

## 应用 LAL 动态浊度法测定复方苦参注射液中细菌内毒素含量

王信<sup>1</sup>, 冯宇<sup>2\*</sup>, 范祥元<sup>3</sup>, 杨喆<sup>2</sup>, 高蕾<sup>2</sup> (1. 国家食品药品监督管理总局高级研修院, 北京 100073; 2. 科德角国际生物医学科技(北京)有限公司, 北京 100068; 3. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

**摘要 目的:**建立应用美洲鲎试剂 LAL 的动态浊度法定量检测复方苦参注射液中细菌内毒素试验方法。**方法:**采用《中国药典》2015 年版(四部)中的细菌内毒素检查法。**结果:**复方苦参注射液用细菌内毒素定量法检测无干扰因素影响, 内毒素回收率在 50% ~ 200% 范围内。**结论:**使用 LAL 进行动态浊度法定量检测复方苦参注射液的细菌内毒素是可行的, 可用细菌内毒素方法代替兔热原检查法, 同时又避免了限量法内毒素检测时的干扰。

**关键词:**复方苦参注射液; 细菌内毒素; 动态浊度法; 干扰试验; 美洲鲎试剂

**中图分类号:**R 921.2      **文献标识码:**A      **文章编号:**1009-3656(2017)-6-0000-0

## Application of the Turbidimetric-Kinetic Method Using LAL for the Measurement of Endotoxin in Composite Radix Sophora Flavescentis Injection

Wang Xin<sup>1</sup>, Feng Yu<sup>2\*</sup>, Fan Xiangyuan<sup>3</sup>, Yang Zhe<sup>2</sup>, Gao Lei<sup>2</sup> (1. China Food and Drug Administration Institute of Executive Development, Beijing 100073; 2. Coastal-Times International BioMedical Technologies (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100068; 3. Anhui Institutes For Food and Drug Control, Hefei 230051)

**Abstract Objective:** To develop an assay for determination of bacterial endotoxin (BET) using LAL in Composite Radix Sophora Flavescentis Injection. **Methods:** BET was determined by turbidimetric-kinetic method. **Results:** The content in Composite Radix Sophora Flavescentis Injection did not interfere with the quantitation of BET. The recovery of BET was between 50% and 200%. **Conclusion:** The method using LAL is proved to be suitable for determination of the BET in Composite Radix Sophora Flavescentis Injection and could be used as an alternative for the rabbit pyrogen test to the injection.

**Key words:** Composite Radix Sophora Flavescentis Injection; Bacterial endotoxin; Turbidimetric-Kinetic method; Interfere factors test; LAL

复方苦参注射液又名岩舒注射液(compound Kushen injection, CKI), 是由苦参、白土苓两味药经提取加工精制而成的纯中药制剂, 收载于卫生部药品标准<sup>[1]</sup>, 具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛之功效。现代研究表明其具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、提高机体免疫力等多种药理作用, 临床上广泛用于非小细胞肺癌、原发性肝癌、消化道癌及恶性胸腔积水等重症疾病的辅助治疗<sup>[3-8]</sup>。目前我国药品标准对复方苦参注射液采用家兔法进行热原检查。但家兔热

原检查操作复杂, 影响因素多, 而细菌内毒素限量检查又具有较大的干扰性<sup>[9]</sup>, 故选用动态浊度法测定其细菌内毒素以消除其干扰, 结果准确可靠。而目前对复方苦参注射液的检测研究多基于东方鲎试剂 TAL, 基于美洲鲎试剂 LAL 的检测鲜有报道, 本文主要应用 LAL 对复方苦参注射液进行动态浊度法检测, 同时所采用的仪器耗材均为美国 ACC 产品, 结果准确可靠, 符合美国 FDA 相关标准, 从而为复方苦参注射液的美国 FDA 认证申报提供参考。

第一作者简介: 王信, 副教授; 研究方向: 新药的研究与开发工作与培训。Tel: 010-63364088; E-mail: wx@cfdaiied.org

通讯作者简介: 冯宇, 总经理兼技术总监; 研究方向: 鲎试剂和 PKF 内毒素定量检测应用和推广。Tel: 010-51662531; E-mail: y.feng@bio-life.cn

## 1 材料与仪器

复方苦参注射液(山西振东制药股份有限公司);LAL 试剂(批号 516-06-789-T,  $\lambda = 0.001 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 规格 5mL/瓶, 美国 ACC 公司);细菌内毒素工作标准品(批号 154, 美国 ACC 公司);细菌内毒素检查用水(批号 AB215748, 规格 50mL/瓶, 美国 ACC 公司);PKF96 细菌内毒素检测仪(美国 ACC 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 细菌内毒素限值的确定<sup>[1]</sup>

公式为:  $L = K \cdot M^{-1}$ ,  $K$  为规定的给药途径, 即人每公斤体重每 1h 最大可接受的内毒素剂量, 注射剂为  $5.0 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 本品的日静脉注射量为 12 mL, 加入 0.9% 氯化钠注射液 200 mL 中静滴, 静注时间按 1 h 计。中国人均体重按 60 kg 计算, 则  $M$  为 1 h 每公斤体重人的最大给药剂量为  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 计算得样品的内毒素限值  $L$  为  $25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 标准曲线制备及可靠性<sup>[2]</sup>

用细菌内毒素检查用水 LRW 将内毒素工作标准品进行 5 倍稀释, 最终细菌内毒素浓度分别为 0.625、0.125、0.025、0.005、0.001  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  稀释系列; 各取 0.1 mL 样本分别加到反应管内, 后加入 0.1 mL LAL 试剂并涡旋 1-2 秒混合均匀, 立即插入 PKF96 细菌内毒素检测仪内进行自动检测, 其中每一个浓度重复 3 管。仪器自动绘制标准曲线, 结果见图 1。回归方程:

$$\text{LgT} = 2.667 - 0.3029\text{LgC}$$

其中相关系数  $r = -0.994$ ; 最低浓度  $\lambda = 0.001 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 空白对照管在检测时间外, 故标准曲线成立。

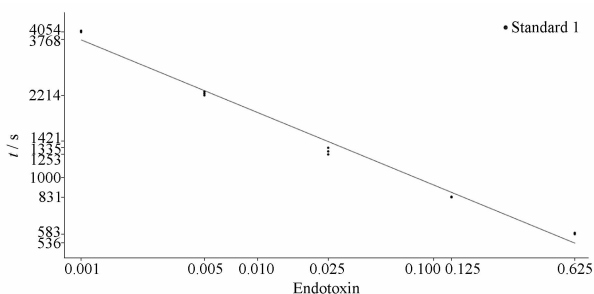


图 1 标准回归曲线

Fig. 1 Standard Curve

### 2.3 干扰试验

#### 2.3.1 样品稀释倍数计算<sup>[3]</sup> 公式为: $\text{MVD} = L \cdot$

$C \cdot \lambda^{-1}$ 。  $L$  为复方苦参注射液内毒素限值;  $C$  为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\lambda$  为标准曲线的最低内毒素浓度  $0.001 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 计算得复方苦参注射液最大有效稀释倍数 MVD 为 25000 倍(由于美国 ACC 鲎试剂的灵敏度较高,  $\lambda$  值较低, 故可稀释倍数更大)。

2.3.2 样品溶液配制及干扰试验 将复方苦参注射液用内毒素检查用水 LRW 依次稀释为 200, 400, 500 倍溶液, 记为 A 溶液; 同时另取 3 管, 进行 100, 200, 250 倍数稀释, 但在稀释液中添加等体积浓度为  $0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的细菌内毒素工作标准品溶液; 作为样品添加内毒素阳性对照管, 记为 B 溶液(经此步操作保证 B 溶液最终样本稀释倍数仍为 200、400、500 倍, 内毒素工作标准品终浓度均为  $0.025 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 分别取上述各液 0.1 mL, 加入预先加有 0.1 mL LAL 试剂的反应管内, 涡旋 1-2s 混匀立即插入 PKF96 细菌内毒素检测仪内进行检测, 其中每一个浓度重复 3 管, 仪器软件会自动计算回收率。回收率(%) = (B 液内毒素值 - A 液内毒素值) /  $0.025 \times 100\%$ 。结果见表 1。

标准曲线:

$$\text{LgT} = 2.667 - 0.3029\text{LgC} \quad r = -0.994.$$

样品的添加内毒素平均回收率均在 50% ~ 200% 范围内, 符合中国药典 2015 年版第四部及美国药典 85 of USP 39 规定, 表明样品的 3 个浓度溶液对鲎试剂 LAL 均无干扰影响。

### 2.4 样品溶液定量试验

分别取 4 批复方苦参注射液, 用内毒素检查用水 LRW 依次稀释为 200 倍溶液, 记为 A 溶液; 同时另取 3 管, 进行 100 倍数稀释, 但在稀释液中添加等体积浓度为  $0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的细菌内毒素工作标准品溶液; 作为样品添加内毒素阳性对照管, 记为 B 溶液(经此步操作保证 B 溶液最终样本稀释倍数仍为 200 倍, 内毒素工作标准品终浓度均为  $0.025 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 其中每个浓度重复 3 管, 计算回收率, 结果见表 2。4 批复方苦参注射液的回收率均在 50% ~ 200% 范围内, 表明复方苦参注射液在本试验条件下对 LAL 无干扰, 因此日常检验选用 200 倍稀释液即可。结论: 4 批次复方苦参注射液内毒素含量均符合规定。

## 3 讨论

### 3.1 干扰实验符合药典规定

从复方苦参注射液的干扰试验结果发现: 复方苦参注射液用美洲鲎试剂 LAL 进行细菌内毒素动

态浊度法检测,由于内毒素回收率在 50% ~ 200% 范围内,表明不存在干扰因素影响,且 4 批复方苦参

注射液(未超过 MVD 的四个稀释梯度)的内毒素含量均在规定限度 25 EU · mL<sup>-1</sup> 以下。

表 1 复方苦参注射液干扰实验结果

Tab. 1 Radix Sophora Flavescentis Injection interference test result

曲线名称 (standard Curve description)		标准曲线浓度 (standard Conc.)/(EU · mL <sup>-1</sup> )		标曲内毒素检测平均浓度 (Std Mean Test Conc.)/(EU · mL <sup>-1</sup> )		CV/%
标准曲线(standard curve)		0.625		0.520		4.511
		0.125		0.147		1.752
		0.025 0		0.029 5		9.876
		0.005 00		0.004 63		9.299
		0.001 00		0.0009 42		8.407

注射液批号 (injection lot No.)	样本稀释倍数 (sample dilution) (EU · mL <sup>-1</sup> )	样品中添加的内毒素阳性对照浓度 (mean spike Conc.) (EU · mL <sup>-1</sup> )	样本内毒素检测平均浓度 (sample mean test Conc.)/(EU · mL <sup>-1</sup> )	样品添加内毒素阳性对照检测平均浓度 (mean spike test Conc.)/(EU · mL <sup>-1</sup> )	回收率 (recovery)	平均终浓度 (mean final Conc) (EU · mL <sup>-1</sup> )	内毒素限值 (endotoxin limit) (EU · mL <sup>-1</sup> )
20170504	1:200	0.025 00	<0.001	0.029 01	116	<0.2	25
	1:400	0.025 00	<0.001	0.026 02	104	<0.4	25
	1:500	0.025 00	<0.001	0.027 52	110	<0.5	25
20170502	1:200	0.025 00	<0.001	0.027 85	111	<0.2	25
	1:400	0.025 00	<0.001	0.028 62	114	<0.4	25
	1:500	0.025 00	<0.001	0.027 93	112	<0.5	25
20170601	1:200	0.025 00	<0.001	0.026 86	107	<0.2	25
	1:400	0.025 00	<0.001	0.029 03	116	<0.4	25
	1:500	0.025 00	<0.001	0.027 79	111	<0.5	25
20170704	1:200	0.025 00	<0.001	0.026 05	104	<0.2	25
	1:400	0.025 00	<0.001	0.029 46	118	<0.4	25
	1:500	0.025 00	<0.001	0.028 93	116	<0.5	25

表 2 复方苦参注射液定量试验

Tab. 2 Radix Sophora Flavescentis Injection quantitative test

批号 (lot No.)	稀释倍数 (dillution factor)	A 液 (solution A) (EU · mL <sup>-1</sup> )	B 液 (solution B) (EU · mL <sup>-1</sup> )	回收率 (spike recovery) (EU · mL <sup>-1</sup> )	热原 (pyrogen)
20170504	200	<0.001	0.029 01	116	符合规定(meet the specification)
20170502	200	<0.001	0.027 85	111	
20170601	200	<0.001	0.026 86	107	
20170704	200	<0.001	0.026 05	104	

### 3.2 动态浊度法可代替传统家兔法

用传统的家兔法检测细菌内毒素,由于操作复杂,影响因素多,对试验结果影响很大。利用美洲鲎试剂 LAL 动态浊度法进行细菌内毒素定量检测,具有操作简便,结果准确,检测灵敏度高等优点,尤其避免了由于家兔差异及人为主观判断所出现的假阳性或假阴性结果。经过动态浊度法试验,样品的细菌内毒素定量检测各项结果均符合中国药典 2015

(四部)及美国药典 85 of USP 39 要求,说明使用美洲鲎试剂 LAL 进行细菌内毒素动态浊度法测定复方苦参注射液的细菌内毒素是可行的,可代替传统家兔热原检查法。

### 3.3 实验结果可追踪充分保证数据完整性

实验中所有实验数据均可进行审计追踪,美国 ACC 内毒素检测仪配套软件 Pyros EQS v1.2 经美国 FDA 认证,配备有 oracle 数据库,能够提

供强大的审计追踪功能,充分保证数据完整性及安全性。便于今后复方苦参注射液美国 FDA 的认证申报。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 14 册[S]. 1995: 中药成方制剂, WS3-B-2752-97  
Drug Standard of Ministry of Public Health of the Peoples Republic of China [S]. Vol. 14. 1995; Chinese patent medicine. WS3-B-2752-97
- [2] 中国药典[S]. 2015 年版. 四部: 生物检查法 1143  
ChP[S]. 2015. Vol IV; Bioassay method 1143
- [3] 李春梅. 复方苦参注射液的临床应用[J]. 疾病监测与控制杂志. 2010, 14(6): 330  
Li Chunmei. The injection on clinical application of compound sophora [J]. Dis Monitor Control. 2010, 14(6): 330
- [4] 夏乐敏. 复方苦参注射液治疗恶性肿瘤的临床研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2011, 18(4): 365  
Xia Lemin. Clinical research progress of compound Sophora Injection in the treatment of malignant tumor [J]. Chin J Clin Oncol Rehabil, 2011, 18(4): 365
- [5] 吴慧婷. 药盒灌注复方苦参注射液联合 TACE 治疗肝癌的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(3): 233  
WU Yiting. Clinical study of compound Sophora Injection combined with TACE in the treatment of liver cancer [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2005, 11(3): 233
- [6] 许刚, 王颖, 徐景明. 复方苦参注射液治疗癌症疼痛[J]. 前卫医药杂志, 1999, 16(1): 31  
Xu Gang, Wang Ying, Xu Jingming. Treatment of cancer pain with Compound Sophora Injection [J]. Qianwei J Med, 1999, 16(1): 31
- [7] 胡和平, 陈贵明. 复方苦参注射液治疗晚期恶性肿瘤 56 例 [J]. 临床医药实践, 2003, 12(6): 440  
Hu Heping, Chen Guiming. Treatment of 56 cases of advanced malignant tumor with Compound Sophora Injection [J]. Proc Clin Med, 2003, 12(6): 440
- [8] 宣丽君. 复方苦参注射液对化疗减毒作用的临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(3): 275  
Xuan Lijun. Clinical observation of Compound Sophora Injection on chemotherapy toxicity [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2005, 19(3): 275
- [9] 宋晓坤, 李利娟. 5 种中药注射液细菌内毒素检测方法的建立 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1819  
Song Xiaokun, Li Lijuan. Establishment of bacterial endotoxin test for 5 kinds of traditional Chinese medicine injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2006, 37(12): 1819

(收稿日期: 2017-11-17)