

# 鲎试验检查细菌内毒素应注意的问题

周爱华(云南省楚雄州人民医院药剂科, 楚雄 675000)

**摘要:** 目的: 探讨影响鲎试验准确性的干扰因素和处理方法。方法: 通过对干扰鲎试验准确性干扰因素的分析(包括鲎试剂本身、操作条件、配制原料等), 提出了鲎试验中应注意的问题。结果: 只要克服了检查中的干扰因素, 鲎法具有比家兔法更简便、快速、灵敏度高、重现性好等优点。结论: 凡不干扰细菌内毒素检查或虽有干扰但可克服的注射剂药品, 均可用鲎法代替家兔法检查其热原。

**关键词:** 鲎试验; 热原; 家兔热原检查法; 注意事项

中图分类号: R927.12

文献标识码: B

文章编号: 1006-0111(2000)03-0162-02

鲎试验是利用鲎的变形细胞与微量内毒素产生凝集反应的现象, 作为判断供试品中细菌内毒素限量是否符合规定的一种方法<sup>[1]</sup>。它具有比家兔法更简便、快速、灵敏度高、重现性好等优点。中国药典 1995 年版已收载细菌内毒素检查法(简称鲎试验), 但只用于几种输液的检查。根据现有的实验证明, 凡不干扰细菌内毒素检查或虽有干扰, 但可以克服的药品注射剂, 将能够全部以鲎法代替家兔热原检查法。但是该法受到许多因素的影响, 故在做鲎试验检查时, 应注意下列问题。

## 1 鲎试剂本身

### 1.1 鲎试剂灵敏度

为了保证检查细菌内毒素结果的准确性, 用于试验的鲎试剂应首先核对灵敏度。因为在我们的实际工作中, 发现鲎试剂均符合药典规定标准前提下, 由于生产厂家不同, 部分鲎试剂的实测灵敏度与标示值有差异而导致检测同一检品时, 用相同标示值的鲎试剂, 出现不同结果。因而先核对灵敏度可避免因鲎试剂本身造成的判断失误。建议法定部门和生产单位应注意鲎试剂的质量检查。

### 1.2 供试品稀释

在取样品时, 一定要熟悉中国药典的内容, 不能直接取大输液原液 0.1ml 进行检查, 这是排除干扰因素的简单有效的方法。因药典已明确规定试验中鲎试剂的灵敏度不超过 0.5EU/ml, 根据供试品的稀释公式:

供试品稀释倍数 =  $L / \lambda_0$

$L$ : 供试品的内毒素限量 (1EU/ml)

$\lambda_0$ : 鲎试剂灵敏度的标示值 (EU/ml)

故检测大输液均应稀释后才能进行试验, 如选用更高灵敏度的鲎试剂, 则应增加样品的稀释倍数。稀释用的细菌内毒素检查用水药典作了规定。在 4h 内不得与鲎试剂产生凝集反应。

如果直接用供试品原液试验, 就会使供试品的内毒素提高到 0.5EU/ml 或 0.5EU/ml 以下, 这样, 根据目前大输液的生产和贮藏条件, 有些就会达不到, 鲎法检出的阳性率会提高, 无法复核的机遇也将增多, 势必会浪费人力物力。

## 2 操作条件

### 2.1 操作熟练程度

操作时严格按无菌操作法进行, 安瓿开启前应先用水划痕(不管是色点或包环易折安瓿), 用手半拉半掰将颈部折断, 防止碎玻璃屑落入安瓿内及有一个比较整齐的颈口。在鲎试剂的溶解、样品的稀释及加入时, 取样均应准确量取。操作时, 双手避免在安瓿或试管的上方来回移动, 加样后迅速封闭管口, 并立即放入恒温水浴箱中, 且整个操作过程中时间应紧凑, 防止微生物的污染, 否则易致假阳性的出现。

### 2.2 混合液的 pH 值

供试液与鲎试剂混合液的 pH 值对鲎试验的影响较大, 根据国内外资料的报道, 试验的最适 pH 为 6.25~7.25 才能形成最佳凝胶<sup>[2]</sup>。而

药典规定各种葡萄糖注射液的 pH 为 3.2~5.5, 我院控制在 3.7~4.2 之间。我们曾对 pH 值小于 4.0 的多批次葡萄糖注射液作了调 pH 和不调 pH 的比较试验, 结果发现在该 pH 范围内两者无显著差异, 不调 pH 者阴性抑制试验仍可得到坚实的凝胶, 说明不影响反应灵敏度, 且鲎试剂本身具有一定的缓冲能力。但 pH 值过大或过小均可抑制鲎试剂与细菌内毒素的反应, 其原因可能是 pH 值过大或过小均可破坏极微量的内毒素。

### 2.3 保温温度

将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水稀释成 1EU/ml, 进行鲎试验, 然后分别放置于 25、28、31、34、37、40、43、46、49℃ 水浴保温。实验中观察到凝胶形成的速度随着温度的升高而加快, 但到达 49℃ 保温 90min 也未出现凝胶。

从实验可以看出, 温度对鲎试剂的灵敏度影响很大, 保温温度在 25~40℃ 之间, 随着温度的升高, 鲎试剂的灵敏度亦增大, 在 40~46℃ 之间, 温度对鲎试剂的灵敏度无明显影响, 达到 49℃ 或更高温度时, 则会破坏鲎试剂。故应严格按照药典的要求, 温度控制在 (37±1)℃ 之间, 才可获得理想的结果。

### 2.4 保温时间

将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水稀释成 1EU/ml, 进行鲎试验, 37℃ 水浴保温, 分别在 10、20、30、40、50、70min 时观察, 发现凝胶形成的坚实状态随着时间的延长而坚固。

从上述实验可以看出, 延长保温时间, 可以提高鲎试剂的灵敏度, 增加假阳性。故应遵守我国药典规定的保温 (60±2) min 时间。

### 2.5 在鲎试验过程中应防止试管受到振动

鲎试剂与细菌内毒素形成的凝胶受到振动后易变形而误判为阴性。因此, 在鲎试验过程中, 不宜进行容易引起试管振动的实验操作, 试验用的试管架的眼孔直径应与安瓿或试管直径相接近, 避免安瓿或试管左右晃动。水浴箱要放置在固定不易受到振动的地方, 保温过程中

不可随时取出观察。

## 3 其它

### 3.1 配制的原料

在鲎试验检测中, 0.9% 氯化钠注射液多次出现假阳性反应, 对此进行了实验工作, 查找原因, 发现阳性率高与厂家原料有关。

笔者把不同厂家生产的氯化钠原料配制的 0.9% 氯化钠注射液, 对不能通过鲎法检查的送药检所用兔法检查, 结果为阴性, 其中个别厂家的阳性率高于其它厂家, 为此将不同厂家的氯化钠原料分别在 230℃ 烘焙 1h 后进行比较, 发现个别产品色泽明显变黄。按中国药典 1995 年版附录规定的易炭化物检查, 分别将不同厂家的氯化钠原料进行易炭化物相对照检查, 结果上述明显变黄厂家的氯化钠色泽较深。因此认为个别厂家的注射用氯化钠原料含有较多的有机杂质, 希望厂家要控制好质量。

另外, 在葡萄糖原料中偶有存在着 β-D 聚葡萄糖的现象, 它与鲎试剂发生凝集反应, 但注入兔体内不能使其升温, 故造成假阳性, 所以最好是使用定点厂家合格的葡萄糖原料。

### 3.2 所用器皿均应彻底洗净和灭菌安全

实验用器皿均应充分洗涤并冲洗干净, 特别是接触酸碱或用洗衣粉、洗液等洗涤后, 更应冲洗干净, 以免残留物破坏极微量的内毒素。灭菌应按药典中的有关方法处理, 防止引入外源性内毒素。如有条件的话可用合格的细菌内毒素快检盒。

### 3.3 阳性对照

我国药典规定鲎试验必须做阳性对照, 其目的就是证实实验条件下鲎试剂的活性, 所以在实验过程中, 阳性对照如为阴性, 此次试验无效, 应重新复做。另外细菌内毒素工作标准品应现用现稀释, 不可放置后再用。

### 参考文献:

- [1] 王茂林. 鲎试剂法检查热原的应用范围[J]. 中国医院药学杂志, 1990, 10(1): 41
- [2] 高国政, 颜锦. pH 值影响细菌内毒素测定的实验室研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(3): 162.