·实验研究·

清热类中药醒脑静注射液热原检测方法的比较

刘　群[1],阮　新[2],阮　健[1]
(1 烟台市食品药品检验检测中心,烟台 264670;2 烟台市海关技术中心,烟台 264000)

[摘要] **目的**:清热类中药醒脑静注射液热原检测中,对家兔法和动态浊度法进行比较。**方法**:选取3批清热类中药注射剂醒脑静注射液为研究对象,实验分为7个组,内毒素组、外加内毒素制成内毒素+供试品组3个、供试品组3个,采用家兔热原检查法进行热原检查,同时采用动态浊度法对醒脑静注射液中内毒素进行定量检测。**结果**:家兔法测定供试品组3批样品均无热原反应;内毒素组家兔体温升高均达到0.6 ℃,发生热原反应;内毒素+供试品组与内毒素组比较,2批样品的内毒素+供试品组热原检查呈假阴性。动态浊度法测定3批醒脑静注射液的细菌内毒素含量,内毒素含量<0.01 EU·mL^{-1}。**结论**:家兔热原检查法对清热类中药醒脑静注射液热原检测出现假阴性,动态浊度法能定量检测其细菌内毒素的含量。

[关键词] 醒脑静注射液;细菌内毒素;热原检查法;动态浊度法
[中图分类号] R927.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)08-0760-05

The comparison of pyrogen tests for heat-clearing Xingnaojing Injection

LIU Qun[1], RUAN Xin[2], RUAN Jian[1]
(1 *Yantai Center for Food and Drug Control and Test*, *Yantai* 264670, *China*; 2 *Technology Center of Yantai Customs*, *Yantai* 264000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To compare the rabbit method and dynamic turbidity method for pyrogen detection in heat-clearing Xingnaojing injection. **Methods**: Three batches of heat-clearing type Chinese medicine injection, Xingnaojing injection, were selected as the research object. Animals were divided into seven groups, including endotoxin, 3 groups of endotoxin + endotoxin test samples, 3 groups of endotoxin test samples. Pyrogen was tested using rabbit pyrogen examination. At the same time, the endotoxin in Xingnaojing Injection was quantitatively detected by dynamic turbidimetry. **Results**: No pyrogen reaction was found in 3 batches of test sample groups by rabbit method. The body temperature of rabbits in endotoxin group increased by 0.6 ℃, and the pyrogen reaction occurred. Compared with the endotoxin group, the pyrogen test in endotoxin + test group was false negative. The contents of bacterial endotoxin in 3 batches of Xingnaojing Injection groups were determined by dynamic turbidimetric method, the content of endotoxin was <0.01 EU·mL^{-1}. **Conclusion**: Rabbit pyrogen test is easy to produce false negative results for pyrogen test of heat-clearing Xingnaojing Injection, and dynamic turbidimetry can quantitatively detect the contents of bacterial endotoxin.

[**Key words**] Xingnaojing injection; bacterial endotoxin; pyrogen test; dynamic turbidimetry

中药注射剂不良反应发生率较高,主要集中在热原反应和辅料过敏反应[1]。热原反应主要致热物质是细菌内毒素,其危害极大,轻则引起人体发热、出汗、恶心、呕吐等,重则引起休克甚至死亡[2]。国内对中药注射剂热原检测主要依靠家兔法进行,但是成本高、耗时长、存在动物间个体差异,用于具有清热功效的中药注射剂的热原检测时,可能会产生假阴性结果[3]。

[作者简介] 刘群,女,副主任药师,主要从事药品检验和质量标准制研究。联系电话:(0535)6243276-8021,E-mail: liu138535@163.com。
[通讯作者] 阮健,女,主任药师,主要从事药品检验和质量标准制研究。联系电话:(0535)6243276-8066,E-mail:1415495671@qq.com。

醒脑静注射液是由人工麝香、栀子、郁金、冰片4味中药提取精制而成的中药制剂，具有清热泻火、凉血解毒、开窍醒脑功效。临床用于治疗脑栓塞、脑出血急性期、颅脑外伤、急性酒精中毒病症等疗效较好[4-5]。

目前，醒脑静注射液的检验标准为《国家食品药品监督管理局国家药品标准》WS-B-3353-98-2003[5]，其中关于热原检查的规定方法为家兔法，随着细菌内毒素检查法的推广和应用，也有文章报道细菌内毒素检查法可用于醒脑静注射液的热原检测[6-8]，但文章中只是单纯地进行了醒脑静注射液的动态浊度法研究，且样本量较少、鲎试剂来源单一，对于方法建立的必要性和可行性仍需进一步研究。

醒脑静注射液功能主治中，具有明确的清热作用，其对家兔体温测定的影响尚未见报道，需探究其清热作用是否对热原实验产生影响。因此，作者以醒脑静注射液作为受试对象，外加内毒素进行实验，采用家兔热原检查法和鲎试剂动态浊度法分别进行检测，研究醒脑静注射液本身作用对内毒素检查方法的影响。

材　　料

1　试剂

细菌内毒素工作标准品（中国食品药品检定研究院，批号：150601-201886，规格：80 EU·支$^{-1}$）；细菌内毒素检查用水（湛江安度斯生物有限公司，批号：1901110）；动态浊度法鲎试剂（湛江安度斯生物有限公司，批号：1701221，可测内毒素范围 10～0.01 EU·mL^{-1}，规格：1.25 mL·支$^{-1}$）；醒脑静注射液1、醒脑静注射液2、醒脑静注射液3（无锡济民可信山禾药业股份有限公司，批号分别为：181205，181117，181106）；氯化钠注射液（山东齐都药业有限公司，批号：11B19052507）。

2　仪器

ZRY－3E 热原测定仪、BET－48G 细菌内毒素测定仪（天津市天大天发科技有限公司）；ZH－2 自动漩涡混合器（天津药典标准仪器厂）；实验用试管等玻璃器材按规定清洗，250 ℃干烤 2 h 除去热原。

3　实验动物

健康新西兰家兔，雄性，体重 2.0～3.0 kg，青岛康大生物科技有限公司提供，生产许可证号 SCXK（鲁）20160002。

方法与结果

1　家兔热原实验内毒素剂量的优化

实验前间隔 30 min 测定家兔正常体温 2 次，在测定第 2 次体温后 15 min 以内，自家兔耳缘静脉缓缓注入已温热至 37 ℃的供试品溶液，然后每隔 30 min 测肛温 1 次，共测 6 次，以 6 次体温中最高的一次减去正常体温，即为该家兔体温的升高温度。

用氯化钠注射液配制不同浓度细菌内毒素溶液 2，3，4 和 5 EU·mL^{-1}，给予家兔注射体积为 2.0 mL·kg^{-1}，观察家兔体温变化情况，结果见表 1。

表 1　不同浓度细菌内毒素溶液家兔体温变化情况　　℃

内毒素剂量	正常体温		注射后体温/h							温差
	第 1 次	第 2 次	平均	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	
4 EU·kg^{-1}	38.2	38.0	38.1	38.4	38.7	38.7	38.6	38.6	38.5	0.6
	38.3	38.3	38.3	38.6	38.6	38.5	38.4	38.3	38.3	0.3
	38.4	38.5	38.4	38.5	38.8	38.9	38.9	38.8	38.6	0.5
6 EU·kg^{-1}	38.9	39.1	39.0	39.4	39.4	39.4	39.2	39.3	39.4	0.4
	38.9	38.7	38.8	38.8	39.0	39.2	39.4	39.3	39.0	0.6
	38.7	38.7	38.7	38.8	38.9	39.3	39.2	39.1	39.0	0.6
8 EU·kg^{-1}	38.8	38.9	38.8	39.1	39.4	39.4	39.3	39.2	39.2	0.6
	38.7	38.6	38.6	38.8	39.1	39.2	39.3	39.2	39.2	0.7
	38.8	38.7	38.8	39.2	39.6	39.7	40.0	39.9	39.7	1.2
10 EU·kg^{-1}	38.3	38.2	38.2	38.7	39.2	39.4	39.2	38.7	38.7	1.2
	38.7	38.7	38.7	39.2	39.6	39.9	39.9	39.5	39.2	1.2
	38.7	38.7	38.7	39.1	39.7	40.2	40.2	39.8	39.5	1.5

2 家兔热原法检测不同样品

将 21 只家兔分成 7 组:内毒素组,用氯化钠注射液外加内毒素配制成含内毒素 4.0 EU·mL^{-1}的药液;内毒素 + 供试品组 1、内毒素 + 供试品组 2、内毒素 + 供试品组 3,在醒脑静注射液中外加内毒素配制成含内毒素 4.0 EU·mL^{-1}的药液;供试品组 1、供试品组 2、供试品组 3。给予家兔注射体积为 2.0 mL·kg^{-1},观察家兔体温变化情况,结果见表 2。

表 2 各给药组家兔体温变化情况 ℃

组别	正常体温		注射后体温/h							温差
	第 1 次	第 2 次	平均	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	
内毒素组	38.8	38.9	38.8	39.1	39.4	39.4	39.3	39.2	39.2	0.6
	38.7	38.6	38.6	38.8	39.1	39.2	39.3	39.2	39.2	0.7
	38.8	38.7	38.8	39.2	39.6	39.7	40.0	39.9	39.7	1.2
内毒素 + 供试品组 1	38.7	38.8	38.8	38.9	39.2	39.1	39.1	38.9	38.9	0.4
	39.0	39.0	39.0	39.2	39.4	39.4	39.4	39.3	39.2	0.4
	38.6	38.6	38.6	38.6	38.7	38.7	38.6	38.4	38.4	0.1
内毒素 + 供试品组 2	39.1	39.3	39.2	39.6	39.6	39.6	39.6	39.4	39.3	0.4
	39.2	39.2	39.2	39.5	39.7	39.7	39.5	39.3	39.2	0.5
	39.0	39.0	39.0	39.0	39.0	39.1	39.2	39.0	39.1	0.2
内毒素 + 供试品组 3	38.9	38.7	38.8	38.8	38.9	39.1	39.2	39.2	39.4	0.6
	39.0	38.9	39.0	39.2	39.6	39.7	39.7	39.6	39.5	0.7
	39.2	39.0	39.1	39.2	39.5	39.5	39.5	39.4	39.4	0.4
供试品组 1	39.6	39.4	39.5	39.4	39.5	39.6	39.9	39.9	39.6	0.4
	39.2	39.0	39.1	38.9	39.0	38.9	39.0	39.0	39.2	0.1
	38.9	38.9	38.9	38.9	39.0	39.0	39.0	39.0	38.9	0.1
供试品组 2	38.7	38.8	38.8	39.0	39.1	38.9	39.0	38.9	38.9	0.3
	39.0	39.2	39.1	39.1	39.0	39.2	39.4	39.1	39.2	0.3
	39.4	39.4	39.4	39.3	39.3	39.2	39.2	39.2	39.2	0.0
供试品组 3	39.1	39.3	39.2	39.2	39.2	39.1	39.0	39.0	39.0	0.0
	38.9	39.1	39.0	39.0	38.9	38.9	38.9	38.8	38.9	0.0
	38.5	38.7	38.6	38.7	38.6	38.5	38.9	38.9	38.9	0.3

3 动态浊度法检测醒脑静注射液中细菌内毒素

3.1 细菌内毒素限值的确定 细菌内毒素限值公式 $L = K \cdot M^{-1}$,式中 L 为供试品细菌内毒素限值,以 EU·mL^{-1}表示,K 为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量,以 EU·kg^{-1}·h^{-1}表示,其中注射剂 K 值为 5 EU·kg^{-1}·h^{-1},M 为人用每千克体重每小时的最大供试品剂量,以 mL·kg^{-1}·h^{-1}表示,人均体重按 60 kg 计算。醒脑静注射液临床上成人单次最大给药剂量 M 为 20 mL·60 kg^{-1},则 L 为 15 EU·mL^{-1}。

3.2 标准曲线可靠性实验 取细菌内毒素国家标准品 1 支,加细菌内毒素检查用水 1.0 mL,封口膜封口,旋涡混合器上混匀 20 min,依次稀释,每稀释一步均在旋涡混合器上混匀 30 s,得到浓度分别为 0.2,0.1,0.05,0.025 和 0.012 5 EU·mL^{-1}的标准溶液,各取 0.2 mL 分别加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂溶液的反应管内,混合均匀,插入细菌内毒素测定仪内进行检测,其中各浓度重复 3 管,以细菌内毒素检查用水为阴性对照,平行 2 管。以细菌内毒素浓度 C 为横坐标,反应时间 t 的对数为纵坐标,按最小二乘法进行统计分析,得标准曲线:$\lg t = 2.759\,83 - 0.262\,85 \lg C$,$r = -0.998\,8$。各浓度 3 支平行管的 CV < 10%,阴性对照管反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,标准曲线有效。结果见表 3。

表 3 标准曲线的可靠性实验结果

样品名称	内毒素剂量 /EU·mL^{-1}	反应时间 /s	CV /%	实测值 /EU·mL^{-1}
内毒素标准品	0.2	858	3.12	0.190 0
内毒素标准品	0.2	905		
内毒素标准品	0.2	907		
内毒素标准品	0.1	1 064	5.83	0.108 5
内毒素标准品	0.1	962		
内毒素标准品	0.1	1 068		
内毒素标准品	0.05	1 283	2.31	0.048 5
内毒素标准品	0.05	1 242		
内毒素标准品	0.05	1 299		
内毒素标准品	0.025	1 505	0.52	0.025 6
内毒素标准品	0.025	1 516		
内毒素标准品	0.025	1 501		
内毒素标准品	0.012 5	1 791	1.89	0.012 2
内毒素标准品	0.012 5	1 855		
内毒素标准品	0.012 5	1 846		
阴性对照	—	>2 560	—	—
阴性对照	—	>2 550		—

3.3 干扰实验及供试品测定 样品最大有效稀释倍数(MVD) = $C \cdot L \cdot \lambda^{-1}$,其中 C 为供试品溶液的浓度,L 为醒脑静注射液内毒素限值,λ 为标准曲线上最低内毒素浓度。此次实验,C 为 1.0 mL·mL^{-1},L 为 15 EU·mL^{-1},λ 为 0.012 5 EU·mL^{-1},MVD 为 1 200 倍。

将 3 批醒脑静注射液用细菌内毒素检查用水稀释一定倍数,作为供试品溶液(T),同时配制相同倍数含内毒素标准品 0.05 EU·mL^{-1}的溶液,作为阳性对照(S),各取 0.2 mL 分别加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂溶液的反应管内,混合均匀,插入细菌内毒素测定仪内进行检测,其中各浓度重复 2 管。按照下式计算回收率:

$$R = (C_s - C_T) \cdot (\lambda_m)^{-1} \times 100\%$$

式中,C_s 为样品阳性对照液中细菌内毒素的含量,C_T 为样品液中细菌内毒素的含量,内毒素含量单位为 EU·mL^{-1}。λ_m 为标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度,即 0.05 EU·mL^{-1}。当细菌内毒素的回收率为 50% ~200%,则认为在此实验条件下供试品溶液不存在干扰作用。取平均回收率 50% ~200%,且更接近于 100% 的稀释倍数时所测的内毒素值作为样品中内毒素的含量。结果见表 4。

表 4 醒脑静注射液动态浊度法定量检测结果

样品名称	稀释倍数	外加内毒素/EU·mL^{-1}	反应时间/s	CV/%	回收率/%	实测值/EU·mL^{-1}	原液含量/EU·mL^{-1}
醒脑静注射液 1	6	—	>2 720	—	68	—	<检测限
		—	>2 710				<检测限
		0.05	1 375	0.97		0.034 2	—
		0.05	1 394				—
醒脑静注射液 2	6	—	>2 640	—	75	—	<检测限
		—	>2 620				<检测限
		0.05	1 304	3.80		0.038 0	—
		0.05	1 376				—
醒脑静注射液 3	6	—	>2 930	—	131	—	<检测限
		—	>2 910				<检测限
		0.05	1 090	4.64		0.065 7	—
		0.05	1 164				—

4 结果

家兔在 4,6,8 和 10 EU·kg^{-1}剂量下,均表现出热原反应,剂量越高,升温越明显,本文选取 8 EU·kg^{-1}剂量作为最佳的内毒素剂量进行实验。

依据《中华人民共和国药典》热原检查法的结果判断[9],供试品组 3 批样品均符合规定,家兔无热原反应,而内毒素组家兔体温升高均达到 0.6 ℃,发生热原反应,内毒素 + 供试品组与内毒素组比较,供试品的存在不同程度的导致了内毒素最大升温值下降,其中 2 批样品的内毒素 + 供试品组判定为无热原反应,结果呈假阴性。

采用鲎试剂动态浊度法定量检测 3 批醒脑静注射液中细菌内毒素的含量,供试品中细菌内毒素含量可能较低,此次实验条件下未检测到数值,内毒素

含量 <0.01 EU·mL^{-1}。

讨　论

本研究在日常实验中发现了醒脑静注射液导致家兔体温下降的趋势，针对这一现象进行了深入探讨，优化了阳性组内毒素的剂量，证实了药物对内毒素致家兔热原反应体温升高存在影响，初步建立了醒脑静注射液的动态浊度法内毒素定量检测方法。

家兔对内毒素的热原反应跟家兔来源、批次等有密切关系，选择合适的内毒素剂量对保证实验的顺利进行起到重要作用。剂量过大，可能发现不了供试品溶液致家兔体温下降的趋势，剂量也不宜过小，需保证内毒素组出现明显的热原反应。本文选取 4 个不同浓度细菌内毒素溶液，采用同一批次、同一来源的家兔进行剂量优化，最终选取内毒素 8 EU·kg^{-1}作为家兔热原反应的致热剂量，既确保内毒素溶液能使家兔产生明显的热原反应，又不至于升温太过，此剂量可作为热原阳性反应的参考剂量。

醒脑静注射液 3 批供试品家兔法热原检查结果，均符合规定，但在内毒素存在的情况下，该品种导致家兔体温下降的趋势明显，甚至产生了假阴性结果。采用动态浊度法对醒脑静注射液 3 批供试品进行检查，未检测出内毒素，均符合规定，表明动态浊度法定量测定醒脑静注射液中细菌内毒素的检查结果与其热原检查结果相吻合。本文提供了研究醒脑静注射液动态浊度法的必要性，家兔法可能会在内毒素污染的情况下检测出假阴性的结果，需要建立第 2 种方法即动态浊度法，对样品中可能存在的内毒素进行检测。

通过家兔法和动态浊度法的对比实验，证实了药物对内毒素致家兔热原反应体温升高存在影响，可能是药物本身的清热作用所引起。家兔法常用于中药注射剂的热原检查，本研究证实虽然药品采用家兔法热原检查合格，有时可能无法排除内毒素的污染，这就对该品种的安全用药留下了隐患。

有报道细菌内毒素检查法可用于醒脑静注射液的热原检测[6-8]，可有效检测出醒脑静注射液中内毒素含量，为中药注射剂热原检查的方法选择提供了实验依据，但文章中样本量较少、鲎试剂来源单一，下一步需要加大样本量，采用不同厂家鲎试剂，甚至不同厂家的细菌内毒素测定仪，对动态浊度法用于醒脑静注射液的可行性进行研究。随着研究的不断深入，可以考虑作为醒脑静注射液热原检查家兔法的补充方法，从而更好地控制该品种质量，也对其临床用药安全起到一定的警示作用。

[参 考 文 献]

[1] 郝满良，白丽欣，秦建华. 复方黄连乳腺炎注射液的药理作用与安全性研究[J]. 中国农学通报，2012，28(11)：55－60.

[2] 李楚云，詹云丽. 输液热原反应与细菌内毒素的定量研究[J]. 中国实用医药，2010，5(10)：230－231.

[3] 杨国秀，张同星，彭国平. 清热解毒类清开灵注射液中热原检测方法的比较[J]. 中药与临床，2011，2(2)：27－29.

[4] 宋永熙，焦亿. 醒脑静注射液临床应用概述[J]. 中国中医药科技，2010，17(5)：472－473.

[5] 原国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 WS3-B-3353-98-2003[S]. 2003.

[6] 汤秋华，林辉，张一帆，等. 动态浊度法测定醒脑静注射液的细菌内毒素含量[J]. 中国医药指南，2014，12(22)：21－23.

[7] 王梅娟，谢斌. 醒脑静注射液细菌内毒素检测方法的建立[J]. 中国医药导报，2008，5(34)：12－13.

[8] 叶树林，王晓蕾. 鲎试剂检查醒脑静注射液细菌内毒素的探讨[J]. 军医进修学院学报，2011，32(5)：469－470.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京：中国医药科技出版社，2015.

编辑：刘卓越/接受日期：2020－09－05