

细菌内毒素检查法影响因素分析

许光

(马鞍山市药品检验所 243011)

细菌内毒素检查法是利用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机制以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。《中国药典》2000年版收载了47种药品的细菌内毒素检查,此法已较广泛地应用于药品质量控制。笔者在实践中有针对性地收集、研究分析此法中的有关影响因素,现总结如下。

1 鲎试剂的影响

1.1 选购 必须购买具有卫生部批准文号的鲎试剂,一般购约半年用量为宜;内毒素检查用水最好使用同厂产品。

1.2 贮存 鲎试剂要在2~10℃低温、避光贮存,在规定的有效期内使用。

1.3 复核 鲎试剂购回后必须进行灵敏度复核,符合标示量的鲎试剂方可使用。同时还须注意经灵敏度复核试验均符合规定的同厂不同批次的鲎试剂检测同一供试品时,也会出现不同的检测结果^[1]。这表明鲎试剂灵敏度实测值与标示值不符。因此,应根据药典的规定,每批新的鲎试剂在用于实验前都要进行灵敏度复核,选择标示值与测定值相符的鲎试剂进行检测或以实测灵敏度为准,避免因鲎试剂本身造成的判断失误,产生假阴性或假阳性结果。鲎试剂的灵敏度应不超过0.5 EU·ml⁻¹。

2 实验器具的影响

试验所用器皿需要处理,除去可能存在的外源性内毒素,若处理不彻底,或器具有破损,这些外源性污染均可致结果出现假阳性。实验器具使用前须彻底清洗干净,在250℃干烤至少1h以上除热原,并使之自然冷却。

3 工作环境和实验操作的影响

为防止微生物的污染,实验宜在净化工作台内进行;操作人员在实验前应用消毒水清洗台面及双手,应小心打开安瓿,以防止玻璃屑落入瓶内,安瓿打开后立即使用,严格遵守操作规程。操作中每稀释一步均要换无热源的卡介苗注射器,吸取0.1ml要准确,针筒内不能有气泡,且针头等保持无菌操作,严防污染,避免假阳性出现。

4 有关振荡问题

内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解后应置旋涡混合器中振荡15min,使之在溶液中均匀分布,每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀旋30s。此法效价测定结果与国际参考标准内毒素基本一致,否则将影响阳性结果,误以为实验失败。

5 钙离子的影响

据报道,钙和四环素可使鲎变形细胞溶解物与细菌热原不发生反应^[2]。用不同浓度的葡萄糖酸钙注射液做试验,其浓度在0.5%时,不影响鲎试剂的测定,其结果见表1。

表1 不同浓度的葡萄糖酸钙注射液对鲎试剂的影响

品名	鲎试剂(ml)	检品用量(ml)	结果判定
1%葡萄糖酸钙	0.1	0.1 ml	-
	0.1	0.1(0.0001 UG·ml ⁻¹ 的内毒素)	±
0.5%葡萄糖酸钙	0.1	0.1 ml	-
	0.1	0.1(0.0001 UG·ml ⁻¹ 的内毒素)	+

+ 阳性; - 阴性; ± 假阴性

由表中可看出,高浓度的钙盐注射液影响鲎试剂的测定,使之出现假阴性,而低浓度的含钙制剂,并不影响鲎试剂的测定。钙离子对鲎试验的影响是双向的,低浓度时增敏,高浓度时抑制。

6 pH值的影响

《中国药典》2000年版对pH值未做具体规定,曾有报道认为,pH值过大过小影响鲎试剂灵敏度及内毒素活性,一般pH<3鲎试验灵敏度极差;pH在6~7、10~11范围内有极高的灵敏度^[3]。实际工作中,将调节过pH和未调节过pH的检品比较,结果发现两者差异无显著性,只是pH值在6.4~8.0,培育时间有显著缩短。

7 温度和培育时间的影响

鲎试剂与内毒素形成凝胶物的速率除与内毒素的含量有关外,还与培养时间的长短和温度的高低有关。鲎试验反应易受到室温和反应温度的影响,水浴温度控制在(37±1)℃,培养时间为(60±1)min。另外,当大量试管置入孵箱时,要考虑到室温与孵箱的温差,要考虑到检品是否真正受到37℃ 1h的孵化。若温度超过38℃可使凝胶反应被阻滞,45℃时溶解物即被破坏^[4];将鲎试验的培养温度提高至50、60℃,检出时间可缩短到3~15min^[5]。

8 影响凝胶的因素

鲎试剂与待检样品应充分混合,因为鲎试验反应是不可逆的,在孵育过程中和观察结果时,应轻拿轻放,绝对不能剧烈振荡,避免凝胶形成不良或遭受不可逆性破坏,而造成判断困难。

细菌内毒素检查法是一种限度试验,此法快速简便,灵敏度高,注意摸索实验过程中影响的检测因素,以提高检验结果的准确率。

参考文献

- 张立新 *et al.* 细菌内毒素检查法的应用体会. 全国医院药学会论文集,2000
- 国外医学参考资料. 药学分册,1977;4:245
- 李彦章 *et al.* pH对鲎试验检验内毒素的影响. 鲎与鲎试验法论文汇编,1983
- 国外医学参考资料, 药学分册,1976;6:352
- 张光杰 *et al.* 药学通报,1980;15(11):496