

动态浊度法定量检测脑组织注射液中细菌内毒素

宾漫容 马 丽 陈焕勇 李 虹 张我东(广州 510507 广州军区军事医学研究所)

摘要 目的: 通过试验以建立脑组织注射液中细菌内毒素定量分析方法。方法: 采用动态浊度法考察脑组织注射液对鲎试剂的干扰作用, 并与热原检查法进行对比试验分析。结果: 动态浊度法干扰试验结果表明, 脑组织注射液原液对鲎试验有干扰, 样品 1: 4 倍稀释后能有效消除干扰。结论: 可用动态浊度法对脑组织注射液中细菌内毒素进行定量检测。

关键词 脑组织注射液; 干扰试验; 动态浊度法; 细菌内毒素

Quantitative examination of bacterial endotoxins in the cerebroinjection by kinetic turbidimetric assay

Bin Manrong, Ma Li, Chen Huanyong, Li Hong, Zhang Wodong (Institute of Military Medicine, GuangZhou Command, PLA, GuangZhou 510507)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To develop a method for the examination of bacterial endotoxins in cerebroinjection. **METHOD:** Kinetic turbidimetric assay was used to evaluate the interference of cerebroinjection to TAL, and compared with pyrogen test. **RESULTS:** Kinetic turbidimetric assay has showed the interference of cerebroinjection to TAL, and the interference could be eliminated when cerebroinjection was four times diluted. **CONCLUSION:** Kinetic turbidimetric assay can be used in the examination of endotoxins in cerebroinjection.

KEY WORDS cerebroinjection, interference test, turbidimetric technique, bacterial endotoxins

脑组织注射液属于脑神经细胞功能障碍治疗剂, 临床主要用于多种疾病导致脑损伤而引起的运动障碍、智能障碍和语言障碍, 为广东省标准收载, 热原检查采用经典的家兔升温法。细菌内毒素检查法(BET)较家兔法检查热原更快速、灵敏、准确, 且重现性好, 更适用于该药品中间体及成品的大规模热原检查。本实验按中国药典 2000 年版二部^[1]检测细菌内毒素的动态浊度法, 对脑组织注射液进行干扰试验, 结果报道如下。

1 实验材料和用具

鲎试剂 TAL, 批号 000813, 标示灵敏度 $0.03 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$, 规格每支 0.5 m l , 湛江海洋生物制品厂; 批号 000205, 标示灵敏度 $0.06 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$, 规格每支 0.5 m l , 福州新北生化工业有限公司。细菌内毒素国家标准品, 批号 981, 每支 9000 EU, 中国药品生物制品检定所。细菌内毒素检查用水, 批号 000626, 规格每支 5 m l , 湛江海洋生物制品厂。脑组织注射液, 规格: $8 \text{ m g} / 4 \text{ m l}$, 批号 991104, 000501, 000503, 000504, 000807, 广东省药物研究所制药厂。BET-16 细菌内毒素测定仪, 天津大学无线电厂。所用试验用具均经 250°C 干烤 1h, 去除外源性内毒素。

2 实验方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素理论限值 L 计算^[2]

脑组织注射液热原检查家兔注射量(M)为 $1.5 \text{ m l} \cdot \text{kg}^{-1}$, 静脉注射用药的细菌内毒素阈值(K)为 $5.0 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1}$, 计算得本品细菌内毒素理论限值 $L = K \cdot M^{-1} = 3.3 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$ 。

2.2 标准曲线的可靠性

取细菌内毒素国家标准品 981 一支, 加 BET 水 1.0 m l , 于旋涡混合器上混合 15 min , 再用 BET 水进行 10 倍和 2 倍稀释, 使成 $1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$ 的内毒素对照品溶液稀释系列, 各取 0.1 m l 分别加到预先加有 0.1 m l TAL 反应管中, 其中每个浓度平行 3 管, 轻轻混匀, 插入细菌内毒素测定仪内, 由计算机控制反应, 自动采集数据并作处理数据, 以内毒素对数浓度 $\lg C$ 与对数反应时间 $\lg T$ 进行直线回归, 得回归方程为: $\lg T = 3.13619 + (-0.33933 \lg C)$, 标准曲线相关系数: $r = -0.9994$, 线性范围: $0.06 \sim 1.0 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$, 鲎试剂灵敏度: $0.03 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$ (批号 000813) 阴性对照管在检测时间外, 故标准曲线建立。

2.3 干扰试验

2.3.1 样品稀释倍数 MVD 计算

按公式 $MVD = L \cdot \lambda_1^{-1}$, 其中 λ_1 为标准曲线的最低浓度 $0.0625 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$, 计算得样品试验时最大有效稀释倍数为 50 倍。

2.3.2 样品预干扰试验

将脑组织注射液用内毒素检查水依次稀释为 2, 4, 8, 16 倍溶液, 作为供试品管; 同时另取 4 管, 进行同样倍数稀释, 并在稀释液中添加内毒素浓度, 制成含细菌内毒素国家标准品的浓度 λ_m 为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{m l}^{-1}$ ($4\lambda_1$) 的内毒素溶液, 作为样品阳性对照管(PPC), 分别取上述各液 0.1 m l 加入预先加有 0.1 m l TAL 的反应管内, 混匀插入细菌内毒素测定仪内进行检测, 其中每一浓度重复 3 管, 同时进行标准曲线制备, 分别得实测内毒素 E_t 和 E_s , 计算平均回收率, 回收率(%) = $(E_s - E_t) / \lambda_m \times 100\%$ (此处须按稀释倍数换算), 我们采用 2 个不

同厂家鲎试剂进行干扰试验,结果见表1。

表 1 脑组织注射液动态浊度法干扰试验结果

鲎试剂批号	样品批号	稀释倍数	E_t	E_s	回收率
000813($\lambda=0.03$) $\lg T=3.07048-$ $0.30317\lg C$ $r=-0.9981$	991104	2	<0.06	0.2060	41%
		4	<0.06	0.5748	57%
		8	<0.06	1.2265	61%
		16	<0.06	2.6745	67%
000205($\lambda=0.06$) $\lg T=2.93907-$ $0.31902\lg C$ $r=-0.9914$	000503	2	0.2867	0.5270	48%
		4	0.2444	1.4742	123%
		8	0.4678	2.6258	108%
		16	0.3310	3.9313	90%

根据中国药典 2000 年版规定,供试品干扰试验平均回收率在 50% ~ 200% 范围内,表明样品溶液对鲎试剂反应无干扰影响,表 1 结果可以看出,2 倍稀释以下供试品对细菌内毒素检查法存在抑制作用,4 倍稀释时已无干扰,脑组织注射液的最小无干扰稀释倍数为 4 倍,为了得到更好的回收率,正式干扰试验选择 8 倍稀释。

2.4 供试品 1: 8 稀释液的干扰试验与热原检查

取 3 批热原检查合格品分别用细菌内毒素检查用水稀释 8 倍,同时制备供试品阳性对照和标准曲线,用细菌内毒素测定仪进行检测,每个浓度重复 2 管,并设空白对照,结果见表 2。

表 2 脑组织注射液(1: 8 稀释液)动态浊度法干扰试验结果

样品批号	稀释倍数	样品管 (EU/ml)	PPC 管 (EU/ml)	内毒素实加 值(EU/ml)	回收率 (%)
000807	8	0.5785	0.7575	0.179	100
000504	8	<0.06	0.1802	0.179	101
000501	8	<0.06	0.1649	0.179	92

标准曲线: $\lg T=3.07287-0.34058\lg C$ $r=-0.9994$

实验表明: 3 批样品的回收率均在 50% ~ 200% 范围内,无干扰影响,日常检查时可取 8 倍稀释液进行。我们对 23 批样品,用细菌内毒素检查用水 8 倍稀释后,用细菌内毒素测定仪定量检测,根据标准曲线得实测内毒素浓度,与凝胶法和热原法比较,23 批样品中有 17 批细菌内毒素含量 <0.1 EU·m⁻¹,凝胶法结果均为阴性,热原法检查均合格;2 批内毒素含量在 0.5~0.7 EU·m⁻¹之间,凝胶法结果为阳性,热原法检查合格;4 批内毒素含量超过理论限值 3.3 EU·m⁻¹,凝胶法结果为阳性,热原法检查不合格。

3 讨论

3.1 脑组织注射液的干扰试验结果表明: 样品溶液在 4 倍稀释以下存在抑制作用,4 倍稀释后能有效排除干扰,得到规定的回收率(50% ~ 200%),因此日常检查时取 8 倍稀释液进行即可。

3.2 由表 2 结果发现: 3 批脑组织注射液的 8 倍稀释液进行干扰定量检测,结果样品的内毒素含量均小于 3.3 EU·m⁻¹,且均得到很好的回收率。

3.3 在生化制剂质量控制中,采用经典的家兔法检测污染内毒素,由于操作复杂,影响因素多,对试验结果影响很大。动态浊度法定量检测细菌内毒素,干扰因素小,便于观察样品反应过程的变化,而且结果准确,比凝胶法可以检测到更低的检测下限,尤其适于产品中间体及成品大规模热原检查。

参考文献

1 中国药典 2000 年版. 二部. 附录: 86-87. 204.
2 黄清泉, 夏振民. 药品细菌内毒素检查法的实验设计. 中国药学杂志, 1997, 32(2): 72.

收稿日期: 2001-09-10