

血液保养液的细菌内毒素测定时鲎试剂溶媒的改进

张天栋 于志英 肖 健(新乡 453000 河南省新乡市中心医院;¹453000 河南省新乡市药品检验所)

摘要 目的: 建立血液保养液的细菌内毒素检查法。方法: 用自制 Tris-HCl 缓冲液代替细菌内毒素检查用水做鲎试剂溶媒, 按中国药典 2000 年版二部收载的细菌内毒素检查法进行实验。结果: Tris-HCl 缓冲液做鲎试剂溶媒能排除血液保养液对鲎试剂凝胶反应的干扰。结论: 鲎试剂溶媒改进后, 可以用细菌内毒素检查法代替血液保养液的热原检查。

关键词 鲎试剂; Tris-HCl 缓冲液; 血液保养液; 细菌内毒素

Improved solvent of limulus amoebocyte lysate as inspecting the endotoxin in compound sodium citrate

Zhang Tian Dong, Yu Zhi Ying, Xiao Jian¹ (Centre hospital of Xinxiang Henan 453000; ¹Xinxiang institute for drug control 453000)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the inspection method of endotoxin in compound sodium citrate injection. **METHODS:** The buffer solution of Tris-HCl was adopted to dissolve limulus amoebocyte lysate, which was instead of the water for the inspection endotoxin, the experiment is implemented according to the request of endotoxin inspection method collected in the 2nd book, China pharmacopoeia. 2000. **RESULT:** The experiment showed that the interference elements could be excluded by altering solvent of limulus amoebocyte lysate. **CONCLUSION:** For daily pyrogen test of compound sodium citrate injection, endotoxin inspection method can be used instead of domestic rabbit method by altering solvent of limulus amoebocyte lysate.

KEY WORDS Compound sodium citrate injection, Limulus amoebocyte lysate, Endotoxin, Buffer solutions of Tris-HCl

细菌内毒素检查法是一种快速、灵敏的检查内毒素的方法, 由于血液保养液中的枸橼酸根离子对鲎试剂的凝胶反应有抑制作用, 因此, 不能用常规的操作方法直接检查其中的热原。文献报道, 通过调整血液保养液的 pH 值及适当稀释并加一定浓度的钙离子, 可以排除枸橼酸根离子的干扰, 但操作

繁琐。在实验基础上, 我们将鲎试剂溶媒由细菌内毒素检查用水改为 Tris-HCl 缓冲液, 现总结如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器 pH S-25 型酸度计, 上海雷磁仪器厂; 超净工作台, 北京半导体设备厂; 电热恒温水箱, 江苏红旗医疗器械厂。

1.2 试剂 鲎试剂,湛江海洋生物制品厂,批号 990816,灵敏度 0.5Eu/ml (灵敏度复核试验符合要求);细菌内毒素工作标准品,湛江海洋生物制品厂,批号 991206,规格 5Eu/ml; T ris-H cl 缓冲液:称取 T ris(三羟甲基氨基甲烷 C₄H₁₁NO₃)(heideberg, new york)6.5g, MgCl₂• 6H₂O(北京红星化工厂)2g,用适量注射用水溶解,浓盐酸调 pH 至 8.0,加注射用水至 100ml,搅匀封装于 2ml 安瓶,115℃ 30min 热压灭菌三次,用细菌内毒素检查法确证内毒素含量小于 0.03Eu/ml,备用;血液保养液,本院自制(按中国医院制剂规范西药制剂第二版规定方法配制),家兔法检查合格。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂更换溶媒前后缓冲能力的测试 用细菌内毒素检查用水和 T ris-H cl 缓冲液,按细菌内毒素检查法分别溶解鲎试剂,测定其与等体积血液保养液混合后 pH 值变化。

表 1 不同溶媒的鲎试液与等体积血液保养液混后 pH 值

溶 媒	鲎试液	血液保养液	混合后
细菌内毒素检查用水	7.02	5.02	4.50
T ris-H cl 缓冲液	8.00	5.02	7.80

结果表明, T ris-H cl 缓冲液能将血液保养液 pH 值稳定在鲎试剂凝胶反应的最佳范围内(6.5~ 8.0)。

2.2 T ris-H cl 缓冲液对鲎试剂凝胶反应的干扰试验 用细菌内毒素检查用水和 T ris-H cl 缓冲液,分别将同一细菌内毒素工作标准品稀释制成 1.0、0.5、0.25 和 0.125Eu/ml 四种浓度的细菌内毒素溶液。各取每一浓度样品 0.1ml 加入细菌内毒素检查用水溶解的鲎试剂 0.1ml,37℃ 恒温 60min,每一浓度平行做 4 支。另取细菌内毒素检查用水和 T ris-H cl 缓冲液,各做两支阴性对照。

表 2 T ris-H cl 缓冲液干扰试验结果

	内毒素浓度(Eu/ml)				阴性
	1.0	0.5	0.25	0.125	
细菌内毒素检查用水	++++	++++	----	----	--
T ris-H cl 缓冲液	++++	++++	----	----	--

结果表明, T ris-H cl 缓冲液对鲎试剂凝胶反应无干扰。

2.3 血液保养液对鲎试剂凝胶反应的干扰试验(鲎试剂用 T ris-H cl 缓冲液溶解) 用 T ris-H cl 缓冲液和血液保养液,分别将同一细菌内毒素工作标准品稀释制成 1.0、0.5、0.25

和 0.125Eu/ml 四种浓度的细菌内毒素溶液。各取每一浓度样品 0.1ml 加入 T ris-H cl 缓冲液溶解的鲎试剂 0.1ml,37℃ 恒温 60min,每一浓度平行做 4 支。另取 T ris-H cl 缓冲液和血液保养液,各做两支阴性对照。

表 3 血液保养液干扰试验结果

	内毒素浓度(Eu/ml)				阴性
	1.0	0.5	0.25	0.125	
T ris-H cl 缓冲液	++++	++++	----	----	--
血液保养液	++++	++++	----	----	--

结果表明,血液保养液对更换溶媒后鲎试剂的凝胶反应无干扰。

2.4 血液保养液的细菌内毒素检查 用 T ris-H cl 缓冲液代替细菌内毒素检查用水,做鲎试剂溶媒,其它按 2000 版中国药典,附录,细菌内毒素检查法项下规定检查。同时,按热原检查法做家兔对照。

表 4 细菌内毒素检查法与家兔法检查结果比较

检品来源	批数	细菌内毒素检查法		家兔法	
		-	+	-	+
本院制剂	14	13	1	14	
其他医院	12	11	1	12	

结果表明,细菌内毒素检查法与家兔法检查结果基本一致(P> 0.05)。

3 讨 论

3.1 血液保养液对鲎试剂凝胶反应的影响,不仅因为枸橼酸根离子络合了鲎试剂凝胶反应的增敏剂钙、镁离子,而且由于血液保养液中枸橼酸和枸橼酸钠组成了有一定容量的缓冲体系。尽管鲎试剂中加有适量 T ris-H cl 缓冲成份,但浓度较小,不能将血液保养液 pH 值调至鲎试剂凝胶反应的最佳范围。 T ris-H cl 缓冲液不仅能将血液保养 pH 值稳定在鲎试剂凝胶反应的最佳范围,也补充了因枸橼酸根离子络合而损失的钙、镁离子。因此, T ris-H cl 缓冲液做鲎试剂溶媒能排除血液保养液对鲎试剂凝胶反应的抑制干扰。

3.2 血液保养液中细菌内毒素限值(L)的确定,根据公式 L = K/M,其中 K 为 5Eu/kg,血液保养液热原检查时的注射剂量(M)为 10ml/kg,故 L 为 0.5Eu/ml。