

業試劑应用与进展

司洛物

湛江安度斯生物有限公司主编 1999年第3期(总第6期) 1999年11月18日

目 录

- 中国药典 2000 年版(二部)新增细菌内毒素检查品种(初稿) (1)
- 中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法修订情况简介 (3)
- 应用有效验证减少鲎试验的 pH 值的测定 (5)
- 美国标准内毒素(EC-5)在人类男性志愿者体内的特性 (7)
- 药品细菌内毒素检查法应用研究 (11)
- EDS 系列细菌内毒素定量测定系统 (16)

中国药典 2000 年版(二部) 新增细菌内毒素检查品种(初稿)

【编者按】 国家药典委员会于 1999 年 7 月编纂了《中国药典 2000 年版(二部)新增与修订内容汇编》(初稿)一书,进一步广泛征求药品科研、生产、检验、使用、监督管理单位及有关人员的意见,同时,也为顺利实施 2000 年版《中国药典》提前作好准备。本刊把此书中刊载的新增细菌内毒素检查品种汇总如下,供读者参考,同时欢迎广大读者针对以下品种来稿交流。

品 名	内毒素限值	品 名	内毒素限值
1. 高三尖杉酯碱注射液	25 Eu/mg	23. 注射用青霉素钾	0.01 Eu/100U
2. 复方氯化钠注射液	0.5 Eu/ml	24. 乳糖酸红霉素	1 Eu/mg
3. 葡萄糖氯化钠注射液	0.5 Eu/ml	25. 注射用乳糖酸红霉素	1 Eu/mg
4. 甲硝唑葡萄糖注射液	0.5 Eu/ml	26. 注射用盐酸平阳霉素	25 Eu/mg
5. 甲硝唑注射液	0.35 Eu/mg	27. 盐酸林可霉素	0.5 Eu/mg
6. 维生素 C 注射液	2.5 Eu/mg	28. 硫酸庆大霉素	1.7 Eu/1000U
7. 莪术油葡萄糖注射液	0.5 Eu/ml	29. 硫酸庆大霉素注射液	1.7 Eu/1000U
8. 头孢曲松钠	0.2 Eu/mg	30. 普鲁卡因青霉素	0.01 Eu/100U
9. 注射用头孢曲松钠	0.2 Eu/mg	31. 注射用普鲁卡因青霉素	0.01 Eu/100U
10. 头孢呋辛钠	0.1 Eu/mg	32. 磺苄西林钠	0.05 Eu/1000U
11. 注射用头孢呋辛钠	0.1 Eu/mg	33. 注射用磺苄西林钠	0.05 Eu/1000U
12. 硫酸西梭米星	0.5 Eu/1000U	34. 右旋糖酐铁注射液	0.5 Eu/mg
13. 硫酸西梭米星注射液	0.5 Eu/1000U	35. 重组人生长激素	5 Eu/mg
14. 硫酸奈替米星	1.25 Eu/1000U	36. 重组人生长激素注射液	5 Eu/mg
15. 硫酸奈替米星注射液	1.25 Eu/1000U	37. 注射用重组人生长激素	5 Eu/mg
16. 头孢拉定	0.2 Eu/mg	38. 重组人胰岛素	10 Eu/mg
17. 注射用头孢拉定	0.2 Eu/mg	39. 重组人胰岛素注射液	80 Eu/100U
18. 两性霉素 B	5 Eu/1000U	40. 精蛋白重组人胰岛素	2.5 Eu/U
19. 注射用两性霉素 B	5/0.9 Eu/1000U	41. 中性胰岛素注射液	0.8 Eu/U
20. 青霉素钠	0.01 Eu/100U	42. 精蛋白锌胰岛素注射液	0.8 Eu/U
21. 注射用青霉素钠	0.01 Eu/100U	43. 缩宫素注射液	0.5 Eu/U
22. 青霉素钾	0.01 Eu/100U		

注：新增品种 43 种（不包括放射性药品），原有品种 5 种，共 48 种。其中抗生素 26 种，生化药品 10 种，其余 12 种。尚有部分部颁标准品种也改用作细菌内毒素检查法。

中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法修订情况简介

黄清泉 (中国药品生物制品检定所 北京 100050)

一、修订情况概述

我国药品应用细菌内毒素检查法最早始于 1988 年,由卫生部颁布试行,1991 年转为正式部标准。1993 年开始收载于中国药典 1990 年版第二增补本,中国药典 1995 年版收载该法时进行了部分修订,中国药典 1998 年增补本收载该法时进行了重大修订。中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法的内容目前已基本定下来。本版药典的内容是在中国药典 1995 年版、1998 年增补本的基础上历时两年多的时间,经过至少 7 次以上的修订而成。本版药典有以下几个特点:

1. 更加科学、完善;
2. 进一步与美、英药典方法接轨;
3. 注重细节;
4. 具有中国特色。

此外,与以往相比,还有另外两个特点:

1. 参与单位多、人员多;
2. 修订内容多(在文字、标点符号、公式、编排格式、方法等方面均有较大修订)。

本版药典内容体现了我国细菌内毒素检验技术水平的发展,体现了我国制药工业水平和甾体剂生产水平的不断提高;同时存在许多不足之处,与美、英、日等国药典相比仍有差距。

二、修订过程

1. 1997 年 2 月 27 日,卫生部药典委员会在北京召开药理专业委员会,讨论落实 2000 年版中国药典的科研课题及 1995 年版中国药典附录及品种的增修订项目等工作。会议决定将 1995 年版中国药典附录细菌内毒素检查法进行修订后收载于 2000 年版中国药典,起草单位是中国药品生物制品检定所(以下简称中检所),要求 1997 年 4 月 30 日前提出修订稿报药典会。

此期间进行了第一次修订,并在《药典通讯》1997 年 7 卷第 2 期(P105)刊登中国药典 1995 年版二部附录《细菌内毒素检查法》修订稿(草稿)及起草说明书以供讨论及征求意见。

2. 卫生部药典委员会以(97)卫典业字第 152 号文发全国药检所及生化药品、抗生素、药理专业委员会委员征求对中检所起草的中国药典 1995 年版二部附录《细菌内毒素检查法》的增修订意见。1997 年 11 月,中检所综合了部分省、市、自治区药检所及部分药典委员的意见,对《细菌内毒素检查法》修订稿(草稿)进行了修订(第二次)。

3. 1998 年 2 月 23 日中检所再次提出中国药典 2000 年版附录细菌内毒素检查法的修订稿,该稿刊登在 1998 年 2 月卫生部药典委员会印发的中国药典 2000 年版二部凡例与附录(草案)第 48~49 页上。药典会要求各单位在实践中进行核对与复核,并于 98 年 10 月前提出修改意见。此为第三次修订。

4. 1998 年 9 月 2 日~4 日,由中检所在北戴河组织召开会议征求对细菌内毒素检查法等修订稿的意见。1999 年第 3 期(总第 6 期)

订意见。参加会议的代表为各省、市、自治区药品检验所药理室主任，鲎试剂研制、生产单位的负责人等。综合与会代表的意见后对细菌内毒素检查法进行了第四次修订。

5. 卫生部药典委员会于1998年9月12日~14日在厦门市召开药理专业委员会(扩大)会议, 审定中国药典1998年增补本有关附录, 会上审定中国药典1998年增补本附录细菌内毒素检查法并进行了修订, 修订后的细菌内毒素检查法收载于中国药典1995年版1998年增补本(P142)。此即第五次修订。

6. 1999年7月6日在北京召开的中国药典2000年版药理专业委员会(扩大)会议上对1998年增补本细菌内毒素检查法进行修订, 此为第六次修订。

7. 第六次修订稿刊登在国家药典委员会编印的中国药典2000年版(二部)新增与修订内容汇编(初稿)(P359), 进一步征求意见, 综合反馈意见进行最后一次修订(第七次)。

三、修订内容

从1995年版到1998年增补本, 进行了重大修订; 从1998年增补本到2000年版, 修订的内容主要侧重于一些细节问题。所以下面主要介绍中国药典1998年增补本(1999年4月1日执行)的修订内容。

(一) 前言部分

1. 细菌内毒素国家标准品的用途增加了复核鲎试剂灵敏度;
2. 细菌内毒素工作标准品的用途将原来的用于鲎试剂灵敏度测定及试验中的阳性对照改为用于试验中鲎试剂灵敏度复核、干扰试验及设置的各种对照;
3. 增加了细菌内毒素检查用水的定义, 即细菌内毒素检查用水系指与灵敏度为0.03EU/ml或更高灵敏度的鲎试剂24小时不产生凝集反应的灭菌注射用水。

(二) 试验准备部分

将除去试验所用器皿可能存在的外源性内毒素的方法由原来的250℃或180℃干烤适当的时间修订为250℃干烤至少1小时, 并增加试验所用器皿应确证无干扰细菌内毒素的检查。

(三) 鲎试剂灵敏度复核试验部分

1. 增加鲎试剂灵敏度的定义, 即鲎试剂灵敏度定义为在本检查法规定的条件下能检测出内毒素标准溶液或供试品溶液中的最低内毒素浓度, 用EU/ml表示;
2. 根据鲎试剂灵敏度的标示值 λ_0 改为 λ ;
3. 增加2管阴性对照;
4. 将鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)的计算公式由 $\lambda_c = \log^{-1}(\sum X/4)$ 改为 $\lambda_c = \lg^{-1}(\sum X/4)$ 。

原表达式的对数形式是一般开式, 没有底, 无法进行计算。实际工作中, 用得最多的是常用对数, 所以将“log”修订为“lg”。

5. 增加反应终点浓度的定义, 即反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度。

(四) 供试品干扰试验部分

1. 将供试品的最大有效稀释液修订为未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数(MVD)的稀释液;
2. 增加标准对照;
3. 增加用细菌内毒素检查用水和供试品溶液或稀释液各做2管阴性对照;

4. 增加干扰试验结果计算公式, 即: $E_s = \lg^{-1} (\sum X_s/4)$ 和 $E_t = \lg^{-1} (\sum X_t/4)$;

5. 修订了判断标准, 即将有供试品和无供试品测得的鲎试剂灵敏度 (λ_c) 在 $0.5 \sim 2.0\lambda_b$ (包括 $0.5\lambda_b$ 和 $2.0\lambda_b$) 时, 则认为供试品在该浓度下不干扰试验修订为当 E_s 在 $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ (包括 0.5λ 和 2.0λ) 时, 且当 E_t 在 $0.5E_s \sim 2.0E_s$ (包括 $0.5E_s$ 和 $2.0E_s$) 时, 则认为供试品在该浓度下不干扰试验。

6. 增加: 当鲎试剂、供试品的来源、供试品的配方或生产工艺有变化时, 须重复进行干扰试验。

7. 将供试品的最大有效稀释倍数 (D) 由式 $D = L/\lambda$ 修订为 $MVD = L \cdot C/\lambda$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值。

C 为供试品溶液的浓度或供试品复溶后所得溶液的浓度, 抗生素样品浓度以活性成分计。其中当 L 以 EU/ml 表示, C 为 1.0ml/ml, 当 L 以 EU/mg 或 EU/u 表示时, C 为 mg/ml 或 u/ml。

(五) 检查法部分

1. 将 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿修订为复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿;

2. 鲎试剂的支数由原来的 4 支修订为 5 支;

3. 增加一支供试品阳性对照管, 并增加供试品阳性对照液的制备方法, 即相当于用被测供试品溶液将细菌内毒素工作标准品制成 2.0λ 浓度的内毒素溶液。

增加供试品阳性对照的目的是证明在本试验条件下被检查的供试品溶液对试验结果不存在抑制作用。

4. 试验用的孵育装置由原来的水浴修订为适宜恒温器中。

除用水浴孵育装置外, 可用于热孵育装置。

(六) 结果判断部分

将试验有效的条件由原来的阳性对照为 (-) 或阴性对照为 (+), 试验无效修订为阳性对照为 (-) 或供试品阳性对照为 (-) 或阴性对照为 (+) 时, 试验无效。

四、结束语

请各生产、检验部门注意这些修订内容, 以利执行。该法同时也存在一些不足之处, 有待进一步修订, 使其更加完善。

应用有效验证减少鲎试验的 pH 值的测定

Dr. James F Cooper

不合适的 pH 条件是导致鲎试验抑制的最重要的原因。最近一期的《LaL 时报》刊载了如何使用缓冲的鲎试剂和许可范围内的稀释来为终产品有效消除这一干扰来源, 该时报还讲述了专为对付在检测原材料中遇到的独特的中和问题而设计生产的 Endosafe 缓冲剂。本技术论述报告描述了如何通过验证过程中着手解决 pH 问题来减少对 pH 值的监控。

一些实验室因在日常检测中未进行检品的 pH 值的检测而被管理官员传讯, 该问题是由于误

解美国药典 (USP) 中细菌内毒素检查 (BET) 中的一段论述而引起的“除非有受特殊的要求, 否则在各论中样品和鲎试剂的检测混合物的 pH 值范围为 6.0-8.0”, 这句话的意思并不是说在检测前要测定样品的 pH 值, 它只不过是指出中性的检测混合物是好的鲎反应的关键; 事实上, 对于所有 Endosafe 试剂和大多数其它鲎试剂销售商来说, 他们唯一要注意的问题是在包装中插入的使用说明书里注明的检测混合物的合适 pH 值, 并且指明试剂是否已有缓冲能力。

毫无疑问鲎试剂的反应环境必须是中性的, 有争议的问题是进行 pH 测定的必要性和频率, 减少 pH 测定次数的最实际的方法是在验证期间解决这个问题, 在工业上, 标准的做法是对一批药品或医疗器械浸取液进行预筛选并对另外三批进行验证, 将每一批鲎试剂与验证样品稀释液的混合物的 pH 值记录下来, 以证明在样品制备期间已取得中性。验证研究应得出结论: 日常鲎试验无需进行 pH 值测定; 然而如果阳性产品对照 (PPCs) 失败, 进行结果调查时必须确定是否是异常 pH 值导致的抑制。

现行管理政策:

FDA 检查官对待这一问题的更开明的方法登载在最近一期的 PDA 简讯上, 题为“人用药品 CGMP 备忘录”, 该备忘录来自项目经理 Paul Motise, FDA, HFD-325, 它记述了与人用药品 CGMP 实施有关的具体争议, 其中提出这样的问题“对内毒素检测 (鲎试验) 是否要求作日常产品 pH 检测”, 答案是对于有效的验证方法不要求这种检测, 除非某公司将此应用于新的药品中, 它明确指出除非检测混合物为中性, 否则日常检测中的 PPC 会失败; 在检测中遇到这种问题, 正确的做法是参考这一已公布的 FDA 的意见。

不幸的是, 该答案的第二部分给人造成一种不确定性, 它暗示在验证过程中未研究终产品的 pH 值释放的上下限范围可能成为被传讯的原因, 这一规定与第一段的意见—PPCs 的回收是监控 pH 条件一种可靠方法, 形成鲜明的对比; 唯一可评判这一关注问题的情况是在 BET 和欧洲药典中提到的 pH 值超出 6-8 范围的成品须经特别缓冲; 中性产品的 pH 值范围分析, 例如浸取液、医疗器械抽提液或未经缓冲或中性的药品都是没有根据的。

这种情况的一种可能的例外是当一验证鲎试验方法要求在内毒素检测前用缓冲剂中和或用酸或碱稀释检品, 对照 CGMP 检查如 pH 的调节以确保取得预期的改进。因此应小心在许可范围进行稀释和使用缓冲的鲎试剂来避免在日常有效验证中 pH 测定的不方便。

更使人困惑的是实验室要面对的问题, 即他们被迫进行日常 pH 测定, 他们必须重新验证他们已有的方法, 且要验证新的鲎试验法来消除不必要的检测的负担, 然后受限的实验室需要通过一种增补表格 483, 或其它适合的答复。已将 pH 检测写进新药申请 (NDAs) 的公司应在他们的年度报告中归档一份更新的程序。

总结:

可避免在这一问题上与管理官员发生冲突而采取的步骤如下:

- 1) 设计验证程序, 解决潜在的 pH 问题。
- 2) 在筛选和验证研究过程中检测具有代表性的检测混合物, 证明已通过稀释取得中性。
- 3) 参考鲎试剂信息进行缓冲物和样品制备。
- 4) 在验证报告中作出结论, 日常 pH 检测是不必要的。

证实在验证方法中的样品制备过程已达到了中性, 则可减少 pH 测定。

参考文献: (略)

刘少燕、刘冰译自 LAL Time Vol14, No2, August 1997

美国标准内毒素 (EC - 5) 在人类男性 志愿者体内的特性

H.D.Hochstein, E.A.Fitzgrald, F.G.McMahon, R.Vargas

Division of Product Quality Control, CEBR, FDA, Rockville, MD, USA, and
Clinical Research Center, New Orleans, LA, USA

摘要: 使用鲎试剂和兔热原法进行内毒素检测曾经令人大感兴趣。通常很难将结果与男性体内的内毒素的实际生物效价联系起来, 所以有必要用美国标准内毒素 (Lot EC - 5) 检测人类志愿者以便比较兔子和人类的数据信息。

人类男性志愿者被随机分成 5 组, 每组 12 人, 每组根据每公斤人体重量分别给予静脉注射 0、2、4、8 或 16 个内毒素单位 (EU) 水平的美国标准内毒素, 从口探温 8 小时, 每隔 15 分钟记录一次; 在检测期间可确定美国标准内毒素在人体中的热原特性, 结果显示对 EU/KG 的控制与温度的上升有直接的相关性, 在这一研究实验中致热阈剂量 (50% 的志愿者体温升高 $\geq 1.0^{\circ}\text{F}$) 大约为 4.1EU/kg。

关于兔子和人类对内毒素的灵敏度有何不同的文献报告多种多样, Dare 发现兔子对内毒素的灵敏度是人类的 0.33 - 7.0 倍, 具体视实验条件而定; Keene 等人声称人、猫、马和兔子对由内毒素引起的热原刺激有大致相同的阈值; 然而 Wolff 声称, 要使兔子和人体内产生同样的致热反应, 以 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 计算, 兔子需要比人类多 10 倍的内毒素; 早在几年前, Greisman 和 Hornick 就发现, 以体重为基础, 两个物种最小的内毒素热原剂量是相同的。

虽然用鲎试剂 (LAL) 和兔热原检测法曾经令人很感兴趣, 但通常很难将结果互相联系起来, 也很难将结果与人体中以内毒素单位 (EU) 表示实际生物效价的特定内毒素联系起来; 本文是第一篇报道人类对美国标准内毒素 Lot EC - 5 (RSE) 在 4 个剂量水平以无热原水为对照通过静脉给药的剂量反应, Lot EC - 5 与美国药典 (USP) 内毒素参考标准品 (Lot F) 完全一样。

Elin 等人研究了在几个人类志愿者体内的 EC 内毒素。此批 EC 材料从未被指定为美国标准内毒素, 美国标准内毒素是通过混合 EC 与几种化合物来制备的, 以提高其稳定性、溶解力及改善冻干特性, 所有的美国标准内毒素的制备都命名为 EC 并在后面加个数字, 目前的标准叫做 EC - 5。

由于 EC - 5 有如此广泛的用途, 本临床检测法尽可能被用来确定人体中 EC - 5 的致热阈剂量 (TPD), 由于 EC - 5 有助于工作标准内毒素 (CSE) 的生物分析研究及标准化, 确定 EC - 5 在人体中的特性就显得很重要。

材料和方法

美国标准内毒素

从 E. coli 0113 提纯制备的脂多糖现被用作 FDA 的美国标准内毒素 (Lot EC-5) 以及美国药典内毒素参考标准品 (Lot F), 该国家参考内毒素的制备和特性以前曾介绍过: Lot EC-5 由设在美国马里兰州 Bethesda 的生物评估和研究中心向所有鲎试剂生产厂家提供, 用于标定每批鲎试剂的灵敏度, 位于马里兰州 Rockville 的美国药典会向公众分发 Lot F, 并象征性地收取一点费用。

表 1 在对照和实验组别中的平均温度变化的 \pm 平均标准误差

感染后小时									
剂量 +	1	2	3	4	5	6	7	8	
0 EU	-0.32 \pm 0.07	-0.27 \pm 0.07	-0.21 \pm 0.11	-0.25 \pm 0.10	-0.11 \pm 0.13	0.08 \pm 0.10	0.26 \pm 0.11	0.27 \pm 0.16	
2 EU	-0.03 \pm 0.10	0.02 \pm 0.12	0.18 \pm 0.17	0.37 \pm 0.11	0.39 \pm 0.17	0.46 \pm 0.13	0.67 \pm 0.12	0.59 \pm 0.1	
4 EU	-0.19 \pm 0.11	0.13 \pm 0.14	0.30 \pm 0.19	0.46 \pm 0.20	0.49 \pm 0.14	0.48 \pm 0.15	0.38 \pm 0.14	0.33 \pm 0.12	
8 EU	-0.07 \pm 0.09	0.93 \pm 0.19	1.59 \pm 0.17	1.63 \pm 0.17	1.28 \pm 0.12	1.00 \pm 0.12	0.99 \pm 0.11	0.81 \pm 0.06	
16EU	-0.18 \pm 0.12	1.04 \pm 0.25	1.64 \pm 0.31	1.54 \pm 0.23	1.08 \pm 0.19	0.82 \pm 0.10	0.72 \pm 0.10	0.71 \pm 0.13	
相对于对照组的数据									
2EU	0.28 \pm 0.14	0.29 \pm 0.13	0.39 \pm 0.19	0.62 \pm 0.13	0.50 \pm 0.24	0.35 \pm 0.15	0.33 \pm 0.15	0.31 \pm 0.19	
4EU	0.13 \pm 0.11	0.40 \pm 0.18	0.51 \pm 0.18	0.71 \pm 0.18	0.60 \pm 0.13	0.37 \pm 0.21	0.16 \pm 0.22	0.06 \pm 0.20	
8EU	0.25 \pm 0.09	1.21 \pm 0.21	1.80 \pm 0.21	1.88 \pm 0.20	1.38 \pm 0.19	0.78 \pm 0.19	0.65 \pm 0.19	0.46 \pm 0.16	
16EU	0.13 \pm 0.14	1.32 \pm 0.28	1.85 \pm 0.30	0.79 \pm 0.26	1.18 \pm 0.23	0.71 \pm 0.16	0.38 \pm 0.12	0.38 \pm 0.18	

* SEM = 平均标准误差 + 每组 12 个志愿者

受试者

60 名健康的 18-45 周岁, 体重在理想体重的 20% 内的男性受实验者参加了在美国路易斯安那州新奥尔良市的医疗研究中心 (独立商业机构) 进行的这项研究实验, 所有志愿者的 CBC、尿分析法和 SMA-20 等体格检查结果都正常, 所有人在开始实验前至少 15 天内不用药, 受实验者在实验开始前 1 小时直到给予内毒素后的 8 小时内禁止吸烟, 每个人在参加实验前必须签定一份正式的协议, 在实验后可获得一份名义上的报酬。

实验设计

该实验是为建立 TPD 和在 8 小时检测期间确定一些系统性副作用的特性而设计的, 为了该实验目的, TPD 被定义为使 50% 的志愿者体温升高 $\geq 1.0^{\circ}\text{F}$ 时, 静脉内给予的内毒素量 (EU/kg), 在我们的实验室, 兔法热原检测 (使用 EC-5) 表明 50% 的接受注射 10EU/kg 内毒素的兔子体温升高 $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ (0.9°F), 在此背景下, 我们决定给予注射 2, 4, 8, 16EU/kg 剂量水平以及用于稀释冻干内毒素的无热原水作为安慰剂, 每 12 个受实验者注射一个剂量水平, 另外 12 个注射安慰剂。

内毒素的制备

内毒素由药剂师用 5.0ml 灭菌注射用水复溶, 按美国药典 (Abbott 实验室) 即得到 2000 EU/ml 的溶液, 然后将试管放在旋涡混合器上混合至少 30 分钟, 混合后, 内毒素以 ml/kg 为标准用于注射; 由于这是一个双盲的研究实验, 看护受试者的护士会以编号和体重来配药, 根据电脑输出的信息指定每个受实验者应接受哪种浓度的内毒素或安慰剂的注射, 根据这个信息, 药剂

师按受试者的编号灌注、标示注射针剂；试管中剩下的内毒素存放在 -20°C 下，留待以后的 LAL 检测使用。

剂量和管理

受试者的体重和指定的内毒素浓度确定了从内毒素试管中抽取出的剂量的大小——例如，如果一个体重 70kg 的受实验者将接受 $8\text{EU}/\text{kg}$ 的注射剂量，则应在注射器中注入 0.28ml 的内毒素，且在注射器上标示受试者的编号，所有含有 0.5ml 灭菌注射用水的安慰剂都使用与复溶内毒素相同的灭菌注射用水。

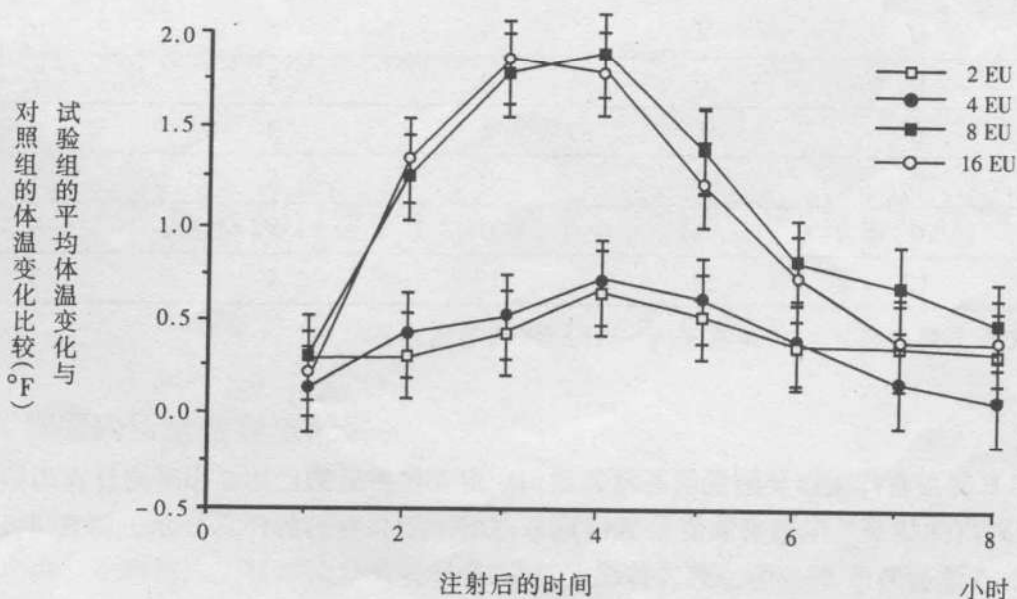
每个实验日，药剂师会根据受试者的编号和体重（每天大约有 3-8 人接受实验）灌注针剂，该容器用手提到病房，在那里有两个注册护士和几个技术员在等待给受试者注射；受试者除了去卫生间外，其余时间在医院病房中卧床休息，早餐后，在以后的 8 个小时的实验过程中，受试者将不再用口进食任何东西，只能饮处于室温的果汁，在进行体温记录 10 分钟内是不允许饮用这些果汁的，在注射前 30 分钟测量血压和脉搏并在实验过程中的第一、二、八小时再重复测量，用 IVAC2000 型体温计在注射前 30 分钟以及注射后的 8 小时内每隔 15 分钟从口探温一次，如果 8 小时后，温度仍然升高 (0.5°F)，继续记录直到温度恢复正常，所有志愿者诉说的不适（寒颤、头痛等）和时间都要记录下来。

萤试剂效价检测

将 4 支 EC-5 内毒素的内容物化冰，每管以 1:30 的比例用无热原水稀释，然后以 2 倍递增进一步稀释直至 1:61, 440，以同样的方法稀释一支未开封的 EC-5 对照管，如 Hochstein 所述用 LAL 凝胶法检测 5 管中每一管的稀释液，每个测试浓度都用美国参考试剂 Lot13 重复 4 管进行。

数据分析

在这个实验中致热反应是由基值（在 07:15~08:00 之间建立）和 8 小时期间的最高温度之间的最高温度上升值来定量的，每次每组的温度变化的平均 \pm SEM 值都会计算出来。



图一 相对于对照组的平均体温变化,竖线为 SEM

结果:

热原特性

在整个检测期间,美国标准内毒素在人体内的热原特性列于表 I,总的温度变化值是每组中每个志愿者的变化的总和;接受安慰剂注射的志愿者在 8 小时后平均体温最高升高 0.3°F,接受 4EU 剂量注射的志愿者在第 5 个小时期间平均升高值为 0.5°F,接受 8EU 和 16EU 剂量的志愿者分别在 3 小时和 4 小时期间平均最多升高 1.6°F,这是一个更典型的内毒素时间高峰,表 1 的下半部份列出与对照志愿者有关的温度变化;2EU 和 4EU 剂量的志愿者都在 4 个小时时平均升温 0.6°F、0.7°F,8EU 剂量组在 4 小时出现温度升高达到 1.9°F 的高峰,16EU 剂量组在 3 小时出现升温高达 1.9°F 的高峰,2、4EU/kg 组在整个 8 小时的研究实验过程中显得相同,在第 7 个小时所有组别都接近正常基础体温。

这些数据都在图表中列出,竖线为 SEM。

表 2 注射不同剂量内毒素后在 5 小时内显示体温升高 $\geq 1.0^\circ\text{F}$ 的志愿者数量

剂量 (Eu/kg)	
0	0/12 *
2	3/12
4	4/12
8	12/12
16	12/12

阈热原剂量 (50%) 为 $4.1 \pm 0.55\text{Eu/kg}$ * 体温升高的志愿者数/志愿者数

表 3 内毒素注射后在志愿者中发现的症状

症状	美国标准内毒素剂量 (Eu/kg)				
	0	2	4	8	16
寒战 *	0	0	0	5	7
头痛 *	0	1	1	3	4
肌痛 *	0	0	0	5	7
流感指数 +	0	0	0	8	9
无症状	12	11	11	4	3

* 有症状的志愿者数 + 有多于一种症状的志愿者数

阈热原剂量

为避免每日的正常体温差异的混淆不清,我们决定在注射后的最初 5 小时内计算阈热原剂量 (TPD)。表 2 列出的数据是用概率单位分析计算来得出 TPD,我们的计算显示,需要 $4.1 \pm 0.55\text{EU/kg}$ 的 EC-5 才会导致 50% 的志愿者体温上升 $\geq 1.0^\circ\text{F}$ 。

表 3 列出了每一内毒素剂量会产生的症状的数目,有一个接受 4EU 剂量的人有一种或多种症状,而接受 8 和 16EU 剂量水平的人中,有 8 个和 9 个志愿者分别有一种或多种症状;在开始

的两个小时内,每小时测一次脉搏和血压并在8小时再测一次,这些参数在8小时内恢复到正常限值内。

用于这次研究实验中的每支内毒素的内容物和1支对照管都经过检测,用于这次研究实验中的所有4管内毒素用批号13的美国参考鲎试剂检测时得出的效价为1920EU/ml,用5.0ml无热原水复溶EC-5也得出同样的结果。

讨论

Lot EC-5的标示效价为10,000EU/支,在这一研究实验中,我们用5.0ml无热原水复溶每支内毒素,因此,用于鲎试验的2倍稀释系列,1920EU/ml这一效价刚好在检测限值内。

我们注意到大约14:00后对照志愿者的体温上升,Greismen和Hoenick还报告说,他发现未给予内毒素的健康男性在正午前直肠温度上升超过 1.0°F ,既然类固醇水平在上午达到最高而在晚上较低,在类固醇水平低时观察内毒素对温度的影响将是一件有趣的事情,我们正在设计这样一个研究实验;我们也注意到的2EU/kg剂量水平时的这个影响,在这一水平温度在7小时(15:00)后最多上升 0.9°F ,当顶峰体温相对于对照志愿者计算时,2EU/kg剂量提前2小时达到顶峰体温,而4,8,16EU/kg剂量志愿者减去对照温度和以前一样同时达到顶峰体温,这表明真正的顶峰体温是在注射内毒素后4和5小时。

既然有更多的药品和生物制品生产商使用鲎试验来检验产品,那么将EU与人类发热反应联系起来是绝对有必要的,由食品与药物管理局发布的鲎试验指南声明对于任何使用鲎试验作为终产品内毒素检验的非肠道药品,除非是鞘内给药,否则其内毒素限值一律为K/M,即每mg或ml产品所允许的内毒素含量,K等于 $5.0\text{EU}/\text{kg}$,M等于每公斤体重的最大给药剂量; $5.0\text{EU}/\text{kg}$ 这个值是根据Elin等人的著作设定的,他们声称参考内毒素(RSE)的最低人类热原剂量在 $0.1\sim 0.5\text{ng}/\text{kg}$ 之间(大约等于 $1\sim 5\text{EU}/\text{kg}$),由于有多个数据可以使用,所以在指南中故意采用其最大值,我们的数据显示这个值可能有点高,但该值在实验差异范围内,因此没必要在指南中作任何改变。

参考文献:(略)

刘少燕、刘冰译自 *Journal of Endotoxin Research* (1994) 1, 52-56

药品细菌内毒素检查法应用研究

陈存兰 (北海 536000 北海市药检所)

1. 细菌内毒素检查法概述

细菌内毒素检查法以其简便、灵敏、快速、准确等显著优点受到世界各国的普遍重视及广泛应用。早在1980年,美国药典等20版已收载了细菌内毒素试验法。其后英国药典、德国药典、意大利药典、欧洲药典、日本药局方等相继收载了该方法。我国于80年代开始,由中国药品生物制品检定所牵头开展细菌内毒素检查法在药品(主要为大输液制剂)中的应用研究。从标准品的建立,鲎试剂的质量控制到检测方法的建立和标准化等方面都做了大量的工作,积累了不少的

经验,为该方法的推广应用奠定了基础,同时在全国范围内曾开展过注射剂家兔热原检查法及细菌内毒素检查法大规模的对比试验研究,大量实验数据充分表明细菌内毒素检查法取代热原检查法是可行的,于是卫生部药典委员会于1988年10月颁发了“细菌内毒素检查法(试行)”(试行期二年)。随后1993年7月在中国药典1990年版第二增补本中收录了该法,自1994年1月1日正式开始实施。但品种仍局限于注射用水,灭菌注射用水,5%葡萄糖注射液、10%葡萄糖注射液、氯化钠注射液等五个品种,直到中国药典1995年版^[1]首次收录了细菌内毒素检查法,并新增了9个放射药(注射用亚锡亚甲基二膦酸盐、注射用亚锡植酸钠、注射用亚锡焦磷酸钠、枸橼酸镓^[67Ga]注射液、胶体磷^[32P]酸铬注射液、高锝^[99mTc]酸钠注射液、铬^[51Cr]酸钠注射液、磷^[32P]酸钠注射液、磷酸钠盐注射液),至目前共有14个品种,与美国药典第23版收录的471种^[2]相比显然是较少的,必须扩大药品细菌内毒素检查的品种,加强应用研究。

2. 药品细菌内毒素应用研究

近几年细菌内毒素检查法用于注射剂新的药品品种的实验研究不少,如甲硝唑葡萄糖注射液、替硝唑葡萄糖注射液、注射用头孢哌酮钠、注射用头孢噻肟钠、注射用青霉素G、注射用氨苄青霉素、注射用乳糖酸红霉素、硫酸卡那霉素注射液、硫酸奈替米星注射液、氧氟沙星注射液、0.2%乳酸环丙沙星注射液、盐酸林可霉素注射液、复方醋酸钠注射液、肝素钠注射液、水解蛋白注射液、复方氨基酸注射液、复方乳酸钠注射液、20%、25%、50%葡萄糖注射液、葡萄糖氯化钠注射液、氯化钾注射液、血透析用补液、脑活素注射液、转移因子注射液半成品、复方枸橼酸钠注射液、磷甲酸钠注射液(20mg/支)、盐酸精氨酸注射液、注射用玻璃酸酶、顺铂注射液等26个^[3]。现将笔者所见到的用于药品细菌内毒素检查的研究报道,增述如下:

2.1 硫酸阿米卡星注射液

该品3mg/ml的溶液不干扰细菌内毒素的检查、试验中选0.76mg/ml的溶液与之相对应的鲎试剂(TAL)灵敏度0.25EU/ml结果最好,对10批样品进行了检测,结果与家兔热原检查相符^[4]。

2.2 甘露醇注射液

该品经4倍稀释,用灵敏度0.25EU/ml TAL检测7批,结果鲎试法与家兔法检查结果一致^[5]。张氏^[6]认为该品除进行1:3稀释同时采用高灵敏度0.125EU/ml TAL更为稳妥,准确。李氏^[7]等认为经1→2倍稀释已能完全消除干扰。

2.3 紫杉醇注射液

该品理论限值 $L = 0.4\text{EU/ml}$,最大有效稀释倍数 $MVD = L/\lambda = 40$,用灵敏度为 $0.03 \sim 0.06\text{EU/ml}$ TAL进行干扰试验,结果表明该品对不同来源和不同厂家的TAL干扰作用不同(对某些厂家试剂存在抑制作用,而对某些厂家的试剂又不存在抑制作用),因此在对该品进行内毒素检查时,一定要事先证明该品对所用批号TAL是否存在干扰作用,否则所得检验结果不可靠^[8]。

2.4 环丙沙星注射液

该品 $L = 3.33\text{EU/ml}$,按4倍稀释后试验10批,并与热原检查法进行比较,结果热原检查全部合格;细菌内毒素检查法9批合格,1批不合格,两法差异无显著意义($P > 0.05$)^[9]。

2.5 替硝唑葡萄糖注射液

该品 $L = 1\text{EU/ml}$,1:4稀释后以灵敏度为 0.125EU/ml 的TAL检测3批,无抑制增强作用^[10]。

2.6 注射用辅酶 A

该品 $L = 1\text{Eu/u}$ ，稀释成 5u/ml 溶液进行试验无干扰作用，共试验 8 批，并与家兔法热原检查比较，结果两法相符^[11]。

2.7 血栓通注射液 (XST)

该品具有明显的抑制作用，经稀释 80 倍后无干扰作用。选用小于或等于 0.06Eu/ml 灵敏度的 TAL，并将 XST 稀释至小于或等于 0.44mg/ml 并增设产品阳性对照管 [PPC 管，含 2λ 的细菌内毒素工作标准品 (CSE) 及 0.44mg/ml 的 XST] 进行试验即可，该品 $L = 5\text{Eu/ml}$ ^[12]。

2.8 注射用青霉素钠 (钾)

该品 10000u/ml 对试验不产生干扰，稀释至浓度 500u/ml 与灵敏度为 0.25Eu/ml 的 TAL 进行检测共 86 批，结果与家兔法热原检查结果一致^[13]。另有报道青霉素钠用水稀释至 4000u/ml 以 0.25Eu/ml 的 TAL 试验，证明此浓度无干扰作用，结果与热原检查一致^[14]。郭红等对 100 批青霉素 G 钾和 100 批青霉素 G 钠分别采用鲎试验及热原试验进行检测结果一致， 10000u/ml 无干扰， $L = 0.83\text{Eu/mg}$ ^[15]。

2.9 硫酸卡那霉素注射液

该品 20000u/ml 对试验不产生干扰，稀释至浓度为 500U/ml 与 0.25Eu/ml 的 TAL 进行试验，共检测 75 批，结果与家兔热原检查结果一致^[13]。另有报道，用鲎试验检查 12 批该品中细菌内毒素，并做干扰试验，结果满意^[16]。

2.10 盐酸林可霉素与注射液

该品 3000u/ml 对试验不产生干扰，稀释至浓度为 125u/ml 与 0.25Eu/ml 的 TAL 进行检测共 26 批，结果与热原检查结果一致^[3]。李文^[17]测得该品 10mg/ml 对 0.5Eu/ml TAL 没有干扰，共检测样品 50 批，与热原检查结果相同，均为阴性。

2.11 三种氨基酸原料 (L-苯丙氨酸, L-苏氨酸、L-亮氨酸)

用三种氨基酸原料热原检查法所规定的原液浓度对 0.5Eu/ml 的 TAL 无抑制或增强作用。并分别进行细菌内毒素检查法与热原检查法对比实验，L-苯丙氨酸共 142 批，符合率为 57.0%，L-苏氨酸共 23 批，符合率为 100%，L-亮氨酸共 141 批，符合率为 92.9%^[18]。

2.12 氯霉素注射液

该品稀释至 5mg/ml 对细菌内毒素检查无干扰，用灵敏度为 0.5Eu/ml 的 TAL 进行检查，检查 6 批结果满意，该品 $L = 1\text{Eu/mg}$ ^[19]。

2.13 茵栀黄注射液

用该品的稀释液进行了干扰试验，取 0.166Eu/ml 的 TAL 需稀释 15 倍，用 0.125Eu/ml 的 TAL，则需稀释 20 倍，可消除干扰^[20]。

2.14 强力宁注射液

该品 $L = 1.6\text{Eu/ml}$ ，在 $12 \sim 3.75\text{mg/ml}$ 范围内与 0.5Eu/ml 的 TAL 试验无干扰，共检测 8 批，与家兔检查结果符合率 100%^[21]，亦有认为该品对 TAL 有干扰作用。不宜以细菌内毒素检查法替代其热原检查^[22]。

2.15 复方丹参注射液

该品经 1:32 稀释，用 0.5Eu/ml 的 TAL 可消除抑制作用，检测 9 批，阴性 8 批，阳性 1 批，表明可用鲎法来控制细菌内毒素的限度^[23]。

2.16 丹参注射液

该品 1:8, 1:16 稀释液分别与 0.5Eu/ml 及 0.25Eu/ml 的 TAL 检测均无干扰作用。共检测 10 批, 家兔法均呈阳性。鲎法 9 批阴性, 1 批阳性 (此批家兔法亦接近不合格边缘), 该品 $L = 5\text{Eu}/\text{kg}^{[22]}$ 。

2.17 维生素 B₁ 注射液

该品稀释至浓度为 0.0625/mg/ml 时与 0.5、0.25、0.125Eu/ml 的 TAL 均无干扰作用, 对 3 批样品进行检测, 与家兔热原试验结果一致, 该品 $L = 4\text{Eu}/\text{mg}^{[25]}$ 。

2.18 10% 甘油注射液

该品可与标示灵敏度为 0.5Eu/ml 的 TAL 进行细菌内毒素检测, 与家兔法的热原检查结果完全一致^[26]。

2.19 碳酸氢钠注射液

该品稀释至 0.6% 后, 用 0.06Eu/ml 的 TAL 进行检测, 与家兔法检测结果一致^[27]。

2.20 注射用氨苄青霉素钠

该品 10mg/ml 为最高非抑制浓度, 以 0.5Eu/ml 的 TAL 检测该品 51 批, 并与家兔热原检测结果比较, 结果满意^[28]。

2.21 甲硝唑注射液

实验表明该品原液对鲎试验有抑制作用, 经 1:1 稀释后, 检测 6 批, 与热原检查结果完全相符^[29]。

2.22 丽参注射液

该品 6 倍稀释液与 0.5Eu/ml 的 TAL 试验无干扰。共检测 36 批并与热原法比较, 结果满意。认为可作为该品热原的初检^[30]。

2.23 泰索帝

该品 1→80 稀释浓度为 0.125mg/ml, 每 1ml 稀释液含内毒素不得超过 0.25Eu, 采用配套溶剂溶解后, 药液的内毒素限值 $L = 20.5\text{Eu}/\text{ml}^{[31]}$ 。

2.24 红花注射液

该品对细菌内毒素检查法有显著抑制作用。经 1:40 稀释后与 0.06Eu/ml 的 TAL 可消除其干扰。检测 5 批, 结果与热原检查完全相符, $L = 2.5\text{Eu}/\text{ml}^{[32]}$ 。

随着鲎试剂及细菌内毒素检查法的深入研究和广泛应用, 其在更多药品中取代家兔法热原检查的前景更加广阔。

参考文献

1. 中华人民共和国药典编委会, 细菌内毒检查法, 中国药典 1995 年版, 1995 年 8 月: 附录, 76 页。
2. 黄清泉等, 药品细菌内毒素检查的实验设计, 中国药学杂志 1997; 32 (2): 72
3. 杨常敏等, 药品细菌内毒素检测研究进展, 中国药房 1999, 10 (增刊): 165
4. 魏家华等, 鲎试法检查硫酸阿米卡星注射液的热原 中国药学杂志 1997; 32 (增刊): 42
5. 朱至明, 甘露醇注射液的鲎试验方法 中国药学杂志 1997; 32 (增刊): 144
6. 张春宝, 再谈 20% 甘露醇注射液中细菌内毒素检查, 中国药房, 1999; 10 (增): 75
7. 李梅荣等, 几种常用医院输液制剂细菌内毒素检查方法的研究 中国药学杂志 1997; 32 (增刊): 154
8. 黄清泉等, 紫杉醇注射液对细菌内毒素检查的干扰作用比较研究 中国药学杂志 1997; 32 (增): 145
9. 聂凤文等, 细菌内毒素检查法用于环丙沙星注射液的热原检测 中国药学杂志 1997; 32 (增): 146
10. 张军, 替硝唑葡萄糖注射液细菌内毒素的检测 中国药学杂志 1997; 32 (增): 147
11. 王晓东, 注射用辅酶 A 细菌内毒素检查方法的探讨 中国药学杂志 1997; 32 (增): 148

12. 陈邦树, 血检通注射液细菌内毒素检查法研究 中国药学杂志 1997; 32 (增): 153
13. 范兵等, 3种抗生素药品的细菌内毒素检测方法的对比考察实验 中国药学杂志 1997; 32 (增): 161
14. 郭桂芳等, 注射用青霉素钠细菌内毒素检查法的研究 黑龙江医药 1998, 11 (2): 75
15. 郭红等, 青霉素细菌内毒素检测研究 药物分析杂志 1992, 12 (3): 184
16. 戴子贞等, 鲎试剂检查硫酸卡那霉素注射液中的细菌内毒素 中国药学杂志 1996, 31 (6): 337
17. 李文, 盐酸林可霉素注射液的细菌内毒素检查法研究 中国药学杂志 1997; 32 (增): 145
18. 李文等, 三种氨基酸原料的细菌内毒素检查法 中国药学杂志 1997; 32 (增): 149
19. 陈存兰, 氯霉素注射液细菌内毒素检查法的初步探讨 广西医学 1997, 19 (4) 688
20. 邵卫梁, 鲎法检测茵栀黄注射液热原 中成药 1997, 19 (2): 17
21. 王桂孜等, 强力宁注射液细菌内毒素检查方法的建立与应用 中成药 1997, 19 (12): 45
22. 邱文炜等, 强力宁注射液细菌内毒素检查法的干扰试验 广东药学院学报 1997, 13 (3): 188
23. 刘萍等, 复方丹参注射液细菌内毒素检查 中成药 1997, 19 (7): 13
24. 姜如敏, 细菌内毒素检查法检测丹参注射液热原的探讨 中国中药杂志 1998, 23 (7): 414
25. 程敏等, 维生素 B₁ 注射液细菌内毒素检查法探讨 中国药师 1999, 2 (3): 154
26. 尹一子等, 用鲎试验检测 10%甘油注射液中内毒素的方法 白求恩医科大学学报 1997, 23 (4): 440
27. 黄素丹等, 碳酸氢钠注射液的细菌内毒素与检测 广东药学院学报 1997, 13 (3): 198
28. 李敏玲等, 鲎试验检测注射用氨苄青霉素钠中内毒素的研究 中国药学杂志 1996, 31 (2): 104
29. 马凤秋等, 甲硝唑注射液的细菌内毒素试验考察 中国药学杂志 1995, 30 (2): 117
30. 孙亦群等, 鲎试验法检测丽参注射液中热原的可行性研究 中药新药与临床药理 1996; 7 (2): 38
31. 黄清泉等, 泰索帝 (Taxotere) 细菌内毒素检查方法的建立 中国药房 1996; 7 (2): 85
32. 韦群等, 红花注射液细菌内毒素检查法的研究 鲎试剂应用与进展 1997; (1): 13

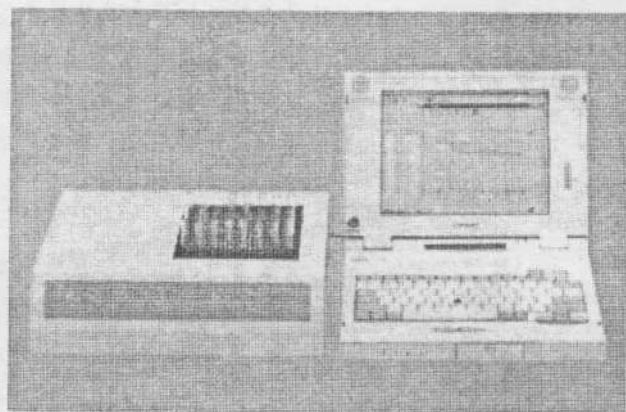
定量检测试剂系列价目表

品 名	货 号	规 格	价 格
动态浊度法鲎试剂	KT-116	1.2ml	55.00 元/支
	KT-117	2.2ml	100.00 元/瓶
动态显色法鲎试剂	KC-116	1.2ml	70.00 元/瓶
	KC-117	2.2ml	130.00 元/瓶
内毒素工作品	E-120B	50EU	8.00 元/支
实验用水 (内毒素含量 < 0.001EU/ml)	W-105	5ml	1.00 元/支
	W-102	30ml	5.00 元/瓶
	W-103	100ml	14.00 元/瓶

EDS 系列细菌内毒素定量测定系统

特点:

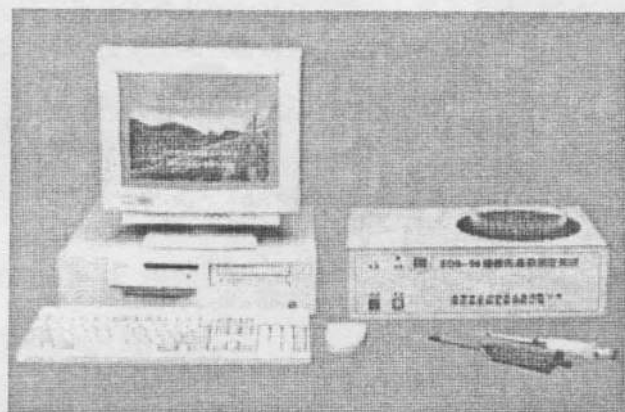
- 世界上第一台采用试管做反应容器，适用于凝胶限量法、动态浊度定量法、动态显色定量法的仪器。
- 动态浊度定量法和动态显色定量法检查快速，30-40分钟便可完成。
- 动态浊度定量法和动态显色定量法检查范围宽，从0.001-1000EU/ml。
- 反应时间、通讯口、动力学曲线的X轴和Y轴等参数均可通过软件设定。
- WINDOW95下的软件包，安装简便，易学易会。



EDS-99 细菌内毒素测定系统

用途:

- 在医药生产过程中，定量检测可监测到生产环节中的内毒素含量的变化趋势，便于厂家及时采取措施，避免出现不合格的最终产品而造成经济损失。
- 细菌内毒素的定量测定对许多疾病的诊断及治疗效果判断具有重要意义，动态显色定量法特别适合于对人体血液中的内毒素水平进行定量测定。



EDS-98 细菌内毒素测定系统

湛江安度斯生物有限公司

《鲨试剂应用与进展》编辑组

地址：湛江市人民大道中38号

邮编：524022

电话：(0759) 3380671 3380672 转

Email: ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn