

# 注射用环孢菌素中细菌内毒素检测的研究

郑丽莉 马赛骏 (福建省药品检验所, 福州 350001)

## 实验材料与amp;方法

### 1 实验材料

鲎试剂: (TAL) 系福州东方鲎试剂厂生产。批号: 920326, 敏感度 ( $\lambda$ ) 为 0.176Eu/ml,  $S=0.174$ ; 内毒素参考标准品: USP RSE (美国药典内毒素参考标准品) 10000Eu/瓶和 China RSE (国家内毒素参考标准品) 20000Eu/瓶。批号: 896; 样品: 国产环孢菌素原料: 批号: 920101、920201、920301。进口环孢菌素注射液: 瑞士山道氏厂出品。批号: ESTD894; 鲎试剂溶解水; 所用器皿经 250 C 干烤 30min 或 180 C 干烤 2h 处理。

### 2 方法

2.1 两种内毒素 (USP RSE, China RSE 896) 对东方鲎试剂灵敏度的比较标定

2.1.1 内毒素的稀释: 取 USP RSE 1 瓶和 China RSE (#896) 1 瓶, 分别用鲎试剂溶解水稀释成 Eu/ml, 0.5Eu/ml, 0.25Eu/ml, 0.125Eu/ml 的系列稀释液。

2.1.2 操作: 取 TAL 若干支, 分别加入 0.1ml 鲎试剂溶解液, 加入内毒素系列稀释液 0.1ml, 同时作阴性对照, 轻轻振动试管混匀内容物, 封闭管口, 置 37 C  $\pm$  1 C 水浴中保温 60  $\pm$  2min。记录反应结果。计算标准差 (S)。

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum S)^2}{n}}{n-1}}$$

当  $S < 0.365$  时, 按公式计算敏感度。

$$\lambda = \log^{-1} \left( \frac{\sum X}{n} \right)$$

X 为 4 组反应终点的对数值。n 为 4

2.2 增强/抑制试验: 精密吸取无热原进口环孢菌素注射液 0.1ml 加入 TAL 冻干品中, 再加内毒素系列稀释液 0.1ml, 轻振均匀, 同时作阴性对照, 置 37  $\pm$  1 C 恒温水浴箱内保温 60  $\pm$  2min, 记录反应结果。

2.3 供试品测定: 按美国药典 X X II 版注射用环孢菌素菌内毒素检查项下规定每毫克环孢菌素不超过 0.84 内毒素单位的限度要求, 参照 USP X X II 细菌内毒素试验法 (85) 进行: 取环孢菌素原粉约 10mg, 精密称定, 加鲎试剂溶解水制成悬液。(鲎试剂溶解水加入体积量 =  $\frac{\text{称量 (mg)} \times \text{限度 (Eu/mg)}}{\text{鲎试剂敏感度}} = \frac{\text{称量} \times 0.84}{0.176}$ ) 超声波旋涡 5min, 得供试品悬液。取

TAL 若干支, 以 0.1ml 鲎试剂溶解水溶解。再加上上述制得的供试品悬液 0.1ml, 轻摇均匀, 封闭, 置 37  $\pm$  1 C 恒温水浴箱保温 60  $\pm$  2min, 同时用 0.84Eu/ml 的 China RSE 作阳性对照, 用鲎试剂溶解水作阴性对照, 记录反应结果。

另取进口环孢菌素注射液 (标示量为 250mg/5ml) 0.1ml, 按上述鲎试剂溶解水加入体积量公式计

算,精密加入 23.8ml 鲎试剂溶解水稀释后同供试品测定方法进行。记录反应结果。

### 实验结果

1 两种内毒素对 TAL 的比例标定结果表明,两者之间的误差在规定范围之内,且重现性好。其结

果见表 1。

2 增强/抑制试验:为了证实被检测的环孢菌素本身是否有增强或抑制鲎试剂作用,人为加入内毒素,结果见表 2。

3 供试品的细菌内毒素检测结果见表 3。

4 进口环孢菌素注射液作对照试验的结果见表 4。

表 1 两种内毒素对 TAL 的比较标定结果

TAL 920326 Vail No		内毒素浓度 China RSE Eu/ml					End Point	LOGIO Endpoint
		1	0.84	0.5	0.25	0.125	(-)	
1	+	+	+	+	+	-	0.25	-0.602
2	+	+	+	+	+	-	0.25	-0.602
3	+	+	+	+	-	-	0.125	-0.903
4	+	+	+	+	-	-	0.125	-0.903
敏感度=0.176Eu/ml, S=0.174								
TAL 920326 Vail No		内毒素浓度 China RSE Eu/ml					End Point	LOGIO Endpoint
		1	0.84	0.5	0.25	0.125	(-)	
1	+	+	+	+	-	-	0.25	-0.602
2	+	+	+	+	-	-	0.25	-0.602
3	+	+	+	+	-	-	0.25	-0.602
4	+	+	+	+	-	-	0.25	-0.602
敏感度=0.25Eu/ml, S=0								

表 2 增强/抑制试验

TAL 920326 Vail No		内毒素浓度 China RSE Eu/ml				
		1	0.5	0.25	0.125	(-)
1	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-

表 4 进口环孢菌素注射液作对照试验检测结果

TAL 920326 Vail No	进口环孢菌素 注射液原液	进口环孢菌素 注射液稀释液	阳性 0.25Eu/ml	阴性 (-)
1	-	-	+	-
2	-	-	+	-
3	-	-	+	-
4	-	-	+	-

表 3 供试品细菌内毒素检测结果

TAL 920326 Vail No	批号 920101	批号 920201	批号 920301	阳性 0.84Eu/ml	阴性 (-)
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-

\* 各表中符号“+”表示结果为坚实凝胶,“-”表示结果为流动液体。

### 讨论

1 本文所设计的实验证明了用东方鲎试剂和国家内毒素标准品(896)可代替 USP X X I 细菌内毒素检查中规定的 LAL 和 USP RSE。为今后进口环孢菌素的细菌内毒素检测提供了依据,且证明本

方法可推广应用。

2 从表 2 的增强/抑制试验结果中可以看出,环孢菌素似乎稍有抑制作用,可使鲎试剂的灵敏度下降一个梯度,但符合部颁标准 50%~200%误差范围。因此,本试验设计的测定方法是可行的。

3 3 批国产环孢菌素原粉用 TAL 测得的细菌内毒素均超过限量规定,提示生产工艺中有污染存

在。

4 用进口无热原的环孢菌素注射液进行细菌内毒素试验结果为(-),证明本品无增强作用,进而提示上述 3 批样品不是增强作用产生的假阳性,而是污染细菌内毒素的结果。

收稿日期:1996-08-01