

脑活素注射液的增强抑制实验

陈海松 黄光才 刘维俊(海口 570102 海南省药品检验所)

增强抑制实验是通过比较鲎试剂在已知含量内毒素水溶液中的反应和在相同内毒素含量的样品溶液中的反应,观察样品对鲎试剂的增强或抑制作用,从而判断样品是否适宜用鲎试剂作细菌内毒素的检查^[1]。增强抑制实验中的最大有效稀释(MVD)适合于注射液或以非经胃肠道给药的溶解液或稀释液,以及给药剂量按重量计而给药体积可以适当变化的药品,其计算公式为: $MVD = E \cdot P / \lambda$,其中 E 为样品的细菌内毒素限量,

λ 为所用鲎试剂的标示灵敏度, P 为产品效价,对以每公斤重量给药的样品,其为 mg 或单位/ml,对以每公斤体积给药的样品, $P = 1.0^{[2-4]}$ 。有人误认为 P 为热原检查中的兔法剂量,从而导致 MVD 的计算出现错误,使实验结果产生了误差^[5]。为此我们用灵敏度为 0.125EU/ml 的鲎试剂对脑活素重新进行了增强抑制实验,现报道如下。

1 实验材料

1.1 细菌内毒素(国家标准品,7200IU/支批号:962,中国药品生物制品检定所)。

1.2 鲎试剂,标示灵敏度 0.125EU/ml(批号:980123)、无热原水(5ml/支,批号:960210)(湛江中美生物有限公司)。

1.3 脑活素注射液(5ml/支,批号:504712,505134,504124,奥地利 EBEWE 药厂)。

2 方法与结果

2.1 内毒素标准品的稀释:取细菌内毒素标准品 1 支(7200EU/支),用 1.2ml 无热原水溶解,振荡 20min 后按 1:10 的梯度稀释成浓度为 6EU/ml 的稀释液,再次其稀释成 1EU/ml 的溶液后按 1:2 的梯度依次稀释成浓度分别为 0.5,0.25,0.125,0.0625 和 0.03EU/ml 的溶液。

2.2 样品的稀释:以 C^1 表示脑活素注射液原液, R_x 表示脑活素注射液的内毒素稀释液,下标“x”表示稀释液中的内毒素浓度(EU/ml),3 批脑活素注射液样品分别按以下步骤依次稀释:

1.0ml C^1 + 12.0ml H_2O → 1/13 C^1 …… C_0

4.0ml C_0 + 4.0ml H_2O → 1/26 C^1 …… $C(MVD)$

1.0ml $R_{1.0}$ + 1.0ml C_0 → $R_{0.5}(1/26C^1)$ …… C_2

1.0ml C_2 + 1.0ml C → $R_{0.25}(1/26C^1)$ …… C_3

1.0ml C_3 + 1.0ml C → $R_{0.125}(1/26C^1)$ …… C_4

1.0ml C_4 + 1.0ml C → $R_{0.0625}(1/26C^1)$ …… C_5

1.0ml C_5 + 1.0ml C → $R_{0.03125}(1/26C^1)$ …… C_6

2.3 用标示灵敏度为 0.125EU/ml 的鲎试剂分别与上述 2 个系列的稀释液反应(37℃水浴,60 ± 2min),每一稀释液做 4 支重复反应管,同时做一组阴性对照,结果见表 1。

2.4 由表 1 可见,无热原水的反应经点值为 0.104 EU/ml,脑活素注射液的反应经点值分别为 0.072,0.087 和 0.087EU/ml。

3 讨论与结论

本文中脑活素注射液的细菌内毒素限量(E)和最大有效稀释(MVD)分别由下式求出: $E = K/M = 3.33$ EU/ml $MVD = E \cdot P/\lambda = 26$ 。

其中 K 为内毒素的致热阈,目前我国 $K = 0.5$ EU/kg; M 为热原实验的家兔法剂量,对脑活素注射液而言 $M = 1.5$ ml/kg; λ 为所用鲎试剂的标示灵敏度,本文中 $\lambda = 0.125$ EU/ml; P 为产品效价,在此 $P = 1.0$ 。

表 1 脑活素注射液的增强抑制实验结果

样品	批号	管号	细菌内毒素标准品(EU/ml)					
			0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	阴性对照
无热原水	960210	1	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
		4	+	+	+	-	-	-
$\lambda = 0.104\text{EU/ml}$								
样品	批号	管号	脑活素稀释液的内毒素浓度(EU/ml)					
			0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	MVD
脑活素注射液	504712	1	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	+	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
		4	+	+	+	+	-	-
$\lambda = 0.072\text{EU/ml}$								
脑活素注射液	501345	1	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	+	-	-
		3	+	+	+	+	-	-
		4	+	+	+	+	-	-
$\lambda = 0.087\text{EU/ml}$								
脑活素注射液	504124	1	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	-	-	-
		3	+	+	+	-	-	-
		4	+	+	+	+	-	-
$\lambda = 0.087\text{EU/ml}$								

注:反应结果按中国药典“细菌内毒素检查法”判断,以 180 度翻转凝集物不流动为阳性,流动为阴性

本文结果按文献^[1]进行判断,表明脑活素注射液对灵敏度为 0.125EU/ml 的鲎试剂无干扰作用,适宜用其做细菌内毒素的检查。

参考文献

- 冯聚锦.细菌内毒素检查的增强抑制实验.中国生化药物杂志,1994,15(2):141.
- 美国药典.第 22 版.1990:1495.
- 黄清泉译.细菌内毒素试验.药典通讯,1995,5(1):51..
- 鲎试剂法国外资料选编.厦门鲎试剂厂编印.
- 吴招娣,黎阳.鲎试剂法用于脑活素针剂细菌内毒素的检测.中国生化药物杂志,1994,15(4):247.

收稿日期:1995-12-25