

用的除蛋白方法如 Sevag 法、三氯乙酸法、酶法等并不能彻底去除蛋白质,只能部分除去游离的蛋白质,这些方法在不同程度上都会造成多糖-蛋白复合物的损失,还可能影响到多糖的得率或活性。本实验通过比较筛选出了女贞子多糖除蛋白的优选工艺为:以1倍量的10%三氯乙酸溶液除蛋白1次,静置2 h后离心。该方法是否影响到女贞子多糖的结构及活性,还有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 李 璘,丁安伟,孟 丽. 女贞子多糖的免疫调节作用研究[J]. 中药药理与临床,2001,17(2):11-12.
- [2] 张振明,蔡曦光,葛 斌,等. 女贞子多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国药师,2005,8(6):489-491.
- [3] 张振明,葛 斌,许爱霞. 女贞子多糖的抗衰老作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2006,20(2):108-111.
- [4] Wang Q J, Yu H, Zong J, et al. Determination of the composition of Chinese *Ligustrum lucidum* polysaccharide by capillary zone electrophoresis with amperometric detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31: 473-480.
- [5] 中国科学院上海药物所. 中草药有效成分的提取与分离[M]. 北京:化学工业出版社,1983.
- [6] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [7] 王文平,郭祀远,李 琳. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):115-117.

莲必治注射液中细菌内毒素检查法的研究

陈宜鸿,白 林

(解放军总医院医学保障部,北京 100853)

摘 要:目的 建立莲必治注射液细菌内毒素检查(BET)方法。方法 参照《中国药典》2005年版细菌内毒素检测方法及其指导原则中干扰试验的基本原理和检测方法。结果 莲必治注射液稀释25倍(2 mg/mL),采用灵敏度0.125 EU/mL的鲎试剂经干扰实验无增强、抑制作用。结论 实验具有准确性、可靠性,细菌内毒素检查法适用于检测莲必治注射液中的内毒素。

关键词:莲必治注射液;鲎试剂;细菌内毒素检查

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)03-0410-02

莲必治注射液具有清热解毒、抗菌消炎的功效,用于细菌性痢疾、肺炎、急性扁桃体炎等。细菌内毒素检测法,具有灵敏,快速,简便易行等诸多优点^[1,2],因此本实验探讨了采用细菌内毒素检查法检测莲必治注射液中细菌内毒素的可行性。

1 材料与仪器

细菌内毒素工作标准品(10 EU/支,厦门鲎试剂厂,批号050301);鲎试剂(灵敏度0.125 EU/mL,厦门市鲎试剂实验厂有限责任公司,批号051138;灵敏度0.125 EU/mL,湛江安度斯生物有限责任公司,批号0503070);细菌内毒素检查用水(BET水,2 mL/支,湛江博康海洋生物有限公司,内毒素<0.005 EU/mL,批号050804);莲必治注射液(2 mL 0.1 g,无锡山禾药业股份有限公司,批号050302、050517、050912)。

超净工作台(四达净化技术研究所);电热恒温水浴锅(上海沪南科学仪器联营厂);旋涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂(TAL)灵敏度(λ)复核试验:按《中国药典》2005年版附录细菌内毒素检查法复核试验用TAL的灵敏度,2批TAL灵敏度复核结果显示 λ 均在0.5 λ ~2.0 λ ,均符合《中国药典》规定,可用于细菌内毒素检查,并以其标示值为灵敏度^[1]。

2.2 供试品细菌内毒素限值(L)的确定

2.2.1 按人用最大剂量确定:《中国药典》2005年版规定注射剂的致热阈值(K)为5.0 EU/(kg·h),根据临床用法,人一次应用最大剂量(M)为600 mg/(60 kg·h),则其细菌内毒素理论限值(L)为: $L' = K/M = 5.0/(600 \times 60) = 0.5 \text{ EU/mg}$ 。

2.2.2 按静脉滴注用药细菌内毒素总限量确定:根据本品临床用法,成人一次500~600 mg,溶于250 mL 0.9%氯化钠注射液中,静脉滴注,按600 mg莲必治注射液与250 mL 0.9%氯化钠注射液(细菌内毒素限值 L_{NaCl} 为0.5 EU/mL)静脉滴注作为1 h的最大剂量计算,混合药液的细菌内毒素总限量应小于或等于《中国药典》规定的K值(5.0 EU/kg·h),即 $(600 \text{ mg} \times L + 250 \text{ mL} \times L_{\text{NaCl}})/(60 \text{ kg} \cdot \text{h}) \leq K$,计

算得供试品的细菌内毒素理论限值(L)为: $L \leq 0.292 \text{ EU/mg}$,小于人用最大剂量确定的细菌内毒素理论限值,考虑到除联合药液可能存在的细菌内毒素的累加因素外还存在环境等污染因素,故确定 0.290 EU/mg 为供试品细菌内毒素限值。

2.3 供试品最大有效稀释倍数(MVD)的确定:按公式 $MVD = CL/\lambda$ 确定 MVD。将供试品加入 $250 \text{ mL } 0.9\%$ 氯化钠注射液中,根据本品说明书,供试品的质量浓度为 $C = 0.1 \text{ g}/2 \text{ mL} = 50 \text{ mg/mL}$, $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$ 时, $MVD = 50 \times 0.290/0.125 = 116(\text{倍})$ 。

2.4 干扰初筛试验:按鲎试剂灵敏度复核试验,取原液适量,并用 BET 水分别将不同批号的莲必治注射液稀释成原液 5、10、20、25 倍稀释液,得质量浓度为 10、5、2.5、2 mg/mL 的样品系列溶液,用不同稀释倍数的供试液将细菌内毒素工作品制成 2λ 的内毒素溶液,并用标示灵敏度为 0.125 EU/mL 的不同厂家的鲎试剂与之反应,每一质量浓度做二管,同时做阳性(Pe)和阴性(Nc)对照液,结果见表 1。

表 2 莲必治注射液干扰试验结果

Table 2 Results of interference test for Lianbizhi Injection

批 号	质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细菌内毒素(批号 050301、0503070)浓度/ ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)				阴性对照 (NC)	E 值/ ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
		0.25	0.125	0.062 5	0.031 252		
050302	2.5	++++	++--	----	----	----	0.177Et
	2.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
	1.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
050517	2.5	++++	++++	----	----	----	0.125Et
	2.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
	1.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
050912	2.5	++++	++++	----	----	----	0.125Et
	2.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
	1.0	++++	++++	----	----	----	0.125Et
BET 水		++++	++++	----	----	----	0.125Et

2.6 供试品细菌内毒素检查:取 3 个批号的样品,分别用 BET 水稀释 25 倍,使用灵敏度 0.125 EU/mL 的鲎试剂按《中国药典》2005 年版细菌内毒素检查法检查,并做样品阳性对照,结果见表 3,均符合规定。

表 3 样品细菌内毒素检查结果

Table 3 Results of bacterial endotoxin test for Lianbizhi Injection

样品批号	样品	阳性对照	样品阳性对照	阴性对照
050302	--	++	++	--
050517	--	++	++	--
050912	--	++	++	--

表 1 干扰初筛试验结果

Table 1 Results of preliminary interference test

批 号	系列	样品溶液质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)				阴性对照 (NC)	阳性对照 (PC)
		10	5	2.5	2		
050302	NPC	--	--	--	--		
	NPC	--	--				
	NPC	--	--	--	--	--	++
	PPC	--	++	++	++		
	NPC	--	--	--	--		
	PPC	--	++	++	++		

2.5 干扰试验:由干扰初筛试验可知,样品溶液浓度较高时对鲎试剂有抑制作用,只有将样品稀释才可消除干扰,所以在干扰试验时用细菌内毒素检查用水将 3 个批号的莲必治注射液分别稀释成 1 20、1 25、1 50 系列质量浓度,将细菌内毒素工作品分别稀释成 2λ 、 1λ 、 0.5λ 、 0.25λ 系列质量浓度与鲎试剂进行干扰试验,结果见表 2。结果表明,其 E_s 在 $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$,其 E_t 在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$,对供试品进行 25 倍及以上稀释可消除干扰。

3 讨论

由干扰试验结果可知,样品经稀释 20 倍时对实验结果仍有干扰,所以本品须经 25 倍及以上稀释后,使用灵敏度为 0.125 EU/mL 的鲎试剂对细菌内毒素的检查无干扰,本实验采用了不同厂家的鲎试剂,对不同批号的样品进行干扰试验,均得到无干扰结果,据此建立的细菌内毒素检查法可行,且简洁、准确、快捷。临床上本品静脉滴注药液如有细菌内毒素污染,可以参考本方法进行检测。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 二部. 2005.
[2] 肖贵南,陆惠文,宜全. 天芎注射液干扰鲎试验检查的研究[J]. 中草药,2007,38(7):1023-1025.