

# 尝试创新与进展

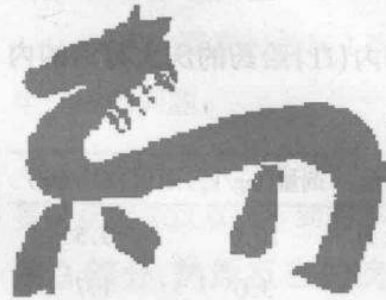
司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2002年第1期(总第10期) 2002年2月6日

## 恭贺新年

A Happy New Year

# 2002



新春伊始, 湛江安度斯公司恭祝全国药检同仁:  
新春快乐, 全家幸福!

### 目 录

庆大霉素引起的热原反应 .....	1
内毒素测定软件精要 .....	5
注射用天门冬氨酸洛美沙星细菌内毒素检测方法的研究 .....	8
肝素钠细菌内毒素检查方法的建立 .....	10

## 庆大霉素引起的热原反应

James F. Cooper

### 第一部分: 美国药典收紧庆大霉素的内毒素限值

一、回顾: 在 USP 24 NF/19 的第 1 增补本中, 按 7mg/kg·hr 的剂量, 静注用庆大霉素的内毒素限值修改为 0.71 Eu/mg; 这是 USP 对每日 1 次(ODD) 5-7mg/kg 这一用药新趋势的回应, 被替代的传统方案将该剂量分 3 次给药; 当静注用庆大霉素引起的热原反应被报道, 这一新

的剂量方案也因此引起了争议。

二、治疗趋势: 庆大霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 用于治疗严重的革兰氏阴性细菌感染, 氨基糖苷类抗生素的抗菌作用起效快, 与  $\beta$ -内酰胺抗生素合用于对抗耐药菌; 然而, 庆大霉素的肾毒性和耳毒性限制了它的治疗应用, 需要设计合理的治疗方案, 例如 ODD 方案, 该方案

保留了抗菌活性,减小了毒性并简化了给药。

三、内毒素限值:庆大霉素是在六十年代中期由 Schering Plough 公司推出的,当时名称为 Garamycin(商品名),最初的剂量为 1 - 1.7mg/kg,每 8 小时 1 次,相当于每日 3 - 5mg/kg,免法热原检查的剂量为 10mg/kg,在过去十几年中,静注用庆大霉素的内毒素限值变更了 2 次,见表 1。

表 1. 静脉注射和鞘内(IT)给药的庆大霉素的内毒素限值历史

文件	生效日期	剂量(mg/kg)	限值(EU/mg)
FDA 指南	1987 年 12 月	10.0	0.5
USP 22	1993 年	3.0	1.7
USP 24	2000 年 1 月	7.0	0.71
FDA 指南	1987 年 12 月	0.11(IT)	1.8(IT)

最初的限值是 0.5EU/mg,因为 1987 年的鲎试验指南要求依据兔或人剂量两者中较高的剂量来确定 L 值;在 USP22 的增补本中,庆大霉素品种项规定内毒素限值为 1.7EU/mg,该限值是基于一人用剂量;最近一次修改于 2000 年 1 月份生效,是以每日 1 次的剂量 7mg/kg 为标准,这一剂量通常在 1 小时内注射完。

鞘内给药的庆大霉素内毒素限值在 FDA 鲎试验指南的附录 E 中被错误计算,用于计算的 K 值应该是 0.2 EU/kg,而非静脉给药的 K 值,正确的 L 值见表 1 中最后一行。

四、鲎试剂的相容性:人用和兽用的庆大霉素被包装在多剂量瓶内,效价为 40 - 50mg/ml,也有 10mg/ml 的儿科用规格;庆大霉素处于溶液状态并被缓冲至酸性 pH 值,消除鲎试验干扰的最好的方法是用 BET 水稀释和使用缓冲的鲎试剂,该方法避免了调节庆大霉素供试品 pH 值引起的增强;由于阳性对照和供试品的 pH 值不

同,如果使用未缓冲的鲎试剂,pH 引起的增强将无法判断;通常,浓度为 0.25mg/ml 的庆大霉素与 Endosafe 试剂反应,内毒素可获得完全的回收。

使用 0.0625 EU/ml 的试剂和检测浓度为 0.25 mg/ml 时,PSS(产品特征灵敏度)为 0.25EU/mg,使用 1 - 0.01EU/ml 标准曲线的动态鲎试验法,PSS 为 0.04 EU/mg。(PSS = EL/TC)

## 第二部分 静脉注射引起的热原反应的报道

1998 年 4 月 30 日至 1998 年 7 月 26 日期间,在洛杉矶医疗中心发生了一系列热原反应,疾病控制中心(CDC)的调查发现这些反应与同一个供应商提供的静注用庆大霉素有关,28% 的患者接受每日 1 次注射 7 mg/kg 的治疗,该治疗方案为无标签操作;CDC 复查了接受静脉注射庆大霉素的 289 个患者在类似内毒素反应的阶段前、中、后的记录,在热原反应流行期间,ODD 方案有 25% 的热原反应风险,而将这一剂量分 3 次注射(传统疗法),发生热原反应的风险要低得多。

CDC 和庆大霉素供应商使用凝胶法和动态浊度法分别进行内毒素检测,内毒素为 0.8 EU/mg,是 1.7 EU/mg 这个限值的一半;CDC 由此得出结论,ODD 给予体内的内毒素超出内毒素阈值 5EU/kg;最坏的情况是以 7 mg/kg·hr 剂量静脉注射含有 0.8 EU/mg 内毒素的庆大霉素时,患者将获得 5.6 EU/kg 内毒素。

在 PDA(非经肠道药物协会)1999 年的年会上,CDER 医疗事物副主任 Marry Fanning 博士就 FDA 的调查作了报告,并对与庆大霉素有关的反应作了回应,她回顾了 1998 年 5 月至 1999 年 8 月期间所报道的类似内毒素的反应,共涉及 149 个病人的 210 个不良反应,最典型的反

应是在注射开始(表 2)的 3 个小时内出现高烧、寒战、发冷和颤抖;75%的不良反应在 1 个小时内表现出明显症状,大多数的不良反应没有造成严重的后遗症,但有 5(3%)名患者很严重,需要深切治疗装置(ICU)的支持。

表 2. FDA 调查的庆大霉素不良反应事件,  
5/98 - 8/99

症 状	事 件(%)
寒战、高烧	57
发冷	20
颤抖/抽搐	33
心动过速、高血压/低血压	41
呼吸系统症状	22

Fanning 博士按严格的时间顺序报道事件的发生,以便于理解内毒素在这些热原反应中的作用,1998 年中期,首次爆发的热原反应使供应商召回所有批号的静注用庆大霉素;对庆大霉素的需求转向另一供应商,该供应商也使用同样的来源于海外的原料药;不良反应持续发生直到 1999 年 8 月, FDA 唯一的办法是从市场上回收产品,并向庆大霉素原料药供应商签发一份进口警告函,因为对原料药供应商的调查中发现了许多 GMP 缺陷,特别是在水系统中;目前,所有静注用庆大霉素都是用同一个海外供应商的原料药生产的,因为西方没有庆大霉素原料药生产商。

Fanning 博士有关杂质的讨论也被披露,化学分析发现总杂质的百分比较高,更进一步,庆大霉素的成分峰值也有变动,相关批号的 10 个兔法热原检查中只有 2 个为阳性,两个生产商、CDC 和第三方用鲎试验检查所有批号的庆大霉素终产品,结果是检测到可接受的内毒素水平;另一方面, FDA 的一个实验室报告指出 10%的

庆大霉素原料和 13.6%的终产品与不良反应有关,内毒素水平高于 1.7 EU/mg。报告会后的讨论中我们得出结论,1999 年的不良反应与 1998 年的 CDC 报道比较,所有批号的庆大霉素有相似化学杂质,只是内毒素较少。

Fanning 博士总结出:

- 1) 不良反应的病原学归因于原料药生产中的多个问题,包括但不限于内毒素;
- 2) 庆大霉素的每日 1 次剂量暴露了原料药生产中的问题;
- 3) 由于高浓度的杂质或非活性辅剂,无标签剂量会导致意想不到的不良反应。

### 第 3 部分. 热原反应的病原学

一、作者的讨论: CDC 和 FDA 调查的庆大霉素不良反应是首次爆发的因静脉或鞘内注射内毒素污染药品引发的热原反应。简单来说,热原反应可以定义为致热原诱发宿主内源性致热原(包括细胞因子)释放的应答反应,表现包括高烧、寒战、抽搐和低血压。

二、所有热原的检测:如果不能确定内毒素在这些反应中的作用,如何解决呢? 由于兔法热原检查无说服力,需要一种替代方法;全血试验可能是最合适的方法,因为它是一种灵敏的体外热原试验,该检测法是利用宿主的反应,检测与热原接触的白细胞产生的细胞因子水平,而鲎试验只对内毒素反应, Pearson 等的回顾指出,内毒素只是许多能引发热原反应的因子之一,热原还包括其它细菌成分和化学致热原;当然内毒素是效力最强的热原,也是非经肠道工业的最大问题;没有合适的检测方法是非经肠道工业界很少有非内毒素热原报道的原因之一;来自微生物的非内毒素热原遇热不稳定,如果它们污染一批用于无菌生产的材料,没有确



定的方法来将它们从终产品中消除；全血试验将填补了这一鸿沟。

Fanning 博士的报告真的很及时，提供了详实而直接的资料；对无标签的剂量的担心当然是正常的；回顾所有的证据表明引起这些热原反应不可能只是内毒素，内毒素可能与非内毒素热原协同作用，我们可能难以确认存在一种有效的新热原或现象；报告中的高内毒素水平会迷惑调查员，使他们疏于考虑各种可能性，这是非常危险的。

**三、内毒素的热原阈值：**哺乳动物对内毒素的敏感度各种各样，良好的状态可能是一个因素；庆大霉素反应比健康男性自愿者对 8 - 16 EU/kg 的精制内毒素 (EC - 5) 的反应要严重，参考内毒素的人体内研究确定了致热阈剂量 (50% 的男性自愿者体温升高  $\geq 1.0$  ) 大约为 4.1 EU/kg，只有一半注射较高剂量的自愿者经历了寒战或肌痛；Pearson 等观察到使溶液热原

### 【小资料】

## 美国历史上的药物热原反应

**鞘内放射性造影剂：**1972 年，鞘内放射性造影剂内的微量内毒素导致了严重的非细菌性脑膜炎流行，热原试验根本无法保证这类药物的安全性，因此 FDA 制定了严格的鞘内用药内毒素限值，鲎试验也首次成为药品检验的法定方法。

**人血白蛋白：**1974 年，25% 的人血白蛋白引起了一系列热原反应，CDC 采用鲎试验法调查流通中的人血白蛋白产品，发现 45% 的产品的内毒素超过了人体的耐受剂量，在正常的治疗剂量下可能会引起热原反应，而这些产品均是免法热原试验合格产品，因此，人血白蛋白生产商被要求在生产过程控制中使用鲎试验，1978

试验恒定失败至少须 80EU/kg (EU 值由鲎试验确定)；比较而言，庆大霉素热原反应的内毒素剂量可能低至 2 - 5 EU/kg。

**四、原料药的警戒限值：**这些反应的共同特性是原料药来自同一海外供应商，而且有不同的内毒素水平和明显的化学杂质；由于对终产品或配方中接近限值的内毒素水平缺乏安全的监控，使内毒素在患者体内得以完全反应，正如 1998 年 9 月通讯中讨论的一样，谨慎的做法是为原料药设定低于限值 4 - 5 倍的内毒素警戒限值。

$$\text{内毒素警戒限} = \frac{\text{内毒素限值}}{\text{安全系数}}$$

总结：对庆大霉素治疗引起的热原反应的调查揭示了是由一批原料药导致，但确切的原因尚未明；这一偏离强化了无菌过程中原料药的内毒素警戒限值的重要性；可能需要新的方法来完成这一调查，例如全血热原检测。

年后，再没有因人血白蛋白引发的热原反应报道。

**流感疫苗：**与人血白蛋白的情况一样，在生产过程控制中采用鲎试验后杜绝了热原反应事件。

上述的几例典型热原反应事件后，鲎试验成为避免热原反应的必然选择，特别是在生产过程控制中的应用，有效的控制了产品中的内毒素水平，而 1998 年的庆大霉素热原反应显然暴露了更多的问题，控制内毒素只是一个必要条件，非内毒素热原的检测第一次引起了广泛的关注。

## 内毒素测定软件精要

细菌内毒素定量测定按自动化的程度分类可简单的分为:手工、半自动和全自动,手工的测定虽然烦琐、效率低下,但还是有一定的使用者,典型的手工操作试剂盒是由上海医学化学研究所提供的显色法试剂盒,其使用步骤见下表,这种检查方法不但步骤多,检测的结果当然也要采用辅助计算工具(如:计算器或 Excel)计算;半自动的方法是在供试品与鲎试剂混合放入检测仪器后,所有的检测、计算均交给检测仪器和计算机自动处理,而供试品的处理、加样和标准内毒素的配制还要人工操作,但在操作步骤上也尽量简化,如:动态显色(KCA)和动态比浊鲎试剂(KTA)均是一步加样反应,没有比凝胶法的加样过程更复杂;全自动的内毒素测定仪则将上述的手工操作部分由机械手完成,典型的产品是 Wako 的 ET - auto3000 和 Tecan 的 RSP - 160。

从下表的比较可以清晰的看到每种方法的复杂程度,全自动无疑令人神往,可几万至十几万美金的价格确实不菲,即使是国内的鲎试剂制造厂也没有使用这种仪器,在性能价格比上,半自动检测仪在目前还是值得推广的;半自动仪器主要由光电检测、恒温器和数据采集 3 个功能模块构成,数字化的检测结果最终传递到数据分析软件,有的仪器将数据分析软件内置于检测仪器内,但多数仪器选择了在外部计算机上运行软件,仪器与计算机之间通常采用串行口通讯,运行在外部计算机上的软件可以方便的维护或升级,扩展功能也很方便,但不良之处是外部计算机系统的稳定性会影响软件运

行。

半自动测定的手工操作部分不过是简单的体力活,即使使用机械手也不过是精确的重复运动,而内毒素检测仪的测定软件则是需要脑力面对的,良好的软件除了强大的功能还需要友好的界面,这样使用者才能够将脑力用在试验的设计与功能的应用上,而不是把时间和精力花在狂点鼠标和莫名其妙的窗口上;软件的稳定性是内毒素检测仪应用的前提,不能因软件故障导致无效试验,最昂贵的试验莫过于复测。

表:不同自动化程度的内毒素测定步骤比较

步骤	手工		半自动 KCA + EDS99	全自动 KTA + ET - auto
	凝胶法 + 水浴	终点显色 + 分光光度计		
准备试验材料	0	0	0	0
自动仪器,设计试验	1	1	1	1
稀释内毒素,溶解试剂,	2	2	2	a
配制供试品溶液				
鲎试剂与供试品混合保温	3	3	3	a
加显色底物	--	4	--	--
终止反应	--	5	--	--
加亚硝酸盐	--	6	--	--
加萘胺	--	7	--	--
检测/判断	4	8	a	a
计算	--	9	a	a
输出/记录结果	5	10	4	2

注: -- 表示不涉及, a 表示仪器自动进行

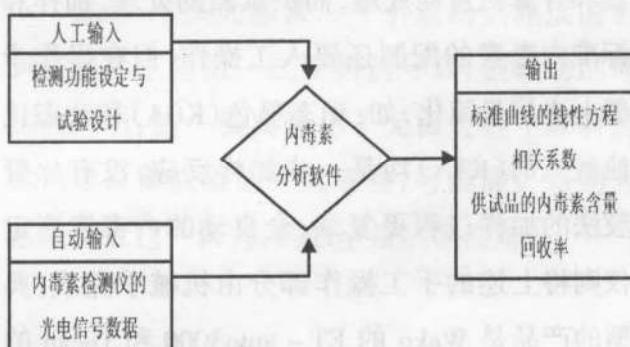
软件是将一系列输入转化为目标输出,内毒素测定软件也不例外,其基本模型如图,即使使用一个完全不熟悉的软件,其结构也基本上按下图所示,其关键在于输入,了解这一概况,学习使用任何一种内毒素测定软件就不再是难事。

首先,检测功能的设定,软件在安装后通常会有一个默认设置,如果只使用单一功能状态,而且厂商已经将设置调整到合适的状态,软件会一直使用该设置;如果需要新的功能或更加合适的功能,那么就需要设定检测软件的各项参数,有些软件甚至可以控制反应温度,因此检查或从新设置检测功能十分重要,这一功能的按钮、菜单或命令名称通常是 **Instrument**、**System**、**Setup**、**Control** 或 **设置** 等,进入该功能界面,最常见的参数设置是通讯口,检查通讯线的连接,确定是 COM1 或 COM2;另外一个检测的初始化时间,在这个时间内的数据是不用于分析的,以 **Wait Time**、**Base OD**、**平衡期**、**零化期** 等,合适的初始化时间可以减弱随机误差和非特异性的显色或浊度,初始化时间通常在 3 - 5min; **检测时间**、**数据采集间隔时间**、**图表坐标**、等也经常列为设置的内容,检测时间是指仪器停止检测的时间,在检测过程中,人为终止反应时该时间即无效,数据采集间隔时间一般在 10 秒左右,坐标的选择仅是为了方便观察反应曲线,有些软件已经能够自动搜索合适的坐标范围,该项目已无实际意义;完成设置的最后步骤是按“确定”并正常退出。

第二,试验的设计,试验的设计被放在 **Protocol**、**Template Setup**、**Plate Configuration**、**数据采集** 的功能按钮或菜单内,打开该界面可见到一个表格(模板),表格(模板)的编号与仪器的检测孔相对应,设计试验就是安排检测孔的检测项目,基本的检测项目有 5 个阴性对照(NC、NEG)、内毒素标准(STD)、样品(SMP)、阳性样品对照(SPK、

PPC)和阳性对照(PC、POS)这些项目有的放在窗口菜单内供选择,有的放在表格旁象调色板一样供选择,还有的放在鼠标右键的菜单内,填充表格时也有不少方便选项,如自动填充、拖放鼠标复制等,键盘上的 **Shift**、**Alt**、**Ctrl** 键与鼠标结合可能会组合出新功能;另外重要的一点是,设计好的表格(模板)可以以文件的形式储存,类似的试验可以直接读取;在试验设计界面还要填一些试剂、人员等信息,有的还需要选择分析方法,即是显色、浊度、动态或终点等;模板文件仅是个试验的设计,没有检测数据,接下来的工作是数据的采集。

图:内毒素测定软件的工作流程图



第三,开启检测,一般开始检测的按钮设在表格(模板)的界面内,也有的放在 **Mesurment**、**File** 的菜单内,其功能键名称为 **Start**、**Reading** 或 **采集** 等,酶标分析仪为批量检测,按下检测的按钮就开始了一个批量的检测,试管式内毒素检测仪,按下该按钮后能够随时放入反应管;之后,即进入了自动化的阶段,内毒素检测仪将检测的光电信号自动输入软件,检测是生成电子文件过程;经过了体力和脑力劳动,检测开始后可以休息一下了,软件在接受检测的信号时通常要独占您的计算机,检测程序的窗口禁止最小化,当然,这并不



能阻止计算机的爱好者们同时运行个 Word、MP3 或 Game,但一定注意,在 Win9x 下某个程序不响应会拖累整个计算机 Down 掉,似乎这可以成为喝杯咖啡舒展一下神经的理由,但不幸的是,这时通常要准备下一个实验;检测结束后,别忘了将检测文件存盘,能够自动存盘的软件在检测开始前就需要确定文件名。

第四,分析,首先要明确软件提供的分析方法有多少,通常分析方法有动态分析法(包括 Onset OD、Vmax、Vmean)和终点法,如果有多种选择,需要确定一种方法,有的软件只提供一种分析方法如:EDS-99 的反应时间法;打开文件,选定分析方法,接下来确定分析所必须的参数,如反应时间法须确定临界透光率(Onset OD 或 Tg),Vmean 法须确定分析时间,确定后,就可以看曲线和报告了,找出 、

、、、、、或 等功能键即可。

第五,打印,没什么好讲的找到打印按钮并按下去即可,各种格式均试一遍也就明白了,一个常见问题是颜色与分辨率,如果图表是彩色的,按黑白打印时须在彩色模式下忽略颜色错误;分辨率应调整在至少 300dpi,否则有时图表会错位。

上面结合了多个内毒素检测软件来介绍如何快速熟悉内毒素测定软件,了解软件的基本结构和 workflow 对掌握软件还是有帮助的,初步能够使用后,慢慢去接触它提供的高级功能,从此,脑力的工作将成为内毒素检测的一个重要部分。

## 【简讯】

### 细菌内毒素定量检测论文集

1999 年,广东省人民医院与湛江安度斯生物有限公司合作承担广东省科技攻关课题,项目名称为临床常用输液配伍的热原研究。该项目是以临床常用输液为研究对象,采用动态比浊法试验法调查配伍输液中的内毒素含量与变化,为临床的安全用药提供科学的依据。项目的研究分 2 个阶段:1. 单方药物的细菌内毒素

检查;2. 常用输液配伍的细菌内毒素调查。

目前该项目已经发表研究论文 10 余篇,另有 10 余篇正在审校中,内容主要涉及抗生素和中药制剂的内毒素定量检测法。湛江安度斯公司计划在今年上半年出版第 1 阶段的研究论文合订本,本刊将在下期刊登论文的目录摘要及有关预订事宜。

# 注射用天门冬氨酸洛美沙星细菌内毒素 检测方法的研究

周长军, 郭爱萍, 余盛刚\*

湖北潜江制药股份有限公司质量部 433100

周素文

湖北省药品检验所 430000

**摘要** 通过干扰试验证明, 天门冬氨酸洛美沙星注射液对  $\lambda = 0.25\text{Eu/ml}$  的鲎试剂无干扰, 可用细菌内毒素检查代替兔法检查热原。

**关键词** 天门冬氨酸洛美沙星注射液, 鲎试剂, 细菌内毒素检查, 干扰试验。

鲎试剂用于细菌内毒素的检测, 具有操作简单、灵敏度高、重现性好、实用性强等优点<sup>[1]</sup>。天门冬氨酸洛美沙星系喹诺酮类广谱抗菌药, 为了扩大应用范围, 我们对注射用天门冬氨酸洛美沙星进行了细菌内毒素检测的研究, 探讨以细菌内毒素检查法取代热原查法检测天门冬氨酸洛美沙星注射液的可行性。

## 1、材料

科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液, 规格: 2ml:0.1g, 湖北潜江制药股份有限公司, 批号: 20011106、20011108、20011203; 鲎试剂(TAL), 湛江安度斯生物有限公司, 批号: 0111062, 标示灵敏度 0.25Eu/ml; 批号: 0107301, 标示灵敏度 0.5Eu/ml; TAL, 福州新北生工业有限公司, 批号: 011109, 标示灵敏度: 0.25Eu/ml; 批号: 010511, 标示灵敏度 0.5Eu/ml, 均为 0.1ml/支。细菌内毒素工作标准品; 批号 2001-3, 效价 70Eu/支, 中国药品生物制品检定所。细菌内毒素检查用水(BET水): 海洋生物制品厂, 批号 010611。

仪器: 旋涡混合器, 恒温水浴箱; 吸管等均经除热原处理。

动物: 家兔, 湖北省潜江市实验动物中心。

## 2、方法与结果

### 2.1 TAL 标示灵敏度复核

用 BET 水将细菌内毒素工作标准品稀释成  $2\lambda_b, 1\lambda_b, 0.5\lambda_b, 0.25\lambda_b$  的标准内毒素溶液, 按文献<sup>[2]</sup>方法进行试验, 平行做 4 管, 结果表明 4 批 TAL 的实测灵敏度与标示灵敏度相符。

### 2.2 干扰试验。

2.2.1 样品内毒素理论限值的计算: 本产品一次最大剂量为 0.2g, 人体重按 60kg 计算:

$$M = \frac{0.2 \times 1000}{60} = \frac{10}{3} \text{mg/kg} \cdot \text{h}$$

细菌内毒素阈值(K)为  $5.0\text{Eu} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 细菌内毒素限值(L)为:

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5.0}{\frac{10}{3}} = 1.5\text{Eu/mg}$$

供试品最大有效稀释倍数(MVD): 根据公式  $MVD = \frac{LC}{\lambda}$  ( $\lambda$  为鲎试剂灵敏度),  $C = 50\text{mg/ml}$ , 求出当  $\lambda$  为  $0.5, 0.25\text{Eu} \cdot \text{ml}^{-1}$  时, MVD 分别为 150、300 倍。

2.2.2 干扰试验: 干扰试验按文献<sup>[2]</sup>方法进行。取 3 批经热原检查合格的科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液, 用 BET 水稀释成 1/3、1/6



两个浓度的供试品溶液,它们分别为 0.5、0.25Eu·ml<sup>-1</sup> 2 个鲎试剂灵敏度所对应的最大有效稀释倍数的浓度。用这 2 两个浓度的样品溶液将内毒素工作标准品稀释成 2λ<sub>b</sub>, 1λ<sub>b</sub>, 0.5λ<sub>b</sub>, 0.25λ<sub>b</sub> 的系列内毒素溶液,并用相应灵敏度的 TAL 分别与之反应。每一浓度平行做 4 管,同时作标准对照。见下表 1

表 1 科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液干扰试验结果

鲎试剂批号	灵敏度 Eu/ml	供试品批号	稀释浓度 mg/ml	Es/Et
010736	0.5	20011106	1/3	< 0.5
		20011108	1/3	< 0.5
		20011203	1/3	< 0.5
		BET 水	—	1(标准对照)
010511	0.5	20011106	1/3	< 0.5
		20011108	1/3	< 0.5
		20011203	1/3	< 0.5
		BET 水	—	1(标准对照)
0111062	0.25	20011106	1/6	0.75
		20011108	1/6	1
		20011203	1/6	1
		BET 水	—	1(标准对照)
011109	0.25	20011106	1/6	0.84
		20011108	1/6	1
		20011203	1/6	1
		BET 水	—	1(标准对照)

实验结果表明,科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液在 1/3mg/ml 浓度下有干扰,而在 1/6mg·ml<sup>-1</sup> 浓度下,使用 λ = 0.25Eu/mlTAL 无干扰。

### 2.3 细菌内毒素检查法与热原检查法的

结果比较:根据上述干扰试验结果,用 λ<sub>b</sub> = 0.25Eu/ml 的 TAL 对 30 批科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液进行 BET 与家兔热原法的对比试验。30 批样品中,29 批 BET 与兔法均为(-),符合规定;1 批 BET 与家兔法为(+),不符合规定。

### 3、讨论

3.1 实验结果表明:选用 λ<sub>b</sub> = 0.25Eu·ml<sup>-1</sup> 的 TAL,供试品在稀释浓度为 1/6mg·ml<sup>-1</sup> 条件下,能消除干扰,可用细菌内毒素法检测热原。

3.2 比较两种方法检查 30 批产品,29 批阴性产品的阴性符合率为 100%,1 批阳性产品的阳性符合率也为 100%,两法无显著差异(P > 0.05),可用细菌内毒素检查法代替家兔检查科奇(天门冬氨酸洛美沙星)注射液中热原。检测方法:取本品,用 BET 水稀释成 300 倍后,依法检查,每 1mg 中含内毒素量不超过 1.5Eu。

3.3 当然,为了进一步避免其干扰作用,可选择更高灵敏度的鲎试剂,将样品稀释至相应的浓度,做细菌内毒素检查。

### 参考文献:

- 1 王志斌、群燕、周建平, 注射用硝普钠中细菌内毒素的检查,药物分析杂志 2000 20(1):59
- 2 中国药典,2000 版 二部:附录 86

# 肝素钠细菌内毒素检查方法的建立

韦群 湛江安度斯生物有限公司

**摘要:**本文通过干扰评价试验证明肝素钠对细菌内毒素检查有抑制作用,主要因素为肝素钠对鲎试剂二价阳离子的络合而不能激活凝固酶原引起凝聚反应,本文提出使用稀释剂(I)适当补充二价阳离子,对样品作适当稀释,以消除其干扰抑制作用。

**关键词:**干扰评价试验,稀释剂(I) 肝素钠 细菌内毒素检查

肝素钠注射液为临床常用药品,药典规定的检查方法为热原检查法,本文通过试验探讨以细菌内毒素检查法取代热原检查法检查肝素钠原料的可行性。

## 1. 实验材料

1.1 肝素钠原料:重庆东虹生化有限公司产品,150 U/mg,批号:001225A

1.2 鲎试剂(TAL):湛江安度斯生物有限公司产品,0.1ml/支,批号见表1。

1.3 国家内毒素参考品:批号:981,效价:9 000 Eu/支,中国药品生物制品检定所制备。

1.4 细菌内毒素检查用水(BET水):湛江安度斯生物公司,批号:000613,5ml/支,内毒素含量 < 0.001 Eu/ml。

1.5 稀释剂(I):Mg<sup>2+</sup>溶液,990115,4.0ml/支,湛江安度斯生物公司

1.6 细菌内毒素检查用具一套,按药典<sup>[2]</sup>规定除热原。

## 2. 实验方法与结果

2.1 TAL 灵敏度复核:按 2000 版细菌内毒素检查法操作要求进行,结果见表 1

表 1 TAL 灵敏度复核结果

TAL批号	标示灵敏度 (λ <sub>b</sub> )Eu/ml	内毒素浓度							复核结果(λ <sub>c</sub> )
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	NC	
0012111	0.25	++++	++++	-----	-----			--	0.25
0012131	0.125		++++	++++	-----	-----		--	0.125
0101082	0.06			++++	++++	-----	-----	--	0.06

复核灵敏度 λ<sub>c</sub> = λ<sub>b</sub>,表明各批 TAL 灵敏度标示符合规定。

## 2.2 肝素钠对细菌内毒素检查的干扰评价试验<sup>[1]</sup>

### 2.2.1 样品内毒素理论限值的计算

本品热原检查的免注射剂量(M)为:1 000 U/ml,2ml/kg(2000 版药典),细菌内毒素阈值(K)为 5.0 Eu/kg,则细菌内毒素理论限值(L)为:

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5\text{Eu/kg}}{1000\text{U/ml} \times 2\text{ml/kg}} = 0.0025\text{Eu/U}$$

2.2.2 样品稀释:若称取样品 0.1g + 5ml 水溶解,则样品始浓度(C)为:20 mg/ml,以鲎试剂灵敏度 0.5 Eu/ml 为基准,计算出相应的最大有效稀释(MVD),并以此为样品基准稀释倍数:

$$\text{MCD}_{0.5} = \frac{L \times C}{\lambda} = \frac{0.0025\text{Eu/U} \times 20\text{mg/ml} \times 150\text{U/mg}}{0.5\text{Eu/ml}} = 15(\text{倍})$$

则 MVD<sub>0.25</sub>、MVD<sub>0.125</sub>、MVD<sub>0.06</sub>、MVD<sub>0.03</sub> 分别为 30、60、120、240 倍(记为 MVD<sub>30</sub>、MVD<sub>60</sub> …)。

用水将样品按以上倍数稀释,得样品的浓度系列溶液,即:1:15,1:30,1:60,1:120,1:240,记此系列溶液为 SW。

2.2.3 另制备一同样浓度系列的样品溶液,但在制备过程中加入内毒素,使每一浓度的样品溶液均含有 2λ<sub>b</sub> 浓度的内毒素,记此系列溶液为 SE。

2.2.4 选灵敏度  $\lambda_b$  为 0.25Eu/ml 的 TAL, 分别与 SW 和 SE 两个系列稀释液反应, 依次记为 NPC 和 PPC。每一反应重复两管, 结果见表 2。

表 2 肝素钠干扰评价试验

TAL	项目	样品稀释倍数					干扰性质
		15	30	60	120	240	
$\lambda_b = 0.25$ Eu/ml	NPC	--	--	--	--	--	
	PPC	--	--	--	--	--	抑制

2.3 抑制作用的消除:  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  等二价阳离子能激活凝固酶原引起 TAL 的凝聚反应, 肝素钠与  $Mg^{2+}$  络合形成稳定的络合物, 减少 TAL 激活因子——游离态  $Mg^{2+}$  的浓度, 使反应钝化。

2.3.1 消除抑制作用的试验: 使用稀释剂 (I) 代替 BET 水稀释样品, 重复 2.2 试验。

表 3 消除抑制作用的试验

TAL	项目	样品稀释倍数				
		15	30	60	120	240
$\lambda_b = 0.25$ Eu/ml	NPC	--	--	--	--	--
	PPC	--	--	++	++	++

### 2.4 干扰试验

表 3 的试验结果表明, 样品在使用稀释剂 (I) 稀释样品, 稀释 60 倍时已基本消除其抑制作用, 但还需进一步作干扰验证, 干扰验证试验按 2000 版药典方法进行。MVD<sub>60</sub> 对应的 TAL 灵敏度为 0.125 Eu/ml, 即需选用  $\lambda$  为 0.125Eu/ml 的 TAL 作干扰试验。

2.4.1 用水将内毒素标准品稀释成  $2\lambda_b$ 、 $\lambda_b$ 、 $0.5\lambda_b$  和  $0.25\lambda_b$  的内毒素系列溶液, 即 0.25、0.125、0.06、0.03Eu/ml, 记为 E 系列。

2.4.2 用稀释剂 (I) 将样品 (20 mg/ml) 稀释 60 倍, 用此样品溶液稀释内毒素标准品, 使其浓度与 2.4.1 相同, 记为 E/S 系列。

2.4.3 使用  $\lambda$  为 0.125 Eu/ml TAL 与上述两系列内毒素反应, 结果见表 4。

表 4 干扰试验

5mm TAL	内毒素	0.25	0.125	0.06	0.03	NC	$\lambda$
0012131	E 系列	++++	++++	-----	-----	--	$\lambda_c = 0.125$
0012131	E/S 系列	++++	++++	+++	----	--	$\lambda_s = 0.09 > 0.5\lambda_b$

### 3. 讨论

3.1 第 2.2 节实验的目的是评价样品浓度对 TAL 与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质, 以便初步筛选出对检查无干扰的样品浓度范围。从表 2 的反应结果看到, 样品对 TAL 的凝集反应的干扰性质为抑制作用, 其抑制原因主要是肝素钠络合 TAL 中的二价阳离子从而抑制凝集反应, 且其抑制作用较强, 即使把样品稀释至 MVD<sub>240</sub> 也不能消除其干扰。

3.2 从表 3 可以看到, 样品经用稀释剂 (I) 稀释至 60 倍后才能出现阳性反应, 这表明稀释剂可补充其络合作用损失的二价阳离子而消除其干扰作用, 但肝素钠浓度较浓时即使补充足量的二价阳离子也达不到消除作用的目的。

3.3 从表 4 的结果看到,  $\lambda_s = 0.09\text{Eu/ml} > 0.5\lambda_b$ , 符合无干扰条件, 故认为肝素钠原料经适当稀释, 并补充一定量的二价阳离子, 可消除其对细菌内毒素检查的抑制作用。

3.4 综上所述, 肝素钠原料可以作细菌内毒素检查。

### 参考文献:

- [1] 鲎试剂应用技术, 湛江安度斯生物公司 1997.4
- [2] 中国药典, 2000 版 二部, 附录 86
- [3] 朱焕杰等, 稀释剂 (I) 消除枸橼酸钠对细菌内毒素检查干扰, 药物分析杂志增刊
- [4] James F. Cooper, 鲎试验干扰的消除, 湛江安度斯生物有限公司, 鲎试剂应用与进展



## 湛江安度斯生物有限公司简介

湛江安度斯生物有限公司是由美国著名的鲎试剂企业 C R Endosafe 公司在华投资建立的高科技企业,专业生产鲎试剂及配套产品。C R Endosafe 公司是美国著名的三大鲎试剂生产企业之一,由鲎试剂创始人之一、国际知名的权威学者詹姆斯弗·库珀博士(Dr. James F·Cooper)创建。该公司现已成为美国鲎试剂(LAL)市场最大的供应商,其产品以良好的稳定性,广泛的适用性以及优越的抗干扰性能享誉国际医药工业界。

作为 Endosafe 公司在中国的分厂,湛江安度斯生物有限公司拥有一流的技术人才,先进的仪器设备,现代化的生物产品生产车间以及良好的生产环境:

- 一流的专业技术人才:65%职员具有生物化学、药学、冷冻等专业的学士或硕士学位;
- 先进的仪器设备:美国 Vurtis 公司最新一代的冷冻干燥机,控制产品残余水份 < 1% (中国标准 3%),确保试剂在三年有效期内非常稳定;日本 Wako 公司的细菌内毒素检测仪控制生产工艺和辅助标定试剂,确保每一批产品质量的均一性及标定的准确性;美国 Corning 公司的超纯水制备系统,使生产的无热原超纯水的水质纯度(电阻率) > 10M $\Omega$ ·cm,内毒素含量 < 0.001Eu/ml;美国 Cozoli 公司安瓿自动分装、充氮拉丝封口系统,取代落后的安瓿熔封工艺,确保分装的精确度 (<  $\pm$  1%)及封口的严密性。
- 现代化的生物车间及良好的生产环境:500M<sup>2</sup> 洁净度 10 万 ~ 100 级的生物车间,确保试剂的无菌。

多年以来,湛江安度斯公司为促进中国鲎试剂的应用与发展作出了巨大的努力和贡献:

- 中国药典细菌内毒素检查法所增添的内容,如干扰试验的应用,旋涡混合器的使用、定量检测技术的应用等,均是本公司积极倡议的结果;
- 中国第一批鲎试剂的国家参考品是由我公司于 94 年制备生产;现用的第二批参考品在中检所组织的公开招标之下,我公司又是一举夺标,于 98 年成功地制备出产;
- 现用的内毒素国家标准品 Lot98 - 1(9000Eu 效价)也是在本公司分装生产;
- 1995 年世界卫生组织(WHO)邀请全球 13 个国家 26 名专家参与第二批内毒素国际标准品的协作标定研究,本公司的冯聚锦高级工程师荣幸受邀,并受到 WHO 的表彰,中国同时被邀请参与研究的还有中检所周海钧所长、夏振民研究员;
- 应美国药典公约组织(USPC)、美国食品药品监督管理局(FDA)以及 C R Endosafe 公司的邀请,国家药典会、中检所有关人员一行四人由本公司冯聚锦总经理陪同于 98 年 1 月 16 ~ 27 日,对美国进行了为期 10 天的访问考察。此行对我国的细毒素检查法与国际接轨有很大的促进作用。

湛江安度斯公司严格实施 GMP 及 ISO9002 标准管理,采用 Endosafe 公司的先进工艺技术生产高品质的中国鲎试剂(TAL),产品面向中国及全球市场。本公司将一如既往地全力为用户提供全方位的技术支持和尽善尽美的售后服务。