 10.000，2.500，0.625，0. 156，0.039 EU/mL 的系列标准溶液，以 BET 水作为阴性对照．各取0.1 mL 加入预先加有 0.1 mL TAL2 溶液的反应管中，混匀（注意应避免产生气泡），立即插入细菌内毒素测定仪中进行检测．其中检测波长为 660 nm，设定光密度 OD 为 0.02．每一含量做 3 个平行管，阴性对照做 2 个平行管．以内毒素含量的对数 lg C 为自变量，以反应时间均值的对数 lg T 为因变量，进行回归分析，拟合回归方程，绘制标准曲线．结果见表 3．

表 3　标准曲线的回归及可靠性分析（$n=3$）

序号	外加内毒素/(EU·mL^{-1})	反应时间/s	变异系数/%	实测内毒素/(EU·mL^{-1})
1	0.000	>6 750 >6 740		
2	10.000	669 689 701	2.36	6.771
3	2.500	914 916 918	0.22	2.889
4	0.625	1 302 1 348 1 356	2.18	0.943
5	0.156	2 203 2 244 2 169	1.70	0.214
6	0.039	4 317 4 872 4 881	6.89	0.023

由表 3 可知，回归方程为 lg T = 3.117 02 − 0.337 67lg C（T 是反应时间，C 是内毒素含量），相关系数的绝对值 $|r|=0.983>0.980$，符合分析线性回归的条件．平行之间的变异系数 CV 均小于 10%．标准曲线中的最低细菌内毒素含量高于 TAL2 标示灵敏度 λ_2，其反应时间小于阴性对照的

反应时间．因此，该回归方程有效．

2.3.2　干扰预实验

用 BET 水将供试品（批号：1604117）稀释成 50，100，240 倍，作为供试品溶液，记为 NPC；同时另行制备含有 0.625 EU/mL 内毒素的上述供试品溶液，作为供试品阳性对照，记为 PPC；以 BET 水作为阴性对照，记为 NC．NPC 和 PPC 系列溶液与 NC 均做 2 支平行管[7]．结果见表 4．

表 4　动态浊度法干扰预实验结果（$n=2$）

样品名称	稀释倍数	外加内毒素/（EU·mL^{-1}）	反应时间/s	变异系数/%	回收率/%	实测内毒素/（EU·mL^{-1}）	原液含量/（EU·mL^{-1}）
NC			>5 760 >5 740				<检测限
PC		0.625	1 322 1 266	3.06		0.938	0.938
NPC	48		3 938 4 941	15.98		0.033	1.599
PPC	48	0.625	1 116 1 130	0.88	237	1.517	
NPC	100		5 517 5 607	1.14		0.014	1.400
PPC	100	0.625	1 189 1 134	3.35	225	1.426	
NPC	240		>5 490 >5 470				<检测限
PPC	240	0.625	1 261 1 186	4.33	180	1.128	

注：检测限为 0.03 EU/mL. 表 5 同.

从表 4 可知，供试品稀释至 48 倍、100 倍时，回收率均大于 200%，原因可能是供试品中含有促进鲎试剂凝集的物质．稀释至 240 倍时，回收率在 50% ~ 200% 之间，表现较好．此稀释度下供试品对鲎试剂干扰作用消除，检测数据较准确，较好地反映了供试品中的内毒素含量，因此以 240 倍稀释液进行干扰实验．

2.3.3　干扰实验与定量检测

依据 2.3.2 项下实验结果，取 3 批供试品稀释至 240 倍，进行干扰实验．并依据干扰实验结果进行样品定量检测．结果见表 5．

表 5　动态浊度法干扰实验结果（$n=2$）

批号	稀释倍数	外加内毒素/（EU·mL^{-1}）	反应时间/s	变异系数/%	回收率/%	实测内毒素/（EU·mL^{-1}）	原液含量/（EU·mL^{-1}）
NC			>8 390 >8 390				<检测限
PC		0.625	1 320 1 325	0.27		0.971	0.971
1604117	240		>5 490 >5 470				<检测限
	240	0.625	1 261 1 186	4.33	180	1.128	
1612321	240		3 437 3 640	3.94		0.053	12.696
	240	0.625	1 194 1 250	3.24	188	1.230	
1612205	240		3 649 3 899	4.68		0.044	10.512
	240	0.625	1 193 1 234	2.39	193	1.254	

由表 5 可知，3 批供试品均稀释 240 倍时，外加内毒素回收率分别为 180%，188% 和 193%，均在 50% ~200% 之间，变异系数 *CV* 均小于 10%，无干扰作用，其结果均低于 *L*，与凝胶限度实验结果相佐证.

3 讨论

样品本身的颜色、成分、批次间及反应体系离子强度、pH 值、温度和 TAL 来源等均干扰鲎试剂的凝集反应[6]. 干扰实验表明，采用凝胶法和动态浊度法，样品原液分别稀释至 48 倍和 240 倍时后，均能达到消除干扰的目的，原因可能是判断标准不同所致[11].

对痰热清注射液，同时采用凝胶法和动态浊度法检查，两者具有良好一致性. 使用动态浊度法检查样品发现，不同批次间内毒素含量差异明显. 回收率均大于 100%，表明供试品的 240 倍稀释液中存在增强凝集反应的物质. 使用上述两种方法进行检测，结果一致，均小于 *L*. 其中凝胶法是一种经典方法，也是仲裁方法；而动态浊度法，可定量，且灵敏度高，但经济成本较高，可作为内控评价使用[7]. 因此，采用上述方法替代热原检查法以达到控制致热源的方法是可行的.

[参考文献]

[1] 连媛媛. 痰热清注射液治疗肾综合征出血热发热期患者的临床疗效［J］. 临床合理用药，2017，10（3）：86 – 87.

[2] 曹娅，刘俊. 50 例痰热清注射液的不良反应及相关因素分析［J］. 吉林医学，2014，35（10）：42 – 44.

[3] 李潇潇，卓琳，杨毅恒. 痰热清注射液儿童应用安全性再评价的真实世界研究［J］. 中华流行病学杂志，2017，38（2）：248 – 252.

[4] 国家食品药品监督管理局. 痰热清注射液的执行标准：YBZ 00912003［S］. 北京：中国标准出版社，2009.

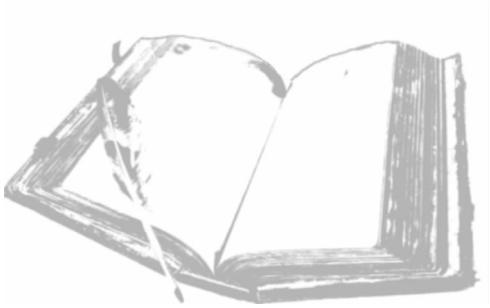
[5] 杨胜富，覃芳，陈飞. 动态浊度法定量测定复方注射液和丹参注射液中的细菌内毒素［J］. 中药材，2016，39（3）：590 – 592.

[6] 林颖，陈华龙. 动态浊度法定量检测痰热清注射液中细菌内毒素［J］. 儿科药物制剂与质量控制，2007，13（4）：51 – 52.

[7] 杨军，应莲芳，蒋琳，等. 凝胶法和动态浊度法检测注射用重组人睫状神经营养因子中细菌内毒素含量［J］. 微生物学免疫学进展，2013，41（4）：37 – 41.

[8] 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，2015：154 – 157.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：二部［M］. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[10] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范［M］. 北京：中国医药科技出版社，2010：310 – 324.

[11] 魏霞，国明，祝清芬，等. 丹红注射液凝胶法和动态浊度法细菌内毒素检查［J］. 中国药事，2012，26（12）：1357 – 1376.