

# 动态浊度法检测关节腔内注射用交联透明质酸钠中细菌内毒素

吴婷\*,曹霞飞,李薇(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3144-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.23

**摘要** 目的:建立定量检测关节腔内注射用2%交联透明质酸钠中细菌内毒素的试验方法。方法:根据2010年版《中国药典》附录细菌内毒素检查法中的动态比浊法及其指导原则进行干扰试验,确定最大有效稀释倍数;并将检测结果与凝胶法比较。结果:样品在原液8倍稀释的浓度下用定量鲎试剂检测无干扰,内毒素回收率在50%~200%内;两种方法检测样品内毒素结果均在规定的限值下。结论:建立的动态比浊法定量检测关节腔内注射用2%交联透明质酸钠中的内毒素方法可行。

**关键词** 关节腔内注射用2%交联透明质酸钠;动态比浊法;细菌内毒素;干扰试验

## Determination of Bacterial Endotoxin in Cross-linked Sodium Hyaluronate for Intraarticular Injection by Using Kinetic-turbidimetric Technique

WU Ting, CAO Xia-fei, LI Wei (Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the quantitative determination of endotoxin in Cross-linked 2% sodium hyaluronate for intraarticular injection. METHODS: According to kinetic-turbidimetric technique and guidance principle stated in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), inference test was carried out to determine maximum effective diluent fold. The results were compared with gel-clot test. RESULTS: There was no interference in the bacterial endotoxin test when the sample was diluted by 8 times. The recovery rates of endotoxin were 50%~200%. Results of two methods both were below the limits. CONCLUSIONS: It is feasible that established kinetic-turbidimetric technique is used to determine the endotoxin in Cross-linked 2% sodium hyaluronate for intraarticular injection.

**KEYWORDS** Cross-linked 2% sodium hyaluronate for intraarticular injection; Kinetic-turbidimetric technique; Bacterial endotoxin; Interference test

透明质酸钠(Sodium hyaluronate)又称玻璃酸钠,是以N-乙酰氨基葡萄糖和D-葡萄糖醛酸二糖单元为基本结构,重复交替连接形成的高分子黏多糖,主要由公鸡冠中提取制备或由细菌发酵纯化制备<sup>[1]</sup>。关节腔内注射用2%交联透明质酸钠是在欧盟上市的一种Ⅲ类医用装置,1 ml溶液含有20 mg透明质酸钠,透明质酸钠原料与交联剂二乙烯基砒在缓冲盐溶液中反应,制备交联透明质酸钠本体溶液,最终灌装成型。本品由于特殊的黏弹性能主要应用于变形膝关节和肩关节周围炎症的辅助治疗。我国对透明质酸钠注射液的行政管理是依据其用途划分为药品类和医疗器械类,根据原国家食品药品监督管理局(SFDA)《关于医用透明质酸钠产品管理类别的公告》<sup>[2]</sup>的要求,该产品按照药品管理。在国内,对透明质酸钠注射液细菌内毒素的限值规定各不相同,如中国组织工程医疗产品行业标准<sup>[3]</sup>规定其细菌内毒素应不大于0.5 EU/mg,中国国家药品标准<sup>[4]</sup>规定供眼内注射用时应小于0.5 EU/mg,供关节内注射用时应小于0.05 EU/mg<sup>[1]</sup>。为此,笔者参照2010年版《中国药典》“细菌内毒素定量测定法”<sup>[5]</sup>及《欧洲药典》(6.0版)内毒素检查法<sup>[6]</sup>,考察了关节腔内注射用2%交联透明质酸钠对细菌内毒素定量检查的干扰情况,建立了该品种的细菌内毒素定量检查方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BioProbe 细菌内毒素检测仪(湛江安度斯生物有限公

\* 主管药师。研究方向:药品检验。电话:020-81484735。E-mail:wuting1984007@163.com

司)。

### 1.2 药品与试剂

样品关节腔内注射用2%交联透明质酸钠(Austria Chroma-Pharma GmbH公司,批号:802023/3、802025/2、802027/3,规格:2 ml:40 mg);鲎试剂(TAL,批号:1202022,标示灵敏度 $\lambda=0.03$  EU/ml,规格:每支1.25 ml)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:1105060,规格:每支50 ml)均来源于湛江安度斯生物有限公司;细菌内毒素标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201174,规格:每支160 EU)。

## 2 方法与结果<sup>[7]</sup>

### 2.1 细菌内毒素限值的确定

根据企业所附标准及使用说明书<sup>[8]</sup>,该样品的使用为一次性整体注射,根据透明质酸钠供关节内注射用时细菌内毒素限值应小于0.05 EU/mg的原则<sup>[1]</sup>,企业规定样品的细菌内毒素为小于0.5 EU/ml,按透明质酸钠计算为0.025 EU/mg,较我国现行标准<sup>[3-4]</sup>更为严格。

### 2.2 标准曲线制备及可靠性试验

用BET水将细菌内毒素标准品进行10~2倍稀释,最终细菌内毒素浓度分别为2.0、0.5、0.25、0.031 25 EU/ml;各取0.1 ml分别加到预先加有0.1 ml鲎试剂反应管内,混合均匀,立即置入细菌内毒素检测仪内进行自动检测,其中每个浓度重复3管;同时用BET水与鲎试剂反应作为阴性对照,平行3管,反应温度为 $(37 \pm 1)$  °C,工作波长为405 nm,建立以平均反应时间( $T$ )对数值 $\lg T$ 与内毒素浓度( $c$ )对数值 $\lg c$ 的相关性,结果见表1。

表1 标准曲线的可靠性试验(n=3)

Tab 1 Reliability test of standard curves(n=3)

细菌内毒素浓度, EU/ml	平均反应时间, s	RSD, %
阴性对照	>3 600	0
2.0	685.0	0.41
0.5	1 005.4	0.41
0.25	1 190.0	1.78
0.031 25	2 298.3	1.20

将数据进行线性回归分析, 得回归方程:  $\lg T=2.915 6-0.288 3 \lg c$ , 其中阴性对照大于3 600 s, 相关系数  $r=-0.999 0$ , 其绝对值大于0.980 0, 故标准曲线成立。

### 2.3 确定最大有效稀释倍数(MVD)

根据公式  $MVD=cL/\lambda$ , 其中  $L$  为内毒素限值0.5 EU/ml,  $c$  为关节腔内注射用2%交联透明质酸钠浓度1.0 ml/ml,  $\lambda$  为标准曲线的最低内毒素浓度0.031 25 EU/ml。计算得关节腔内注射用2%交联透明质酸钠最大有效稀释倍数为16倍。

### 2.4 样品溶液配制及干扰预试验<sup>[9]</sup>

由于样品具有特殊的黏弹性能, 因此样品溶液的配制具有一定的难度。本试验采取的配制方法为将1支样品(2 ml)全部转移至试管内, 加入BET水6.0 ml, 在振荡器上高速混匀, 即为4倍稀释液; 在此基础上另进行8、16倍稀释液, 记为A<sub>1</sub>液。同时另取3管, 进行同倍数稀释, 并在稀释液中添加中点浓度(M)为0.25 EU/ml的细菌内毒素标准品溶液, 作为供试品添加内毒素阳性对照管, 记为B<sub>1</sub>液。

分别取上述各稀释液0.1 ml, 加入预先加有0.1 ml 鲎试剂的反应管内, 混匀后立即插入细菌内毒素检测仪内进行检测, 每个浓度重复3管测定, 检测条件同“2.2”项下。测定结束后, 按标准曲线回归方程分别计算出供试品溶液的细菌内毒素含量, 再计算平均回收率。回收率(%)=(B<sub>1</sub>液内毒素值-A<sub>1</sub>液内毒素值)/0.25×100%。样品添加内毒素后平均回收率结果见表2。

表2 预干扰试验结果(n=3)

Tab 2 Results of preliminary interference test(n=3)

样品批号	稀释倍数	检查项目	平均反应时间, s	细菌内毒素浓度, EU/ml	回收率, %
802023/3	4	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	176.68
		B <sub>1</sub>	1 022.7	0.471 4	
	8	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	140.00
		B <sub>1</sub>	1 088.3	0.380 0	
	16	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	152.28
		B <sub>1</sub>	1 064.2	0.410 7	

由表2结果发现, 样品添加内毒素回收率均在50%~200%范围内, 其中以8倍稀释浓度回收率结果为最佳, 符合有关要求。初步表明, 此试验条件下供试品对鲎试剂反应不存在干扰。

### 2.5 干扰试验

将3批样品分别用BET水制成8倍稀释液, 记为A<sub>1</sub>液; 同时另取3管, 进行同倍数稀释, 并在稀释液中添加中点浓度为0.25 EU/ml的细菌内毒素标准品稀释液, 作为供试品添加内毒素阳性对照管, 记为B<sub>1</sub>液。分别取上述各液0.1 ml, 加入预先加有0.1 ml 鲎试剂的反应管内, 混匀后立即插入细菌内毒素检测仪内进行检测, 检测条件同“2.2”项。每个浓度重复3管

测定, 计算平均回收率, 结果见表3。

表3 干扰试验结果(n=3)

Tab 3 Results of interference test(n=3)

样品批号	稀释倍数	检查项目	平均反应时间, s	细菌内毒素浓度, EU/ml	回收率, %
802023/3	8	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	148.68
		B <sub>1</sub>	1 071.0	0.401 7	
802025/2	8	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	134.92
		B <sub>1</sub>	1 099.0	0.367 3	
802027/3	8	A <sub>1</sub>	>3 600	<0.03	141.12
		B <sub>1</sub>	1 086.0	0.382 8	

由表3结果发现, 3批样品中的细菌内毒素含量(0.03×2=0.06 EU/ml)均在内毒素规定的限值0.5 EU/ml以下, 且添加内毒素回收率均在50%~200%内, 再次确认以该样品的8倍稀释液用定量鲎试剂检测无干扰。

### 2.6 两种方法检测样品中的细菌内毒素

根据2010年版《中国药典》附录XIE“细菌内毒素定量测定法”规定方法<sup>[5]</sup>, 内毒素限值按0.5 EU/ml对3批样品在稀释8倍时进行内毒素定量检测; 同时按2010年版《中国药典》附录XIE中凝胶法<sup>[5]</sup>进行检测。结果显示, 两种内毒素检测方法的实测值均在规定的限值以下, 见表4。

表4 两种方法检测结果比较

Tab 4 Comparison of the results of 2 kinds of methods

样品批号	动态浊度法			凝胶法
	A液, EU/ml	B液, EU/ml	回收率, %	
802023/3	<0.03	0.401 7	148.68	实测细菌内毒素浓度, EU/ml <0.06 阴性(-)
802025/2	<0.03	0.367 3	134.92	<0.06 阴性(-)
802027/3	<0.03	0.382 8	141.12	<0.06 阴性(-)

## 3 讨论

关节腔内注射用2%交联透明质酸钠样品性质特殊, 具有很强的黏弹性能, 取样过程中容易发生挂壁现象, 因此本试验采取整支样品取样, 避免样品丢失。样品稀释过程中直接采用4倍稀释后, 样品溶液仍有较强黏弹性, 需多次润洗管壁。根据表2预干扰试验结果, 选择8倍稀释液的浓度范围, 用定量鲎试剂检测干扰最小。与内毒素常规凝胶法检测相比, 动态比浊法的数据具有更高的检测灵敏度。

由于细菌内毒素与鲎试剂的反应是由一系列酶促放大作用而产生的, 因此其干扰因素较多。一般要求采用2个不同厂家的鲎试剂同时进行试验以验证其平行性。因本试验是定量测定细菌内毒素, 对鲎试剂的要求较高, 目前满足实验室要求的定量测定鲎试剂生产厂家只有1个, 故无法采用2家产品同时做平行试验。

关节腔内注射用2%交联透明质酸钠因使用的部位有特殊性, 国外生产及检验机构对其细菌内毒素的控制更为严格, 动态比浊法的检测数据能更好地检测其产品质量, 可促进其产品质量不断完善和提高<sup>[10]</sup>。

## 参考文献

- [1] 顾其胜, 王琼, 付爱玲. 玻璃酸钠产品标准与质量控制[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(9): 1 130.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 关于医用透明质酸钠产品管理类别的公告[S]. 2009-12-24.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 中华人民共和国医药行业标

