

动态浊度法检测细菌内毒素方法的改进

陈晓佳 林金海 丁友玲

(福州新北生化工业有限公司 福州 350101)

摘要 目的:改进动态浊度法检测细菌内毒素的测定方法,实现鲎试剂减量使用。方法:依据《中华人民共和国药典》2020年版细菌内毒素检查法,对比分析不同反应体系的线性、范围及样品检测。结果:改进的检测方法(50:150 μL),线性可靠性、检测范围及样品检测结果与传统方法(100:100 μL)一致。结论:改进后的动态浊度法,检测结果稳定,易于操作,可减少鲎试剂使用,保护鲎资源。

关键词 细菌内毒素 鲎资源 动态浊度法

中图分类号: 文献标志码: 文章编号:

引用本文 陈晓佳,林金海,丁友玲.动态浊度法检测细菌内毒素方法的改进[J].上海医药,2023,44(21):

Improvement of kinetic turbidimetric method for the determination of bacterial endotoxin

CHEN Xiaojia, LIN Jinhai, DING Youling

(Fuzhou Xinbei Biochemical Industrial Co., Ltd., Fuzhou 350101, China)

ABSTRACT Objective: To improve the kinetic turbidimetric method for the determination of bacterial endotoxin and reduce the use of TAL reagent. **Methods:** According to the bacterial endotoxin testing method in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020), the linearity, range, and sample detection for different reaction systems were compared and analyzed. **Results:** The linear reliability, detection range, and sample detection results by the improved detection method (50:150 μL) were consistent with the traditional method (100:100 μL). **Conclusion:** The improved kinetic turbidimetric method can obtain stable determination results, simplify operation, reduced the use of TAL reagent, and protect the resource of horseshoe crab.

KEY WORDS bacterial endotoxin; horseshoe crab resource; kinetic turbidimetric method

细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁的主要成分之一,具有高致热性,会引起败血症、休克等疾病,是药品生产上必须严格控制的有害物质^[1-3]。鲎试剂是从鲎的血液中提取的冻干试剂,用于检测药品中细菌内毒素。光度测定法分浊度法和显色基质法,具有定量检测、简便、快捷、灵敏度高等优点^[4-6]。动态浊度法是通过仪器测定鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化,即检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度或透光率所需要的反应时间、制备标准曲线后检测样品中细菌内毒素的定量检测法。

2021年2月5日,国家林业和草原局、农业农村部颁布公告,将中国鲎及圆尾鲎列为国家二级保护野生动

物。为了保护鲎资源、节约鲎血细胞,在符合2020版《中华人民共和国药典》四部通则1143“细菌内毒素检查法”中“光度法”要求基础上,改进动态浊度法的测定方法,鲎试剂用量由原来100 μL /次(份)减少至50 μL ,比较分析样品用量分别为50、100、150 μL 时,哪一种比例的线性和检测范围能达到主试剂100 μL 样品量的水平。并通过实际样品检测验证改进后的测定方法。更好地保护鲎资源和保持细菌内毒素检测的可持续发展^[7-9]。

1 材料和方法

1.1 试剂

细菌动态浊度法鲎试剂(批号22101512,规格:0.5 mL/支,检测范围:10~0.01 EU/mL;批号22090312,规格:0.5 mL/支,检测范围:10~0.03 EU/mL;批号

通信作者:丁友玲,高级工程师。主要从事细菌内毒素检测等临床诊断试剂的研究

22022612, 规格: 0.5 mL/支, 检测范围: 10~0.005 EU/mL)、细菌内毒素检查用水(批号 21100105, 规格: 5 mL/支, 细菌内毒素含量 < 0.005 EU/mL), 均源自福州新北生化工业有限公司; 细菌内毒素国家标准品(批号 150800-201601, 效价: 9 000 EU/支, 中国食品药品检定研究院); 硫酸庆大霉素注射液(批号 200707, 规格: 2 mL : 8 万单位, 福建汇天生物药业有限公司); 0.9% 氯化钠注射液(批号 G20040704A, 四川科伦药业有限公司); 10% 葡萄糖注射液(批号 2012072724, 辰欣药业股份有限公司); 盐酸林可霉素注射液(批号 21110901, 规格: 2 mL : 0.6 g, 山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司)。

1.2 仪器设备

Multiskan FC 酶标仪(Thermo Fisher Scientific Inc.); ZH-2 混合器(天津药典标准仪器厂); 微量移液器(北京大龙兴创实验仪器有限公司); 96 孔板(美国康宁); 细菌内毒素检查器具(福州新北生化工业有限公司); 其他试验玻璃器具均经 250 °C 干热灭菌 0.5 h 以上除去热原。

1.3 方法

1.3.1 三批鲎试剂细菌内毒素动态浊度法标准曲线的可靠性试验

依照 2020 版《中华人民共和国药典》四部通则 1143 “细菌内毒素检查法”中“光度测定法中标准曲线的可靠性试验”^[10], 分析标准曲线的可靠性。试验根据所使用动态浊度法鲎试剂的检测范围, 分别选择 3 个连续的细菌内毒素标准浓度(3 个浓度点均在鲎试剂检测范围内, 同时包含最低检测限, 且相邻浓度点间的稀释倍数为 10), 用细菌内毒素标准品分别制成这 3 个浓度的稀释液, 每一浓度做 3 个平行孔, 同时做 2 个阴性对照。加样量按原来 100 μL/支主试剂+100 μL/支细菌内毒素溶液(或样品), 实验结果根据线性回归分析, 计算标准曲线的相关系数 r 值。

1.3.2 不同反应体系对动态浊度法鲎试剂的影响

1) 不同反应体系对标准曲线可靠性的影响 设置 3 组实验反应体系: 50+50、50+100、50+150 的反应液, 按文献^[10]分析 3 组实验反应体系标准曲线的可靠性。实验结果根据线性回归分析, 计算标准曲线的相关系数 r

值。

2) 不同浓度内毒素反应时间的比较 通过对比鲎试剂检测不同浓度内毒素时达到预设吸光度 0.02 的时间差异, 来分析 50+50、50+100、50+150 的反应液相比于对照(100+100 反应液)对鲎试剂检测灵敏性的显著性影响。

1.3.3 样品细菌内毒素检测比较

按文献^[7]对比 50+150、100+100 的反应液检测盐酸林可霉素、硫酸庆大霉素、葡萄糖、氯化钠注射液中的细菌内毒素含量。

2 结果

2.1 三批鲎试剂细菌内毒素动态浊度法标准曲线的可靠性试验

根据线性回归分析, 标准曲线的相关系数 r 的绝对值均 ≥ 0.980 。动态浊度法鲎试剂批号 22090312、22101512、22022612 标准曲线可靠性试验, 均符合中国药典规定(表 1)。

表 1 三批鲎试剂细菌内毒素动态浊度法标准曲线的可靠性试验结果^{a)}

鲎试剂批号	检测范围 / (EU·mL ⁻¹)	线性回归方程	r
22090312	10 ~ 0.03	$\lg T = -0.199 6 \lg C + 3.083 0$	-0.989 6
22101512	10 ~ 0.01	$\lg T = -0.232 5 \lg C + 2.967 9$	-0.999 0
22022612	10 ~ 0.005	$\lg T = -0.210 2 \lg C + 3.026 8$	-0.999 6

注: a) 表中“lgT”表示反应达到预设吸光度 0.02 的平均时间的对数, “lgC”表示对应的细菌内毒素溶液浓度的对数

2.2 不同反应体系对动态浊度法鲎试剂的影响

2.2.1 不同反应体系对标准曲线可靠性的影响

根据线性回归分析, 标准曲线的相关系数 r 的绝对值均 ≥ 0.980 。表明 3 组实验反应体系均不影响鲎试剂(22090312、22101512、22022612)标准曲线的可靠性(表 2)。

2.2.2 不同浓度内毒素反应时间的比较

对于不同浓度内毒素反应, 相对于对照(100+100 反

表2 不同反应体系对标准曲线可靠性的影响^{a)}

鲎试剂批号	检测范围 / (EU·mL ⁻¹)	反应液 / μL	线性回归方程	r
22090312	10 ~ 0.03	50+50	lgT= - 0.227 2lgC + 3.0934	- 0.998 5
		50+100	lgT= - 0.197 3lgC + 3.0962	- 0.991 8
		50+150	lgT= - 0.180 9lgC + 3.1156	- 0.983 9
22101512	10 ~ 0.01	50+50	lgT= - 0.243 4lgC + 3.0354	- 0.996 4
		50+100	lgT= - 0.237 0lgC + 2.9946	- 0.997 9
		50+150	lgT= - 0.224 0lgC + 2.9935	- 0.995 3
22022612	10 ~ 0.005	50+50	lgT= - 0.209 7lgC + 3.1255	- 0.994 7
		50+100	lgT= - 0.195 7lgC + 3.0818	- 0.998 7
		50+150	lgT= - 0.166 3lgC + 3.0722	- 0.995 5

注：a) 表中“lgT”表示反应达到预设吸光度 0.02 的平均时间的对数，“lgC”表示对应的细菌内毒素溶液浓度的对数

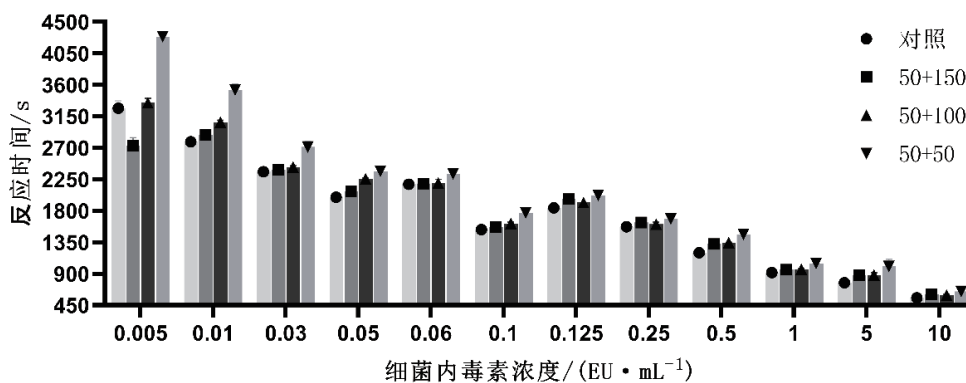


图1 不同反应液和不同细菌内毒素浓度对反应时间的影响

3 讨论

本研究将鲎试剂的减量用于动态浊度法方法改进，成倍减少鲎资源消耗。实验中发现，在预设吸光度值 (0.02) 下检测低内毒素含量时，该方法改进反应时间明显比文献方法短，而稍高内毒素含量其反应时间变化不明显。我们结合内毒素与鲎试剂进行的一系列酶反应过程分析，内毒素浓度高鲎试剂酶反应快、时间短，反之，反应慢、时间长。那么在鲎试剂半量情况下，要使反应终点达到固定吸光度的时间不出现延长，就需要相应增

加反应物的量 (50+150)。改进后的方法有利于反应物激活鲎试剂酶反应，显著提高低浓度内毒素测定的灵敏性。而在高浓度内毒素的反应中考虑到操作及设备误差、酶反应快、时间短，而使结果无明显差异，更稳定。表明改进的方法既可保持动态浊度法原有的优点，也可提高细菌内毒素测定的灵敏性。

2.3 样品细菌内毒素检测比较

实验结果显示，采用 50+150 的反应液检测盐酸林可霉素、硫酸庆大霉素、葡萄糖、氯化钠注射液中的细菌内毒素含量，回收率均符合中国药典规定 (50% ~ 200%)，细菌内毒素含量均符合中国药典规定 (表 3)。

表3 样品细菌内毒素检测比较

注射液	反应液 / μL	样品外加内毒素浓度 / (EU·mL ⁻¹)		回收率 / %
		0	0.1	
盐酸林可霉素	50+150	< 0.01	0.153 4	153.4
	对照	< 0.01	0.138 0	138.0
硫酸庆大霉素	50+150	< 0.01	0.106 5	106.5
	对照	< 0.01	0.116 4	116.4
葡萄糖	50+150	< 0.01	0.152 3	152.3
	对照	< 0.01	0.145 7	145.7
氯化钠	50+150	< 0.01	0.168 4	168.4
	对照	< 0.01	0.126 0	126.0

的研究及反应器具的改进等,以便在测定细菌内毒素的同时能更好地实现鲎资源的保护。

参考文献

- [1] 王娅宁,高龙.细菌内毒素检查法研究进展[J].现代盐化工,2019,46(5):59-60.
- [2] 张旭,郝欣岭,程晓岭.定量检测4种清热解毒类中药注射液中细菌内毒素的试验方法[J].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2020,20(44):105-106.
- [3] 季文君,方韵,戴国英,等.动态浊度法定量检测注射用氟氧头孢钠中细菌内毒素的含量[J].中国合理用药探索,2021,18(6):103-106.
- [4] 顾程宏,张炜杰,张兵,等.动态浊度法检测明胶中细菌内毒素的含量[J].明胶科学与技术,2021,41(4):184-189.
- [5] 刘骅,李刚,黄莉娟,等.动态浊度法定量检测磺达肝癸钠注射液细菌内毒素含量的研究[J].中国药品标准,2022,23(1):70-74.
- [6] 刘晋,王芳芳,冯宇,等.动态浊度法定量检测乳糖-水合物中细菌内毒素的含量[J].药物分析杂志,2020,40(5):884-888.
- [7] 朱俊华,吴宙,冯炳斌,等.全球中华鲎资源保护现状及对策建议[J].生物多样性,2020,28(5):621-629.
- [8] 黄文静,张敬,崔林青,等.海洋活化石——鲎的研究进展[J].生物资源,2022,44(4):344-354.
- [9] 颜晓勇,钟金香,关杰耀,等.基于鲎试剂需求的中国鲎资源保护的迫切性研究[J].中国渔业经济,2021,39(2):109-116.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2020年版四部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:178-181.

(收稿日期:2023-03-06)