经验交流

文章编号:1000-5404(2005)13-1418-02

抗休克血管活性药注射液中细菌内毒素的定量测定

Kinetic turbidimetric limulus test for quantitation of bacterial endotoxin in antishock vasoative injections

林秋晓,劳海燕 (广东省人民医院药学部,广州 510080)

休克是以微循环血流障碍为特征的急性循环不全的综合病征。应用血管活性药物以改变血管机能和改善微循环是治疗休克的一项重要措施。盐酸多巴胺和盐酸多巴酚丁胺是这类药物的代表药。本研究拟采用鲎试验定量法(动态比浊法)来测定抗休克血管活性药代表药注射液中的细菌内毒素含量。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

细菌内毒素检查用水(Lot.No.0012270, 50 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司);动态比浊法鲎试验(Lot.No.000131L,λ=0.015EU/ml,1.2 ml/Amp 湛江安度斯生物有限公司);细菌内毒素国家参考标准品(Lot.No.981,9000 EU/Amp 中国药品生物制品检定所);盐酸多巴胺注射液(Lot.No.0101013, 0107172, 0108032, 20 mg/2 ml 江苏林海药业有限公司制造分公司);盐酸多巴酚丁胺注射液(Lot.No.990801、000502、001101, 20 mg/ml)。EDS~99 细菌内毒素检测仪(北京金山川科技发展有限公司)。以及使用前按细菌内毒素检查法规定,置烘箱中用 250 ℃干烤至少 1 h 除去热原的细菌内毒素检查玻璃器皿、恒温水浴箱、超净工作台、漩涡混合器。

1.2 鲎试剂灵敏度复核试验

根据本实验鲎试剂灵敏度的标示值(λ=0.015 EU/ml),将细菌内毒素国家标准品(Lot.No.981 9000 EU/Amp)用细菌内毒素检查用水溶解,在旋涡混合器上混匀 15 min,然后制成 2.0、1.0、0.5 和 0.25 λ 4 个浓度的内毒素标准溶液,取装有 0.1 ml 鲎试剂溶液的试管,等体积加入内毒素标准溶液,每一浓度平行做 4 支,同时在 2 管中加入细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照管。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入(37±1)℃适宜恒温水浴箱中,保温(60±2) min。

基金项目:广东省重点科技攻关项目(2KM054063)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Guangdong Province (2KM054063)

作者简介:林秋晓(1974-),女,广州市人,主管药师,主要从事药物检验方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(020)83827812-42517

收稿日期:2004-01-09;修回日期:2004-05-02

1.3 数据处理

最大浓度 2.0 λ 管均为阳性,最低浓度 0.25 λ 管均为阴性,阴性对照管均为阴性。按 λc = lg-1(∑X/4)计算出反应终点浓度[反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度。式中 X 为反映终点浓度的对数(lg)值]的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度的测定值(λc)。λc 在 0.5 λ~2.0 λ,可用于细菌内毒素检查,并以 λ=0.015 EU/ml 为该批鲎试剂的灵敏度。

2 结果

2.1 细菌内毒素限值的确立

查《美国药典》23 版,盐酸多巴胺和盐酸多巴酚丁胺注射液内毒素限值分别为 L=16.67 EU/mg[1] 和 L=2.08 EU/mg[1]

2.2 标准曲线制作及可靠性[2]

用细菌内毒素检查用水对细菌内毒素国家参考标准品 981 进行稀释,使其细菌内毒素最终浓度分别为 5、0.5、0.05 EU/ml,各取 0.1 ml 分别加到预先加有 0.100 ml 鲎试剂反应管内,混合均匀,插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测,其中每一浓度重复 3 管,并同时作阴性对照 3 管。实验数据按最小二乘法进行统计分析,得出其相关标准曲线,其相关系数>0.980,阴性对照管反应时间>3 600 s,判断其标准曲线成立。

2.3 干扰试验

2.3.1 样品稀释倍数 最大的有效稀释倍数 MVD = LC/λ(动态比浊法鲎试验:λ 为标准曲线最低点,本试验中 λ=0.05 EU/ml),分别计算出其稀释倍数[2],见表 1。

表 1 样品稀释倍数

药名	内毒素限值(L)	MVD	采用稀释倍数
盐酸多巴胺	16.67 EU/mg	3 334	20
盐酸多巴酚丁	2.08 EU/mg	416	20

2.3.2 样品溶液的配制及干扰试验 干扰试验:根据稀释倍数将它们稀释为表 2 的浓度,每个浓度下分别取 0.1 ml 样品加 0.1 ml 鲎试剂作为样品检查(S 或 NPC);取 0.1 ml 样品加 0.1 ml 鲎试剂再加入 5 EU/ml 的内毒素溶液 10 μl 作为样品阳性对

照(PPC)，PPC 中强化的内毒素浓度为 0.5 EU/ml，处在标准曲线的中点浓度。将溶液分别平行 2 组，插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测，另外还按标准曲线制作方法制备标准曲线及阴性对照(NC)，并得出不同稀释浓度下的内毒素回收率，见表 2。

表 2　干扰预试验［mg/ml，(%)］

药名	批号	不同稀释浓度下的内毒素回收率				验证浓度
盐酸多巴胺	0108032	2	0.5	0.2	0.1	0.5
		(68.89)	(119.6)	(101.9)	(113.5)	
多巴酚丁胺	001101	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.5
		(108.0)	(108.6)	(84.74)	(99.45)	

结果可见所选取的浓度其干扰试验添加内毒素的回收率均在有效范围 50% ~ 200%，表明均无干扰，在日常检查中两者均选用 0.5 mg/ml 的浓度。

干扰试验的验证：为确定多巴胺、多巴酚丁胺在 0.5 mg/ml 的有效性，分别进行 3 个批号的干扰试验验证，其他具体操作参照预干扰试验。将溶液分别平行 3 组，插入 EDS-99 细菌内毒素检测仪内进行检测，结果见表 3。

表 3　干扰试验

药名	批号	回收率(%)
盐酸多巴胺	Lot.No.0101013	147.1
	Lot.No.0107172	149.0
	Lot.No.0108032	140.9
盐酸多巴酚丁胺	Lot.No.990801	122.8
	Lot.No.000502	97.68
	Lot.No.001101	87.22

2.4　定量检查

根据以上干扰试验结果对 3 个批号盐酸多巴胺、盐酸多巴酚丁胺在 0.5 mg/ml 浓度进行定量检查，结果见表 4。

表 4　定量检查(Eu/mg)

药名	批号	内毒素限值	内毒素实际值
盐酸多巴胺	Lot.No0101013		<0.019 2
	Lot.No0107172	16.67	<0.026 8
	Lot.No0108032		<0.019 2
盐酸多酚丁胺	Lot.No990801		<0.004 8
<0.004 8	Lot.No000502	2.08	
	Lot.No001101		<0.004 8

3　讨论

回收率% = (PPC 实测值-NPC 实测值)/强化内毒素浓度 × 100%动态比浊法干扰试验，是以样品的添加内毒素平均回收率来判断，若回收率在 50% ~ 200%，表明样品溶液对鲎试剂反应无干扰影响[3]。

多巴酚丁胺和多巴胺均是盐酸盐注射液，其原液的 pH 值均在 5 左右。对其内毒素的测定有较大的干扰。但在稀释后，由于鲎试剂本身具备一定的缓冲能力，故在本试验中，pH 值不是干扰的主要因素。

用定量法(动态比浊法)进行盐酸多巴酚丁胺和盐酸多巴胺注射液细菌内毒素检查是可行的。它们在性状、规格、药理及应用、用法等方面有一定的共性，均可把它们稀释成 0.5 mg/ml 的浓度进行细菌内毒素含量的测定。所以把这两种注射液归纳在一起比较、讨论其内毒素的测定会具有一定的临床意义，从而推广到同类药品注射液细菌内毒素的含量测定。

目前国际临床测定注射液中细菌内毒素含量的方法主要有凝胶法、光电测定法(包括比色法和比浊法)、罗氏蛋白染色法、荧光偏振法、免疫火箭电脉法、ELISA 法、细胞因子测定法[1-4]。其中 ELISA 法、细胞因子测定法和鲎实验的比浊法、比色法是在药品检验领域比较成熟，并且是广泛使用的细菌内毒素定量法。定量法能准确地测量出样品的内毒素含量，其作为一种新技术载入药典，成为官方承认的一种法定的药检方法，反映了药典标准水平、药检技术水平的提高，标志着一个国家制药工业水平及药品质量的提高。随着历史的发展，必将有更多国家的药典收载细菌内毒素检查法。本试验采用动态比浊法，是比浊法的一种，它根据凝胶反应在到达预设的吸光度变化值(D)时所需的反应时间对数值(lgTg)与细菌内毒素浓度对数值(lgC)呈负相关，进行定量测定细菌内毒素的方法。它的特点是快速(一般小于 60 min)，可迅速得到结果；灵敏度高(可达 0.001 EU/ml)；抗干扰能力强；测定范围宽；重现性好；能标准化；而且"当细菌内毒素测定结果有争议时，除有专门说明外，以凝胶法结果为准"动态比浊法是测定凝胶形成过程中伴随的浊度变化，EDS-99 细菌内毒素检测仪 (北京金山川科技发展有限公司)可以同时进行凝胶法试验，作为动态比浊法试验结果的参考。但其缺点是需要精密的仪器和电脑；对试验材料和仪器等要求比较高；通常，受 pH 值、离子浓度以及某些干扰成分影响到检查结果的准确性，会得出所谓"假阴性""假阳性"的结果。

经过实验可知：我们医院现使用的盐酸多巴酚丁胺和盐酸多巴胺注射液的内毒素含量均在《美国药典》23 版规定的内毒素限量范围内。

关键词：动态比浊法鲎试验；细菌内毒素；干扰试验

中图法分类号：Q936　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 美国药典委员会. 美国药典[S]. 第 23 版. 1995. 1969.

[2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2000 年版. 北京：化学工业出版社，2002. 附录. 7 - 8.

[3] 劳海燕，罗宇芬，林秋晓. 注射用头孢呋辛中细菌内毒素动态比浊定量法的研究[J]. 中国抗生素杂志，2002，27(5)：283 - 286

[4] 罗宇芬，劳海燕，林秋晓. 动态比浊法鲎试验用于注射用 β-七叶皂苷钠细菌内毒素检测[J]. 中国医院药学杂志，2002，22(1)：7 - 8.

(编辑　刘洪娥)