

动态浊度法定量检测依地酸二钠中细菌内毒素的含量

王尧尧, 顾德周, 王贺*, 杨晨, 何跃芳, 王林

(扬子江药业集团有限公司, 江苏 泰州 225321)

摘要 目的: 建立依地酸二钠细菌内毒素的常规检测方法。方法: 根据《中国药典》2015年版四部通则 1143 细菌内毒素检查法, 采用动态浊度法对依地酸二钠进行干扰预试验和正式干扰试验, 确定依地酸二钠的不干扰稀释倍数或不干扰稀释浓度。结果: 用 BET 水溶解配制成初始浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液, 采用钙离子缓冲液稀释 50 倍, 再用 BET 水稀释 2 倍进行定量检测。结果无干扰因素影响, 内毒素回收率在 50% ~ 200% 范围内。结论: 动态浊度法可用于检测依地酸二钠中的细菌内毒素含量。

关键词: 依地酸二钠; 细菌内毒素; 动态浊度法

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2019)-6-0000-0

doi: 10.19778/j.chp.2019.06.00?

Quantitative determination of bacterial endotoxin in disodium edetate by kinetic turbidimetric assay

WANG Yaoyao, GU Dezhou, WANG He*, YANG Chen, HE Yuefang, WANG Lin

(Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou 225321, China)

Abstract Objective: To establish a routine test method of bacterial endotoxin for disodium edetate. **Methods:** The bacterial endotoxin test was carried out according to the general rule 1143 of Chinese Pharmacopoeia 2015 Vol IV. The kinetic turbidimetric method was used to conduct pre-interference test and interference test on disodium edetate to confirm the non-interference dilution ratio or non-interference dilution concentration of the sample. **Results:** The test solution with initial concentration of $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ was prepared with BET water. The initial solution was diluted 50 times with calcium ion buffer, then diluted 2 times with BET water for quantitative determination. There was no interference and the recovery rate of endotoxin fell into 50% - 200%. **Conclusion:** Kinetic turbidimetric assay can be used for determination of bacterial endotoxin in disodium edetate.

Key words: disodium edetate; bacterial endotoxin; kinetic turbidimetric method

依地酸二钠是常用的金属离子螯合剂, 它能增强药物的稳定性, 原理为: 依地酸二钠可以与金属离子形成稳定的螯合物。依地酸二钠会螯合鲎试剂中的二价阳离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}), 导致鲎试剂中的二价阳离子浓度不足, 对细菌内毒素与鲎试剂的反应

造成干扰^[1-3]。本文根据《中华人民共和国药典》2015年版四部通则 1143 细菌内毒素检查法, 采用动态浊度法对依地酸二钠进行干扰试验及添加内毒素回收试验, 为建立该品种的细菌内毒素检查方法提供依据^[4]。

第一作者简介: 王尧尧, 实验研究员; 研究方向: 药品质量检测。Tel: 19975155935, E-mail: wangyaoyao@yangzijiang.com

* 通讯作者简介: 王贺, 硕士研究生, 研究方向: 药品质量检测。Tel: 19802649081, E-mail: wanghe@yangzijiang.com

1 仪器与材料

FED400 型干燥箱(德国宾德公司); IKA MS3 型自动漩涡混合器(广州仪科实验室技术有限公司); LKL064-03 型动态试管检测仪(湛江安度斯生物有限公司); SL-1000 型移液器、SL-200 型移液器(梅特勒托利多公司); XSE205DU 型电子天平(梅特勒托利多公司); 鲎试剂(灵敏度为 10~0.01EU/mL, 批号为 1701221, 湛江安度斯生物有限公司); 钙离子缓冲液, 2.1 mL/支, 批号为 1706220, 湛江安度斯生物有限公司); 细菌内毒素标准品(80EU/支, 批号为 150601~201885, 中国食品药品检定研究院); BET 水(50 mL/瓶, 批号为 1808290, 湛江安度斯生物有限公司); 依地酸二钠(批号为 180201010C、180116006C、180129004C、180116004C、180221009C、180316002C, 南京化学试剂股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值的确定

根据企业内控标准, 确定原辅料的细菌内毒素限值(总细菌内毒素之和小于制剂限度)。依地酸二钠是注射用泮托拉唑钠制剂中的辅料, 质量标准规定: 每 1 mg 依地酸二钠含内毒素的量应小于 0.02EU。

2.2 供试品溶液浓度的确定

供试品的最小有效稀释浓度计算如下: $C = \lambda/L$, 式中 L 为细菌内毒素限值 0.02 EU·mg⁻¹, λ 为标准曲线细菌内毒素最低浓度 0.01EU·mL⁻¹。计算出供试品的最小有效稀释浓度 C 为 0.5 mg·mL⁻¹(供试液初始浓度 50 mg·mL⁻¹, 即最大可稀释 100 倍)。

2.3 标准曲线的可靠性试验

用细菌内毒素检查用水(Bacterial Endotoxin Test Water, BET 水)将细菌内毒素工作标准品进行溶解稀释, 使其最终浓度为 1.25、0.25、0.05、0.01 EU·mL⁻¹ 系列, 每稀释一步均应在漩涡混合器上混匀 30s。然后将 4 个浓度的标准品溶液分别加入装有 0.1mL 鲎试剂的反应试管中, 每支每个浓度平行 3 管, 同时做 2 管阴性对照, 预设值 95%, 反应时间 3600s, 试验结果见表 1。

将数据进行线性回归分析, 得回归方程: $\text{LgTg} = 2.7902 - 0.2964\text{LgC}$, 平行管的变异系数(CV)均小于 10%, 空白对照在规定检测时间外, 相关系数 $|r| = 0.9968 > 0.980$, 故标准曲线可靠。

表 1 标准曲线的可靠性试验结果

Tab. 1 The reliability test results of the standard curve

标准曲线浓度 C (standard curve concentration)/ (EU·mL ⁻¹)	平均反应时间 T (mean response time)/ s	CV/ %
阴性对照(negative)	>3600	-
1.25	602.3	1.45
0.25	893.0	1.38
0.05	1433.0	1.43
0.01	2523.3	1.42

2.4 预干扰试验

称取供试品适量, 加 BET 水适量($V = m/50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)充分振荡使溶解, 制备成初始浓度为 50 mg·mL⁻¹的溶液, 用钙离子缓冲液分别稀释至 4、2、1 mg·mL⁻¹作为 2 倍的供试品溶液备用。再用 BET 水分别稀释至 2、1、0.5 mg·mL⁻¹(即分别稀释 25 倍、50 倍、100 倍)作为供试品溶液。同时用 2 倍浓度的各梯度供试品溶液与 0.5 EU·mL⁻¹的细菌内毒素对照品溶液等比例混合作为供试品阳性对照液。

取上述制备的各溶液 0.1 mL 至含 0.1 mL 鲎试剂(10~0.01 EU·mL⁻¹, 用 BET 水复溶混合)的光度法检测用试管中, 每个浓度重复 2 管, 进行自动检测。同时以 BET 水作为阴性对照。试验结果见表 2。

标准曲线 $\text{LgTg} = 2.8187 - 0.2918\text{LgC}$, 变异系数在 10% 以下, 相关系数 $|r| = 0.9969 > 0.980$; 阴性对照反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间, 试验有效; 稀释至 50 倍、100 倍的回收率均在 50%~200% 范围内, 但供试品溶液稀释 100 倍时的回收率 93%, 接近 100%, 故初步选择稀释至 100 倍的供试品溶液进行正式干扰试验与样品处理的有效性试验。

2.5 干扰试验与样品处理的有效性验证

由于供试液的稀释过程中采用了钙离子缓冲液, 为考察供试液制备过程是否破坏供试品本底的细菌内毒素, 在制备供试液时预添加一定浓度的细菌内毒素标准品(至终浓度为 8 EU·mL⁻¹), 按供试液制备方法处理后, 进行预加内毒素回收试验, 预加内毒素组记作 r。若供试品中预加内毒素的回收率在 50%~200% 之间, 则认为供试液制备过程对供试品本底细菌内毒素不存在破坏或不影响本底细菌内毒素的检出。取三批供试品做正式干扰试验和样品处理有效性试验, 结果见表 3。

表2 预干扰试验结果

Tab. 2 The pre-interferencetest results

批号 (batch No.)	稀释倍数 (dilution times)	外加内毒素 (added endotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	反应时间 (response time)/ s	CV/ %	回收率 (recovery)/ %	实测内毒素 (detected endotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	原液含量 (content of endotoxin in initial concentration)/(EU · mL ⁻¹)
180201010C	25		>3600	0.00		<0.002 97	<0.250
	25		>3600				
	25	0.25	>3600	0.00	0	<0.002 97	
	25	0.25	>3600				
180201010C	50		>3600	0.00		<0.002 97	<0.500
	50		>3600				
	50	0.25	1063	2.68	71	0.181 66	
	50	0.25	1104				
180201010C	100		>3600	0.00		<0.002 97	<1.000
	100		>3600				
	100	0.25	1015	1.62	93	0.236 27	
	100	0.25	992				

表3 干扰试验与样品处理的有效性试验结果

Tab. 3 The test results of interference and sample preparation

批号 (batch No.)	稀释倍数 (dilution times)	外加内毒素 (added exdotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	反应时间 (response time)/ s	CV/ %	回收率 (recovery)/ %	实测内毒素 (detected endotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	原液含量 (content of endotoxin in initial concentration)/(EU · mL ⁻¹)
180201010C	100		>3600	0.00		<0.002 84	<1.000
	100		>3600				
	100	0.25	941	1.19	106	0.269 04	
	100	0.25	957				
180201010C(r)	100		1371	0.62		0.077 81	7.781
	100		1359				
	100	0.25	887	1.45	109	0.350 82	
	100	0.25	869				
180116006C	100		>3600	0.00		<0.002 60	<1.000
	100		>3600				
	100	0.25	950	0.96	103	0.260 50	
	100	0.25	963				
180116006C(r)	100		1400	0.61		0.070 33	7.033
	100		1388				
	100	0.25	893	0.16	104	0.329 48	
	100	0.25	895				
180129004C	100		>3600	0.00		<0.002 64	<1.000
	100		>3600				
	100	0.25	946	0.07	113	0.294 39	
	100	0.25	947				
180129004C(r)	100		1377	0.88		0.078 19	7.819
	100		1360				
	100	0.25	913	1.17	102	0.332 10	
	100	0.25	898				

对批号为 180201010C、180116006C、180129004C 的依地酸二钠分别进行干扰试验与样品处理的有效性试验的线性回归分析结果分别为:

$$\text{LgTg} = 2.8102 - 0.2930\text{LgC} \quad |r| = 0.9973 > 0.980$$

$$\text{LgTg} = 2.8126 - 0.22876\text{LgC} \quad |r| = 0.9972 > 0.980$$

$$\text{LgTg} = 2.8202 - 0.2855\text{LgC} \quad |r| = 0.9974 > 0.980$$

变异系数均在 10% 以下。

由表 3 结果得知,①三批次供试品稀释至 100 倍时的回收率分别为 106%、103%、113%,均在 50%~200% 范围内。因此供试品原液制备成

$C_{\text{初始}} = 50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对鲎试剂与内毒素反应不存在干扰作用。②三批次供试品(预加内毒素)稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的回收率分别为 109%、104%、102%,在 50%~200% 范围内,可认为供试品稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时无干扰作用;三组试验预加内毒素浓度为 $8 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,实测值分别为 $7.781 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $7.033 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $7.819 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,对应的回收率分别为 97%、88%、98%,可认为供试液制备过程对供试品本底细菌内毒素不存在破坏或不影响本底细菌内毒素的检出。

2.6 依地酸二钠的常规检测

采用动态浊度法对 3 批依地酸二钠进行细菌内毒素含量测定,结果见表 4。

表 4 三批依地酸二钠检测结果

Tab. 4 The test results of endotoxin in three batches of disodium edetate

批号 (batch No.)	稀释倍数 (dilution times)	回收率 (recovery)/%	CV/ %	原液内毒素含量	供试品内毒素含量
				(content of endotoxin in initial concentration)/ ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	(content of endotoxin in the samples)/ ($\text{EU} \cdot \text{mg}^{-1}$)
180116004C	100	94	0.77	<1.000	<0.02
180221009C	100	91	1.08	<1.000	<0.02
180316002C	100	100	0.39	<1.000	<0.02

由表 4 中得出 3 批依地酸二钠光度法结果:供试品原液内毒素含量 $<1.000 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,原液浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,则供试品中内毒素含量为 $<0.02 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,均符合标准规定。说明该方法可用于日常监测。

3 讨论

本实验采用细菌内毒素检查法中的动态浊度法建立依地酸二钠的细菌内毒素检测方法,利用动态试管检测仪检测可以自动计算供试品内毒素含量,可以更真实更客观反应药品的内在质量^[5]。

根据文献报导,由于依地酸二钠易与二价阳离子发生螯合作用,进而导致鲎试剂活性降低,对内毒素检查有一定的干扰作用,故考虑用补足二价阳离子来降低活性螯合剂含量,排除供试品对鲎试剂的干扰^[6]。首先考察供试品的干扰程度,以确定供试品的不干扰浓度。预试验结果表明,供试品稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 无干扰作用,故进行正式干扰试验与样品处理的有效性试验。

在正式干扰试验中,三批供试品阳性回收率均在 103%~113%,重复性好,正式确定供试品在 0.5

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下,对细菌内毒素检测试验无干扰,可用于细菌内毒素检测。通过在供试品中预添加一定浓度的细菌内毒素($8 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$),按供试液制备方法处理后,进行预加内毒素测回收率试验,三组试验预加内毒素回收率均在 88%~98%,可认为供试液制备过程对供试品本底细菌内毒素不存在破坏作用。

该法具有灵敏度高、重现性好,且可完成多批次样品检测等优点,因此可以采用动态浊度法,监测依地酸二钠中细菌内毒素的具体含量,满足原辅料细菌内毒素的质量控制的要求,可为该品种提供细菌内毒素检测方法^[7-9]。

参考文献

- [1] 彭怡星,贾元超. 依地酸二钠对注射用艾司奥美拉唑钠的影响[J]. 海峡药学, 2017, 29(1):6
PENG Y X, JIA Y C. Influence of edetate disodium on the quality of esomeprazole[J]. Strait Pharm J, 2017, 29(1):6
- [2] 王信,冯宇,范祥元,等. 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[J]. 中国药品标准, 2017, 18(6):461
WANG X, FENG Y, FAN XY. Application of the turbidimetric-kinetic method using LAL for the measurement of endotoxin in Composite Radix Sophora Flavescentis Injection[J]. Drug Stand China, 2017, 18(6):461

- [3] 李树馥. 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
LI SY. Study on bacterial endotoxin test of cisatracuriumbesilate for injection using the dynamic turbidity method[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(2):340
- [4] 朱佳丽, 段鹏, 曹慧, 等. 动态浊度法定量测定碘克沙醇中细菌内毒素的含量[J]. 中国药师, 2016, 19(2):384
ZHU JL, DUAN P, CAO H, *et al.* Determination of bacterial endotoxin in iodixanol by kinetic turbidimetric method[J]. China Pharm, 2016, 19(2):384
- [5] 苑庆华, 芮菁, 华晓东, 等. 动态浊度法定量检测替硝唑注射液中内毒素研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(12):952
YUAN QH, RUI Y, HUA XD. Measurement of endotoxin in tinidazole injection using the kinetic turbidimetric technique[J]. Chin Pharm J, 2003, 38(12):952
- [6] 陈莉, 张啸, 刘永革, 等. 动态浊度法定量测定注射用盐酸大观霉素中细菌内毒素的含量[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(6):45
CHEN L, ZHANG X, LIU YG, *et al.* Determination of bacterial endotoxin content in spectinomycin hydrochloride for injection by kinetic turbidimetric method[J]. Chin J Ration Drug Use, 2017, 14(6):45
- [7] 姚明达, 黄仙梅, 王梅娟. 动态浊度法定量检测舒肝宁注射液中细菌内毒素[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(3):239
YAO M L, HUANG X M, WANG M J. Quantitative determination of bacterial endotoxin in Shuganning Injection[J]. Chin Pharm J, 2011, 46(3):239
- [8] 申应德, 张新, 李杰, 等. 动态浊度法定量测定吡拉西坦氯化钠注射液中细菌内毒素含量[J]. 中国药品标准, 2016, 17(1):41
SHEN YD, ZHANG X, LI J. Determination of bacterial endotoxin in piracetam and sodium chloride injection by kinetic turbidimetric assay[J]. Drug Stand China, 2016, 17(1):41
- [9] 石晶萍, 黄加秀. 动态显色基质法定量测定地佐辛注射液中细菌内毒素的含量[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(2):31
SHI JP, HUANG JX. Content determination of bacterial endotoxin in dezocine injection by kinetic chromogenic substrate method[J]. Chin J Ration Drug Use, 2017, 14(2):31

(收稿日期:2019-07-26)