

## · 药物分析与鉴定 ·

## 鲎试剂测定内毒素定量法研究

解放军146医院 马守江 孙迪清 潘 起

近几年来鲎试验定量学的研究进展较快。目前主要有合成基质法<sup>(1)</sup>、Oishi等的自动测定仪法<sup>(2)</sup>及胡冠时氏的经验公式法<sup>(3)</sup>等。但是还没有人从理论上找出完整的符合鲎试验凝胶化实际的量变规律。因而使这些方法在应用中受到很大限制,定量误差较大。笔者在实验中发现了鲎试剂对内毒素检出度的对数与其生成凝胶化反应时间的对数成正比的鲎试验量变关系,且导出了鲎试验定量公式:  $C = K \cdot aT^b$

## 一、材料与仪器

鲎试剂:批号870115、870223、84112-B、841012-C(厦门鲎试剂厂),88041(福建省药检所);无热原蒸馏水(本实验室制

备);内毒素:E.Coli O111 B4浓度1000 EU/ml、2500EU/ml(上海生物制品研究所),浓度4000EU/ml(福建省药检所);内毒素测定仪:XNC-I型;试管75×10(江苏无锡洛社实验电器厂)。

## 二、方法与结果

用无热原蒸馏水稀释参考标准内毒素浓度系列备用。每支鲎试剂用0.1ml的无热原蒸馏水溶解,同批号合并,取0.1ml内毒素稀释液与0.1ml鲎试剂混匀于75×10试管中,然后迅速放入XNC-I型内毒素测定仪内,按该测定仪说明,观察并记录反应时间。每支样品重复3次。

表1 不同灵敏度鲎试剂与内毒素凝胶时间

	a = 0.5					a = 80				
C	50	10	5	2.5	1	100	50	25	12.5	6.25
C/a	10	2	1	0.5	0.2	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.0781
T	0.4833	0.7167	1.0333	1.3333	1.7333	0.9	1.2278	1.5583	1.885	2.5267

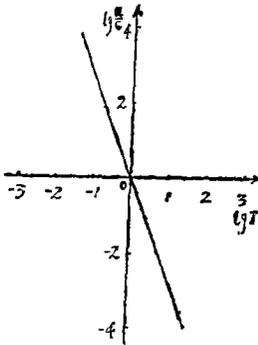
表2 不同灵敏度鲎试剂与内毒素凝胶时间

	a = 10			a = 2			a = 0.625			
C	200	100	50	100	10	1	100	10	1	0.1
C/a	20	10	5	50	5	0.5	160	16	1.6	0.16
T	0.325	0.3955	0.558	0.2389	0.5472	1.2639	0.1555	0.4208	0.9819	2.0772

5批鲎试剂与内毒素反应时测得结果见表1、2,用鲎试剂检出度( $\frac{C}{a}$ )——内毒素浓度与鲎试剂灵敏度之比对其反应生成凝胶时间(T)做全对数曲线(图1)。

图1看出,鲎试剂的同批号 $\lg \frac{C}{a} - \lg T$ 曲线与不同批号的 $\lg \frac{C}{a} - \lg T$ 曲线是同一条直线,得直线回归方程式:

$$\lg \frac{C}{a} = \lg A + B \lg T \quad \dots \quad (1)$$



(1) 式中A、B分别用k、b表示，整理得：

$$C = K \cdot aT^b \dots\dots (2)$$

表3 鲎试剂测定参考标准内毒素测得结果

a = 10				a = 2			
实际浓度	T	理论值	误差 (%)	实际浓度	T	理论值	误差 (%)
200	0.325	214	7.5	100	0.2389	100.4	0.4
100	0.3955	125.9	25.9	10	0.5472	10.35	3.5
50	0.558	4.918	-1.64	1	1.2639	1.048	4.8

三、讨 论

1. 本实验利用鲎试剂对内毒素检出度与其反应生成凝胶时间的相关性，导出了鲎试验定量公式。初步揭示了鲎试验(试管法)的内在量变关系规律，为鲎试验定量研究及应用提供了重要的理论依据。

2. 由于不同批号鲎试剂灵敏度不同，对内毒素的定量带来了困难。本实验得出的经验公式在回归过程中用鲎试剂对内毒素的检出度对凝胶时间作全对数曲线，这样就消除了灵敏度的影响，勿须对每批鲎试剂作标准曲线，可直接根据凝胶反应的时间进行定量或限时限量检查。

3. 公式 $C = kaT^b$ 中，鲎试剂灵敏度a为已知量，k、b为常数，K与工作条件(pH值、温度等)有关，pH=7, 37℃时k取1。本实

式(2)中a为鲎试剂灵敏度，单位EU/ml. hr; C为内毒素浓度，单位EU/ml; T为凝胶时间，单位hr; k、b为常数。

将表1、2中5批鲎试剂测得数据用电子计算机回归，得本实验经验公式为 $C = 1.036aT^{-2.73}$ ， $r = 0.9963$   $f = n - 2 = 18$ 。查表 $r_{.01}(18) = 0.561$ ， $r > 0.561$ ，故相关性非常显著。经验公式与(2)式拟合。

利用经验公式测算已知含量的内毒素参考品稀释液，结果(表3)表明，用定量公式测得结果与实际浓度很接近，故定量公式得证。

验的经验公式相关性极显著( $P < 0.01$ )，利用该公式测得结果变异系数能控制在3.6% ( $n = 20$ )以下，说明本法优于美国自动测定仪测得结果( $V = 5.71 - 14.1\%$ )<sup>(4)</sup>。

4. 由于鲎试验(试管法)受观察方法的限制，因此k、b的真实值有待进一步测定。b是否与自然对数e有关尚待研究。

**致谢：**表1数据由155医院胡冠时主任提供，本实验承贡瑞生、于连生、兰家让老师指导。

参 考 文 献

[1] 丹羽允：鲎与鲎试验论文汇编，1983：81  
 [2] 周海钧：药学通报，1988；23(5)：277  
 [3] 胡冠时等：International Symposium on Pyrogen, P. 69-100, June 1987  
 [4]：周海钧：药学通报，1988；23(5)：277