

灯盏花素注射液中细菌内毒素动态比浊法测定的研究

劳海燕,林秋晓,刘秋琼*

(广东省人民医院 药学部,广东 广州 510080)

摘要:目的 应用动态比浊法鲎试验定量测定灯盏花素注射液中的细菌内毒素含量。方法 通过对样品中定量添加标准内毒素的干扰试验,检测其回收率应在 50%~200% 范围。结果 将样品进行 1/12 稀释可以有效地消除其对鲎试验的干扰。结论 动态比浊法鲎试验可以高效地测定样品中的细菌内毒素含量。

关键词: 动态比浊法鲎试验;灯盏花素注射液;细菌内毒素;干扰试验

中图分类号: R286.01 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0505-03

Study on bacterial endotoxin in BREVISCAPINI INJECTION* by kinetic turbidimetric limulus test

LAO Hai-yan, LIN Qiu-xiao, LIU Qiu-qiong

(Department of Pharmacy, Guangdong People's Hospital, Guangzhou Guangdong 510080, China)

Abstract Object To determine the bacterial endotoxin in BREVISCAPINI INJECTION (BI) by kinetic turbidimetric limulus test. **Methods** By spiking the amount of standard endotoxin into BI sample, the interference test was fulfilled to detect the recovery in the range of 50%~200%. **Results** A 12-fold dilution to BI sample is effective to eliminate the interference in limulus test. **Conclusion** The kinetic turbidimetric limulus test provides an efficient way to detect the bacterial endotoxin in BI sample.

Key words kinetic turbidimetric limulus test; BREVISCAPINI INJECTION (BI); bacterial endotoxin; interference test

* BREVISCAPINI INJECTION consists of breviscapine, used in the treatment of paralysis induced by cerebrovascular occlusion.

灯盏花素注射液为灯盏花素无菌水溶液,可改善脑血液循环,增加脑血流量,降低血管阻力和抗血小板凝聚,用于治疗闭塞性脑血管疾病所致的瘫痪及脑出血所致的后遗症。本实验采用动态比浊法鲎试验,建立灯盏花素注射液的细菌内毒素检查法。动态比浊法鲎试验是采用光电仪器检测鲎试验反应物 37℃ 保温时吸光度随时间的变化,预设吸光度,检测反应物到达预设吸光度的反应时间以定量测定细菌内毒素。对天然药物注射液用动态比浊法鲎试验进行细菌内毒素测定具有巨大的临床意义,可为临床安全用药提供技术支持。

1 材料及仪器

细菌内毒素检查用水(规格: 30 mL/Amp,湛江安度斯生物有限公司),动态比浊法鲎试剂(批号: 991230L, $\lambda = 0.015$ EU/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

(批号: 981,9000 EU/Amp,中国药品生物制品检定所),灯盏花素注射液(批号: 000510, 001007, 001012,规格: 5 mL/Amp,中美合资黑龙江迪龙制药有限公司); EDS-99细菌内毒素检测仪(北京金山科技发展有限公司),岛津 UV-2401型紫外分光光度计; ORION 420型 pH计(美国)。

2 方法与结果

2.1 试验参数: 本试验按“供试品干扰试验”方法进行^[1],各试验参数如下^[2]: M: 灯盏花素人用最大剂量 0.17 mL/kg·h, K: 热原反应阈值 5.0 EU/kg·h, L: 灯盏花素细菌内毒素限值 $L = K/M = 29$ EU/mL, MVD: 最大有效稀释倍数 $MVD = L/\lambda$ (动态比浊法鲎试验: λ 为标准曲线最低点浓度,本试验中 $\lambda = 0.05$ EU/mL, $MVD = 232$)

2.2 实验方法

2.2.1 标准曲线制作及可靠性^[1]: 用细菌内毒素检

* 收稿日期: 2001-10-08

基金项目: 广东省重点科技攻关项目(2KM054063)

作者简介: 劳海燕(1963-),女,海南琼海人,副主任药师,执业药师,1985年毕业于广东药学院,获理学学士学位,2001年至今攻读中山大学医学院药理学专业硕士学位,研究方向为细菌内毒素与输液热原反应,发表论文 10 余篇。

Tel: 020-83827812-2517 E-mail: laohyan@21cn.com.

查用水对细菌内毒素国家参考标准品(批号: 981)进行稀释,使其细菌内毒素终浓度分别为 5.00, 0.500, 0.050 0 EU /mL,各取 0.100 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,其标准曲线为:

$\text{Log } T = 2.73237 - 0.29036 \text{ Log } C, r = -0.99909, |r| = 0.99909 > 0.980$,反应时间在 339~ 1334 s,而阴性对照管反应时间 > 3600 s,故标准曲线成立。

2.2.2 干扰试验: 干扰预试验: 灯盏花素最大有效稀释倍数为 232,本试验中为获得较高的检查灵敏度和较快的反应时间,仅对其在较小的范围进行一系列稀释,以筛选到最好的检查浓度。将灯盏花素(批号: 000510)制备成原液,1/4, 1/8, 1/12, 1/16 5个浓度系列,每个浓度下分别取 0.100 mL样品加 0.100 mL鲎试剂作为样品检查(S或NPC);取 0.100 mL样品加 0.100 mL鲎试剂在加入 5.00 EU /mL内毒素溶液 10.0 μ L作为样品阳性对照(PPC),PPC中强化的内毒素浓度为 0.500 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),其标准曲线为: $\text{Log } T = 2.73237 - 0.29036 \text{ Log } C, r = 0.99909, |r| > 0.980$,内毒素浓度范围为 0.05~ 5.00 EU /mL,反应时间在 339~ 1334 s,而阴性对照管反应时间 > 3600 s,故标准曲线成立。结果见表 1

结果可见,灯盏花素原液对仪器检测光源有极强吸收而有干扰作用外,灯盏花素 3个浓度(1/8, 1/12, 1/16)其干扰试验添加内毒素的回收率均在有效范围 50% ~ 200% 之间,表明 1/8开始无干扰,在日常检查中选用 1/12倍稀释。灯盏花素 1/4回收率虽在有效范围,但其 PPC两管在反应结束前显橙色,意味着因检测光吸收而提前中断反应,干扰尚未完全消除。

干扰试验: 为确证 1/12稀释的有效性,进行 3个批号灯盏花素(批号: 00051, 0001007, 001012)正式干扰试验。以灯盏花素 1/12稀释为样品检查(S),其他具体操作参照预试验。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,其标准曲线为: $\text{Log } T = 2.7388 - 0.2652 \text{ Log } C, r = -0.9967, |r| > 0.980$,内毒素浓度范围为 0.05~ 5.00 EU /mL,反应时间在 364~ 1276 s,而阴性对照管反应时

间 > 3600 s,故标准曲线成立。结果见表 2

表 1 灯盏花素注射液(批号: 000510)干扰预试验

稀释倍数	检查项目	反应时间 (s)	内毒素浓度 (EU /mL)	回收率 (%)
原液	S			
原液	PPC	> 10	无效试管	
4	S	1018	0.1651	
4	PPC	803	0.8151	130.0
8	S	583	0.0195	
8	PPC	562	0.7201	140.1
12	S	1712	0.0049	
12	PPC	1678	0.5539	109.8
16	S	579	0.0020	
16	PPC	609	0.6760	134.8
		2526		
		2527		
		676		
		605		
		3448		
		3093		
		598		
		612		

注: 原液反应窗(S)完全无显示

表 2 灯盏花素注射液 1/12稀释干扰试验

批号	检查项目	反应时间 (s)	内毒素浓度 (EU /mL)	回收率 (%)
000510	S	1928	0.0087	
		1894		
		1961		
000510	PPC	547	0.8074	159.7
		580		
		580		
001007	S	1098	0.0452	
		1298		
		1340		
001007	PPC	598	0.6843	127.8
		607		
		612		
001012	S	1025	0.0489	
		1259		
		1375		
001012	PPC	583	0.7061	131.4
		631		
		589		

结果可见,3个批号灯盏花素在 1/12稀释下,其干扰试验添加内毒素回收率均在有效范围 50% ~ 200% 之间,对鲎试验没有干扰作用。

2.2.3 定量检查: 根据以上干扰试验结果对 3个批号灯盏花素注射液以 1/12稀释进行定量检查,其标准曲线为: $\text{Log } T = 2.73879 - 0.26518 \text{ Log } C, r = -0.99673, |r| > 0.980$,内毒素浓度范围为 0.05~ 5.00 EU /mL,反应时间在 364~ 1276 s,而阴性对照管反应时间 > 3600 s,故标准曲线成立。结果见表 3

表 3 灯盏花素注射液动态比浊法鲎试验定量测定结果

批号	稀释倍数	S平均值 (EU/mL)	PPC平均值 (EU/mL)	回收率 (%)	内毒素实际值 (EU/mL)
000510	12	0.008 7	0.807 4	159.7	0.104 4
001007	12	0.045 2	0.684 3	127.8	0.542 4
001012	12	0.048 9	0.706 1	137.4	0.586 8

2.2.4 消除干扰影响的试验:对检测光源 405 nm 的吸收作用以及不合适 pH 值是导致鲎实验抑制的重要因素,故进行以下 2 项试验。

对检测光源的吸收试验:以上干扰试验结果可见,灯盏花素原液对仪器检测光源有极强的吸收而有干扰作用,为了确证这个问题,将灯盏花素(批号 000510)原液(5 mg/mL)用细菌内毒素检查用水稀释成系列浓度 1.25(1/4 稀释),0.625(1/8 稀释),0.312 5(1/16 稀释),0.156 2(1/32 稀释),0.078 12 mg/mL(1/64 稀释),测定 405 nm 处吸光度(A),将数据进行最小二乘法回归,得直线方程: $C=0.241A+0.0361$, $r=0.97815$

pH 值试验:将原液,1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64 浓度系列测定其 pH 值,结果是 8.00,7.79,7.59,7.26,6.87,6.49,6.13

结果可见,405 nm 波长处吸光度值与样品浓度成良好线性关系,随着样品的稀释,吸光度值减少,干扰也减少直到消失。pH 值在 6~8 范围内,样品和鲎试剂在检测混合物 pH 值范围为 6.0~8.0^[3],故 pH 值不是鲎试验干扰因素

3 讨论

3.1 计算公式:回收率%=(PPC 实测值-NPC 实测值)强化内毒素浓度。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% 范围内,表明样品溶液对鲎试剂反应无干扰影响^[4]。

3.2 灯盏花素原液 NPC 两管插入反应试管后,反应窗无任何显示,说明原液对光吸收极强;PPC 两管反应时间分别为 10/10(s)、10/10(s);(符号“/”前数据是反应物到达预设吸光度的反应时间,符号“/”后数据是反应完成时间)由于灯盏花素原液对仪器检测光源 405 nm 波长有极强吸收而干扰了仪器正常的检测过程,加了强化内毒素的 PPC 管光吸收作用尤其显著,使反应曲线提前结束。反应窗上显示好像是被提前中断反应而出现橙色(比如反应中途拔出反应试管)样品 1/4 回收率在有效范围内,但其 PPC 两管反应时间分别是 600/1 200,580/980 s,即分别在 1 200,980 s 时提前中断反应而呈橙色,说明 1/4 尚未完全消除干扰。故灯盏花素原液对仪器检测光源吸收作用是灯盏花素注射液对动态比浊法鲎试验的主要干扰因素。

3.3 细菌内毒素与鲎试剂的反应是基于一系列丝氨酸蛋白酶的酶促放大作用产生的,其干扰因素包括:不合适的 pH 环境,对照内毒素聚集或吸附,不适宜的阳离子浓度,酶或蛋白质的修饰,非特异性的鲎试剂激活物,对仪器检测光源的吸收作用。大部分的干扰作用可通过适当的样品稀释将干扰消除,故稀释法是排除干扰的最基本方法。

3.4 灯盏花素注射液按 1/12 稀释用动态比浊法鲎试验进行细菌内毒素检查是可行的。对于这类天然药物注射液用动态比浊法鲎试验进行细菌内毒素检查比凝胶法具有更大的优越性。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].2000年版·二部.
- [2] 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):54-56.
- [3] 美国药典[S].23版.
- [4] EP Supplement[S].1999.

正交试验法优选胃安冲剂的制备工艺

刘芳¹,王小平²,向爱民¹,伍伟祯¹,王越^{2*}

(1.广东开平中医院,广东开平 529300 2.广东彼迪药业有限公司,广东开平 529300)

摘要:目的 优选胃安冲剂的制备工艺。方法 以厚朴酚、白术多糖、盐酸小檗碱为指标成分,采用正交试验法对胃安冲剂的制备工艺进行优选。结果 优化工艺为:厚朴、枳实采用水提醇沉(20倍量水,0.5 h,提取 3 次,95%乙

* 收稿日期:2001-08-14

基金项目:广东省中医药管理局 2000 年立项科研课题(100070)

作者简介:刘芳(1968-),女,湖南益阳人,副主任中药师,1990 年毕业于湖南中医学院中药系,1990~1995 年任职于广东彼迪药业有限公司,负责多项新产品的开发及检测,现为广东省中医药学会医院中药管理委员会委员,在各级药学专业杂志发表论文 10 余篇,研究方向为中药制剂与中药检验。