

## 动态浊度法鲎试验用于检测人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素的研究

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

**[摘要]** 目的 应用动态浊度法定量测定人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素含量。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→100 稀释可以有效地消除其对鲎试验的干扰。结论 应用动态浊度法定量测定人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素含量是可行的,与热原检查法结果一致。

**[关键词]** 人凝血因子Ⅷ;细菌内毒素;动态浊度法鲎试验;干扰试验

**[中图分类号]** R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)02-0107-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.02.008

## Determination of bacterial endotoxin in human coagulation factor VIII by kinetic turbidimetric limulus test

SHENG Feng-xian, XIONG Ke-qiang, WANG Hui-zhi, ZHANG You-jie, GAO Li-ping (Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd., Shanghai 200135, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determination of bacterial endotoxin in human coagulation factor VIII by kinetic turbidimetric limulus test. **Methods** Based on interference experiment, the endotoxin was added in the samples, whose recovery should be within the range 50%~200%. **Results** The interference from limulus test was eliminated by diluting the Human coagulation factor VIII (1→100 solution). **Conclusions** Turbidimetric-kinetic method was feasible, and had the same result with the rabbit-pyretogen test.

**[Key words]** human coagulation factor VIII; bacterial endotoxin; kinetic turbidimetric limulus test; interference test

人凝血因子Ⅷ是我公司研发的产品,临床上主要用于预防甲型血友病和获得性凝血因子Ⅷ缺乏而致的出血症及这类病人的手术出血治疗<sup>[1~2]</sup>。依据2010年版《中国药典》三部规定,人凝血因子Ⅷ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,用于人凝血因子Ⅷ生产过程中细菌内毒素含量的控制。有关动态浊度法鲎试验定量测定人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素含量的报道未见收载,故笔者参阅了有关文献<sup>[3~4]</sup>,初步建立了动态浊度法定量测定人凝血因子Ⅷ制品中细菌内毒素含量的方法。

### 1 材料

**1.1 仪器** 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 试剂** 细菌内毒素检查用水(批号:1010130,规格,5 ml/支,湛江安度斯生物有限公司);动态浊

度法鲎试剂(批号:1010142,规格:1.25 ml/支, $\lambda = 10 \sim 0.03$  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:150601-200966,规格:90 EU/支,中国药品生物制品检定所);人凝血因子Ⅷ(批号:20090503、20090605、20090607、20091112、20091213、0100706、20110804、20110805、20110906,规格:200 IU/瓶,本公司研究部提供)。

### 2 方法与结果

**2.1 细菌内毒素限值(L)的确定** 采用细菌内毒素公式为: $L = K/M$ , K为规定的给药途径,即人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂  $K = 5$  EU/(kg·h); M为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量 10 IU/(kg·h),计算得样品的内毒素限值 L 为 0.5 EU/IU。

**2.2 标准曲线制备及可靠性试验** 将细菌内毒素工作标准品用 1 ml 细菌内毒素检查用水溶解,置漩涡混合器上混合 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、0.25、0.031 25 EU/ml,三个标准品溶液,各取 0.1 ml 分别加到预先加有 0.1 ml 动态浊度法鲎试剂反应管内,混匀,立即插入 Bioprobe-2002 型细菌内毒素测定仪

**[作者简介]** 盛凤仙(1965-),女,本科,执业药师。Tel:18918063565, E-mail: wlrssfx@citiz.net.

**[通讯作者]** 高莉萍。Tel: (021) 50931037, E-mail: liping-gao@163.com.

内,37℃ 1 h 自动检测,其中每个浓度重复 3 管,并同时作阴性对照 2 管。结果如下:实验数据按最小二乘法进行统计分析,得回归方程: $\lg T_g = 2.969 3 - 0.303 6 \lg C$ (其中: $T_g$ 为透光度达到 92% 时反应时间(S), $C$ 为内毒素浓度(EU/ml));相关系数  $R = |-0.994 2| > 0.980$ ,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。见表 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 (%)
NC	> 3 600	0.00	0.00
0.03125	2 776	111.96	4.03
0.25	1 312	27.97	2.13
2	785	6.03	0.77

### 2.3 干扰实验

**2.3.1 样品最大稀释倍数计算** 公式为: $MVD = LC/\lambda_1$ ,式中  $\lambda_1$  为动态浊度法标准曲线中最低点细菌内毒素浓度 0.031 25 EU/ml, $L$  为供试品的细菌内毒素限值 0.5 EU/IU;当  $L$  以 EU/IU 表示时, $C$  为 20 IU/ml,计算得 VIII 因子最大有效稀释倍数 MVD 为 320 倍。

**2.3.2 样品溶液配制干扰实验** 取人凝血因子 VIII 样品(批号为 20090503,规格为 200 IU/瓶)用 10 ml 水复溶,然后用细菌内毒素检查用水稀释为 5、50、100、200、300 倍溶液,作为样品溶液,记为  $A_i$  液;同时进行同样倍数稀释,但在稀释液中添加细菌内毒素标准溶液使终浓度为 0.25 EU/ml,作为内毒素阳性对照管,记为  $B_i$  液;分别吸取上述各液 0.1 ml,加入预先加有 0.1 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,其中每个浓度重复 3 管,计算回收率。回收率( $\%$ ) = ( $B_i$  液内毒素值 -  $A_i$  液内毒素值)/添加内毒素浓度  $\lambda \times 100\%$ 。结果如下:标准曲线: $\lg T = 2.965 3 - 0.317 2 \lg C$ ;相关系数  $R = |-0.995 9| > 0.980$ 。在供试品稀释倍数中,1→5 稀释液的平均回收率为 28.02%,说明该稀释液对鲎试剂有抑制作用;1→50,1→100,1→200,1→300 稀释液的平均回收率均在 50%~200% 范围内,符合《中国药典》2010 年版三部规定,表明样品此 4 个稀释液对鲎试剂无干扰影响,其中 1→100 稀释液的平均回收率最接近 100%,故在日常检测中,选用 1→100 稀释液。见表 2。

**2.4 样品溶液验证试验** 分别取 3 批人凝血因子 VIII (批号 20110804、20110805、20110906,规格为 200 IU/

瓶)用 10 ml 水复溶,然后用细菌内毒素检查用水制成 100 倍稀释液,记为  $A_i$  液;;同时另取 4 管进行 100 倍稀释,并在稀释液中添加细菌内毒素标准溶液使终浓度为 0.25 EU/ml,记为  $B_i$  液;分别取上述各液 0.1 ml,加入预先加有 0.1 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,其中每个浓度重复 3 管,计算回收率。结果如下:标准曲线: $\lg T = 2.951 4 - 0.327 1 \lg C$ ;相关系数  $R = |-0.998 7| > 0.980$ 。三批样品的平均回收率均在 50%~200% 范围内,进一步验证了样品在本实验条件下对鲎试剂无干扰影响。见表 3。

表 2 批号 20090503 人凝血因子 VIII 的干扰实验( $n=3$ )

稀释倍数	$A_i$ 内毒素 (EU/ml)	$B_i$ 内毒素 (EU/ml)	回收率 (%)	CV (%)
5	1.004 4	1.074 5	28.04	1.57
50	0.167 7	0.392 0	89.72	3.29
100	0.070 6	0.306 1	94.20	1.97
200	0.044 0	0.330 5	114.60	2.38
300	0.020 0	0.329 8	123.92	1.68

表 3 人凝血因子 VIII 样品的验证试验( $n=3$ )

样品批号	稀释倍数	外加内毒素 (EU/ml)	回收率 (%)	CV (%)	样品内毒素 (EU/IU)
20110804	100	0.25	98.39	0.51	< 0.07
20110805	100	0.25	102.38	0.41	< 0.07
20110906	100	0.25	99.21	2.93	0.34

**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 5 批样品(批号为:20090605、20090607、20091112、20091213、20100706,规格:200 IU/瓶)以 100 倍稀释后进行定量检测,同时进行兔法热原检查。结果其平均回收率均在 50%~200% 范围内,并和家兔法检测结果基本一致,均符合规定,判合格。见表 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)	兔法
20090605	100	0.25	112.03	3.22	< 0.08	合格
20090607	100	0.25	114.28	0.71	< 0.08	合格
20091112	100	0.25	110.39	1.96	< 0.08	合格
20091213	100	0.25	97.03	2.34	< 0.05	合格
20100706	100	0.25	101.31	1.15	< 0.09	合格

## 3 讨论

**3.1 鲎试剂动态浊度法**是采用专用仪器在适当波 (下转第 114 页)

合理性作出结论,而代之以“符合”或“不符合”标准来进行分类。

**4.3** 本研究建立的模型发现“失血量”因素是影响该医院剖宫产围手术期抗菌药物使用的重要因素,提示可能由于失血较多,影响了病人的生理病理情况或医生对病情的判断,使医生倾向于超标准地使用抗菌药物。不同的模型还表明其他因素,如麻醉方式、住院时间、主治医师等对抗菌药物的使用有影响。这些“发现的知识”需要利用专业知识进一步筛选,评价和解释。通过分类模型建立以及变量重要性的获得,便于对抗菌药物使用容易出现“不符合标准”的病例进行重点监测和及时干预。

**4.4** 数据挖掘进程需要不断的循环和深入。本研究数据来源于1家医院1年的病例,得出的结论也较为粗浅。为了增强模型的说服力,有必要采用多个样本医院的数据加以综合。此外,仅通过“失血量”和“麻醉方式”来预测分类也是不全面的,还应考虑其他因素,使模型更加完善。

**【参考文献】**

[1] 王敬花. 剖宫产围术期抗菌药物的使用干预与分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(8): 688.  
 [2] 张奕, 李润萍, 孟繁星. 我院剖宫产手术预防感染应用抗菌药物的合理性分析[J]. 实用药物与临床, 2010, 13(3): 218.  
 [3] 姜涛. 785例产妇产后抗菌药物应用的合理性分析[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(10): 884.  
 [4] 孟现民, 丁天然, 张莉, 等. HBsAg阳性孕产妇剖宫产术抗菌药物预防用药调查与分析[J]. 中国药物应用与监测, 2010, 7(1): 29.  
 [5] 傅翔, 陈盛新, 杨樟卫. 数据挖掘在合理用药信息分析中的应用[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(6): 411.  
 [6] 李小毛, 段涛, 杨慧霞主编. 剖宫产热点问题解读[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008.  
 [7] 叶晨洲, 杨杰, 耿道颖. 应用数据挖掘技术从大脑胶质瘤病例中获取诊断知识[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(3): 426.

[收稿日期] 2011-10-08

[修回日期] 2011-12-29

(上接第108页)

长范围内检测凝胶反应过程中的浊度(透光度)变化而确定供试品中内毒素含量的方法。待测样品中内毒素与鲎试剂的C因子反应, 激活凝固酶切断凝固蛋白原中特定位置的精氨酸链, 肽链凝固产生凝胶, 根据测定反应液到达事先设定的浊度(透光度)值所需要的时间的对数值与细菌内毒素浓度的对数值成反比关系而进行定量测量的一种分析方法。

**3.2** 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因素。本实验干扰试验结果发现: 用动态浊度法定量测定人凝血因子Ⅷ(1→100)稀释液中细菌内毒素, 其回收率均在50%~200%, 表明此条件下不存在干扰因素, 且8批样品均在规定的限度0.5 EU/IU 1以下, 判为合格。

**3.3** 鲎试剂动态浊度法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, 避免了由于家兔个体差异所致的假阳性或假阴性结果, 能直观地反映样品中细菌内毒素多少, 在试验的反应过程中可以动态观察并分析干扰情况。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Ⅷ因子制品中细菌内毒素是可行的。

**【参考文献】**

[1] Van DK, Van Der Bom JG, Lenting PJ, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A [J]. Haematologica, 2005, 90(4): 494.  
 [2] 赵艳华, 马平, 卜凤荣. 凝血因子分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 1999, 10(2): 158.  
 [3] 国家药典2010版. 三部[S]. 2010: 95.  
 [4] 劳海燕, 罗宇芬, 林秋晓. 动态比浊法用于检测生脉注射液细菌内毒素的研究[J]. 广东药学报, 2002, 18(1): 21.

[收稿日期] 2011-12-22

[修回日期] 2012-03-06

欢迎订阅2012年《药学实践杂志》  
 本刊网址: www.yxsjzz.cn; yxsj.smmu.edu.cn