

微量动态显色法检测奥拉西坦注射液中细菌内毒素含量

杨海燕, 周继春, 张军霞, 宋汉敏, 张婷婷, 郭兴辉 (河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

摘要 目的: 应用微量动态显色法对奥拉西坦注射液进行细菌内毒素定量检测, 并与凝胶法结果比较。方法: 采用微量动态显色法试剂对奥拉西坦注射液进行干扰试验, 采用凝胶法试剂对奥拉西坦注射液进行细菌内毒素检查。结果: 本品在终浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以下浓度时对微量动态显色法试剂与细菌内毒素的凝集反应无干扰作用, 回收率在 50%~200% 之间, 检测结果与凝胶法一致。结论: 本品可采用微量动态显色法定量检测细菌内毒素含量, 进行质量控制。

关键词: 奥拉西坦注射液; 微量动态显色法; 内毒素定量检测; 凝胶法; 显色基质

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)05-0596-06
doi:10.16153/j.1002-7777.2020.05.016

Detection of Bacterial Endotoxin Content in Oxiracetam Injection by Using Micro-kinetic Chromogenic Method

Yang Haiyan, Zhou Jichun, Zhang Junxia, Song Hanmin, Zhang Tingting, Guo Xinghui (Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou, 450003, China)

Abstract Objective: To quantitatively detect the bacterial endotoxins in Oxiracetam injection by using the micro-kinetic chromogenic method and compare the results with those of the gel-clot method. **Methods:** The micro-kinetic chromogenic tachypleus amebocyte lysate was used in the interference test for Oxiracetam injection while the gel-clot method tachypleus amebocyte lysate was used to detect the bacterial endotoxins. **Results:** When the final concentration of Oxiracetam injection was at or below $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, no interference of the micro-kinetic chromogenic tachypleus amebocyte lysate and the agglutination reaction of bacterial endotoxin were found, with the recovery rates between 50% and 200%. The results were consistent with those of the gel-clot method. **Conclusion:** Micro-kinetic chromogenic method for quantitatively detecting the bacterial endotoxin can be adopted in the quality control of Oxiracetam injection.

Keywords: Oxiracetam injection; micro-kinetic chromogenic method; quantitative detection of endotoxin; gel-clot method; chromogenic reagent

奥拉西坦注射液, 用于脑损伤及其引起的神经功能缺失、记忆与智能障碍的治疗; 主要成分为奥拉西坦, 辅料为磷酸二氢钠和乙二胺四乙酸二钠

盐。本品为吡拉西坦的类似物, 可改善老年性痴呆和记忆障碍患者的记忆和学习功能^[1-2]。机理研究结果提示, 本品可促进磷酰胆碱和磷酰乙醇胺合

成, 提高大脑中ATP/ADP的浓度比值, 使大脑中蛋白质和核酸的合成增加^[3-4]。

本品剂型为注射液, 故应严格控制细菌内毒素含量, 以保证临床用药的安全性。微量动态显色法 (Micro-Kinetic Chromogenic Method, MKCA) 是一种内毒素定量检测的新方法^[5], 是用酶标仪测定溶液的吸收度值, 根据检测反应液的颜色达到某一预先设定的吸收度所需要的反应时间和反应液中内毒素浓度成比例的原理而进行检测的一种方法。该方法不需要凝固蛋白原形成凝胶, 根据显色反应即可准确定量细菌内毒素。其操作便捷, 允许多个浓度供试品在96孔反应板中同时进行检测, 节约时间和减少工作量。

奥拉西坦注射液现行标准对于细菌内毒素的控制并不统一: 一是 (2014) 国药准字X-271-2号, 热原实验采用家兔法, 操作烦琐, 耗时较多, 并且家兔法不能定量检测出供试品中的内毒素含量, 容易受到外界环境因素干扰; 二是 (2014) 国药准字X-271号, 采用凝胶法对细菌内毒素进行控制。本研究采用MKCA对奥拉西坦注射液进行定量检测, 以建立奥拉西坦注射液的细菌内毒素定量检测方法, 并与现行标准进行比较。

1 材料

1.1 供试品

奥拉西坦注射液, 批号17070101X、17070102X、17070103X (天方药业有限公司)。

1.2 细菌内毒素工作标准品

批号150601-201783, 规格80 EU·支⁻¹ (中国食品药品检定研究院)。

1.3 鲎试剂

MKCA鲎试剂 (批号1604220, 规格0.35 mL, 定量范围20~0.01 EU·mL⁻¹, 湛江安度斯生物有限公司); 凝胶法鲎试剂 (批号170309, 规格0.5 mL·支⁻¹, 灵敏度0.25 EU·mL⁻¹, 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司)。

1.4 细菌内毒素检查用水 (BET水)

批号160006-201704, 规格5 mL (中国食品药品检定研究院)。

1.5 仪器

细菌内毒素检查96孔反应板 (批号1510080, 湛江安度斯生物有限公司); BioProbe生物探针5.2系统 (湛江安度斯生物有限公司); Multiskan FC

内毒素仪 (赛默飞世尔(上海) 仪器有限公司); ZH-2漩涡混合器 (天津大学无线电厂); 内毒素凝胶法测定仪 (天津市天大天发科技有限公司)。

2 方法

2.1 细菌内毒素限值 (L) 的确定^[6]

根据公式 $L=K/M$, K 为人每千克体质量每小时可接受的内毒素剂量, 注射剂 $K=5\text{ EU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, M 为人用每千克体质量每小时的最高供试品剂量, 以 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 表示。按本品说明书规定, $L=0.05\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 注射剂安全性检查法应用指导原则 (2015年版《中国药典》四部通则9301), 为保证用药安全, 药品的 L 值一般为计算值的1/2~1/3。考虑到制剂中还有辅料及各种制剂工艺操作, 本品内毒素限值拟定为每1 mg奥拉西坦注射液中含内毒素的量应小于0.012 EU。

2.2 标准曲线可靠性试验

取细菌内毒素工作标准品1支 (80 EU), 加入BET水0.8 mL, 涡旋仪震荡混匀15 min, 用BET水将细菌内毒素工作标准品稀释成2.0、0.2、0.02 EU·mL⁻¹ 3个浓度的内毒素标准溶液, 同时设立阴性对照管。取MKCA鲎试剂, 参照MKCA法鲎试剂说明书, 加0.35 mL BET水复溶后取25 μL鲎试剂, 加至96孔反应板上, 分别加上述系列浓度细菌内毒素标准溶液25 μL与鲎试剂进行反应。每个浓度平行2管。预设吸收度 A 值0.1, 反应时间 T 为3600 s, 温度 $(37\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长405 nm, 以 T 的对数为横坐标, 以浓度 c 的对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算相关系数 r 值。

2.3 供试品光度法测定干扰初筛试验

按“2.2”项下方法制备0.4 EU·mL⁻¹内毒素标准溶液; 将供试品原液用BET水稀释成160、80、40、20 mg·mL⁻¹的溶液, 分别与0.4 EU·mL⁻¹内毒素标准溶液等体积混合, 得到终浓度为80、40、20、10 mg·mL⁻¹的供试品阳性对照溶液, 内毒素终浓度为0.2 EU·mL⁻¹, 用MKCA法进行预试验。

2.4 供试品干扰试验

2.4.1 系列内毒素标准溶液 (C溶液) 的制备

按“2.2”项下方法制备终浓度为2.0、0.2、0.02 EU·mL⁻¹ 3个浓度的内毒素标准溶液, 分别标记为 $E_{2.0}$ 、 $E_{0.2}$ 、 $E_{0.02}$ (下标表示内毒素浓度)。

2.4.2 供试品溶液 (A溶液) 的制备

本试验标准曲线中细菌内毒素的浓度为2.0、0.2、0.02 EU·mL⁻¹，根据最大有效稀释倍数MVD=cL/λ，供试品质量浓度为200 mg·mL⁻¹，限值L按0.012 EU·mg⁻¹，λ按0.02 EU·mL⁻¹，带入计算，计算的MVD为120倍，根据预试验结果，在不超过MVD的情况下用BET水对供试品进行稀释，制成药物浓度为80、40 mg·mL⁻¹的供试品溶液。

2.4.3 供试品阳性对照溶液（B溶液）的制备

取80 mg·mL⁻¹供试品溶液与等量的0.4 EU·mL⁻¹内毒素标准溶液混合，即得40 mg·mL⁻¹奥拉西坦注射液阳性对照溶液（含有0.2 EU·mL⁻¹内毒素，记为S₄₀E_{0.2}）。同法制备，取40 mg·mL⁻¹供试品溶液与等量的0.4 EU·mL⁻¹内毒素标准溶液混合，即得20 mg·mL⁻¹奥拉西坦注射液阳性对照溶液（含有0.2 EU·mL⁻¹内毒素，记为S₂₀E_{0.2}）。

2.4.4 与MKCA鲎试剂反应

根据标准曲线计算回归方程，计算各浓度供试品溶液细菌内毒素浓度（c_t）和含细菌内毒素的供试品阳性对照溶液的细菌内毒素浓度（c_s），将0.2 EU·mL⁻¹内毒素浓度设为λ_m，按照下式计算回收率（r）。无干扰浓度下回收率应在50%~200%之间。

$$r = (c_s - c_t) / \lambda_m \times 100\%$$

参照MKCA鲎试剂说明书，取A溶液、B溶液、C溶液各25 μL，分别与加至反应板上的25 μL微量动态显色法鲎试剂反应，每个浓度均设置两个平行孔，还另设两孔BET水作为阴性对照（D溶液）。反应条件同“2.2”项。

2.5 供试品溶液外加内毒素回收率测定

根据干扰试验所得供试品无干扰浓度，对供试品溶液外加内毒素浓度进行计算，并进行供试品

细菌内毒素回收率测定，方法同“2.4”项。观察药物本身对细菌内毒素和鲎试剂的反应有无影响。

2.6 供试品的细菌内毒素检查

同时采用灵敏度为0.25 EU·mL⁻¹的凝胶法鲎试剂，根据干扰试验结果和细菌内毒素限值0.012 EU·mg⁻¹，参照《中国药典》）2015年版四部1143细菌内毒素检查法及文献^[7]，对奥拉西坦注射液进行细菌内毒素检查。根据公式MVD= c_t/λ，将奥拉西坦注射液稀释至20.833 mg·mL⁻¹，检测全部3个批号奥拉西坦注射液细菌内毒素含量。制备供试品溶液、供试品阳性对照溶液（2λ）、细菌内毒素阳性对照溶液（2λ）、阴性对照溶液，分别取0.1 mL，加入分装有0.1 mL鲎试剂溶液的试管中，均设置2个平行孔，轻摇混匀，封闭管口，标记为供试品管、供试品阳性对照管、细菌内毒素阳性对照管及阴性对照管。垂直放入内毒素凝胶法测定仪中，温度（37±1）℃，保温60 min，取出并观察结果。

3 结果

3.1 标准曲线可靠性

根据MKCA鲎试剂说明书的规定：标准曲线的相关系数r绝对值应≥0.980，RSD≤10%，试验方为有效。细菌内毒素标准曲线线性回归后，得到回归方程：lgT=2.6817-0.4736 lgC，r=-0.9999。每个浓度平行做两管，测得各平行管细菌内毒素浓度的变异系数均小于10%，标准曲线最低浓度均大于阴性对照管内毒素含量（反应时间T>3600 s），标准曲线最低点反应时间为3032.5 s。标准曲线可靠性试验结果表明，本次试验结果可信，线性可靠。批号为1604220的MKCA鲎试剂（TAL）符合要求。结果见表1。

表1 标准曲线可靠性试验结果

名称	外加内毒素 / (EU·mL ⁻¹)	反应时间 / s	细菌内毒素实测值 / (EU·mL ⁻¹)	RSD/%
阴性对照	0	> 3600	< 0.01423	0
阴性对照	0	> 3600		
内毒素标准品	0.02	3105	0.02044	3.38
内毒素标准品	0.02	2960		

续表1

名称	外加内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	反应时间 / s	细菌内毒素实测值 / (EU · mL ⁻¹)	RSD/%
内毒素标准品	0.2	1058	0.019152	0.94
内毒素标准品	0.2	1044		
内毒素标准品	2.0	340	2.04382	1.03
内毒素标准品	2.0	345		

鲎试剂灵敏度复核试验结果表明, 经复核, 见表2。
批号为170309的凝胶法鲎试剂符合试验要求。结果

表2 鲎试剂灵敏度复核试验结果

鲎试剂批号	内毒素浓度 / (EU · mL ⁻¹)				阴性对照	λ / (EU · mL ⁻¹)	λ_c / (EU · mL ⁻¹)	结论
	0.5	0.25	0.125	0.0625				
170309	++++	+++ -	-----	-----	--	0.25	0.30	符合规定

注: “-”为阴性结果; “+”为阳性结果。

3.2 供试品干扰试验预试验结果

用MKCA法鲎试剂(TAL)进行干扰试验预试验, 结果见表3。外加内毒素终浓度为0.2 EU · mL⁻¹, 测得奥拉西坦注射液供试品溶液细菌内毒素均小于0.001 EU · mg⁻¹。预试验结果表明, 供试

品稀释至40、20、10 mg · mL⁻¹时, 回收率均在50% ~ 200%, 表明在浓度为40、20、10 mg · mL⁻¹时, 奥拉西坦注射液对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用, 且试验结果有效。

表3 干扰试验预试验结果

供试品批号	浓度 / (mg · mL ⁻¹)	原液细菌内毒素 / (EU · mL ⁻¹)	外加细菌内毒素实测值 / (EU · mL ⁻¹)	回收率 / %	RSD/%
170701X	80	< 0.01147	0.09633	42.43	1.05
	40	< 0.01975	0.19476	87.5	2.93
	20	< 0.01147	0.20378	96.15	1.65
	10	< 0.01147	0.26134	124.94	2.11

3.3 供试品干扰试验结果

奥拉西坦注射液在40、20 mg · mL⁻¹浓度时, 回收率均在50% ~ 200%, 表明在该浓度下对细菌内毒素及鲎试剂反应没有干扰作用。结果见

表4。结果表明, 3个批号的供试品回收率都在50% ~ 200%, 且各个供试品的内毒素含量都小于其限值0.012 EU · mg⁻¹, 供试品合格。

表4 奥拉西坦注射液干扰试验结果

批号	供试品浓度 / (mg · mL ⁻¹)	标准细菌内毒素溶液 / (EU · mL ⁻¹)	平均反应时间 / s	回收率 /%	RSD/%	内毒素实测值 / (EU · mg ⁻¹)
阴性对照	/	/	> 3600	/	0	< 0.001
170701X	40	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	1011	96.82	0.14	0.20787
170702X	40	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	798.5	108.09	0.63	0.21780
170703X	40	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	1010.5	96.93	5.67	0.20809
170701X	20	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	987	102.23	7.62	0.21869
170702X	20	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	1033.5	92.10	7.32	0.19843
170703X	20	/	> 3600	/	0	< 0.001
		0.2	1022	94.47	2.63	0.20317

3.4 奥拉西坦注射液外加细菌内毒素回收试验的测定

奥拉西坦注射液稀释至40 mg · mL⁻¹、细菌内毒素回收率均大于50% (见表5)。表明在该浓度下, 奥拉西坦注射液对MCKA鲎试剂与细菌内

毒素的反应无干扰, 可采用该法进行细菌内毒素检查。

3.5 供试品的细菌内毒素检查

结果表明, 3个批号奥拉西坦注射液细菌内毒素检测结果均符合规定。见表6。

表5 试验药物细菌内毒素回收试验结果

试验药物批号	供试品浓度 / (mg · mL ⁻¹)	内毒素实测值 / (EU · mL ⁻¹)	回收率 / %	RSD/%	结论
170701X	40	0.20787	96.82	0.14	符合规定
170702X	40	0.20809	96.93	5.67	符合规定
170703X	40	0.19843	92.10	7.32	符合规定

表6 细菌内毒素凝胶法检查结果

鲎试剂批号	供试品批号	阴性对照	阳性对照	供试品阳性对照	供试品	结论
	17070101X			++	--	符合规定
170309	17070102X	--	++	++	--	符合规定
	17070103X			++	--	符合规定

4 讨论

奥拉西坦药理作用广泛,可有效改善患者的记忆学习能力^[8],临床上用于脑损伤及引起的神经功能缺失、记忆与智能障碍等症的治疗,特别是对预防老年人痴呆症有显著疗效^[9-11],目前国内已经有多个厂家生产奥拉西坦注射液。现在细菌内毒素最常用的检查法一般是凝胶试验法,用细菌内毒素检查法代替热原法也符合动物福利的3R原则。

本研究采用微量动态显色法对3批奥拉西坦注射液进行的干扰试验结果表明,当稀释到终浓度 $\leq 40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,外加内毒素回收率均在50%~200%,且各浓度供试品的内毒素含量均低于限值,表明方法准确。且对供试品的各个批号进行了凝胶法检测限量试验,试验成立,各个批号内毒素均合格,这与MKCA结果一致。

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,也是当测定结果有争议时的仲裁方法。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,其中动态显色法是所有鲎试剂检测方法中最灵敏的,能更好地消除各种干扰因素。而MKCA属于定量检测,检测结果可以在试剂范围内以准确的数值表示,并且灵敏度高。与传统的凝胶法相比较,3批奥拉西坦注射液检测结果一致,均符合《中国药典》规定,但MKCA的检测过程及结果处理均由仪器执行,能实时动态监控反应过程,更能直观反映供试品中细菌内毒素的含量,能大范围定量,快速检测供试品中的细菌内毒素含量,且数据具有可溯源性,可避免主观判断结果等影响因素。检测结果可以在试剂的检测范围内以精确的数值表示,也有利于生产过程中的监控,生产质控人员能够明确地知道半成品中的内毒素含量。此外,动态显色法鲎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^[12-13],兼有动态浊度法鲎试剂和终点法显色基质鲎试剂的优点。

考虑到临床上奥拉西坦注射液多用于老年人,由于其用药的特殊性,更应严格控制质量,降低风险。本方法过程可监控,结果可准确定量,因此,

为保证临床用药安全,可采用MKCA对供试品中的内毒素含量进行定量检测并准确控制。

参考文献:

- [1] 贺仙光. 奥拉西坦注射液治疗阿尔茨海默病疗效观察[J]. 实用医药杂志, 2010, 27(2): 408.
- [2] 钟华, 陈莉, 李颖. 奥拉西坦注射液治疗血管性痴呆的临床研究[J]. 中国临床神经科学, 2014, 22(6): 657-662.
- [3] 杨虎. 奥拉西坦注射液治疗血管性认知功能障碍的疗效观察[J]. 西南军医, 2016, 18(6): 522-524.
- [4] 罗成义, 柯以铨, 徐如祥, 等. 注射用奥拉西坦治疗颅脑损伤的随机、双盲、对照、多中心临床研究[J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(2): 192-196.
- [5] 李树徐, 梁进. 微量动态显色法定量检测3种大输液的细菌内毒素[J]. 中国药师, 2014, 17(6): 1052-1054.
- [6] 中华人民共和国药典: 四部通则1143 细菌内毒素检查法[S]. 2015: 154-157.
- [7] 刘鹏, 李健和, 曹俊华, 等. 奥拉西坦注射液细菌内毒素检查[J]. 中国当代医药, 2009, 16(12): 117-118.
- [8] 金磊, 李博, 叶雷, 等. 奥拉西坦的临床前药理学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(3): 354-360.
- [9] 曾祥海, 石继和, 胡正晖, 等. 奥拉西坦注射液治疗脑病临床进展[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(16): 231-232.
- [10] 方兴. 奥拉西坦治疗神经科疾病的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(5): 606-607.
- [11] 胡雪, 余捷. 奥拉西坦注射液有关物质分析方法及稳定性研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(11): 2087-2089.
- [12] 马莉, 张淞, 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.
- [13] Fingola FF, Albertino SR, Abrantes SMP, et al. Intralaboratory Validation of Kinetic Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Bacterial Endotoxin Determination in Anti-biothropic Serum[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 85(8): 93-98.

(收稿日期 2019年11月13日 编辑 郑丽娥)