

# 动态比浊法定量检测硝酸异山梨酯注射液中的细菌内毒素

郭桂峰,周荣丽,杨东,尹向明,于兴会(胜利油田中心医院,山东 东营 257034)

**摘要:**目的 建立硝酸异山梨酯注射液细菌内毒素定量分析方法。方法 采用动态比浊法,对硝酸异山梨酯注射液稀释液进行定量检测。结果 硝酸异山梨酯注射液无干扰作用。结论 可以进行定量检测。

**关键词** 硝酸异山梨酯注射液;动态比浊法;细菌内毒素;干扰试验;鲎试剂

中图分类号:R927.12 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)04-0323-03

## Determination of bacterial endotoxin in isosorbide dinitrate injection by kinetic turbidimetric assay

GUO Gui-feng, ZHOU Rong-li, YANG Dong, YIN Xiang-ming, YU Xing-hui( Central Hospital of Shengli Oil, Dongying 257034, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the method for the test of bacterial endotoxin in isosorbide dinitrate injection. **METHODS**

The kinetic turbidimetric assay was used. **RESULTS** This test showed that tachypleus amebocyte lysate was not disturbed by

isosorbide dinitrate injection. **CONCLUSION** The kinetic turbidimetric method can be used for determination of bacterial endotoxin in isosorbide dinitrate injection.

**KEY WORDS:** isosorbide dinitrate injection; turbidimetric technique; bacterial endotoxin; interference test; tachypleus amebocyte lysate

## 1 材料与仪器

细菌内毒素检查用水 (BET水,批号 020510,规格 10mL/支,厦门鲎试剂厂);鲎试剂 (动态浊度法鲎试剂专用,批号 020725,规格 0.15mL/支,厦门鲎试剂厂);细菌内毒素工作品 (批号 030610,规格 10EU/支,厦门鲎试剂厂);硝酸异山梨酯注射液 (批号 C0210263, C0211221, C0212092, C0112201, C0206113,规格 200mL瓶,广西浦北制药厂);BET-32型细菌内毒素测定仪 (天津大学无线电厂);ZH-2自动漩涡混合器 (天津药典标准仪器厂);实验所用玻璃器皿经铬酸洗液处理后,再经 250℃干烤 1h以上,除去外源性内毒素。

## 2 方法与结果

### 2.1 实验条件

检测温度: 37℃;检测波长: 660nm;最长检测时间: 8400s。

### 2.2 细菌内毒素限值 (L)的确定<sup>[1]</sup>

按公式  $L = K/M$ , K为静脉注射给药的细菌内毒素阈剂量 =  $5.0EU \cdot mL^{-1}$ , M为临床人用每千克体重每小时最大给药剂量。本实验采用家兔热原剂量  $M = 10mL \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ , 硝酸异山梨酯注射液细菌内毒素限值 (L)为  $0.5EU \cdot mL^{-1}$ 。

### 2.3 标准曲线制备及可靠性

取细菌内毒素工作品 1支加 BET水 1.0mL,用封口膜封口,置漩涡混合器上混合 15min,进行 10倍稀释,然后 2倍稀释,且各步置漩涡混合器上混合 30s,使其最终内毒素浓度为 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156EU·mL<sup>-1</sup>稀释系列。各取 0.15mL分别加到预先加有 0.15mL鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入浊度仪进行检测,每一浓度平行 3管,同时用 BET水做 2管阴性对照 (NC),结果见表 1。

表 1 标准曲线的可靠性

Tab 1 The reliability of standard curve

内毒素浓度 EU/mL	平均反应时间 (s)	RSD%
1.0	1010	3.22
0.5	1250	2.10
0.25	1520	1.61
0.125	1900	0.59
0.0625	2450	0.00
0.0312	2990	3.73
0.0156	3580	0.00
NC	>3600	0.00

将全部数据进行线性回归分析,回归方程:  $\lg T = 3.02721 - 0.29802 \lg C$ ,  $r = 0.9941$ ,最低浓度 =  $0.0156EU \cdot mL^{-1}$ ,且阴性对照管在检测时间外,故标准曲线成立。

### 2.4 供试品溶液配制及干扰试验

#### 2.4.1 供试品最大有效稀释倍数 (MVD)计算

按公式

$MVD = L \times C / \lambda$ , L为硝酸异山梨酯注射液的内毒素限值  $0.5EU \cdot mL^{-1}$ ,  $\lambda$ 为标准曲线最低浓度  $0.0156EU \cdot mL^{-1}$ , C为供试液浓度,当 L以  $EU \cdot mL^{-1}$ 表示时, C为  $1.0mL \cdot mL^{-1}$ 得样品试验时最大有效稀释倍数 (MVD)为 32倍。

2.4.2 干扰预试验 将 3批硝酸异山梨酯注射液用 BET水稀释为 2, 4, 6, 8, 10倍溶液,每个浓度分别取 0.15mL加 0.15mL鲎试剂作为样品检查 (Et);同时另取 5管,进行同样倍数稀释,并在各浓度溶液中强化  $0.125EU \cdot mL^{-1}$ 的内毒素作为样品阳性对照液 (Es)。分别取上述各液  $0.15mL^{-1}$ 加入预先加有 0.15mL鲎试剂的反应管内进行检测,每个浓度重复 3管,并设阴性对照,分别测定各浓度样品液及阳性样品的内毒素含量 Et和 Es,按下式计算回收率 (R)。  $R = (Es - Et) / 0.125 \times 100\%$ ,结果见表 2。

表 2 供试品干扰预实验

Tab 2 The results of preliminary inhibition and enhancement test

样品批号	稀释倍数	Et (EU/mL)	Es (EU/mL)
C0210263	2	<检测限 0.120	96.0
	4	<检测限 0.126	100.8
	6	<检测限 0.127	101.6
	8	<检测限 0.123	98.4
	10	<检测限 0.132	105.6
C0211221	2	<检测限 0.117	93.6
	4	<检测限 0.128	102.4
	6	<检测限 0.130	104.0
	8	<检测限 0.122	97.6
	10	<检测限 0.137	109.6
C0212092	2	<检测限 0.121	96.8
	4	<检测限 0.125	100.0
	6	<检测限 0.127	101.6
	8	<检测限 0.124	99.2
	10	<检测限 0.144	115.2

其中批号 C0210263 的回归方程为  $\lg T = 3.06649 - 0.3606 \lg C$ ,  $r = 0.9945$

批号 C0211221 的回归方程为  $\lg T = 3.06675 - 0.3591 \lg C$ ,  $r = -0.9937$

批号 C0212092 的回归方程为  $\lg T = 3.06624 - 0.3612 \lg C$ ,  $r = -0.9896$

根据中国药典 2000年版规定,如果内毒素的回收率在 50% ~ 200%之间时,则供试品在该试验条件下不存在干扰因素。表 2结果表明,3批供试品在各倍稀释时均无干扰作用,4倍时回收率更好,可作为定量检测的浓度。

#### 2.4.3 供试品干扰试验与家兔法检查

取 5批硝酸异山梨酯注射液用 BET水稀释 4倍,并制备样品阳性对照,每个浓

度重复 3 管, 并做阴性对照, 放入检测仪检测, 同时进行家兔法检查, 结果见表 3。

表 3 干扰试验

Tab 3 The results of inhibition and enhancement test

样品批号	稀释倍数	Et( EU/mL)	Es( EU/mL)	R%	家兔法检查
C0112201	4	<检测限	0.128	102.4	合格
C0206113	4	<检测限	0.126	100.8	合格
C0210263	4	<检测限	0.125	100.0	合格
C0211221	4	<检测限	0.123	98.4	合格
C0212092	4	<检测限	0.130	104.0	合格

标准曲线为:  $\lg T = 3.02721 - 0.29802 \lg C$ ,  $r = 0.9941$

### 3 讨论

实验结果表明: 硝酸异山梨酯注射液稀释液对鲎试剂不

存在干扰作用, 可以得到很好的回收率, 且动态浊度法进行细菌内毒素定量检测, 使用计算机全过程监控, 样品反映情况能在显示屏上直观地反映出来, 与传统的家兔法相比, 避免了动物个体差异及人为判断误差所造成的假阳性或假阴性结果, 具有灵敏、简便、结果准确等优点, 其检测结果与家兔热原检查结果一致。因此, 用动态浊度法检测硝酸异山梨酯注射液中细菌内毒素含量是可行的。

### 参考文献

- [1] 夏振民. 药品细菌内毒素检查的限值 [J]. 药物分析杂志, 1995, 15(3): 54.
- [2] 中国药典. 二部 [S]. 2000附录 204.

收稿日期: 2003-11-10