

鲎试验及其在输液生产中的应用

嘉兴制药厂 吴 伟 管永梅

鉴于鲎试验在实际应用中具有快速、简便、灵敏、专一性好的优点。1980年美国药典20版已收载鲎试验作为细菌内毒素试验的方法。在美国药典的21版中,鲎试验又作为注射用水和部份放射药品的细菌内毒素检查以代替家兔热原检查法,并规定这些品种的细菌内毒素限值,确定了细菌内毒素的参考标准(EC-S),每瓶含10000USP内毒素单位(Eu)。

自1980年以来,世界卫生组织进行了国际性的鲎试验协作研究,我国也组织有关单位参加了该项研究。我厂对119批大输液用鲎试验和家兔法进行了热原检查对照试验,以确定鲎试验在输液生产实际应用中的可能性。现将试验结果分述如下:

试验材料与方法

一、材 料

1. 鲎试剂 厦门鲎试剂厂生产,批号850902,灵敏度:0.726Eu/ml。

2. 内毒素 上海生物制品研究所,批号8501—1,规格500Eu/支

3. 无热原注射用水 杭州民生药厂,批号851229—1,规格5ml/支

4. 家兔 本厂饲养,按中国药典规定的热原检查要求选取。

5. 试验样品 本厂生产的10%葡萄糖注射液61批,5%葡萄糖注射液11批,葡萄糖氯化钠注射液47批、共计119批。

6. 试验用器械 XW-80型旋涡混合

器,100 μ l微量吸液器及塑料针头等有关的试管针筒。

二、试验方法

1. 内毒素工作标准品的稀释 把规格为500Eu/支的冻干状内毒素用无热原注射用水稀释成250Eu/ml,然后以1:8的比例逐级稀释,得到七个浓度梯度:250Eu/ml、31.25Eu/ml、3.9063Eu/ml、0.4883Eu/ml、0.061Eu/ml、0.0076Eu/ml、0.00095Eu/ml。

2. 鲎试剂稀释 试剂规格为0.5ml/支,每支加0.5ml无热原的注射用水。

3. 检测过程

预测 取10 $\times$ 75mm试管14支,加入上述七种浓度的内毒素工作标准品(每个浓度2管)0.1ml,再加入0.1ml鲎试剂,置37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C恒温水溶箱中保温60 $\pm$ 2分钟后观察结果。确定鲎试剂与内毒素的反应范围。

复测 根据预测的反应范围,将内毒素工作标准品以1:2等比稀释,预测得到的反应范围在0.4883Eu/ml~0.061Eu/ml之间,以0.4883Eu/ml的上一个浓度梯度3.9063Eu/ml进行1:2等比稀释直至0.061的浓度梯度为止。得到七个浓度梯度:3.9063Eu/ml、1.9531Eu/ml、0.9760Eu/ml、0.4883Eu/ml、0.2442Eu/ml、0.1221Eu/ml、0.061Eu/ml。

然后,按预测实验的方法,再进行加入鲎试剂0.1ml确定反应范围、得到0.2442Eu/ml为阳性反应、0.1221Eu/ml为阴性反应。因此该试剂的反应范围在0.2442~

0.1221Eu/ml之间、也即灵敏度实测为0.2442 Eu/ml。

样品测定 取供试液 0.1ml 与鲎试剂 0.1ml, 分别各置于 2 支小试管(10×75mm)中, 另作一支阳性对照管(加入 2 倍鲎试剂灵敏度的内毒素标准品单位)和一支阴性对照管(加入无热原的注射用水), 混匀后置于 $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 60 ± 2 分钟后观察试验结果。如果试管倒转 180 度无坚实凝胶产生, 则为阴性。认为产品通过鲎试验。如果试管中形成坚实的凝胶, 则判为阳性, 产品不能通过鲎试验。若阳性对照显阴性或阴性对照显阳性, 本次实验无效。

结果与讨论

用上述的试验方法, 我们进行了 119 批大输液的鲎试验、同时用家兔热原试验作对照, 结果均为阴性, 也未发现家兔试验阳性而鲎试验阴性情况。从各地实验室所得结果看, 两法符合率很高, 因此认为鲎试验法用于大输液的內毒素检查是可行的。

由于鲎试验是一种酶促反应, 特异性高, 仅对革兰氏阴性菌产生的內毒素起反应, 而热原并非都是由革兰氏阴性菌的內毒素因此鲎试剂是否对所有的热原都敏感, 尚待进一步证实, 家兔热原检查法尽管其灵敏度低于鲎试验, 据国外资料⁽¹⁾认为两者相差 5~10 倍, 但是, 它终究反映了热原引起哺乳动物复杂的升温反应过程, 而鲎试验法仅对革兰氏阴性菌的內毒素有高度的敏感性, 且干扰生成凝胶反应的因素较多, 因此两者都有一定的局限性。但是由于鲎试验具有高灵敏度, 操作快速、简便、成本低的优点, 在输液生产上可用于生产中间过程的质量监控, 如注射用水的质量检查、成品的预试验、企业“内控”检查等等, 但最终成品的检查仍按法定的方法进行。

卫生部的“标准草案”中所用的方法没有

指明供试药物的剂量, 鲎试验中加入的供试品量均是 0.1ml, 然而对病人来说热原反应主要取决于所用药物中內毒素的总量、即是否达到了致热量, 而与每毫升药品中所含的內毒素量关系相对小些。针对这种情况, 美国 FDA 曾作过有关规定使药品中內毒素的限量和剂量有关。由于各种药品之间剂量的不同, 內毒素的限量用 K/M 表示, K 表示 5.0Eu/kg, 它是人和家兔近似的热原反应阈值, M 是家兔热原剂量和人体, 小时给予的药品最大剂量/kg 体重。因此对于具有最大人体剂量为 10ml/kg 的大输液, 其內毒素限量(K/M)就不能超过 0.5Eu/ml。鲎试验在用于大剂量输入的注射药品检查时其安全度比之用于小剂量注射药品小得多。

操作应注意的问题

1. 在试验中所用的器具必须预先去热原处理, 操作过程性防热原污染。

2. 在操作过程中, 试管内的各种内容物必须混匀(最好用旋涡混匀器), 以避免产生假阴性。在反应保温时要防止水浴的振动。由于鲎试验是与温度和时间有关, 因此在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 1 小时、且保持一定的水面使试管至少浸入 3 厘米深、但不能浸入水浴太深, 以引起试管的浮动而不稳定。

3. 鲎试验的正确性还与 pH 有关。有关资料认为鲎试验的适宜 pH 应在 6.0~7.5 的范围之内, 若 pH 低于 4 或高于 8 时, 反应可能被抑制。因此试验前最好先测定供试品的 pH 值, 然后用无热原的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH。

4. 鲎试验是一个酶促反应, 如果药品中有抑制酶活性或与二价阳离子结合的物质存在。就会干扰鲎试验。抑制反应的存在可以通过阳性对照鉴别出来。而抑制反应的消除, 则需计算药品的最大有效稀释(MVD)和排

除抑制所需的稀释(DROI)。然后把 DROI 和 MVD 进行比较, 如果 DROI/MVD 小于 1 则表示可以进行鲎试验, 如果 DROI/MVD 大于 1 则表示该药品不能进行鲎试验。

本文经胡景华总工程师审阅, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] 南京药学院:《药剂学》第一版, 228页 人民卫生出版社 1979年

- [2] FDA National Center for Drugs and Biologics, Office of Drugs «Draft Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal parenteral Drugs, Bio'ogics products, and Medical Devices» February 2, 1983
- [3] FDA «Limulus Amebocyte Lysate for the Detection and Quantitation of Endotoxin»