

动态浊度法测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素含量

盛凤仙, 王惠之, 张幼捷 (上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

摘要: [目的] 建立动态浊度法定量测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素含量的方法。 [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] 人凝血酶原复合物制品对鲎试验无干扰作用,动态浊度法定量检测结果与家兔实验结果基本一致。 [结论] 应用本方法定量测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素含量是可行的。

关键词: 人凝血酶原复合物; 细菌内毒素; 动态浊度法; 鲎试验

中图分类号: TQ 460.7+2 **文献标志码:** B

Kinetic turbidimetric limulus test for quantitative determination of bacterial endotoxin in human prothrombin complex SHENG Feng-xian, WANG Hui-zhi, ZHANG You-jie (Shanghai Xinxing Medicine Co. Ltd., Shanghai 200135, China)

Abstract: [Objective] To determine bacterial endotoxin quantitatively in human prothrombin complex by kinetic turbidimetric limulus test. [Methods] The validation was investigated, when the amount of endotoxin spiked in the sample were recovered within the range 50% - 200%. [Results] Human prothrombin complex did not interfere in limulus test. The result by kinetic turbidimetric limulus test was consistent with that of the rabbit pyrogen test. [Conclusion] The kinetic turbidimetric limulus test is suitable for quantitative determination of endotoxin in human prothrombin complex.

Key words: Human prothrombin complex; Bacterial endotoxin; Kinetic turbidimetric; Limulus test

人凝血酶原复合物临床上主要用于治疗先天性和获得性凝血因子 II、VII、IX、X 缺乏症^[1-2]。依据 2010 年版《中国药典》三部规定,人凝血酶原复合物制品中热原检查是采用家兔法,但此法操作繁琐,时间长且费用高,不适用于制品的生产过程控制和成品的大规模热原检测,故需建立一种快速测定的方法,用于人凝血酶原复合物生产过程中细菌内毒素含量的控制。笔者参阅了有关文献^[3-4],初步建立了动态浊度法定量测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素含量的方法。

1 材料与方法

1.1 样品和仪器

人凝血酶原复合物(批号为 20110610、20110711、20110712、20110713、20110714、20110815、20110816、20110919、Test1、Test2、Test3,规格为 300 IU/瓶);细菌内毒素检查用水(批号为 1010130,规格

为 5 mL/支,湛江安度斯生物有限公司);动态浊度法鲎试剂(批号为 1010142,规格为 1.25 mL/支, $\lambda = 0.03\text{EU/mL}$,湛江安度斯生物有限公司);细菌内毒素工作标准品(批号为 150601-201071,规格为 90 EU/支,中国药品生物制品检定所)。Bioprobe—2002 型细菌内毒素测定仪,XW-80A 型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌内毒素限值(L)的确定 采用公式为: $L = K/M$,式中 K 为规定的给药途径,人每千克质量每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K = 5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$;M 为每千克质量每小时的最高给药剂量为 $30\text{IU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。计算得样品的内毒素限值 L 为 $0.167\text{EU}/\text{IU}$ 。

1.2.2 标准曲线制备及可靠性试验 用细菌内毒素检查用水(BET)水 1 mL 溶解细菌内毒素工作标准品,置旋涡混合器上混合 15 min,然后逐级稀释(每步不超过 10 倍)至最终细菌内毒素浓度分别为 2.00、0.25、0.03125 EU/mL,3 个标准品溶液各取 0.10 mL,

作者简介:盛凤仙(1965—),女,执业药师,学士。

分别加到预先加有0.10 mL动态浊度法鲎试剂的试管内,混匀,立即插入Bioprobe—2002型细菌内毒素测定仪内,37℃1 h自动检测,每个浓度重复3管,并同时做阴性对照2管。

1.2.3 干扰实验

① 样品最大稀释倍数计算:公式为 $MVD = LC/\lambda_1$,式中 λ_1 为动态浊度法标准曲线中最低点细菌内毒素浓度0.03125 EU/mL;L为供试品的细菌内毒素限值0.167 EU/IU;C为10 IU/mL。计算得人凝血酶原复合物最大有效稀释倍数MVD为53倍。

② 样品溶液配制及干扰实验:取人凝血酶原复合物样品(批号为20110610,规格为300 IU/mL)用30 mL水复溶,然后用BET水稀释为5、10、20、40、50倍溶液,作为样品溶液,记为Ai液。同时进行同样倍数稀释,但在稀释液中添加浓度为0.25 EU/mL或0.50 EU/mL的细菌内毒素标准品,作为内毒素阳性对照管,记为Bi液。分别吸取上述各液0.10 mL,加入预先加有0.10 mL动态浊度法鲎试剂(TAL)的试管内混匀,立即插入Bioprobe—2002型细菌内毒素测定仪内自动检测,每个浓度重复3管,计算回收率。回收率(%) = (Bi液内毒素值 - Ai液内毒素值) / 添加内毒素浓度 $\lambda \times 100\%$ 。

1.2.4 样品溶液正式试验 分别取4批人凝血酶原复合物(批号为20110711、20110712、20110713、Test1,规格为300 IU/mL)用30 mL水复溶,然后用BET水制成50倍稀释液,记为Ai液。同时另取4管进行50倍稀释,并在稀释液中添加浓度为0.25 EU/mL的细菌内毒素标准溶液,记为Bi液。分别取上述各液0.10 mL,加入预先加有0.10 mL TAL的试管内混匀,立即插入Bioprobe—2002型细菌内毒素测定仪内自动检测,每个浓度重复3管,计算回收率。

1.2.5 样品的细菌内毒素定量检测 根据以上干扰试验结果,对6批样品(批号为20110714、20110815、20110816、20110919、Test2、Test3,规格为300 IU/瓶)以50倍稀释后进行定量检测,同时进行家兔法热原检测。

2 结果

2.1 标准曲线可靠性试验结果

回归方程: $\lg T_g = 2.9552 - 0.3349 \lg C$; 相关系数 $R = | -0.9971 | > 0.980$, 阴性对照管的反应时间大于标准内毒素最低点的反应时间,变异系数 $CV\% < 10\%$, 故标准曲线成立(表1)。

表1 标准曲线的可靠性试验结果(n=3)

内毒素浓度(EU/mL)	平均反应时间(s)	SD	CV(%)
阴性	>3600	0.00	0.00
0.03125	2969	97.03	3.27
0.25	1350	4.62	0.34
2.00	737	12.06	1.64

2.2 样品干扰试验结果

标准曲线: $\lg T = 2.9876 - 0.3338 \lg C$; 相关系数 $R = | -0.9998 | > 0.980$ 。样品的添加内毒素平均回收率均在50.00%~200.00%范围内,符合《中国药典》2010年版三部规定,样品的5个浓度溶液对鲎试剂无干扰影响(表2)。

表2 批号20110610人凝血酶原复合物的干扰实验(n=16)

稀释倍数	Ai液内毒素(EU/mL)	添加内毒素(EU/mL)	Bi液内毒素(EU/mL)	回收率(%)	CV(%)
10	0.4224	0.25	0.7250	121.04	0.52
	0.4224	0.50	0.9743	110.38	5.68
20	0.1987	0.25	0.5061	122.96	0.70
	0.1987	0.50	0.8042	121.10	1.69
40	0.0965	0.25	0.4305	133.60	2.58
	0.0965	0.50	0.6225	105.20	0.31
50	0.0687	0.25	0.4060	134.92	0.32
	0.0687	0.50	0.6456	115.38	1.63

2.3 样品溶液正式试验结果

标准曲线: $\lg T = 2.9699 - 0.3079 \lg C$; 相关系数 $R = | -0.9979 | > 0.980$ 。4批样品的平均回收率均在50.00%~200.00%范围内,样品在本实验条件下对鲎试剂无干扰影响,因此日常检测选用50倍即可(表3)。

表3 人凝血酶原复合物样品的正式试验(n=4)

样品批号	稀释倍数	添加内毒素(EU/mL)	回收率(%)	CV(%)	样品内毒素(EU/IU)
20110711	50	0.25	120.61	2.34	<0.062
20110712	50	0.25	114.14	1.58	<0.062
20110713	50	0.25	113.96	1.60	<0.062
Test1	50	0.25	107.58	1.58	0.237

2.4 细菌内毒素定量与家兔法检测结果比较

人凝血酶原复合物6批样品(批号20110714、20110815、20110816、20110919、Test2、Test3,规格为300 IU/mL)以动态浊度法定量检测和家兔法检测,结果回收率均在50.00%~200.00%,其中Test2、Test3家兔热原检测结果不合格,动态浊度法检测结果大于细菌内毒素限值0.167 EU/IU,判为不合格。其余4批家兔热原检测结果合格,动态浊度法检测结果小于细菌内毒素限值0.167 EU/IU,判为合格,两

者结果基本一致(表4)。

表4 动态浊度法定量检测结果与家兔法检测结果的比较

样品批号	稀释 倍数	外加内毒素 (EU/mL)	回收率 (%)	CV (%)	样品实测值 (EU/IU)	家兔法
20110714	50	0.25	117.80	1.49	<0.068	合格
20110815	50	0.25	120.23	3.39	<0.083	合格
20110816	50	0.25	128.92	2.09	<0.063	合格
20110919	50	0.25	132.80	2.34	<0.080	合格
Test2	50	0.25	128.67	2.13	0.427	不合格
Test3	50	0.25	149.42	5.87	0.336	不合格

3 讨论

细菌内毒素与鲎试剂的反应是由一系列酶促放大作用产生的,其干扰因素主要包括供试品的酸碱度、金属离子浓度、非特异性鲎试剂激活物、对仪器检测光源的吸收干扰等。本实验干扰试验结果发现,用动态浊度法定量测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素,其回收率均在50.00%~200.00%,表明不存在干扰因素,且含量均在规定的限度1.67 EU/mL以下。

鲎试剂动态浊度法能直观地反映样品中细菌内

毒素的含量,在试验的反应过程中可以动态观察并分析干扰情况,与传统的家兔检查法相比,具有操作简单、准确、检测灵敏度高、可定量等优点,避免了由于家兔差异及人为主观判断所出现的假阳性或假阴性结果。经过对比试验,样品的细菌内毒素定量检测结果与家兔热原检测结果基本一致,说明使用细菌内毒素动态浊度法测定人凝血酶原复合物制品中细菌内毒素是可行的。

4 参考文献

- [1] Chandra S, Brummelhuis HGJ. Prothrombin complex concentrates for clinical use[J]. Vox Sang, 1981, 41(4): 257-273.
- [2] 焦丽华,代旭兰,刘文芳. 凝血酶原复合物的制备及其临床应用进展[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(9): 27-30.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010年版(三部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 95-98.
- [4] 黄志军,劳海燕,赖伟华. 动态比浊法鲎试验定量检测潘南金注射液细菌内毒素含量[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(11): 756-757.

(收稿日期: 2011-12-05)

文章编号: 1004-9231(2012)07-0408-02

· 护理园地 ·

重症监护室危重患者床头信息便签的设计和应用

金静洁, 林丛, 王徐赢, 严玲微, 虞荷荷 (浙江省温州市第二人民医院, 浙江 温州 325000)

重症监护室(ICU)是集中收治危重症患者的场所。ICU护理交接是将危重患者的病情及应注意的问题向下一班报告,便于医护人员全面系统了解患者信息,及时提供全方位服务,体现护理工作的连续性^[1]。为了提高交接班质量,降低医疗投诉,我们于2011年1月自行设计了一款信息便签,经7个月的临床实践,效果显著,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

我院ICU科共有在编护士28名,其中男性3名,女性25名;年龄24~41岁;护龄1~23年,平均6

年;大专学历19名,本科学历9名;护士17名,护师9名,主管护师1名,副主任护师1名。另有轮转及进修护士18名。设有护士长1名,小组长6名,实行三班制排班,护士长总负责,小组长具体负责制。

1.2 便签的设计和应用

1.2.1 设计 ICU危重患者床头信息便签纸张规格为21 cm×15 cm,眉栏包括患者的姓名、住院号、诊断、性别、年龄、家属电话、主诊医生。便签设计了护士、医生、家属留言项目。留言内容可以是护理、医疗、生活的注意点或关键点,以及需要下一班护理人员关注执行的事项(表1)。

作者简介:金静洁(1983—),女,护师,学士。