

热原试验方法概述

杭州第二中药厂 姚丹霞

药典规定凡能污染热原的注射液,尤其是大输液等静脉注射液均需做热原检查,以保证用药安全。目前对改进检查热原的方法,国内外都在进行探讨,大致有以下几种:

一、兔温法 这是中国药典85版规定的检查方法。

热原对不同动物的致热作用不同,人对热原最敏感,兔也较其他动物敏感,一般认为兔>狗>豚鼠>大鼠>小鼠^[1]。这些动物对热原的敏感性与人相比,则兔为人的1/3,狗为人的1/6。由于兔的敏感性接近于人,同时将含有热源的药液由静脉注入人体或兔后约15分钟到90分钟内均能使体温上升^[2]。然而对豚鼠、大白鼠、田鼠、鸡等则体温上升较不规则,所以药典规定用兔来进行热原测定。

兔温法的优点是可反映热原质引起哺乳动物复杂的升温反应过程,而且兔的敏感性接近于人,且升温规律与人相似,所以能反映药物中的热原对人体的影响限度情况。但是兔温法必须有足够的动物饲养场地,占地面积大,投资大,管理不便;在试验前要做好动物的选择和供试验用具的消毒等一系列的准备工作;兔子易躁动,测温和注射都比较麻烦;同时影响兔温法的精确度和可靠性的因素很多,如操作中肛温计插入深浅程度与测温大有关系,兔子因排粪使肛表脱出;在整个实验过程中室温变化不宜超过3℃等等。

从实质上说,兔温法仍是一种定性的方法,并且动物存在着差异性,精确程度较

差。研究者探求的一个目标就是克服兔温法的弱点,采用更优越的方法。

二、鲎法(鲎血细胞溶解物凝集法)

鲎法是世界上近年来正在研究用于检查热原的方法。鲎为海洋中一种生物(节肢动物),血液呈蓝色,我国早在三百年前即已应用鲎作为药用,载于本草纲目。国外学者于1956年才发现革兰氏阴性菌注入美洲鲎,即引起致命的血管内凝血反应,凝血的原因是由于细菌内毒素作用于鲎的循环血细胞(即变形细胞)的溶解物,激活其所含的一种酶而使可溶性蛋白变成凝胶物所致。1968年首次报导从美洲鲎的血液中提取到了变形细胞溶解物,可与少到0.1毫微克/毫升的细菌内毒素形成凝集反应,因而可以用于某些药物的致热检查。

1973年美国食品药品监督管理局(FDA)批准用鲎法检测注射剂和生物制剂中的内毒素,细菌内毒素是热原的主要来源^[3]。1980年美国药典第二十版中刊载了细菌内毒素类物质的检测方法,就是鲎法。

鲎法对革兰氏阴性细菌内毒素极为灵敏,可检出每ml含0.1ng量的内毒素,比家兔法灵敏十倍,操作简便、迅速,即用一定浓度的鲎试剂来检验待测药品,将药品滴入鲎试剂中,如发生凝固则有热原反应,反之则无热原反应。这在抢救病员时确有比较大的实用价值。在药物生产中用作中间质量控制,可迅速取得数据,而且资源丰富。国内已人工饲养鲎,并成功地用中国鲎制成鲎试剂(福建省和我省象山药厂),此外重现性好,需要量少,试验费用低,非常适合于作

为现场检验的手段。例如控制注射用水的制备或药房自制制剂的质量等。在药检工作中有些特殊的对象,如放射性同位素制品,因放射性药品射线的生物效应影响采用家兔法,还有某些癌症化疗剂、生化制品、流感菌苗、鞘内注射液、亚甲兰、荧光素等不能用兔温法检查热源的,可以考虑用鲎法。试剂还用于医院检查病人的体液(血、尿)中是否有内毒素,方法同热原,而且效果很好,但是鲎法不能检测内毒素以外的其他热原,故只能作为家兔法的一种辅助方法。国内把鲎法与兔温法作对比,二者符合率达80%。因此尚未列入我国药典作为热原检查的法定标准。鲎法有时会出现假阳性,制剂中含有吐温—80或丙二醇较高时就干扰检查结果,各种抗生素有不同的最适当测试浓度(不干扰凝胶产生的最高浓度)如果超过此值,凝胶作用受到抑制而可能产生假阴性,不能调节PH到6—8者以及抑制胶凝作用的物质,如生物硷、琥珀酸钠、氯霉素、四环素类等均不宜用鲎法。[4]、[6]、[9]、[7]

三、TBP 反应试验法

由于上述家兔发热试验的动物个体差异大,干扰因素多,而且需要时间长,故近年来许多学者曾研究用TBP试剂以检查热源^[3]。TBP是一种指示剂,即四溴酚酞乙酯钾盐,该试剂遇微量蛋白质,产生变色现象,通常取样品1ml滴于瓷板上,加0.1%TBP试剂两滴,0.2N醋酸1滴作对照,如有热原存在则呈绿色至青绿色。此法虽然可以克服兔温法的缺点,但TBP试剂尚与其他化合物如生物硷、胺的衍生物等均呈阳性反应,故不适用。同时此法对极微量的热原显色并不敏感,只能检出10微克/毫升的热原,有人曾改用比色计或分光光度计进行测试、灵敏度提高到1微克/毫升,故在实际应用上有一定限度,同时此法可靠性也差。

四、白血球反应试验法

根据热原的药理作用,各种热原能使人和其他动物于注射后发生全量白血球过少症,一小时左右最甚,一小时半至二小时体温上升后发生全量白血球过多症,所以可用白血球反应试验法。即取注射液试品10ml,注入家兔耳静脉中,注射后每隔一小时取血样检验白血球数,如有热原存在,则在注射后10—90分钟白血球减少,此法的限度检验尚未明确,有待进一步探讨。

五、荧光反应试验法

凡带有热原的注射液,在紫外光线下照射时,常有发生荧光现象,故荧光反应可作为热原检查法。但某些药物本身能产生荧光的则不适用,此法灵敏度很低,阳性反应率仅占75%。

六、薄层凝胶法

在四溴酚酞乙酯的比色法检测热原的基础上,用纸层析法检测热原。原理是借助葡萄糖聚糖凝胶,将制剂中的热原分离出来,进行检测,与家兔法对照获得较好的结果,但此法需要一定的设备条件,手续麻烦,时间长,不能普遍应用。

七、小白鼠耗氧率法

实验证明小白鼠体温每增加一度,耗氧率增加13%^[4],这个方法用现代测定仪器是很容易完成的,而且小白鼠容易得到,它不仅可用于热原检测,还可以用于一些药物对动物代谢影响方面的研究。但这种耗氧测定仪目前不能在实用中普及。

八、紫外光光度法

热原溶液在265毫微米波长处有吸收峰,当药液中的热原浓度为7.5ppm(毫克/升),在259毫微米处有最大的吸收峰,内毒素的浓度与吸收系数呈线性关系^[6]。但此法仍有待于深入研究,如各种热原质的吸收度与含量的关系等。

九、大白鼠血浆铁的测定

热原质注入大白鼠后可使大白鼠血浆的

纤维蛋白质增加,白细胞数增加和血浆铁的含量急剧下降。因此有可能从测定大白鼠血浆中铁的下降来检测热原或内热肽。

十、小白鼠体温测定法

测定体温变化来检测热原是理想的生理反应实验方法,用小白鼠代替家兔是比较经济而且理想。一种方法是用无毛大鼠以红外测量装置测量体温的改变。红外测量法近来发展很快,红外测温可精确到 0.1°C ,动物身上的皮毛能干扰红外线的测量,所以用无毛大鼠。另一种方法是直接小白鼠直肠测温法。目前有些国家已用直肠电热,代替直肠温度计,热电偶在整个实验中固定在肛门内,其温度可在仪表中表示出来。因而免除对单个动物温度多次测量操作的麻烦,此方法一天能够实验100只以上的动物,如果用小白鼠实验,数目可以增加,实验结果可以进行统计学处理,是一个有希望的热原试验方法。

由于兔温法热原检查操作麻烦,实验结果受影响的因素很多,既费事又费时,所以

目前对有关热原检查的方法研究较多,以上几种方法各有千秋,但总的研究趋势是:从动物体内检查方法逐步向动物体外的检查方法发展;从利用比较娇嫩,价格较贵,难以饲养管理的动物逐渐改为利用容易生长繁殖,较易饲养管理、价格低廉的小动物;从定性检查逐步到定量检查;并力求操作简便、迅速、灵敏度高、重现性好,省事省时,降低试验费用,可靠性好、减少局限性等。总之要得到理想的热原检查法,还有待于进一步探讨研究。

参 考 文 献

- [1] 国外医药动态, 6, 1965
- [2] C. A. Vol. 54, 9223d, 1963
- [3] Weinos, P. J.: J. Parent Drug Assoc., 32, (5):236, 1978
- [4] 医药工业, 国外动态, 6:5, 1980
- [5] 郁福年:脏器生化制药, 1:70. 1981
- [6] Mascoli, C. C.等; J. Parent Drug Assoc., 33(2):81, 1979
- [7] 中国人民解放军广州部队总医院等; 药学通报, 4:9, 1980
- [8] 南京药学院药剂教研室; 药剂学1960