

# 试剂应用与进展

周海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 1998年第2期(总第3期) 1998年7月18日

## 目 录

### ·译文及专利·

非内毒素反应物质对鲎试验的影响····· (2)

### ·经验交流·

四种抗生素对细菌内毒素试验的干扰作用考察····· (6)

沙星类抗生素细菌内毒素检查方法的研究····· (9)

附:美国几类常见的抗生素等药品与细菌内毒素检查法相关的数据····· (12)

### ·学术交流动态·

细菌内毒素检查法考察报告····· (14)

### ·文献题录·

注射用葡萄糖、生理盐水、右旋糖苷等药品的国内外鲎试验信息····· (16)

### ·新产品介绍·

内毒素指示剂····· (18)

EDS-98型细菌内毒素测定系统····· (19)

## 非内毒素反应物质对鲎试验的影响

James F. Cooper    Marlys E. Weary  
Foster T. Jordan

**\*摘要:** 鲎试剂可以被细菌内毒素和特定的葡聚糖激活, 因为商用鲎试剂与 LAL 反应葡聚糖 (LAL-RGs) 的反应的高变异性, 导致不同实验室的鲎试验结果存在潜在的差异, 本文回顾了天然  $\beta$ -D-葡聚糖对 LAL 的激活作用和葡聚糖不敏感的 LAL 技术, 为解决上述差异提供了背景资料。动态鲎试验技术尤其适用于筛选有潜在葡聚糖污染的材料。 $\beta$ -葡聚糖在非口服药中的存在并不普遍, 只限于与微生物或纤维素接触的产品。本文还推荐了一个方法用于鉴定 LAL-RGs 和进行没有葡聚糖干扰的鲎试验。

### \*引言:

采用鲎试验检查内毒素具有灵敏、专一、简便、易于排除干扰因素等优点; 当鲎试剂应用拓展, 其专一性受到了质疑, 经常有报导鲎试剂可被非内毒素物质激活, 这些物质被称为 LAL 反应物质 (LAL-RMs), 其天然成份为葡聚糖。鲎试验技术应用于工业中, 这种激活会导致实验室之间潜在的不一致和假阳性结果。本文致力于澄清 LAL 专一性的问题, 以促进对鲎试验结果更进一步的认识。

### \*多糖激活 LAL

内毒素介导的鲎反应已被充分地阐明和鉴定, 鲎血细胞溶解物中包含多种宿主与革兰阴性菌内毒素产生凝血反应的必要成份, 当细菌内毒素与胞溶物接触, 会引发一系列酶促反应, 这一反应至少涉及三种丝氨酸蛋白酶, 因子 C、因子 B 和凝固蛋白酶原, 内毒素反应途径的终点是催化凝固蛋白原——一种无脊椎动物纤元样可凝结蛋白成为凝固蛋白凝胶, LAL 中的其它蛋白因子如抗脂多糖因子对 LPS 介导的鲎反应有调节作用。(图一略)

LAL 的激活一直被认为是内毒素专一的, 直到有报导一种羧甲基化葡聚糖可激活 LAL, 此后不久, 血液透析器的中空纤维膜浸取液也被发现具有较高的鲎反应活性, 但兔法热原检查却为阴性, 绵毛和一些医用纤维材质的滤

膜中也陆续发现纤维素类 LAL-RMs; LAL-RGs 还被发现存在于真菌细胞壁中, 这些 LAL-RMs 都属于一类  $\beta$ -D-葡聚糖, 它们通过另一条 G 因子介导的反应途径激活凝固酶原; 根据我们的经验, 制药工艺中与纤维素膜、滤纸或酵母提取物长期接触的产品都会含有 LAL-RMs, 而葡聚糖的其它污染源则缺乏报道, 这意味着在工艺用水或化学合成的材料中还没发现葡聚糖。

### \* $\beta$ -D 葡聚糖激活 LAL 的特征

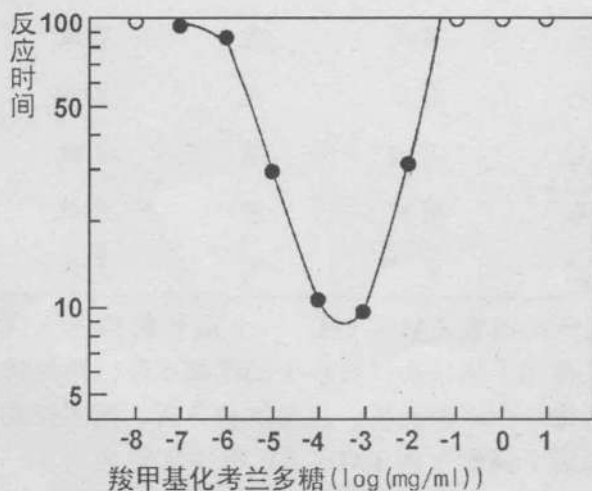
内毒素与葡聚糖具有不同的微生物来源、结构和药理反应也不同, 葡聚糖对 LAL 的反应比 LPS 至少低 1000 倍, 内毒素的生物活性需脂质 A, 而  $\beta$ -葡聚糖中没有发现类似的结构域, 碱性条件下, 内毒素会失去 LAL 反应性和生物活性, 而葡聚糖则相对稳定, 这为制备无内毒素的葡聚糖提供了一种方法; 两种物质都能通过除菌滤膜, 因此消除任何一种的痕量污染都很困难。在关于静脉血透析病人体内含有 LAL-RMs 的报导之后, Pearson 和他的同事确定 LAL-RMs 存在于纤维素透析器的洗脱液中, LAL-RM 的分子量约 24KD, 含有纤维二糖单位, 其基本重复结构是  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 键。当用纤维素酶处理后 LAL-RM 失去至少 99% 的 LAL 反应活性; LAL-RM 与内毒素在四个体外细胞实验中没有任何共同之处, 浓缩的

——鲎试剂应用与进展

LAL-RM 已达到内毒素阈剂量的 2000 倍时也未引起家兔致热。Pearson 等由此得出结论 LAL-RMs 不是内毒素, 而是一种能激活 LAL 凝固反应的纤维素衍生物。

有关  $\beta$ -D-葡聚糖对 LAL 的激活和这种激活作用的抑制物的描述更一进步扩展了我们对微生物和植物来源的 LAL-RM 的认识, 田中等报导因子 G 的激活须  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) - D-葡聚糖苷键, 而且受分子量、构型、浓度的影响, LAL-RGs 有酵母多糖, 海带多糖, 香菇多糖和由细菌提取的考兰多糖, 这些  $\beta$ -D-葡聚糖包含  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) 葡萄糖苷键和一些  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 和  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) 键, 分子量大约 3000Dal 至 10 万 Dal, 而低分子量的葡聚糖、考兰多糖降解物在特定浓度时专一性抑制 G 因子途径, 这一类的可溶性抑制物对制备内毒素专一的 LAL 非常有用, 一种可溶的羧甲基化考兰多糖已用作鲎试剂  $\beta$ -葡聚糖阻断剂, 在 1~1000ng/ml 时它可激活 LAL, 但超过 0.1mg/ml 时可阻断 LAL-RGs, 图 2 显示羧甲基化考兰多糖在  $1 \sim 10^{-6}$ mg/ml 范围的 LAL 反应曲线。

葡聚糖检查法也有其它的报导方法。土谷等描述了一种蚕体液试剂 (SLP) 用于检查  $\beta$ -D-葡聚糖和肽聚糖——真菌细菌的组份, 苯酚氧化酶系统的激活产生凝胶, 可采用动态浊度或目测分析; 而 G 检查法则是利用中国鲎凝固因子 G 来检查葡聚糖。



(图二)

#### \* 不同鲎试剂的影响

尽管商用鲎试剂已使用内毒素国家标准品统一标示, 但对 LAL-RM 的反应却明显多变。首先这种变异归因于鲎试剂生产者使用有机溶剂来去除抗脂多糖因子以提高对 LPS 的灵敏度; 而未经这种方法处理的 LAL 则使用另一种方法来增强灵敏度, 在鲎试剂配方中加入一种表面活性剂可增强试剂对内毒素的灵敏度, 而且令试剂缺乏葡聚糖反应性, 当用有机溶剂萃取出表面活性剂, 葡聚糖反应性又恢复。

一系列的 LAL-RGs 的鲎试验结果缺乏实验室间的一致性, 有些数据还互相矛盾, 例如如果一个液体介质的供应商使用 LAL-RM 不敏感的鲎试剂检查葡聚糖污染的物料, 而他的用户使用 LAL-RM 敏感的鲎试剂检查收料, 甚至美国 FDA 的参考鲎试剂是葡聚糖敏感的, 这就使工业中鲎试验的数据与法规之间产生了潜在的分歧; 为了消除不同实验室对葡聚糖的检查分歧, 需要一有效的方法从葡聚糖中分辨内毒素。如前所述, LAL 对 LAL-RMs 的反应可以通过使用去除 G 因子试剂或可溶性的葡聚糖阻断物来区分, 平行的试验则不使用阻断剂, 如果两组反应终点存在显著差异, 就很可能存在  $\beta$ -葡聚糖。

检品中存在 LAL-RGs 会产生令人费解的鲎试验结果。表 I 提供了动态显色法 (KCA) 检查的三个批号抗生素原料药, 其中含有不同的微量葡聚糖, 标准曲线用 RSE 和 Endochrom-K<sup>TM</sup> LAL 制作, 从 0.05 至 5Eu/ml, 内毒素对照为 0.5Eu/ml; A 批次抗生素原料使用葡聚糖阻断的 LAL 和敏感 LAL 都没有可测的内毒素, 而 B 和 C 批次, 不阻断 G 因子反应, 内毒素对照的回收率则无效, C 批次的内毒素效价已接近限值; 当使用葡聚糖阻断剂 (GB) 溶解鲎试剂, 采用 KCA 再分析一次, 所有结果都显示无可检测到的内毒素, 所有的回收率都有效 ( $\pm 50\%$ )。这一研究例证了使用动态分析法检查怀疑有葡聚糖干扰比凝胶法更有效, 因为内毒素和葡聚糖对 LAL 的反应具有协同性。葡聚糖与内毒素对照的协同反应产生了无效的鲎试验, 回收率是不许可的增强 (>



150%); 试验的无效导致一个新的、使用内毒素专一鲎试剂检查, 为产品通过检查提供了一个机会。

表 I 动态显色法分析抗生素原料药中微量 LAL - RG (LRG)

批次	无 LRG 阻断剂		加入 LRG 阻断剂	
	Eu/mg	回收率%	Eu/mg	回收率%
A	< . 014	110	< . 014 <	90
B	< . 014	152	< . 014 <	82
C	< 0. 1	337	< . 014 <	99

商用的 KCA 鲎试剂可用于 LAL - RGs 的筛选, 海带多糖用 NaOH 除去内毒素后用作葡聚糖的一个来源, 它的结构为 (1→3) 键, 纤维素类 LAL - RM 如前所述从中空纤维素中提取, 结构为混合键, 无菌、无内毒素的羧甲基考兰多糖已用于复溶鲎试剂使试剂专一内毒素, 每种商用试剂盒、动态浊度 (KTA) 试剂、动态显色试剂都采用保温酶标仪和内毒素测量软件 (Thermomax 和 Softmax2. 34) 系统, 标准曲线为 RSE 制备从 0. 05Eu/ml 到 5Eu/ml, 内毒素控制为 midpoint 0. 5Eu/ml。表 II 显示两种葡聚糖

的检查结果, 十倍稀释的海带多糖系列在  $2 \times 10^{-2}$  至  $2 \times 10^{-5}$  mg/ml 为可检测的范围, 反应结果大于 0. 05Eu/ml 被视有反应, 回收率大于 150% 因为增强, 结果无效; < 0. 05Eu/ml 为无反应, 回收率在  $\pm 50\%$  时有效。纤维素类的 LAL - RM 从 0. 3mg/ml 为首浓度制备一系列十倍稀释液采用与海带多糖同样的试剂及方法检查。结果显示, 除了使用羧甲基考兰多糖阻断剂外, 所有的鲎试剂对 LAL - RM 都有反应, 这些动态试剂同凝胶法试剂一样高变异。

表 II、商用动态鲎试剂对两种 LAL - RG 的反应

试剂	分析方法	海带多糖		纤维素 LAL - RM	
		反应性	回收率	反应性	回收率
Endosafe - KTA	KTA	有	无效	有	无效
Endosafe - KTA ⊕ 考兰多糖	KTA	无	有效	无	有效
Endochrom - K	KCA	有	无效	有	无效
Endochrom - K ⊕ 考兰多糖	KCA	无	有效	无	有效
Pyrogen - 5000	KTA	无	有效	无	无效
KQCL	KCA	无	有效	有	无效
Pyrotell T	KTA	无	有效	有	无效
Pyrochrome	KCA	有	无效	有	无效

\* LAL - RM 的体内慢性作用

低剂量的 LAL - RM 对哺乳动物机体的慢性影响仍是未知, 一份关于微生物葡聚糖生物活性的综述中阐述了  $\beta$  (1→3) - D 葡聚糖在治疗人类肿瘤中起免疫促进剂的作用, 因为宿主防御机制被激活而不表现出毒性和抗原性。

对于纤维素 LAL - RM, 一个最坏的情况下病人使用干燥结构, 可再生的纤维素膜 (铜氨仿纤维) 作血液透析, 经鲎试验分析, 病人长期暴露于高水平的 LAL - RM 中达数年之久, 一项研究证实病人血清中的 LAL - RM 平均水平相当于  $50 \pm 4$  ng/ml 的内毒素。相反, 透析膜

为合成材料的非纤维素质如聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、聚砜、乙烯乙二醇等就不会产生 LAL - RM。

有人提议,从纤维素膜上解离的葡聚糖可能要对透析病人的一些长期不可逆的影响负责,这些副作用包括动脉粥样硬化、高血压、骨营养不良、缺血性心脏病、神经病和淀粉样蛋白血。如果葡聚糖 LAL - RM 是这些病症的主要因素,那么使用合成膜应该更安全、健康,然而最近的透析技术报告对这种提议提出异议,细胞变动素的水平例如 IL - 1、TNF 所引起的负面作用在所有透析病人中都被观察到,(与所使用膜的种类无关)这主要应归因于血液与膜表面接触的原因。

更有趣的是,一个长期的对照实验将病人分为使用纤维素膜和合成膜两组,试验进行了数年的医学检查和病情记录,评价内容包括心血管、胃肠道、骨关节、复合神经系统,与血透析相关的淀粉样蛋白血病也作了生物化学及仪器分析评价,研究结论是两组病人之间没有差异,尽管统计中的显著系数  $P < 0.05$ ,使用合成膜的病人(23.8%比13.2%)却有更高的因 Carpal Tunnel 综合症而进行外科手术的机率;大量的病人仍主要使用铜氨纤维膜,尽管合成膜具有比铜氨纤维膜更好的生物相容性。

一项研究评价了血浆中真菌多糖水平的影响,与内毒素相反从白色念珠菌中提取的可溶性  $\beta(1 \rightarrow 3)$  葡聚糖与血浆脂蛋白未显示出结合,其器官分布也不同于内毒素,葡聚糖可快速被清除而且不能改变红细胞数、TNF 水平和脂代谢,因此作者得出结论, $\beta - D -$  葡聚糖不应该对深度真菌感染病人的病理变化负责。

最后 FDA 的一份有关 LAL 检查葡聚糖的报告指出,产品中痕量的 LAL - RM 不必视为杂质或不利因素。

#### \* 慎用内毒素专一鲎试剂

因为没有通用的葡聚糖标准物和许可的葡聚糖限值,鲎试验检查葡聚糖一直受限;反应的变异性和依赖于检查浓度致使 LAL 很少能

用于葡聚糖检查;事实上,与浓度相关的抑制作用阻碍了 LAL 检出显著水平的葡聚糖,这也许是天然产生的葡聚糖缺乏 LAL 反应性的一个重要原因。由于 LAL 检查葡聚糖受到诸多限制和缺乏足够的数据来支持  $\beta -$  葡聚糖有害健康,致使葡聚糖只被认为是鲎试验的干扰而不是明显的污染,最新版本日本药典 BET 中建议使用葡聚糖阻断剂来检查含有  $\beta -$  葡聚糖的物质以避免误检。

当产品中发现未预期的高水平内毒素,葡聚糖的存在就会被怀疑,尤其在内毒素已属于危险的类别时,动态法检查内毒素对照的回收存在较大的增强时,很可能是葡聚糖的因素内毒素与葡聚糖的协同作用使检查无效。据此可辨别葡聚糖的污染。

有两种方法解决葡聚糖对鲎试验的干扰,一是使用葡聚糖敏感和葡聚糖阻断的鲎试剂来区分内毒素或葡聚糖,若可能,确定葡聚糖的污染源,建立从产品中消除污染的目标;二是使用葡聚糖阻断鲎试剂作为特定产品的合格性检查,如医疗器械、羧甲基化多糖,这一方法只用作专一检查内毒素。

#### \* 结论:

鲎凝血系统存在两个微生物多糖激活途径,分别是 LPS 和 LAL - RMs ( $\beta - D -$  葡聚糖),然而葡聚糖的干扰并不普遍,仅限于在生产过程中与纤维素膜、滤纸或其它微生物葡聚糖接触的产品,没有证据表明葡聚糖有害健康,尽管使用葡聚糖敏感的鲎试剂可能偶而产生增强的鲎试验结果。专一鲎试验已用于确证检品中是否含有内毒素,在生产过程控制、终产品检查中,组合使用葡聚糖敏感和葡聚糖阻断动态鲎试剂可从确证脂多糖是否存在,这一方法提供了有关存在多糖污染的关键信息,因此有争议的鲎试验结果可以被解释、解决。

#### 致谢:

作者感谢 Jack Levin 和 Fred Pearson 的帮助,建议和细心审阅全文,多谢 Frances Cooper 细心处理和审阅草稿。

参考文献:略

(刘冰译)

# 四种抗生素对细菌内毒素试验的干扰作用考察

广西药品检验所 陈邦树

**摘要** 本文按照美国药典 1995 年 23 版规定的细菌内毒素限值, 考察了硫酸庆大霉素注射液、注射用青霉素钠、注射用氨苄青霉素钠、注射用头孢唑啉钠四种抗生素对细菌内毒素试验的干扰, 结果表明, 在浓度分别为  $600\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $10000\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $6.8\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  和  $6.8\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  时对细菌内毒素试验均无干扰作用, 可用细菌内毒素检查法控制热原。

**关键词** 抗生素 细菌内毒素检查 干扰试验

硫酸庆大霉素注射液、注射用青霉素钠、注射用氨苄青霉素钠、注射用头孢唑啉钠四种抗生素均为中国药典 1995 年版收载的品种, 其热原检查方法为家兔法; 而美国药典 1995 年 23 版则全部改用细菌内毒素检查法, 这比用家兔法检查热原提供了更大的安全性。本文参照美国药典规定的细菌内毒素限值考察了桂林市第二制药厂生产的上述抗生素药品对细菌内毒素检查的干扰, 为建立这些品种的细菌内毒素检查法提供依据。

## 1 材料

1.1 硫酸庆大霉素注射液: 规格  $2\text{ml}:8\text{万 u}$  ( $80\text{mg}$ ), 批号 960904、960905、960906、960907、960909; 注射用青霉素钠: 规格  $80\text{万 u}\cdot\text{瓶}^{-1}$ , 批号 970514、970515、970516、970517、970518; 注射用氨苄青霉素钠: 规格  $0.5\text{g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ , 批号 961204、961205、961206、961207、961208; 注射用头孢唑啉钠: 规格  $0.5\text{g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ , 批号 960603、960604、960605、960606、960607, 桂林市第二制药厂生产。

1.2 细菌内毒素国家标准品 (RSE): 批号 962,  $7,200\text{Eu}\cdot\text{支}^{-1}$ , 中国药品生物制品检定所生产; 鲎试剂 (TAL): 批号 970904, 灵敏度 ( $\lambda$ )  $0.5\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 规格  $0.5\text{ml}\cdot\text{支}^{-1}$ , 细菌内毒素检查用水 (WBET): 批号 961128, 规格  $5\text{ml}\cdot\text{支}^{-1}$ , 湛江安度斯生物有限公司生产。

1.3 除热原空安瓿、除热原吸头等器具由湛江安度斯生物有限公司提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 TAL 灵敏度复核

按中国药典 1995 年版二部<sup>[2]</sup>规定的方法复核灵敏度, 结果符合规定。

### 2.2 内毒素限值 (L) 的确定

按中国医药工业公司及中国药品生物制品检定所药工字 [1997] 第 58 号“关于开展青霉素钾 (钠) 等八个抗生素品种细菌内毒素检查法对比试验的通知”要求, 抗生素品种的细菌内毒素限值拟按美国药典 1995 年 23 版<sup>[3]</sup>的限值。硫酸庆大霉素为  $1.7\text{Eu}\cdot\text{mg}^{-1}$  [或  $0.17\text{Eu}\cdot(100\text{u})^{-1}$ ]、注射用青霉素钠为  $0.01\text{Eu}\cdot(100\text{u})^{-1}$ 、注射用氨苄青霉素钠为  $0.15\text{Eu}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、注射用头孢唑啉钠为  $0.15\text{Eu}\cdot\text{mg}^{-1}$

### 2.3 限量检查的最高浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 计算

由于市售 TAL 的  $\lambda$  值一般在  $0.03\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$  ~  $1.0\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$  范围内,  $1.0\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$  TAL 所对应的 MVC 即为限量检查可能使用的最高浓度  $C_{\text{max}}$ , 按公式  $\text{MVC} = \lambda \cdot L^{-1}$ ,  $C_{\text{max}} = (1.0\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}) \cdot L^{-1}$  计算可得各供试品的最高浓度<sup>[1]</sup>。硫酸庆大霉素注射液为  $588\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、注射用青霉素钠为  $10000\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、注射用氨苄青霉素钠为  $6.7\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、注射用头孢唑啉钠为  $6.7\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。为便于稀释, 试验中供试品最高浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 采用中国药品生物制品检定所推荐的浓度近似值, 即分别为  $600\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $10000\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $6.8\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  和  $6.8\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。



## 2.4 干扰试验

按中国药典 1995 年版二部干扰试验方法进行试验, 使用同一批号 (970904) 的 TAL, 测定并比较同一批 RSE 在供试品系列及 WBET 系列中的效价 ( $E_t$  及  $E_s$ )。RSE 以 WBET 溶解, 配制成  $1.0\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.5\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.25\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.125\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$  的稀释液。以 WBET 溶解 TAL, 与 RSE 稀释液反应即为 WBET

系列; 以供试品溶液 ( $C_{\text{max}}$ ) 代替 WBET 溶解 TAL, 与 RSE 稀释液反应即为供试品系列。上述两个系列分别以 WBET 和供试品溶液 ( $C_{\text{max}}$ ) 作阴性对照。结果按公式:  $E_t$  (或  $E_s$ ) =  $\lg^{-1}(\sum X/4)$  进行计算 ( $X$  为供试品系列或 WBET 系列各反应终点内毒素浓度的对数值), 见表

表 1. 四种抗生素的干扰性试验结果

样品名称	批数	检测浓度	NC 管	$E_t$ 及 $E_s$ 范围	$E_t/E_s$ 范围	结论
硫酸庆大霉素注射液	3 批	600u/ml	-	0.5λ ~ 2.0λ	0.5 ~ 2.0	无干扰
硫酸庆大霉素注射液	2 批	600u/ml	+	-	-	-
注射用青霉素钠	5 批	10000u/ml	-	0.5λ ~ 2.0λ	0.5 ~ 2.0	无干扰
注射用氨苄青霉素钠	5 批	6.8mg/ml	-	0.5λ ~ 2.0λ	0.5 ~ 2.0	无干扰
注射用头孢唑啉钠	5 批	6.8mg/ml	-	0.5λ ~ 2.0λ	0.5 ~ 2.0	无干扰

表 1 可见, 硫酸庆大霉素注射液三批 (960904、960907、960909)、注射用青霉素钠 5 批、注射用氨苄青霉素钠 5 批及注射用头孢唑啉钠 5 批的  $E_t$  值及  $E_s$  值均在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$  范围内, 且  $E_t$  与  $E_s$  的比值均在  $0.5 \sim 2.0$  范围内。硫酸庆大霉素注射液在  $C_{\text{max}}$  浓度 ( $600\text{u}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 时有两批样品 (960905, 960906) 使灵敏度为  $0.5\text{Eu}\cdot\text{ml}^{-1}$  的鲎试剂产生凝集反应 (即两批样

品不适作此浓度下的干扰试验), 因此本两批不作干扰判断。上述结果表明, 四个抗生素药品在浓度为  $C_{\text{max}}$  时对细菌内毒素检查无干扰, 可用细菌内毒素检查法控制热原。

## 2.5 样品的细菌内毒素检查方法

按中国药典 1995 年版二部细菌内毒素检查法进行试验<sup>[2]</sup>, 同时增设两支阳性产品对照管 (PPC 管)。结果见表 2。

表 2. 四种抗生素的细菌内毒素检查结果

样品名称	批数	检测浓度	样品管	NC	PC	PPC	结论
硫酸庆大霉素注射液	5 批	300u/ml	--	-	+	++	合格
注射用青霉素钠	5 批	5000u/ml	--	-	+	++	合格
注射用氨苄青霉素钠	5 批	3.4mg/ml	--	-	+	++	合格
注射用头孢唑啉钠	5 批	3.4mg/ml	--	-	+	++	合格

结果可见, PPC 管均为阳性, 样品在检查浓度下对反应无抑制作用, 所检查的 20 批样品 (包括内毒素污染相对较多的两批硫酸庆大霉素注射液, 960905、960906) 细菌内毒素含量均小于限值。

## 3. 讨论

3.1 药品采用细菌内毒素检查的先决条件是证明药品在满足限量检查要求的浓度下对细菌

内毒素试验不产生干扰作用, 如果药品在高浓度时对细菌内毒素试验无干扰, 则在更低浓度时也不会产生干扰<sup>[1]</sup>。实验结果表明, 四个抗生素药品在满足检查要求的最高浓度时对细菌内毒素试验均无干扰作用, 因此均可采用细菌内毒素检查法控制热原。

3.2 细菌内毒素试验的反应过程较为复杂, 干扰反应的因素较多。在使用不同厂家的鲎试

剂或检测不同厂家的药品等情况下,其干扰可能有所不同。在进行细菌内毒素检查时,除可重新进行干扰试验外<sup>[1]</sup>,也可通过使用特异性鲎试剂及设立 PPC 管的方法以防止因药品本身的增强或抑制作用引起的假阳性或假阴性反应,提高实验结果的可靠性<sup>[4-5]</sup>。

参考文献

1 黄清泉,夏振民.药品细菌内毒素检查的实验设计.中国药学杂志.1997; 32(2): 72  
2 卫生部药典委员会.细菌内毒素检查

法.中国药典1995年版二部.北京:化学工业出版社,广东:广东科技出版社,1995:附录76

3 Bacterial endotoxins test.USP X X III & NF X V III.1995: 1696~1697  
4 夏振民,刘大英.特异性鲎试剂研究进展.药物分析杂志1997; 17(5): 353  
5 陈邦树.血栓通注射液细菌内毒素检查法研究.中国药学杂志1997; 32(增刊): 153

(上接第11页) 各浓度状态的 pH 值以及与 TAL 等比混合后的 pH 状态,表明沙星类样品不但 pH 值低,而且具有一定的缓冲能力,在一定的浓度范围时使得 TAL 自身的缓冲能力不能将反应介质的 pH 值缓冲到合适的范围,造成对 BET 的抑制作用。用 pH 调节剂(稀释剂 II)稀释 S<sub>C</sub> 后再与 TAL 等比混合,反应介质的 pH 值恢复到正常的水平 6.96。表 6 的结果表明,用 pH 调节剂稀释样品后,消除了样品对 BET 的抑制作用。由于用 BET 水稀释 S<sub>C</sub> 8 倍后与 TAL 等比混合的混合液的 pH 值已达到

6.94,这解释了使用高灵敏度 TAL 作检查无需调节样品 pH 值的原因。

7.3 结论:沙星类抗生素注射剂对 BET 有抑制作用,干扰的原因是产品的 pH 值偏低造成的。对此类产品作 BET 可采用两种方法:一是用 BET 水对样品作较大倍数稀释(8~16 倍),用较高灵敏度(0.06~0.03EU/ml)的 TAL 做检查;二是使用 pH 调节剂来调整样品的 pH,使反应介质的 pH 值达到适合 TAL 反应的水平,这样可以使低灵敏度(0.25EU/ml)的 TAL 作 BET。

(上接第16页) B:凝胶法半定量检查

将未干热的指示剂内毒素液 10 倍稀释至接近所选用鲎试剂的灵敏度,再二倍稀释制备 4λ、2λ、λ、0.5λ、0.25λ 系列,半定量检查指示剂内毒素回收量,残余内毒素限量检查即可;

例:使用 0.125Eu/ml 鲎试剂,结果如下:

$$\lg R_d = \lg 2,000 - \lg 0.125 = 4.2$$

因此,干热程序的内毒素对数衰减至少为 4.2

C:动态分析法

动态浊度或动态显色分析法都可使用,标准曲线为二个数量级即可,一般为 0.05 到 5Eu/ml 范围,未干热指示剂内毒素 1000 倍稀释作为阳性对照,干热后残余内毒素作为样品,阳性对照不小于 500Eu/瓶,残余内毒素不大于 0.5Eu/瓶即满足 1000 倍的灭活内毒素要求,

例  $\lg R_d = \lg 2,000 - \lg 0.05 = 4.6$

6、注意事项:

本品仅用于体外试验,严禁以任何方式用于人体。



# 沙星类抗生素细菌内毒素检查方法的研究

朱焕杰 韦群 陈喻 冯聚锦

(湛江安度斯生物有限公司 524022)

**摘要:** 本文通过实验验证沙星类抗生素注射剂对 BET 有抑制作用, 干扰的原因是此类产品的 pH 值偏低所致。通过实验研究推荐使用高灵敏度 TAL 或使用 pH 调节剂调节样品的 pH 水平来作 BET。

**关键词:** 沙星类抗生素 细菌内毒素检查 TAL

氧氟沙星、诺氟沙星、乳酸环丙沙星等都是临床上较常用的抗生素。美国药典 (USP) 对环丙沙星抗生素注射剂要求作细菌内毒素检查项, 内毒素限值为 0.25EU/mg。国内对抗生素注射剂仍规定作热原检查项。本文通过实验表 1:

研究沙星类抗生素注射剂细菌内毒素检查 (BET) 的方法, 供生产此类品种的企业在生产过程质控上应用细菌内毒素检查法时作参考。

### 1. 实验样品及试剂

样品号	名称	产地	批号	规格	来源
S <sub>A</sub>	氧氟沙星葡萄糖注射液	湛江	970102	100ml: 0.2g	市售
S <sub>B</sub>	氧氟沙星葡萄糖注射液	海南	96110321	250ml: 0.2g	厂家提供
S <sub>C</sub>	乳酸环丙沙星注射液	广州	9801121A	100ml: 0.2g	市售
S <sub>D</sub>	诺氟沙星葡萄糖注射液	海南	970324-02	100ml: 0.2g	厂家提供

鲎试剂 (TAL): 湛江安度斯生物有限公司产品, 0.1ml/支

内毒素国家标准品: 批号 981, 9000EU/支

细菌内毒素检查用水 (BET 水): 湛江安度斯公司产品, 批号 980408, 100ml/瓶, 内毒素含量 < 0.005EU/ml

素含量 < 0.005EU/ml

pH 调节剂, 稀释剂 II, 湛江安度斯公司产品, 批号 980525, 含 Tris 0.01M, pH7.0

### 2. TAL 灵敏度复核试验

按照九五版药典 BET 的规定复核实验用 TAL 的灵敏度, 结果见表 2。

TAL 批号	标示灵敏度 (λ)	内毒素浓度 (EU/ml)						复核灵敏度 (λ <sub>0</sub> )
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	NC	
980430	0.25EU/ml	++++	++++	-----	-----	-----	--	0.25EU/ml
980109	0.06EU/ml			++++	++++	-----	--	0.06EU/ml

两批 TAL 复核结果 λ<sub>C</sub> 与 λ 一致, 符合使用要求。

### 3. 初筛试验

取样品 S<sub>C</sub> 作试验, 内毒素限值 (L) 按 USPO.25EU/mg 计算为 0.5EU/ml。用 BET 水将 S<sub>C</sub> 作 2, 4, 8, 16 倍的稀释, 记此稀释液系列

为 NPC 系列。另将  $S_C$  作与 NPC 系列同样倍数的稀释，但在稀释过程加入标准内毒素，使每一稀释度的稀释液都含  $2\lambda$  (0.5EU/ml) 浓度的标准内毒素，记此稀释系列为 PPC 系列。

取  $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$  的 TAL 分别与上述两个样品稀释系列反应，每一稀释度重复两反应管，结果见表 3。

表 3: 初筛试验

样品: $S_C$		TAL 批号: 980430		$\lambda = 0.25\text{EU/ml}$		
样品稀释倍数		1	2	4	8	16
对应 MVD		MVD <sub>0.5</sub>	MVD <sub>0.25</sub>	MVD <sub>0.125</sub>	MVD <sub>0.06</sub>	MVD <sub>0.03</sub>
反应结果	NPC	--	--	--	--	--
	PPC	--	--	--	++	++

说明: 本实验使用的 TAL 是 0.1ml/支, 所以并没有稀释 PPC 系列, 而是用 NPC 系列的各稀释液 0.1ml 分别复溶 TAL, 再加 0.5EU/ml 的标准内毒素各 0.1ml 与之反应。以下试验均是照此方法操作。

4. 样品干扰试验

4.1 取样品  $S_A$ 、 $S_B$ 、 $S_C$  和  $S_D$ , 用 BET 水分别作 2 倍稀释, 按药典 BET 供试品干扰试验项作试验, 结果见表 4-1。

表 4-1: 样品干扰试验

TAL 批号 980430		$\lambda = 0.25\text{EU/ml}$		MVD <sub>0.25</sub> = 2 (倍)		
样品	稀释倍数	内毒素浓度 (EU/ml)				
		0.5	0.25	0.125	0.06	NC
$S_A$	2	--	--	--	--	--
$S_B$	2	+-	--	--	--	--
$S_C$	2	--	--	--	--	--
$S_D$	2	--	--	--	--	--
内毒素水溶对照		++	++	--	--	--

4.2 取样品  $S_C$  用 BET 水稀释 8 倍, 按上述方法作供试品干扰试验, 结果见表 4-2。

表 4-2: 样品干扰试验

TAL 批号 980109		$\lambda = 0.06\text{EU/ml}$		MVD <sub>0.06</sub> = 8 (倍)		
样品	稀释倍数	内毒素浓度 (EU/ml)				灵敏度
		0.125	0.06	0.03	NC	
$S_C$	2	++	++	--	--	$\lambda_S = 0.06\text{EU/ml}$
内毒素水溶液对照		++	++	--	--	$\lambda_C = 0.06\text{EU/ml}$

5. pH测定

5.1 样品的 pH 值测定见表 5-1

表 5-1:

样品	S <sub>A</sub>	S <sub>B</sub>	S <sub>C</sub>	S <sub>D</sub>
PH 值	4.52	4.05	4.05	4.83

5.2 测定 NPC 系列的 pH 值以及与 TAL 等比混合后的 pH 值, 结果见 5-2

5.3 取稀释剂 II 对 S<sub>C</sub> 作 2 倍稀释 (即 1:1 混合), 再将稀释液与 TAL 等比混合, 测得混合液的 pH 为 6.96。

表 5-2:

NPC	1	2	4	8
PH 值	4.05	4.22	4.38	4.74
NPC: TAL = 1:1				
PH 值	5.19	6.46	6.72	6.94

TAL pH7.0

6. 消除 pH 因素干扰的试验

作 2 倍稀释, 然后用稀释作干扰试验, 结果见

取稀释剂 II 分别对样品 S<sub>A</sub>、S<sub>B</sub>、S<sub>C</sub> 和 S<sub>D</sub> 表 6。

表 6:

消除 pH 因素干扰的试验

TAL 批号 980430		$\lambda = 0.25\text{EU/ml}$		MVD <sub>0.25</sub> = 2 (倍)			
样 品	稀释倍数	内毒素浓度 (EU/ml)					$\lambda_s$
		0.5	0.25	0.125	0.06		
S <sub>A</sub>	2	++	++	+-	--	--	0.177
S <sub>B</sub>	2	++	++	+-	--	--	0.177
S <sub>C</sub>	2	++	++	--	--	--	0.25
S <sub>D</sub>	2	++	++	+-	--	--	0.177
内毒素水溶对照		++	++	--	--	--	$\lambda_c$ 0.25

7. 讨论

7.1 表 3 初筛试验的结果表明, 样品对 BET 的干扰为抑制作用; 对样品 S<sub>C</sub> 作 BET, 至少要将样品稀释 8 倍, 使用  $\lambda = 0.6\text{EU/ml}$  的 TAL 作检查。表 4-1 样品干扰试验的结果进一步验证了沙星类抗生素对 BET 的抑制作用, 表明不能用常用的低灵敏度 TAL (0.5 或 0.25EU/ml) 对沙星类抗生素作 BET。表 4-2 结果表明对样品作较大倍数的稀释, 使用高灵

敏度 TAL (0.06 或 0.03EU/ml) 作检查, 可以消除样品对 BET 的抑制作用。这与国外有关资料报道用 0.03EU/ml 灵敏度的试剂检查沙星类抗生素是一致的。

7.2 表 5-1 对样品作 pH 分析的结果表明, 样品的 pH 值均在 4~5 之间, 这是沙星类抗生素必须在酸性介质中保存的原因所致, 如果介质的 pH 值大于 5.5, 溶液中就会有白色晶状物析出。表 5-2 为 S<sub>C</sub> (转下第 8 页)



附录：美国几类常见的抗生素等药品与细菌内毒素检查法相关的数据

药品中文名称	药品英文名称	USP 页码	L 值	最低抑制浓度 单位:mg/ml	最高无抑制浓度 单位:mg/ml	LAL 灵敏度
<b>西林类:</b>						
氨苄西林钠	Ampicillin Sodium Salt	111	0.15Eu/ml	40~50	10~25	0.5Eu/ml
羧苄西林钠	Carbenicillin Sodium Salt	268	0.05Eu/ml	50	25	0.125u/ml
氯唑西林钠	Cloxacillin Sodium Salt	412	0.4Eu/ml	Φ	2	0.5Eu/ml
甲氧西林钠	Methicillin Sodium Salt	979	0.1Eu/ml	30	10~15	0.5Eu/ml
萘夫西林钠	Nafcillin Sodium Salt	1045	0.13Eu/ml	2.5~6	1.3~3	0.125Eu/ml
苯唑西林钠	Oxacillin Sodium Salt	1119	0.2Eu/ml	2.5~12	1.2~6	0.125Eu/ml
替卡西林钠	Ticarcillin Sodium Salt	1550	0.05Eu/ml	25	12.5	0.5Eu/ml
青霉素 G	Penicillin Sodium Salt	1116	0.01Eu/100U	40~100	10,000U	0.5Eu/ml
苯青霉素	Benzylpenicillin Sodium Salt					
<b>头孢类:</b>						
头孢唑啉钠	Cefazolin Sodium Salt	289	0.15Eu/ml	26	13	0.5Eu/ml
头孢西丁钠	Cefoxitin Sodium Salt	304	0.13Eu/ml	10	5	0.5Eu/ml
头孢唑肟钠	Ceftizoxime Sodium Salt	312	0.1Eu/ml	12.5	6.3	0.5Eu/ml
头孢呋辛钠	Cefuroxime Sodium Salt	317	0.1Eu/ml	Φ	2	0.125Eu/ml
头孢噻吩钠	Cephalothin Sodium Salt	323	0.13Eu/ml	12	2~6	0.25Eu/ml
头孢西林钠	Cephapirin Sodium Salt	325	0.17Eu/ml	30	15	0.5Eu/ml
头孢拉定钠	Cephradin Hydrate	327	0.2Eu/ml	32	16	0.5Eu/ml

药品中文名称	药品英文名称	USP 页码	L 值	最低抑制浓度 单位:mg/ml	最高无抑制浓度 单位:mg/ml	LAL 灵敏度
<b>氨基糖苷类:</b>						
硫酸阿米卡星	Amikacin Solphate	77	0.33Eu/mg	4	2	0.25Eu/ml
庆大(良它)霉素	Gentamycin Sulphate	703	1.7Eu/mg	2.5	1.3	0.5Eu/ml
硫酸卡那霉素	Kanamycin Sulphate	862	0.67Eu/mg	2.5	1.3	0.5Eu/ml
硫酸新霉素	Neomycin Sulphate	1058	1.3Eu/mg	0.5~50	0.3~25	0.25Eu/ml
硫酸链霉素	Strptomycin Sulphate	1441	0.25Eu/mg	0.4	0.2	0.03Eu/ml
硫酸妥布霉素	Tobramycin Sulphate	1561	2.0Eu/mg	20	10	0.5Eu/ml
壮(大)观霉素盐酸盐	Spectinomycin HCl	1431	0.09Eu/mg	4~20	2~10	0.125Eu/ml
<b>四环素类:</b>						
四环素盐酸盐	Tetracycline HCl	1511	0.5Eu/mg	0.3~1	0.15~5	0.06Eu/ml
米诺环素盐酸盐	Mincycline HCl	1030	1.25Eu/mg	0.2	Φ	
<b>大环内脂类:</b>						
红霉素庚糖酸酯	Erythromycin glucoheptonate	1511	0.5Eu/mg	30	3	0.5Eu/ml
克林霉素磷	Clindamycin phosphate	392	0.58Eu/mg	24	2.4	0.5Eu/ml
克林霉素(氯林肯)	Clindamycin HCl	392	0.58Eu/mg	Φ	0.5	0.25Eu/ml
林可霉素盐酸盐	Lincomycin HCl	888	1.1Eu/mg	Φ	0.5	0.5Eu/ml
<b>多肽类:</b>						
杆菌肽	Bacitracin	159	0.01Eu/mg	0.08	0.04	
多粘菌素 E 甲磺酸钠	Colistin mesilate sodium salt	422	2.0Eu/mg	Φ	10	0.5Eu/ml
多粘菌素 B	Polymyxin B Sulphate	1243			2.5	

## 细菌内毒素检查法考察报告

赴美考察组

应美国查士利华公司 (Charles River Laboratories) 的邀请, 王思理等一行 4 人于 1998 年 1 月 16 日 ~ 27 日赴美国首都华盛顿 (Washington, DC) 和美国南卡罗来纳州查尔斯顿 (Charleston, SC) 进行为期 10 天的访问。我们这次去美国考察, 美国 FDA、美国 USPC 以及查士利华公司非常重视, FDA 负责生物制品质控评价与研究中心的 H. Donald Hochstein 博士专门抽出时间介绍美国在鲎试剂质控方面的方法与经验, 以及细菌内毒素检查法的发展与现状, USPC 执行副总裁杰罗姆·霍尔珀林, 副总裁兼标准发展部主任李·格雷迪博士等五人也专门安排时间接待了我们, 并就美国药典在细菌内毒素检查法的方法、进展等方面进行了详细介绍。查士利华公司亚洲事务副总裁李灿星先生给予了热情接待, 专程从波士顿来陪同我们参观访问; 我们这次考察作了充分准备, 是带着问题而去的, 在出访前又集中讨论了要了解的重点问题。所以这次考察我们达到了预期的目标。从考察到的结果来看, 我国目前在鲎试剂生产、质控以及细菌内毒素检查法和应用诸方面存在相当大的差距, 我们期望卫生部和有关单位领导给予重视及支持, 力争我国在较短的时间内能有更多的品种采用细菌内毒素检查法。下面就这次考察情况汇告如下:

### 一、考察组人员及主要陪同人员情况

本考察组人员 4 人, 分别是中国药品生物制品检定所王思理主任、黄清泉主管药师; 卫生部药典委员会原秘书长朱济广; 湛江安度斯生物有限公司冯聚锦总经理。领队: 王思理。

邀请方主要陪同人员共 4 人, 分别是美国查士利华公司亚洲事务副总裁李灿星 (Richard C.S. Lee) 先生; 美国 Charles River Endosafe 公司环球科技顾问詹姆斯·弗·库珀博士 (Dr.

James F. Cooper)、总经理 Foster T. Jordan、翻译蒋惠迪 (Wendy Chiang) 小姐, 除总经理外, 其余三位全程陪同访问。

### 二、主要收获

#### (一) 鲎试剂的生产和质量管理

鲎试剂生产企业可以同时生产用于凝胶法、浊度法和显色基质法的试剂, 也可以单独生产其中一种或两种试剂, 三种试剂均须按照美国联邦法律 (CFR) 的有关规定进行质量控制并送 FDA 检验通过后方可销售。生产企业在批批送检时须呈交所有质量控制的原始记录。在对鲎试剂的灵敏度进行标定时需同时使用美国内毒素国家标准品和鲎试剂参考标准品。

其中 Charles River Endosafe 公司生产的鲎试剂 20 年来一直由 FDA 批批检定, 因其质量可靠, 从 1998 年 1 月开始, FDA 决定该公司生产的试剂每季度只送一批进行检定, 但要求呈交每批产品进行质量控制的所有数据。

美国联邦法律对 LAL 进行质量控制的项目包括灵敏度、无菌、水分、24 小时自身凝集等项目。FDA 对每批产品须在两周内通知厂家是否可以发货, 不发检定报告。

#### (二) 对内毒素标准品的管理

美国 FDA 负责管理内毒素国家标准品 (EC 系列) 和鲎试剂参考品, 政府免费提供内毒素国家标准品和鲎试剂参考品给鲎试剂生产厂家用于灵敏度标定; 工作标准品 (CSE) 由厂家自行生产和发放, 政府不核发有关执照。政府不管工作标准品原因有三点: 一是样品所含内毒素与 CSE 无关; 二是 CSE 的是否准确只与阳性对照 (PC)、供试品阳性对照 (PPC) 结果有关; 三是复核灵敏度时虽用 CSE, 但灵敏度仍以标示值为准。



EC系列标准品(目前为EC-6)与USP的RSE(目前为第G批)内容是相同的,只是批号不同。

(三)细菌内毒素检查法用于药品生产过程及最终产品的质量控制

至今,美国已将细菌内毒素检查法普遍用于肌肉注射、静脉注射、皮下注射、鞘内注射用药品(包括放射性药品)生产过程的质量控制和最终产品的质量检定,接触注射用的医疗装置亦普遍采用该法。采用热原检查法仅限于生物制品,原因是CFR有规定,同时这些厂家习惯于采用热原检查法。这只是对最终产品而言,但中间过程必须采用细菌内毒素检查法。

目前美国药典23版及1至7增补本采用细菌内毒素检查法的品种已达620余种,大约有30个品种保留热原检查法。原因是有些品种当时无法排除干扰。对由细菌生产的疫苗,因其细菌内毒素含量较高(10万EU/ml),不要求采用该法。实际上这些品种采用细菌内毒素检查法在技术上没有问题,只有法规上的问题。两年后美国药典采用细菌内毒素检查法将要达到650种,基本上不再采用热原检查法。

(四)由热原检查法改为细菌内毒素检查法

1. 细菌内毒素限值(L)的计算:  $L = K/M$  (式中K, M的意义略) 1987年以前,对原规定进行热原检查的品种, FDA规定在计算内毒素限值时, M采用热原检查剂量或人用最大剂量,以计算所得限值最小为准;但热原检查法家兔注射剂量一般都高于人用剂量,致使内毒素的限值规定过严,经过充分讨论和FDA利用细菌内毒素标准品做过60名男性志愿者的结果证明致使热阈为5EU/kg/hr时,与家兔的致热阈是一致的,因此采用人用剂量更符合实际情况,所以1993年全部改用人用最大剂量进行计算。现在欧洲药典、英国药典、印度药典和日本药局方均统一采用此规定计算内毒素限值。

2. 由热原检查法转换为细菌内毒素检查法的条件是供试品在一定条件下不干扰鲎试

验,每个厂家每个品种做3批供试品的干扰试验即可,不必进行对比试验。因为细菌内毒素检查法比热原检查法灵敏,重现性好,而热原检查法影响因素比较多。

不放心的厂家可以做对比试验,每个厂家对每个样品做3批就足够了,这样做是为了检出鲎试剂不能检出的致热性物质,但至今没有发现这种现象。

(五)细菌内毒素检查法

1. 鲎试剂灵敏度复核的目的不是考察灵敏度是否准确,而是考察操作是否准确,以及工作标准品是否准确。

2. 0.1ml规格的鲎试剂的生产与使用应与国际接轨,即在对其灵敏度进行测定时不加0.1ml水复溶,而是直接加入0.2ml标准内毒素溶液;使用时应直接加入0.2ml供试品溶液。

3. 对供试品进行常规检查时,阳性对照为4个浓度,至少有两个浓度,即 $2\lambda$ 和 $0.25\lambda$ 。同时供试品阳性对照不可缺少,每个浓度平行做两管。

4. 用于配制调节供试品酸碱度的氢氧化钠溶液、盐酸溶液、缓冲溶液等均严格要求用细菌内毒素检查用水。

(六)其他

1. 在计算大输液的内毒素限值时, M一般定为10ml/kg/hr。

2. FDA的关于细菌内毒素检查法的Guideline(指南)不具有法律效应,它不是Regulation。

3. 美国药典收载的细菌内毒素检查法的法定方法为凝胶法,其它两种方法可以采用,但需做比较试验。

4. 新药在生产过程中和最终产品的质量控制均须要求采用细菌内毒素检查法。

5. 朱济广还就口报和外用制剂微生物限量的规定等,征询USPC格雷迪博士的意见,他表示美国下一版药典不会有大的改变,他们不赞同欧洲药典收载的附录(注:1997年出版的欧洲药典片剂通则项下已写明该附录为推荐性的材料,不作为法定标 (下转第15页)

## 文献题录

旨在向读者提供各种药品的国内外鲎试验信息,读者可进一步挑选感兴趣的文章。本期主要刊载注射用葡萄糖、生理盐水、右旋糖苷部分(时间为1995年~1997年末)

- 题名: 鲎法检测葡萄糖氯化钠注射液细菌内毒素的探讨  
 作者: 方维军; 沈玲芳; 范国信  
 地址: 上海松江上海市松江县中心医院 201600  
 出处: 药学实践杂志 1997年第15卷第6期 350-351  
 关键词: 葡萄糖氯化钠注射液; 鲎试剂; 细菌内毒素; 干扰试验  
 摘要: 本文通过葡萄糖氯化钠注射液对鲎试剂的灵敏度试验,确定了其对鲎试剂凝集有干扰作用,实验结果表明,采用稀释法可排除干扰,样品1:2稀释时,可选用标定灵敏度为0.25Eu/ml的鲎试剂检测样品的细菌内毒素,该法可提高热原检查的效率和灵敏度,对实际工作具有一定的参考价值。
- 题名: 鲎法检查大输液中细菌内毒素假阳性结果判定  
 作者: 张会林  
 地址: 甘肃酒泉解放军第25医院药材科 735000  
 出处: 药学实践杂志 1997年第15卷第6期 351-352  
 标题: 鲎试剂法检测右旋糖酐20葡萄糖注射液的热原  
 作者: 常立刚; 沈以凤; 王士冰  
 著者单位: 空军天津医院 300381  
 出处: 天津药学 1996.11.01; 8(4): 94-95  
 主题词: \*葡萄糖; 热原/\*分析; \*右旋糖酐类; 注射剂; 鲎试验
- 标题: 20%、25%、50%葡萄糖注射液细菌内毒素检测方法的实验研究  
 作者: 曲道杰; 芮跃伍; 黄清泉; 杨广文; 许全明; 夏振民  
 著者单位: 北京制药厂 100020  
 中文摘要: 本文参考美国药典 XX III (1995) 规定,结合我国国情,将20%、25%、50%葡萄糖注射液的细菌内毒素限值(L)初定为5Eu/ml。用不同灵敏度、不同批号的鲎试剂,在严格标准操作的条件下,对3种不同规格浓度的葡萄糖注射液按有效浓度范围稀释后,进行干扰试验干扰试验考察。20%、25%葡萄糖注射液经2倍稀释,50%葡萄糖注射液经4倍稀释即对细菌内毒素检查法无干扰作用。对157种3种不同规格的葡萄糖注射液进行了热原检查及细菌内毒素检查的对比试验,两法符合率为100%。  
 出处: 药物分析杂志 1996.09.15; 16(5): 305-308  
 关键词: 干扰试验; 细菌内毒素试验; 限值; 有效浓度范围  
 主题词: 参考值; 对比研究; 内毒素类/\*分析; \*葡萄糖; 注射剂
- 标题: 鲎试验法检测复方氯化钠注射剂热原的应用  
 作者: 李建勤; 田娟华; 张建伟; 刘滨兵  
 著者单位: 吕梁地区人民医院 033000  
 中文摘要: 笔者用鲎试法对93批复方氯化钠注射液应用与进展

注射液进行了热原检测。结果与兔法的相符率为 94.6%，且具有灵敏度高，检测速度快，方法简便，检测量大等优点，是适于制剂及药厂使用的有效检测方法。

出 处：实用医技杂志 1996.07.20；3(5)：319-321

关键词：鲎试法；复方氯化钠；热原

主题词：复方合剂，氯化钠，热原，兔，注射剂，鲎试验

标 题：鲎试验对自制四种大输液热原的可行性考查

著 者：张静；李刚；于永洲

著者单位：南昌解放军第 94 医院 330002

出 处：药学实践杂志 1996.05.15；14(3)：163-164

主题词：可行性研究；\*热原；\*输液疗法；\*鲎试验

标 题：低分子右旋糖酐葡萄糖注射液的细菌内毒素检测试验考察

著 者：周长根；周丽芳

著者单位：莆田解放军第 95 医院 351100

中文摘要：对低分子右旋糖酐葡萄糖注射液的细菌内毒素用鲎试剂做了抑制试验，增强试验，并用药典家兔法对照。

出 处：药学实践杂志 1995.11.15；13(6)：349-350

关键词：低分子右旋糖酐葡萄糖注射液；细菌内毒素；鲎试剂

主题词：动物；对比研究；内毒素类/\*分

(上接第 13 页) 准)；但是，他认为来自天然药物一定要有微生物限度控制。

### 三、几点建议

1. 抓紧修订和完善中国药典 2000 年出版附录细菌内毒素检查法。

2. 制订细菌内毒素检查法应用指导原则，统一规范检查中的有关问题。

析；\*葡萄糖；兔；细菌；\*右旋糖酐类；注射剂；鲎试验

标 题：两组鲎试剂检测大输液热原的差异比较

著 者：孙熔；戴德银

著者单位：解放军 452 医院 610061

出 处：军队医药杂志 1995.10.15；1(5)：33-34

主题词：\*热原；鲎试验

标 题：鲎试验在大输液热原检查中的应用

著 者：方维军

著者单位：松江县中心医院药剂科

出 处：江苏医药 1995.07.10；21(7)：479

主题词：热原/\*分析；\*鲎试验

标 题：鲎法检测 33 批葡萄糖氯化钠注射液中热原的实验考察

著 者：成玉英；胡毅坚

著者单位：宁波市第一医院 315010

出 处：现代应用药学 1995.06.28；12(3)：39-40

主题词：\*氯化钠；\*葡萄糖；热原/\*分析；注射剂；鲎试验

标 题：应用鲎法检查大输液热原的体会

著 者：高丽云；闵简书；岳建国

著者单位：个旧市人民医院药检室 661400

出 处：中国药学杂志 1995.01.08；30(1)：19

主题词：热原/\*分析；鲎试验

3. 对鲎试剂实行批批检定或统一发放细菌内毒素工作标准品，建议中检所研究解决。

4. 扩大品种的应用，建议药典会制定原则，宜先将中国药典 95 年版中要求进行热原检查法的品种改为细菌内毒素检查法，新药应积极推广使用细菌内毒素检查法。

1998 年 2 月



## 内毒素指示剂

### 一、背景知识

去除热原有两类方法，一、灭活热原，二、分离热原。后一种方法包括常用的蒸馏、冲洗、超滤、反渗、吸附、层析等方法，这一类方法一般较温和，除了蒸馏和吸附须较高温度外，其它方法一般都在室温或更低的温度下进行。前一类方法则较剧烈，须用酸、碱、氧化剂、烷化剂处理或者 170℃ 以上的干热；干热法在产品中不会引入其它杂质，而且条件易于控制，一般耐热的玻璃包装材料首选干热法除热原，隧道式烘箱使用后干热生产过程可自动化连续进行。

干热可以同时除菌除热原，内毒素比细菌芽孢更加耐热，以内毒素的衰减来评价灭菌效果是完全有保证的；不同来源的革兰阴性菌内毒素在干热条件下失活的动力学行为也很相近，这样可以方便地建立一个验证用内毒素指示剂；干热除热原的效果与温度直接相关，在不低于 170℃ 条件下，内毒素即可被较大程度地破坏，短时间的干热一般使用 200℃ 以上的高温，248℃ 8 分钟、220℃ 21 分钟、210℃ 42 分钟即可实现内毒素灭活 1000 倍；美国药典已推荐在干热程序中使用内毒素指示剂来评价干热的有效性，内毒素指示剂中可回收的内毒素与干热后残余内毒素应至少相差三个数量级，干热过程才有效。

### 二、内毒素指示剂

内毒素指示剂是干燥在玻璃瓶中的一定量的内毒素，一般每瓶为 2,000 ~ 100,000Eu，不含任何稳定剂和赋形剂；由于内毒素的固体内容物很少，所以指示剂看上去象个空瓶。干燥的内毒素吸附在玻璃壁上，由于没有含内毒素分散剂，指示剂溶解后须较长时间的旋涡混合，即使如此内毒素也较难恢复其全部的填充量，指示剂中内毒素量的实测值只是可回收的内毒素量，回收率 = [(可回收的内毒素) /

(标示量)] × 100%，回收率不应低于 50%。有报导，使用低浓度吐温溶液溶解指示剂可以显著提高回收率，但应注意干热后检测残余内毒素时也应使用同一吐温溶液溶解指示剂。

内毒素指示剂用于烘箱验证时应合理布置于烘箱内，隧道式烘箱应在模拟正常生产条件下分别在生产的前、中、后各阶段加入指示剂验证，若在生产过程中采取随机检查的方法，指示剂应与产品有效隔离，且应有明显标识。干热后指示剂中的内毒素为残余内毒素，设内毒素衰减为 Rd，残余内毒素为 Rs，回收的内毒素为 Re；

$$\lg R_d = \lg R_e - \lg R_s$$

按美国药典  $\lg R_d > 3$  干热程序有效。

### 三、内毒素指示剂使用说明 (例)

1、成份：本品每瓶含有 2,000Eu 的精制大肠杆菌 055:B5 内毒素，

2、贮存：2 ~ 25℃，保持密封。

3、用途：干热程序验证。

放入烘箱前应除去标签、胶塞、用铝箔封口

4、分析准备：

从烘箱内取出指示剂，每瓶用 1ml 无热原水溶解，旋涡混合二分钟，然后在一个半小时内，每隔 10 分钟混合一次，时间一分钟；未干热的指示剂也按上述方法溶解混合，溶解混合完成后应立即进行检查。

5、分析方法：(推荐方法)

A：凝胶法限值检查：

鲎试剂选用灵敏度为 0.125Eu/ml 较为合适，未干热的指示剂内毒素溶液稀释 1000 倍用作阳性对照，干热后的残余内毒素溶液作为样品，若检查结果为阳性对照全部阳性（凝胶），样品全部阴性，则证明干热程序已达到预定的 1000 倍灭活内毒素效果；检查出现其它任何的结果均无效。 (下转第 8 页)

## EDS - 98 型细菌内毒素测定系统

**EDS - 98** 型细菌内毒素测定系统是由北京金山川科技发展有限公司和湛江安度斯生物有限公司联合研制的用于限量和定量检查细菌内毒素的仪器,可用于药品、生物制品、血液制品、医疗器械及食品的细菌内毒素检查,也可在临床上测定各种体液的细菌内毒素含量。

EDS - 98 型细菌内毒素测定系统在设计上吸收了国外所有同类仪器的优点,具有相当完善的功能。它是世界上第一台能够适合最常用的三种细菌内毒素检查方法的仪器(凝胶限量法、动态浊度定量法和动态显色定量法),也是世界上第一台三种检查方法都采用试管作反应容器的仪器,与国外同类仪器使用 96 孔平板作反应器比较,大大降低了使用成本,因此,EDS - 98 细菌内毒素测定系统是非常适合中国用户使用的仪器。

目前各国药典收载的细菌内毒素检查法(包括中国药典 2000 年版《细菌内毒素检查法》修订稿)都规定凝胶限量检查法为法定的细菌内毒素检查方法,其它方法只要结果可靠也可采用。为了适应这一规定,EDS - 98 型细菌内毒素测定系统采用了独特的设计,使三种检查方法的反应物量都与凝胶限量法统一,即 0.1ml 鲎试剂 + 0.1ml 检品,这样在作内毒素定量检查的同时已包括了凝胶限量法检查,两法结果可同时比较,无须另作凝胶限量法检查对照。目前国内外的同类仪器,有的只能作一种定量方法检查,而且反应物量为 0.3ml (即 0.1ml 鲎试剂 + 0.2ml 样品),不可与凝胶限量法同时比较;有的虽然可以同时作凝胶限量法,但不能作动态显色定量法;有的可以作动态浊度定量法和动态显色定量法,但使用 96 孔平板作反应容器,也不能与凝胶限量法同时比较。EDS - 98 型细菌内毒素测定系统具有的三合一且能同时与凝胶限量法比较的独特功能是在仪器的硬件与软件设计上的一项重大突

破。

定量法检测的重要优点之一是检查时间短。由于 EDS - 98 型细菌内毒素测定系统采用了特殊的数据处理方式,使检测所需的时间大大缩短,除凝胶限量法检查按规定需要 60 分钟外,动态浊度定量法和动态显色定量法检查 30 ~ 40 分钟便可完成,所需要时间仅为国内同类仪器的 1/4 ~ 1/3。EDS - 98 型细菌内毒素测定系统充分体现了定量检查法快速这一重要优势,在药品生产过程的质量控制上有重要的应用价值。

EDS - 98 型细菌内毒素测定系统的软件在 Windows95 系统上安装,界面清晰,操作十分简单方便。一般的同类仪器采用数据归化处理的方式,使得数据图象的表达对检测结果的分析没有太大的意义。EDS - 98 型细菌毒素测定系统所采用的数据处理方式,使得检查过程的动力学曲线能够客观地起初真实地反映出检查过程的任何微细的变化,对检查结果的分析有重要的指导意义。

任何的细菌内毒素检查仪器都需要质量稳定、性能优良的鲎试剂的支持,特别是用于定量检查的鲎试剂,对其质量及性能更有特殊的要求,如相关系数好、灵敏度高、浊度/色度信号敏锐,检查用水品质高等等。湛江安度斯有限公司为 EDS - 98 型细菌内毒素测定系统提供强有力的试剂支持。

仪器主要技术指标:

1. 内毒素测定范围: 0.001 ~ 10,000Eu/ml
2. 测定时间: 0 ~ 9000 秒可自由设定
3. 反应器工作温度:  $37.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$
4. 数据采集间隔时间: 10 秒
5. 试管了数: 32 孔
6. 试管孔径:  $\phi 10.0 \sim 10.1\text{mm}$
7. 试管反应物量: 0.1ml 鲎试剂 + 0.

1ml 检品

8. 浊度/色度限度线: 50 ~ 100% 可自由设定

9. 使用环境温度: 12 ~ 32℃

10. 电源电压: 交流 220V ± 10%

11. 整机功耗: < 300W

仪器标准配置:

1. EDS-98 型主机 1 台

2. 外围设备

(1) DEC 或 IBM586 多媒体计算机 1 套

包括: 200MMX 奔腾 CPU

32M 内存

2G 硬盘

24X CDROM

声卡

音箱

(2) Cannon210 CP 彩色喷墨打印机 1 台

(3) 专用软件 1 套

3. 实验用品

反应试管 50 支

微量移液器 1 把

移液毛细管 200 支

技术培训及服务:

用户在湛江安度斯生物有限公司接受技术培训。仪器免费保修一年, 终身保修。

小资料

美国使用的各种鲎试剂检查方法所占比例的统计 (1996 年)

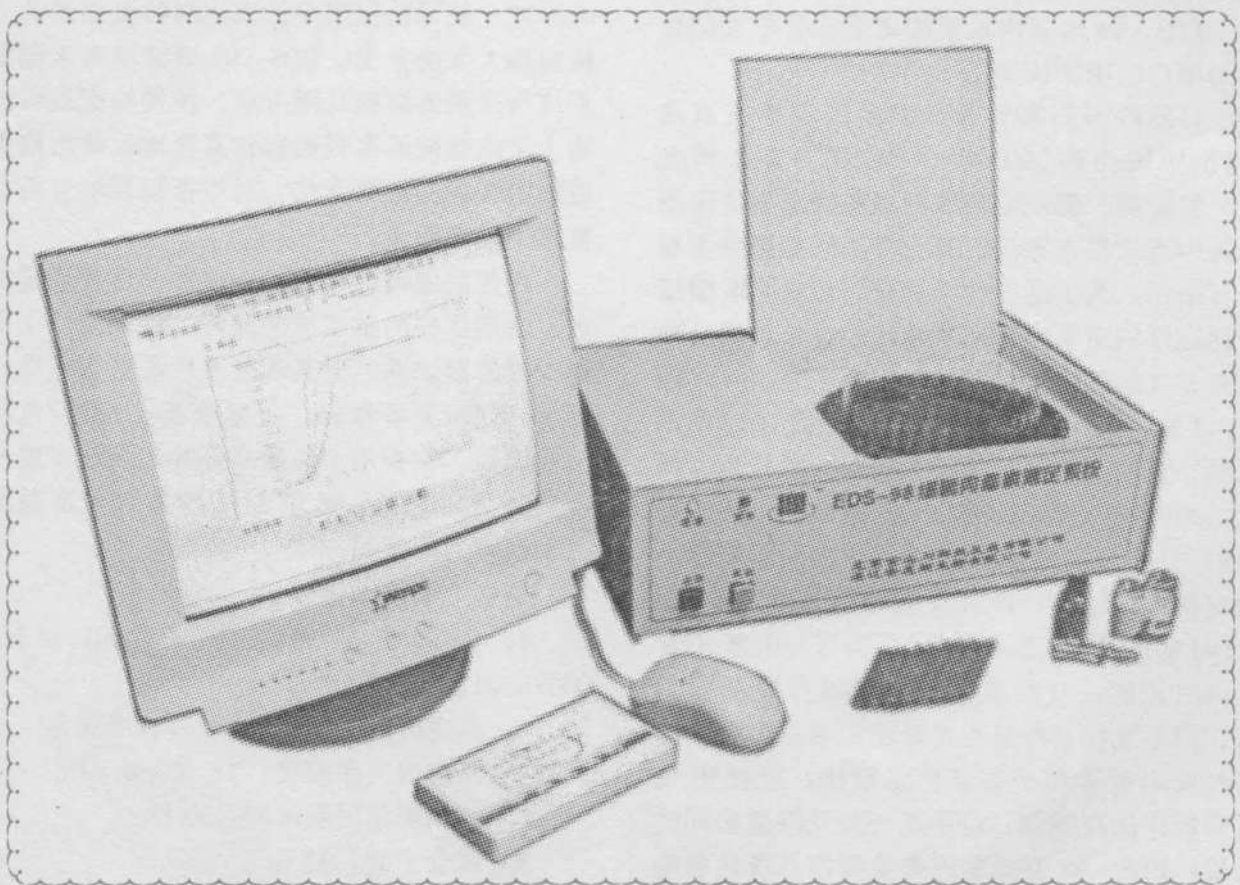
凝胶限量法 动态浊度定量法 动态显色定量法 终点显色定量法

45%

25%

27%

3%



EDS-98 型细菌内毒素测定系统