

鲎试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 1997年第1期(总第1期) 1997年12月15日

创 刊 词

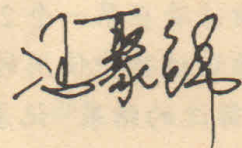
我们很早就想办一份刊物——属于鲎试剂用户的刊物。今天，这份刊物终于与大家见面了。我们把它命名为《鲎试剂应用与进展》。

鲎试剂真是个奇妙的东西！它是大自然对人类的厚赐，也是我们科学前辈的智慧的结晶。它的问世，为人类消除细菌内毒素的威胁提供了最有效的武器，给制药工业带来了难以估量的效益。今天，人们仍在继续研究和发展它的应用，以鲎试剂为主角的细菌内毒素检查法取代以兔子为主角的热原检查法已经成为药检发展的趋势之一。

广大鲎试剂用户都希望对鲎试剂的应用以及它的发展有更多的了解。鲎试剂的应用涉及的领域很多，如医药工业、药品检查、临床检查、环境保护、食品卫生甚至电子工业。本刊旨在为鲎试剂用户提供鲎试剂在制药工业及药检方面应用与发展的信息，开设的栏目有：进展综述、经验交流、法规的理解与讨论、鲎试剂研究与发展、译文及专利、专题讲座、文献题录、文摘、学术交流动态以及新产品介绍。我们希望本刊的出版能够满足广大鲎试剂用户对信息的部分需求，为广大同仁提供一个从事鲎试剂应用研究的论坛，成为服务于广大鲎试剂用户的园地。

本刊是刚破土的幼苗，我们衷心希望广大鲎试剂用户能够接受它，关心它，扶持它，使它能够在学术自由的沃土中茁壮成长。

湛江安度斯生物有限公司



一九九七年十一月二十八日

药品与鲎试剂相容性的初步筛选

James F. Cooper

许多国家已要求对大体积注射液 (LVP) 和抗生素作细菌内毒素检查。Endosafe 所研制出的鲎试剂具有良好的抗干扰能力, 非常适用于小体积注射剂 (SVPs) 的检查, 如注射用抗生素、抗凝剂和治疗心脏病、高血压及镇痛的高效药物。内毒素检查代替热原检查的方法转换和确认包括稀释的计算和鲎试剂抑制试验。下表标题为“从热原检查到鲎试验的转换”这是建立有效的鲎试验的首要步骤。

图表说明:

- 1、药品名称及含量, 须填入药品法定名称和药品浓度或无菌干粉量 (重量、效价、或其它量值)。
- 2、溶解后浓度, 这一栏适用于无菌粉剂和冷冻干燥制品, 将药品按说明溶解后所得出的浓度填入本栏, 对于液体药品无需填写。
- 3、M, 指每小时人体最大的注射剂量, 可从填入法定剂量或根据药品说明填写。
- 4、L, 大多数 L 值可从在美国药典或 FDA 指南中查到, 对于新药可用 $\frac{K}{M}$ 的公式计算出。
- 5、 λ , 鲎试剂的标示灵敏度, 该值由鲎试剂生产商标示;
- 6、MVC 用于以 mg 或效价单位 (U) 表示剂量的注射用药, 通常这些药品具有复杂的配方, 在用鲎试剂检查时须稀释。MVC 不用于医疗器械浸出液和输注液。
- 7、MVD 这项可用于所有注射用药品, 对于输液可用 L 与 λ 计算得出, 而小体积注射剂则由药品浓度和 MVC 计算出;
- 8、设计药品与鲎试剂相容性的筛选试验, 通过对一系列药品浓度的试验, 选出对鲎试验无干扰的浓度。以下指南适用于使用 Endosafe® 的鲎试剂检查一些常规药品。输注液可选用一系列二倍稀释系列, 稀释到半最大有效稀释 (HMVD)^①。抗生素和其它 SVPs 选用从 2mg 开始的二倍稀释系列。不同的药品对鲎试剂配方中 PH 缓冲剂的影响也会引起相容性差异。
 - a, 抗生素通常在 1~10mg/ml 范围内相容;
 - b, 青霉素类通常在 5 千~2 万单位/ml 范围相容;
 - c, 白蛋白及其它生物制品通常低于 1mg/ml 才相容;
 - d, 其它 SVP 制品在低于 2mg/ml 时均可相容;
 - e, 输注液在第一个 2 倍稀释浓度相容。
- 9、初步筛选试验中使用的内毒素系列稀释液^②, 须经检查确定其有效性。
- 10、初步筛选的结果^③记录在此处。药品用高质量水稀释, PPC 稀释系列是药品与内毒素系列溶液的稀释液, 含有 2 λ 的内毒素。
- 11、输注液和医疗器械浸出液的有效浓度范围是从最低的相容稀释到 MVD, 其它注射剂是

从最高的相容浓度到 MVC^④。

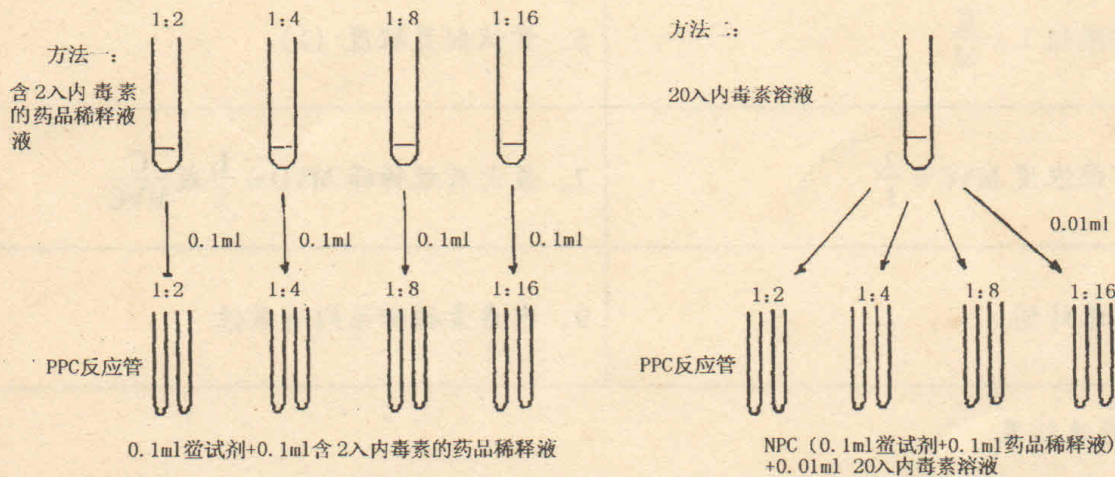
12、日常测试浓度 (TC) 由检验人员自己选定, 最好是选择一个方便的稀释倍数或接近 HMVD 的稀释倍数。

13、PSS^⑤ 用于记录一个限量检查的结果。例如, 某种输注液在 HMVD 浓度作限量检查的结果为阴性 (1:4 的稀释, 使用 0.06Eu/ml 的鲎试剂), 则记录为 “<0.25Eu/ml”。

译者注:

①半最大有效稀释 HMVD (Half of the Maximum Valid Dilution) 是最大有效稀释 MVD 一半的稀释, 欧州药厂通常选用 HMVD 来作内毒素检查。

②内毒素系列溶液——在作 PPC 时一般有两种制备方法: 一是制备含 2λ 内毒素的各浓度药品系列; 二是在 NPC 的各浓度药品与鲎试剂的反应体系中加入少量高浓度内毒素溶液, 一般选用 0.01ml 20λ 浓度的内毒素加入 NPC 中, 体积上引起的误差可忽略不计。方法一中内毒素与药品的混合液虽可准确制备, 但有些药品如氨苄青霉素钠与内毒素混合后会使得内毒素的效价降低, 而方法二不会产生这种现象。



③初步筛选试验, 即相容性筛选试验可提供更多的信息, 假设表二中结果如下

样品浓度 mg/ml	10	5	2	1	0.5	0.3
NPC	--	++	--	--	--	--
PPC	--	++	++	++	++	++
稀释	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	MVD

本例中浓度为 5mg/ml 时 NPC 阳性可得出此样品内毒素含量大于 $0.012\text{Eu/mg} \left(\frac{0.06\text{Eu/ml}}{5\text{mg/ml}} \right)$, 而 2mg/ml 时 NPC 阴性可判定内毒素含量小于 $0.03\text{Eu/mg} \left(\frac{0.06\text{Eu/ml}}{2\text{mg/ml}} \right)$; 不同的鲎试剂在同样的试验条件下可能会有不同的结果, 假设选用另一厂商的 0.06Eu/ml 鲎试剂得如下结果,

样品浓度 mg/ml	10	5	2	1	0.5	0.3
NPC	--	--	--	--	--	--
PPC	--	--	++	++	++	++

稀释 1:10 1:20 1:50 1:100 1:200 MVD

从这个结果中只能得出内毒素含量小于 $0.03\text{Eu}/\text{mg}$ 。 ($\frac{0.06\text{Eu}/\text{ml}}{2\text{mg}/\text{ml}}$, 因为 PPC 在 $2\text{mg}/\text{ml}$ 处才出现阳性, 表明从此浓度起开始无干扰。) 鲎试剂这种相容性的差异使鲎试剂检查内毒素的能力有优劣之分。对于同一厂家的鲎试剂原则上应没有相容性的差异, 即批次之间相容性相同, 这也是建立干扰试验的前提条件。

从热原检查到鲎试验的转换

表一

1、药品名称、浓度 (C) 或干粉重量						
2、溶解后浓度 (C)			3、最大人体剂量 (M)			
4、内毒素限值 $L = \frac{K}{M}$			5、鲎试剂灵敏度 (λ)			
6、最低有效浓度 $MVC = \frac{\lambda}{L}$			7、最大有效稀释 $MVD = \frac{L}{\lambda}$ 或 $\frac{C}{MVC}$			
8、初步筛选计划			9、内毒素稀释系列有效性			
10、初步筛选结果						
浓度						
NPC						
PPC						
稀释度						
11、有效的浓度/稀释度范围			12、日常检测浓度 (TC)			
13、产品特征灵敏度 $PSS = \frac{\lambda}{TC}$						

从热原检查到鲎试验的转换

表二

1、药品名称、浓度 (C) 或干粉重量 头孢抗生素 注射用无菌粉末 2g/瓶 20ml 水溶解						
2、溶解后浓度 (C) 100mg/ml			3、最大人体剂量 (M) 25mg/kg			
4、内毒素限值 $L = \frac{K}{M}$ 0.2Eu/mg			5、鲎试剂灵敏度 (λ) 0.006Eu/ml			
6、最低有效浓度 $MVC = \frac{\lambda}{L}$ 0.3mg/ml			7、最大有效稀释 $MVD = \frac{L}{\lambda}$ 或 $\frac{C}{MVC}$ 1:330			
8、初步筛选计划 测试低于 10mg/ml 的浓度			9、内毒素稀释系列有效性 有效			
10、初步筛选结果						
浓度 (mg/ml)	10	5	2	1	0.5	0.3
NPC						
PPC						
稀释度	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	MVD
11、有效的浓度/稀释度范围 2 ~ 0.3mg/ml			12、日常检测浓度 (TC) 1mg/ml (1:100)			
13、产品特征灵敏度 $PSS = \frac{\lambda}{TC} = \frac{0.06Eu/ml}{1mg/ml} = 0.06Eu/mg$						

从热原检查到鲎试验的转换

表三

1、药品名称、浓度 (C) 或干粉重量 5%右旋糖酐注射液						
2、溶解后浓度 (C) NA			3、最大人体剂量 (M) 10ml/kg			
4、内毒素限值 $L = \frac{K}{M}$ 0.5Eu/ml			5、鲎试剂灵敏度 (λ) 0.06Eu/ml			
6、最低有效浓度 $MVC = \frac{\lambda}{L}$ NA			7、最大有效稀释 $MVD = \frac{L}{\lambda}$ 或 $\frac{C}{MVC}$ $0.5Eu/ml / 0.06Eu/ml = 8$			
8、初步筛选计划 测试连续三个 2 倍稀释			9、内毒素稀释系列有效性 有效			
10、初步筛选结果						
浓度 NA						
NPC						
PPC						
稀释度	1:2	1:4	1:8			
11、有效的浓度/稀释度范围 至 1:8 稀释			12、日常检测浓度 (TC) 0.25 比例 (1:4)			
13、产品特征灵敏度 $PSS = \frac{\lambda}{TC} = \frac{0.06Eu/ml}{0.25} = 0.25Eu/ml$						

从热原检查到鲎试验的转换

表四

1、药品名称、浓度 (C) 或干粉重量 注射用硫酸庆大霉素 40mg/ml						
2、溶解后浓度 C NA			3、最大人体剂量 (M) 3mg/kg			
4、内毒素限值 $L = \frac{K}{M}$ 1.7Eu/mg			5、鲎试剂灵敏度 (λ) 0.6Eu/ml			
6、最低有效浓度 $MVC = \frac{\lambda}{L}$ 0.035mg/ml			7、最大有效稀释 $MVD = \frac{L}{\lambda}$ 或 $\frac{C}{MVC}$ 1:1140			
8、初步筛选计划 测试 4mg/ml 以下的浓度			9、内毒素稀释系列有效性 有效			
10、初步筛选结果						
浓度 (mg/ml)	4	2	1	0.4	0.2	0.04
NPC						
PPC						
稀释度	1:10	1:20	1:40	1:100	1:200	MVD
11、有效的浓度/稀释度范围 从 1 到 0.04mg/ml			12、日常检测浓度 (TC) 0.4mg/ml (1:100)			
13、产品特征灵敏度 $PSS = \frac{\lambda}{TC} = \frac{0.06Eu/ml}{0.4mg/ml} = 0.015Eu/mg$						

(刘冰译 冯聚锦校)

环境内毒素与脂多糖的致热性比较

Frederick C. Pearson

当药品生产者使用精制内毒素比较热原检查 (RPT) 和细菌内毒素检查 (BET) 时, 得出精制内毒素的临界致热剂量 (TPD) 为 1ng/kg , 大约相当于 5.0Eu/kg 。据此国家药品生物制品中心建立以 5.0Eu/kg 作为药品生物制品的内毒素阈剂量 (K), 若兔法剂量为 10ml/kg 则 K 值也可以 0.5Eu/ml 表示。近来, 我们实验室的工作显示用鲎试剂测定的含有 10 倍于 K 值的环境内毒素样品仍不能引起按美国药典 (USP) 的 RPT 不合格, 环境内毒素 (EET) 含量超过 10Eu/kg 剂量的样品有 90% RPT 合格, 饮用的自来水也作了 BET 和 RPT 的平行试验, 结果 40Eu/kg 时兔法仍为合格, 偶而 $80 \sim 500\text{Eu/Kg}$ 也能通过 RPT, 由这些数据及本文其它数据, 得出 5Eu/kg 的限值至少有 10 倍的安全系数。

内毒素是一种存在于革兰氏阴性菌细胞外膜的高分子量复合物, 是非经肠道用药及医疗器械中最主要的热原物质。内毒素普遍隐蔽于它们的外部环境如水、空气、各种原料。天然产生的环境内毒素 (EET) 包括脂、多糖、蛋白及其它杂质, 而用于试验的内毒素是经纯化的仅包含脂和多糖两部分, 近来出于强调内毒素的化学构成而称其为脂多糖 (LPS)。通过 USP 的 RPT 与 BET 比较发现 EET 比纯化的 LPS 明显缺乏致热性; 原料药、中间产品及生产用水分别作了上述两种检查法的比较, 结果显示 EET 与 LPS 有很大的不同, 现行的 K 值 5Eu/kg 至少有八倍的安全系数; 其它研究显示从大肠杆菌中制备的 LPS 1ng/kg 即可引起人或兔发热, 而未经纯化的假单胞菌内毒素需 14.0ng/kg 才能引起临界热原反应, 这个发现同样证实 USP 和 FDA 建立的 K 值具有很高的安全系数, 人血清白蛋白在用 USP 的 RPT 与 BET 比较分析中发现 $12 \sim 60\text{Eu/kg}$ 的剂量有 94% 通过 RPT, 近来经合作研究建立的 USP 参考内毒素 (RES) 的 ED_{50} 为 10.3Eu/kg , 如果环境内毒素与 LPS 是可比的, 那么白蛋白样品超过 12Eu/kg , 将不会通过 USP 的 RPT, 而事实并非如此。

鲎试剂的灵敏度是用 LPS 标定的, 因此 LPS 用鲎试剂和家兔来检查都具有可靠性, 而 EET 的检查则显示出鲎试剂过于灵敏, 这使 FDA 和 USP 在建立内毒素阈值 (K) 时面临严肃的问题, 在 USPXX 版增补中 0.25Eu/ml , 2.5Eu/kg 限值曾经被采用。EET 与 LPS 的关系及它们用鲎试剂检查时的特殊反应行为犹为重要, 特别当鲎试剂用作为终产品检查时; 本文将详细讨论这些问题。

LPS 的致热性

有关精制 LPS 的一些研究概要见表 1, 遗憾的是大多数数据是在内毒素单位 (EU) 使用前采集的, 因而仍采用重量单位 ng/kg 表示, 不过这些数据可以被转换, 例如 EC-2, 1ng 约为 5Eu , 其 ED_{50} 为: 6.85Eu/kg , 热原反应剂量范围可以被记为 5.2 到 8.95Eu/kg , 同理 Ecoli 055: B5、Ecoli 127: B8 的效价也可以转化为 EU, 但根据 USP 和 FDA 的要求, 这种转换需经过 LPS 与 RSE 的实验比较才可以确定。

表 I

精制脂多糖	热原反应 (ng/kg)	致热剂量范围 (mg/kg)	参考文献
大肠杆菌 (Ecoli)	1.0^a	--	2
痢疾志贺氏菌	2.0^a	--	7

大肠杆菌 055:B5	1.57 ^b	0.98 ~ 3.09	8
Ecoli 0113 (EC-2)	1.37 ^b	1.04 ^a ~ 1.79	9
Ecoli 127:B8	1.43 ^b	1.06 ~ 2.24	10
Ecoli 055:B5	1.26	0.93 ~ 2.64	11
痢疾志贺氏菌	2.43	1:39 ~ 3.94	11
Ecoli 127:B8	1.3	0.90 ~ 1.90	12
Ecoli (EC-5)	10.3Eu/kg ^c	2.5 ~ 40Eu/kg	4

a、临界致热剂量 TPD

b、ED₅₀, 兔法试验中可以引起半数兔子致热的内毒素剂量

c、内毒素单位 1EU = 0.194ng 的 EC-2 参考内毒素。

表 I 中 EC-2 的 ED₅₀ 为 1.37ng/kg, Ecoli055:B5、Ecoli127:B8 的 ED₅₀ 分别为 1.57, 1.43ng/kg, 根据 EC-2 的效价 5Eu/ng 这些 LPS 的 ED₅₀ 均小于 1Eu/kg, 而 EC-5 的 ED₅₀ 却为 10.3Eu/kg, 因此 TPD 对于人体热原反应可能是更有意义的测量方式, TPD 是用大量兔子在较宽的内毒素剂量范围内所测出的 LPS 致热剂量。

表 I 中 EC-2 的 TPD 是 1.04ng/kg 或 5.2Eu/kg 这与 FDA 建立的 5Eu/kg 内毒素阈值非常接近。以下我们将讨论环境内毒素 (EET), 我们发现 EET 的 TPD 明显高于 LPS 的 TPD。

环境内毒素的致热性

本地的环境内毒素测试

在表 II 中我们可以看到 Travenol 公司在国内几个分厂的工艺用水和原料的 BET 与 RPT 的比较, 因为 BET 阳性的样品经常免法合格, 因而使大规模的比较研究得以实现。这些数据是在六年间所收集的 684, 062 个样品中得出的, 其中 860 个剂量为 2.5 ~ 10Eu/kg 的样品 98% 可以通过 USP 的 RPT, 另外 140 个内毒素剂量为 10Eu/kg 的样品仍有 90% 通过 8 只兔子的复测。这些发现导致我们在跨国公司范围进行世界范围的样品收集来继续类似的试验。表 III 中 2.5 ~ 10.0Eu/kg 剂量, 98.5% USP 的 RPT 合格, 大于 10Eu/kg 仍有 94.1% 合格; 此后我们对自来水中的 EET 也作了 BET 与 USP RPT 比较, 表 IV 显示大多数 1 ~ 4Eu/ml 的样品 RPT 合格, 而 USP 中用 RSE 确定的内毒素限值为 0.5Eu/ml, 尽管当内毒素剂量大于 40Eu/kg 时兔法检查经常不合格, 但一些 80Eu/kg、500Eu/kg 的剂量却偶而通过 RPT; 由此得出, 5Eu/kg 的热原限值至少有 8 倍的安全系数。

表 II 从 1977 到 1982 国内 Tvarenol 公司采集的 BET 阳性样品再用 8 只兔子测试的结果比较

鲎试剂测试阳性 Eu/kg	样本数	兔法热原检查 (RPT)	
		合格数 %	不合格数 %
2.5 ~ 10.0	860	843 (98)	17 (2)
> 10.0	140	126 (89)	15 (11)

表 III 1980 年 Travenol 公司国外分厂采集的 BET 阳性样品再用 8 只兔子测试的结果比较

鲎试剂测试阳性 Eu/kg	样本数	兔法热原检查 (RPT)	
		合格数 %	不合格数 %
2.5 ~ 10.0	67	66 (98.5)	1 (1.5)
> 10.0	18	17 (94.1)	1 (5.9)

表IV

自来水中 EET 的热原性与 LAL 检出的内毒素含量比较

内毒素浓度 (Eu/ml)	USP 兔法剂量 (Eu/kg)	USP 兔法检查结果
1	10 ^b	合格
1	10	合格
1	10	合格
1	10	合格
2	20	合格
4	40	合格
4	40	合格
4	40	合格
4	40	合格
4	40	合格
4	40	不合格
8	80	合格
8	80	不合格
8	80	不合格
12.5	125	不合格
25	250	不合格
31	310	不合格
50	500	合格
50	500	不合格
50	500	不合格
100	1000	不合格
200	2000	不合格
400	4000	不合格

海水是 EET 的另一重要的来源，它孕藏多种未知的革兰阴性菌，这是许多重要天然内毒素的源泉，表 V 中三个来源于海水的样品内毒素浓度为 64 到 128Eu/ml，以 30、60、120Eu/kg 剂量分别作 RPT，仅最后一个剂量没能通过；在图 1 中对比了 10Eu/kg 剂量的 Ecoli055:B5 和 130Eu/kg 的海水 EET 样品的免升温曲线，曲线的极其相似，意味着 Ecoli055:B5 与 13 倍于其内毒素含量的海水 EET 具有同样的致热性，这一研究结果与自来水的研究相一致；同样的平行试验被用于 piromen[®]——一种经消化的假单胞菌，采用测量吸光度的 BET 法分析这种样品，结果显示其富含内毒素；但用 RPT 测试时，当内毒素剂量大于 250ng/kg 约 1250 ~ 2500Eu/kg 才能引起热原反应，在此处，FDA 的 5Eu/kg 似乎有 250 倍的安全系数。

表 V

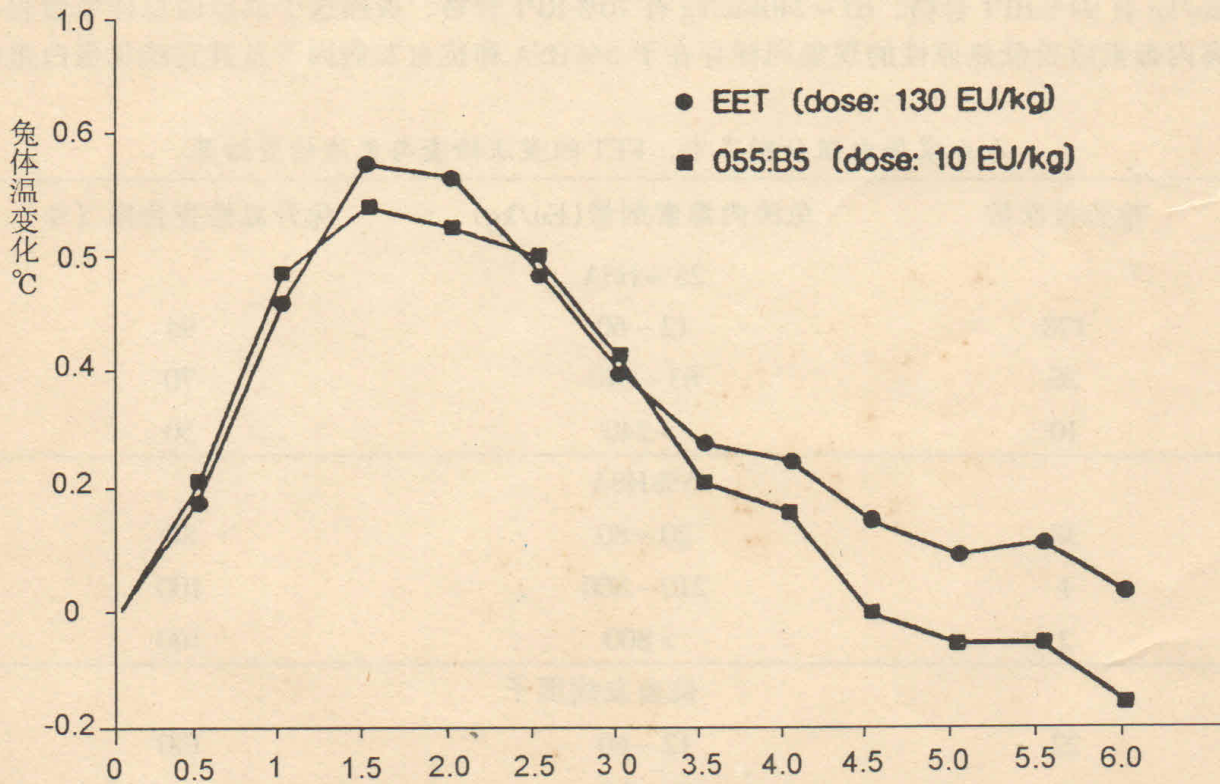
海水中 EET 的 BET 与 RPT 比较

内毒素浓度 (Eu/ml ^a)	剂量 (Eu/kg)	三只兔子总升温 (°C)
64	30	0.6
	60	1.1
	120	1.8
64	30	0.1
	60	0.6
	120	2.2
128	30	0.4
	60	0.8
	120	1.9

a、用鲎试剂测得的内毒素浓度

b、USP 规定三只兔子总升温大于 1.4°C 为不合格

图一 大肠杆菌 O55:B5 和海水 EET 的兔升温曲线



兔体温变化，为三只平行试验的家兔的平均体温变化

表 VI Piromen[®] (假单胞菌) 的 BET 与 RPT 比较

兔法剂量 ng/kg ^a	吸光度 O、D		阴性对照 吸光度			8只兔子 总升温℃	
1000	1.245	1.247	1.351 ^b	.086	.095	.083	+6.5
500	1.260	1.257	1.301	.123	.095	.093	+4.7
250	1.142	1.123	1.268	.070	.067	.080	+2.3
125	1.226	1.179	1.217	.071	.062	.070	+1.1
62.5	1.275	1.356	1.397	.075	.074	.071	+1.2
31.3	1.111	1.241	1.198	.075	.066	.079	+0.8
15.6	1.266	1.155	0.920	.065	.056	.070	+2.1

含有 EET 的人血白蛋白和其它血浆蛋白组分制品的内毒素检查为阳性的样品, 仅少数热原检查不合格; 表 7 中, 178 批制成品 25% 白蛋白 (HSA) 用 BET 法和 USP 的 RPT 法测试, 其中 12-60Eu/kg 有 94% RPT 合格, 63~240Eu/kg 有 70% RPT 合格, 虽然这个试验的总样本数较小, 但 EET 高内毒素效价低热原性的现象同样存在于 5% HSA 和抗血友病因子及其它纯化蛋白组份制品中。

表 VII 人血浆蛋白组分制品中, EET 的鲎法检查与兔法检查结果

检查批次数	兔法内毒素剂量 (Eu/kg)	兔升温检查合格 (%)
	25% HSA	
178	12 ~ 60	94
26	63 ~ 240	70
10	> 240	50
	5% HSA	
38	20 ~ 80	80
1	210 ~ 800	100
2	> 800	100
	抗血友病因子	
22	12 ~ 60	100
44	63 ~ 240	96
4	> 240	75
	纯蛋白组份	
7	40 ~ 200	100
0	210 ~ 800	--
1	800	100

(下转第 20 页)

红花注射液细菌内毒素检查方法的研究

韦群 陈瑜 朱焕杰 冯聚锦 (湛江 524022 湛江安度斯生物有限公司)
 贾雪¹ (山西 030006 山西华卫制药厂))

摘要: 通过干扰评价试验证明红花注射液对细菌内毒素检查法有显著的抑制作用。将样品作适当的稀释 (1:40), 使用 $\lambda = 0.06\text{Eu/ml}$ 鲎试剂可消除其对检查的干扰。

关键词: 红花注射液 细菌内毒素检查 干扰试验

红花注射液为中药注射剂, 在临床上应用较广泛。该品种规定的检查项是热原检查。本文通过实验探讨以细菌内毒素检查法取代热原检查法检测红花注射液的可行性。

1 实验材料

- 1.1 红花注射液: 水浸提工艺, 山西华卫制药厂产品, 液体制剂, 5ml/支, 含红花 2.5g。
- 1.2 鲎试剂 (TAL): 湛江中美生物有限公司产品, 0.1ml/支, 批号见表 1。
- 1.3 国家内毒素标准品 (RSE): 批号 96-2, 效价: 7200Eu/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 (以下简称水): 湛江中美生物有限公司产品, 批号 970307, 内毒素含量 $< 0.015\text{Eu/ml}$ 。
- 1.5 细菌内毒素检查用具一套, 按规定除热原。

2 实验方法与结果

2.1 TAL 标示灵敏度 (λ_b) 复核试验按细菌内毒素检查法操作, 结果见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核结果

TAL 批号	λ_b Eu/ml	内毒素浓度 (Eu/ml)					NC	λ_c
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03		
970424	0.25	++++	++++	-----	-----		--	0.25
970411	0.125		++++	++++	-----	-----	--	0.125
940610	0.06			++++	++++	-----	--	0.06

复核灵敏度 $\lambda_c = \lambda_b$, 表明各批 TAL 灵敏度标示符合规定。

2.2 红花注射液对细菌内毒素检查的干扰评价试验^[1]

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 2ml/kg, 细菌内毒素阈值 (K) 为 5.0Eu/kg, 细菌内毒素理论限值 (L) 为:

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5.0\text{Eu/kg}}{2\text{ml/kg}} = 2.5\text{Eu/ml}$$

2.2.2 样品稀释

以鲎试剂灵敏度 0.5Eu/ml 为基准, 计算出相应的最大有效稀释 (MVD), 并以此为样品的基准稀释倍数:

$$MVD = \frac{L}{\lambda} = \frac{2.5Eu/ml}{0.5Eu/ml} = 5 \text{ 倍}$$

用水将样品以基准倍数为起点，等倍往下稀释，得样品的浓度系列溶液，即 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 和 1:80，记此系列溶液为 S_w 。

- 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都含有 $2\lambda_b$ 浓度的内毒素。记此系列溶液为 S_E 。
- 2.2.4 选灵敏度 λ_b 为 0.25Eu/ml 的 TAL，分别与 S_w 和 S_E 两个系列稀释液反应，依次记为 NPC 和 PPC。试验重复两管，结果见表 2。

表 2 红花注射液干扰评价试验结果

TAL	项目	样品稀释倍数				
		5	10	20	40	80
970424	NPC	--	--	--	--	--
$\lambda_b = 0.25$	PPC	--	--	++	++	++

2.3 干扰试验

表 2. 的试验结果表明，PPC 项在样品的 20 倍稀释 (MVD_{20}) 处开始出现阳性结果， MVD_{20} 所对应的 TAL 灵敏度为 $\lambda = \frac{L}{MVD_{20}} = \frac{2.5Eu/ml}{20} = 0.125Eu/ml$ ，即需要使用 $\lambda_b = 0.125Eu/ml$ 的 TAL 作干扰试验。干扰试验按中国药典 95 版细菌内毒素检查法的供试品干扰试验项进行。

- 2.3.1 用水将内毒素稀释成 $2\lambda_b$, λ_b , $0.5\lambda_b$ 和 $0.25\lambda_b$ 浓度的系列内毒素溶液，即 0.25, 0.125, 0.06, 及 0.03Eu/ml。
- 2.3.2 取三批经热原检查合格的样品，分别作 1:20 稀释，用这些样品稀释液分别复溶 TAL，然后与系列内毒素溶液反应；另作以水复溶 TAL 与同样的内毒素溶液反应的比较。试验重复两管，结果见表 3。

表 3. 红花样品 1:20 稀释液的干扰试验结果

TAL	TAL 复溶液	内毒素溶液 (Eu/ml)				NC	λ'_c
		0.25	0.125	0.06	0.03		
970411	红花 970123	++	++	--	--	--	0.125
	红花 970124	++	++	--	--	--	0.125
λ_b	红花 960322	++	--	--	--	--	0.25
0.125	水 970307	++	++	--	--	--	0.125

2.4 样品细菌内毒素检查与热原检查的比较试验

- 2.4.1 将 5 批红花注射液样品用水分别作 1:20 稀释，使用 $\lambda_b = 0.125Eu/ml$ 的 TAL 按细菌内毒素检查法进行检查，同时增加 1 支阳性产品对照管 (PPC, 即 0.1mlTAL + 0.1ml 含 $2\lambda_b$ 浓度内毒素的样品稀释液。此反应结果应为阳性，否则检查无效)。
- 2.4.2 将上述同样 5 批样品用水分别作 1:40 稀释，使用 $\lambda_b = 0.06Eu/ml$ 的 TAL 重复 2.4.1 的检查。
- 2.4.3 对上述同样 5 批样品作热原检查。

两种方法检查结果见表4。

表4. 五批红花注射液的细菌内毒素检查与热原检查结果

TAL		红花注射液		细菌内毒素检查						热原检查
批号	λ_b	批号	MVD	S	S	PC	PPC	NC	结果	
970411	0.125	970424	1:20	-	-	+	+	-	合格	不合格
		970123		-	-	+	+	-	合格	合格
		950928		+	+	+	+	-	不合格	不合格
		970114		-	-	+	+	-	合格	合格
		970124		-	-	+	+	-	合格	合格
940610	0.06	970424	1:40	+	+	+	+	-	不合格	不合格
		970123		-	-	+	+	-	合格	合格
		950928		+	+	+	+	-	不合格	不合格
		970114		-	-	+	+	-	合格	合格
		970124		-	-	+	+	-	合格	合格

3. 讨论

- 3.1 2.2 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 PPC 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，浓度越大，抑制越强，自 20 倍稀释以上，反应才出现阳性结果。这表明对红花注射液作内毒素检查，至少要作 20 倍的稀释。
- 3.2 从表 3 可看到，三批样品稀释 20 倍作干扰试验， λ'_c 都在 $0.5 \sim 2\lambda_b$ 内，按照干扰试验的判断方法，可认为样品在该浓度以下不干扰检查。但其中有一批样品 (960322) 的 $\lambda'_c = 0.25\text{Eu/ml} = 2\lambda_b$ ，即处于允许范围的边缘。
- 3.3 从表 4 看到，对 5 批样品作 1:20 稀释，使用 $\lambda_b = 0.125\text{Eu/ml}$ 的 TAL 作细菌内毒素检查，有 4 批结果与热原检查结果相符，1 批 (970424) 的结果不相符。对同样的 5 批样品作 1:40 稀释，使用 $\lambda_b = 0.06\text{Eu/ml}$ 的 TAL 作细菌内毒素检查，结果全部与热原检查结果相符。这说明某些批号的红花注射液在 1:20 稀释后，仍对 TAL 检查有轻微的抑制干扰，如果这些样品的内毒素含量在临界水平时，即接近内毒素限值的水平时，检查容易得出假阴性的结果。提高样品的稀释倍数 (如 1:40) 及选用更高灵敏度 (如 0.06Eu/ml) 的 TAL 作检查可以有效地消除样品对检查的干扰，得到与热原检查完全一致的结果。
- 3.4 2.4 的实验结果还表明，在做样品干扰评价试验 (如 2.2 的实验) 后，根据实验结果，应选择出现阳性结果所对应的样品浓度以下的浓度作进一步的干扰试验或内毒素 (限量) 检查。如 2.2 实验结果，PPC 反应在样品 1:20 倍稀释液处开始出现阳性结果，进一步的干扰试验或细菌内毒素检查应选择样品的 1:40 或 1:80 稀释。
- 3.5 综上所述，结论是：红花注射液可以由细菌内毒素检查取代热原检查；作细菌内毒素检查合适的样品浓度是 1:40 稀释，合适的 TAL 灵敏度值为 0.06Eu/ml 以下 (包括 0.06Eu/ml)。

参考文献

- [1] 鲎试剂应用技术，湛江安度斯生物有限公司，1997.4。
 [2] 中国药典 1995 年版第 2 部 附录 XIE

建议修订灭菌注射用水细菌内毒素限量

余方键 张国来 夏振民

(北京 100050 中国药品生物制品检定所)

中国药典 1995 年版正式收载了灭菌注射用水细菌内毒素检查法。根据 (97) 卫典业字第 057 号文件, 为有计划地做好细菌内毒素标准化工作, 更好的开展细菌内毒素检查方法学的研究, 落实中国药典 2000 年版工作, 我所放射药品室为配合细菌内毒素检查法正式为药典收载, 1995 年开始抽检全国各药厂生产的四大输液, 其中包括了灭菌注射用水。我室连续 3 个抽检四大输液工作的具体试验结果, 未发现灭菌用水有不合格产品 (内毒素限量为每毫升小于 0.5Eu)。我们从抽检的样品中取出一部分注射用水做了内毒素限量 $0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的试验, 未见阳性结果出现。根据本试验结果, 笔者提出修订灭菌注射用水细菌内毒素限量。

1 实验材料

1.1 鲎试剂 (970221, $\lambda = 0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$, 湛江中美生物公司), 中国药品生物制品所复核灵敏度符合规定, 装量: $0.1\text{ml}\cdot\text{支}^{-1}$ 。

1.2 细菌内毒素 (阳性对照): 批号 9702, $12\text{Eu}\cdot\text{支}^{-1}$ (中国药品生物制品检定所制备)。

1.3 细菌内毒素溶解用水: 规格 $10\text{ml}\cdot\text{支}^{-1}$ (中国药品生物制品检定所制备)。

1.4 所用玻璃器皿均经 240°C 2 h 干烤。

2 实验结果

灭菌注射用水细菌内毒素限量实验结果见表 1。

3 讨论

从上述结果说明我国目前灭菌注射用水质量能够满足细菌内毒素限量 $0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的技术要求。灭菌注射用水和氯化钠注射液及葡萄糖注射液在临床上用途各不相同, 氯化钠和葡萄糖注射液主要用于静脉滴注而灭菌注射用水

主要用于各种药物的溶剂, 3 种药物内毒素限量均为 $0.5\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 明显不合理。

现行的美国药典 23 版 (1995 年)、日本及欧洲收载了灭菌注射用水细菌内毒素限量也都是小于 $0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。为与国际接轨, 提高我国细菌内毒素限量水平, 保证人民安全用药, 笔者建议将中国药典 1995 年版灭菌注射用水细菌内毒素限量从 $0.5\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 提高到 $0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

表 1 灭菌注射用水细菌内毒素限量实验记录

生产厂家及生产批号	$0.25/\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$	阳性对照
张家口云峰制药厂		
950502	--	+
950503	--	+
950504	--	+
上海信谊制药厂		
950502-2	--	+
950301	--	+
大连金港制药厂		
950511	--	+
950509	--	+
950516	--	+
内蒙古甘旗卡制药厂		
960126	--	+
960125	--	+
960529	--	+
桂林市第二制药厂		
960102	--	+
960103	--	+
960104	--	+
内蒙古甘旗卡制药厂		
960627	--	+
960628	--	+
960929	--	+
甘肃相连山制药厂		
970105	--	+
970106	--	+
970107	--	+

抗增液及其应用

一、品名：抗增液 (Antienhancement Solution)

二、用途：

抗增液是一种辅助剂，用于阻断 β -D-葡聚糖及 LAL-RM 类物质对细菌内毒素检查时的干扰。美国 FDA 的《鲎试剂检查准则》允许使用辅助剂来消除干扰鲎试剂检查的因素。

三、原理：

鲎试剂是由鲎血细胞溶解物制备而成。鲎血细胞溶解物除了含有能被细菌内毒素激活的凝集因子外，还含有能被其它物质激活的 G 因子，即存在着一个能被非内毒素物质激活的反应旁路。因此，鲎试剂并不是专一对内毒素反应的试剂。研究已证实，能激活鲎试剂旁路的物质主要有 (1-3)- β -D-葡聚糖和 LAL-RM (LAL-Reaction Material) 两类，如真菌多糖，中空纤维虑膜洗涤液，肾透析仪 (人工肾，血液渗析仪) 洗涤液等。实验室常用的血清，棉球等也含有较多的 (1-3)- β -D-葡聚糖。我们通常称由非内毒素物质导致鲎试剂反应阳性的结果为“假阳性”。研究表明，低于一定浓度的 (1-3)- β -D-葡聚糖或 LAL-RM 不足以使鲎试剂的凝集反应产生阳性结果，但如果有细菌内毒素共同作用的情况下，凝集反应会变得更为激烈及迅速，很容易使反应出现阳性结果。

本抗增液含有能抑制或阻断鲎试剂 G 因子旁路反应的抑制剂。当怀疑检品中含有能激活 G 因子旁路的物质，或怀疑检查结果为假阳性，或经干扰试验证实检品对细菌内毒素检查有增强作用，可使用本品来消除这类物质的干扰。

四、使用方法：

作细菌内毒素检查时，如果需要，使用本品作为鲎试剂溶解液来复溶鲎试剂。

五、注意事项：

1. 本品为无菌无热原溶液，仅供体外试验使用，切勿用于人体或动物体。
2. 本品仅用于配套本公司鲎试剂使用，切勿将本品用于其它厂家的鲎试剂产品。

六、贮存： 2-30℃ 存放，切勿冻结。

七、有效期： 三年

八、规格： 0.6ml/支、1.2ml/支

应用举例——人血白蛋白细菌内毒素检查的干扰试验

一、材料

1. 人血白蛋白, 国产, 低温乙醇工艺, 20% 5 克, 批号 960328 - 1, 热原检查合格
2. 鲎试剂 (TAL), 0.5ml/支, 灵敏度 $\lambda = 0.125\text{Eu/ml}$, 批号 960811 - 1
3. 抗增液, 批号 960822, 0.6ml/支
4. 内毒素工作品, 中国药品生物制品检定所制备, 批号 9605, 效价 20Eu/支

二、有关参数

1. 内毒素限值 (L): 美国药典 XXIII 版规定 20% 人血白蛋白的内毒素限值为 $L = 1.33\text{Eu/ml}$
2. 最大有效稀释 (MVD): $MVD = \frac{L}{\lambda} = \frac{1.33}{0.125} = 10.6$ (倍)

三、步骤

1. 用无热原水将内毒素工作品稀释成浓度分别为 0.5、0.25、……、0.03Eu/ml 的系列溶液。稀释过程必须使用旋涡混合器。

2. 用无热原水将白蛋白样品 (S) 稀释 5.3 倍 ($S_{5.3}$) 和 10.6 倍 ($S_{10.6}$):

$$1.0\text{ml S} + 4.3\text{ml 水} \rightarrow S_{5.3}$$

$$0.5\text{ml } S_{5.3} + 0.5\text{ml 水} \rightarrow S_{10.6}$$

3. 用样品稀释内毒素: ($E_{0.5}$ 表示浓度为 0.5Eu/ml 的内毒素溶液)

$$0.5\text{ml } E_{0.5} + 0.5\text{ml } S_{5.3} \rightarrow E_{0.25}/S_{10.6}$$

$$0.5\text{ml } E_{0.25} + 0.5\text{ml } S_{5.3} \rightarrow E_{0.125}/S_{10.6}$$

$$0.5\text{ml } E_{0.125} + 0.5\text{ml } S_{5.3} \rightarrow E_{0.06}/S_{10.6}$$

$$0.5\text{ml } E_{0.06} + 0.5\text{ml } S_{5.3} \rightarrow E_{0.03}/S_{10.6}$$

4. 分别用无热原水和抗增液复溶 TAL, 与上述内毒素系列溶液及含内毒素的样品系列溶液反应, 结果如下:

I. 内毒素水溶液 (Eu/ml):	0.25	0.125	0.06	0.03	阴性对照	反应终点
a. 用水复溶 TAL	++++	++++	-----	-----	--	$\lambda_1 = 0.125$
b. 用抗增液复溶 TAL	++++	++++	-----	-----	--	$\lambda_2 = 0.125$
II. 含内毒素的样品溶液: (Eu/ml $S_{10.6}$)	0.25	0.125	0.06	0.03	空白对照 ($S_{10.6}$)	反应终点
a. 用水复溶 TAL	++++	++++	++++	++++	++	—
b. 用抗增液复溶 TAL	++++	++++	-----	-----	--	$\lambda_s = 0.125$

四、讨论:

1. 设 TAL 灵敏度的标示值为 λ , TAL 与内毒素在样品溶液 (MVD 浓度) 中反应的终点值为 λ_s , 按照干扰试验的规定, 若 $2\lambda \geq \lambda_s \geq 0.5\lambda$, 可认为该样品 (MVD 浓度) 对细菌内毒素检查无干扰; 否则认为有干扰, $\lambda_s > 2\lambda$ 为抑制; $\lambda_s < 0.5\lambda$ 为增强。

2. 实验 I 中, a 及 b 的反应终点值分别为 $\lambda_1 = 0.125\text{Eu/ml}$, $\lambda_2 = 0.125\text{Eu/ml}$, 与 TAL 的标示值 $\lambda = 0.125\text{Eu/ml}$ 相同, 表明用水复溶 TAL 与用抗增液复溶 TAL, 对灵敏度无影响。此实验实际是鲎试剂灵敏度的复核试验。

3. 实验 II 中, a 的空白对照为阳性, 表明样品 (MVD 浓度) 对细菌内毒素检查有很强的增强干扰, 阳性结果应属假阳性, 因为此样品经热原检查合格。*

4. 实验 II 中, b 的反应终点值 $\lambda_s = \lambda = 0.125\text{Eu/ml}$, 表明用抗增液复溶 TAL, 可以消除样品对细菌内毒素检查的干扰 (增强作用)。

*此提法尚值得商榷, 因篇幅所限, 不便详细讨论。

“第一届全国细菌内毒素检查法研究与应用学术会议” 在 宁 波 召 开

中国药品生物制品检定所, 中国药学会和中国药理学会药检药理专业委员会于 1997 年 10 月 29 日至 11 月 2 日在浙江宁波联合召开了“第一届全国细菌内毒素检查法研究与应用学术会议”。与会的 160 多位科学技术工作者就细菌内毒素检查的历史, 现状与发展, 内毒素标准物质的建立, 细菌内毒素检查法的研究与应用等内容进行了学术交流。本次学术会议编辑的《论文汇编》收录了来自全国 29 个省、自治区和直辖市的 148 篇学术论文。大会还邀请了卫生部药典会、中检所等有关单位的专家就中国药典 2000 年版的收载情况和我国细菌内毒素检查法的发展方向作了专题发言。大会期间还分别召开了“中国药典 2000 年版工作进展座谈会”、“新一批内毒素国家标准品研制和标定总结会议”和“鲎试剂生产厂家工作会议”。

这次学术会议对进一步推动我国细菌内毒素检查法的应用研究, 扩大药品细菌内毒素检查的品种, 提高我国细菌内毒素检查法的水平有重要的意义。

“中国药典 2000 年版药检专业科研课题和修订项目工作进展座谈会” 在 宁 波 召 开

卫生部药典委员会药检药理专业委员会于 1997 年 10 月 30 日在宁波召开了部分药理专业委员会委员和省、市药检所有关人员参加的座谈会。会上就中国药典 2000 年版中“细菌内毒素检查法”、“热原检查法”等附录的修订, 细菌内毒素检查的浊度法、比色法以及检查用水质量的研究等工作的进展了解情况, 听取意见并进行了热烈的讨论, 同时对上述工作提出了完成日期的要求。

美国学者库珀博士来华讲学

受中国药品生物制品检定所、上海市药学会以及广州市药检所的邀请, 美国学者詹姆斯·弗·库珀博士 (Dr. James F. Cooper) 于今年五月二十六日至六月四日来华讲学, 先后在广州、上海及北京等地作了题为“药品与医疗器械的细菌内毒素检查”的学术报告。库珀博士是鲎试验研究的先驱之一, 是国际知名的细菌内毒素检查领域的专家, 现任美国南卡罗来纳州医科大学的药学博士及著名的鲎试剂企业 Endosafe® 公司的环球科技顾问。他此次讲学着重阐述药品从热原检查到鲎试验的转换方法, 并提供了大量关于鲎试剂应用与发展的新鲜信息, 受到听众的好评。

由世界卫生组织 (WHO) 的生物标准品专家委员会 (ECBS) 组织的第二批内毒素国际标准品 (IS) 的协作标定研究工作已经结束, 共有 13 个国家或地区的 26 位科学家参与本次协作研究, 湛江安度斯生物公司是除中检所外唯一被邀请参加此次协作研究。本次协作研究主要取得以下的成果:

I、重新复核了第一批内毒素国际标准品 IS84/650 的效价, 结果显示将原来标示的 14,000IU/瓶校正为 18,000IU/瓶更合适。

II、确立新的内毒素国际标准品的效价为 10,000IU/瓶, 并且确定 1IU = 1EU, 并比较了新标准品各亚批号之间差异, 确定各亚批之间无明显差异可视为同一批号, 这样保证了新的 IS 有足够的数量, 在较长时间内有充足的供应。

III、比较了 EC-5、EC-6、IS84/650、EP 标准品 BRP-2 及 JP 标准品与新 IS 的差异, 证实新 IS 与这几个重要的内毒素标准品无显著差异, 据此新的 IS 可以作为全球适用的标准内毒素。

IV、新的 IS 对凝胶法、浊度法、显色法鲎试验具有相同的效价, 成为适用于定量与半定量方法细菌内毒素检查的通用国际标准品。

(“Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study” S poole, et al: J Endotoxin Res. 4 (3) 221 1997.)

(接上第 12 页) 结论:

综上所述, 在大多情况下用 BET 检测 EET 得到很高的内毒素效价, 但含有 EET 的样品缺乏象 Ecoli 这样经纯化的内毒素的致热性, 所以标准内毒素比在制药工业中威胁人类健康的 EET 更具致热性, LAL 是用标准内毒素标定的, 因而用它检查 EET 时具有一个潜在的安全系数; 高纯的 LPS 虽然作为标定 LAL 的标准物, 但它不可能成为唯一的热原标准物, 因为它与环境内毒素的热原性并不平行。(参考文献略)

(刘冰译 冯聚锦校)

征 稿 启 示

本刊旨在为广大读者提供鲎试剂在制药工业及药检方面应用与发展的信息, 也是广大读者交流经验和学术讨论的园地。我们殷切希望广大读者积极撰文来稿交流。凡有关细菌内毒素检查和鲎试剂应用的文章都可以投稿 (已经在其它刊物发表的请注明刊物名称和期号), 形式不拘。来稿一经录用即奉稿酬。

来稿请寄: 湛江安度斯生物有限公司《进展》编辑组
广东湛江市人民大道中 38 号 邮编: 524022
电话: (0759) 3380671、3380672 转 8028
传真: (0759) 3380671、3380672 转 8668