

特异性鲎试剂检查生脉注射液细菌内毒素

黄东燕,章丽佳,罗梓河,黄俊斌(汕头市中心医院,广东 汕头 515031)

摘要:目的 建立生脉注射液的细菌内毒素检查方法,以控制药品质量。方法 按中国药典 2000年版二部检查法,考察生脉注射液对细菌内毒素检查法的干扰。结果 确定生脉注射液细菌内毒素限值为 3.75EU/mL,最佳检测条件为供试品稀释 10倍,特异性鲎试剂灵敏度为 0.25EU/mL。结论 用特异性鲎试剂检查生脉注射液细菌内毒素,方法简便、灵敏、准确、重现性好,可替代家兔法用于生脉注射液的热原检查。

关键词:特异性鲎试剂;生脉注射液;抑制增强试验;细菌内毒素

中图分类号:R927.12 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)04-0325-04

Detection of bacterial endotoxins of Shengmai injection with TAL ES-TEST

HUANG Dong-yan, ZHANG Li-jia, LUO Zi-he, HUANG Jun-bin (*Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the test of bacterial endotoxins in order to replace the test for pyrogen in Shengmai injection. **METHODS** The inhibition and enhancement test were carried out by tachypleus amoebocyte lysate ES-Test according to the bacteria endotoxin content by Chinese Pharmacopoeia (2000). **RESULTS** The bacterial endotoxins limit value of Shengmai injection was 3.75EU/mL and the experiment showed that the interference elements could be excluded by diluting Shengmai injection 10 times. **CONCLUSION** The method is convenient, sensitive, accurate and can replace the pyrogen test of Shengmai injection.

KEY WORDS tachypleus amoebocyte lysate ES Test (TAL ES Test); Shengmai injection; inhibition and enhancement test; bacterial endotoxins

我院制剂室生产的生脉注射液是由 10%红参、15%五味子、30%麦冬组成,有强心复脉、益气生津、增进冠脉流量的作用,临床用于心源性休克、心肌梗死、心绞痛及其他微循环障碍等疾病,静滴或静注使用。在《卫生部药品标准》中药成方制剂第十五册中用家兔法检查热原。细菌内毒素检查法检查药品中的细菌内毒素,与传统的家兔法相比,具有灵敏度高、重现性好、样品用量少、时间短、费用低等优点,我们用

中国现代应用药学杂志 2005年 8月第 22卷第 4期

热原检查合格的生脉注射液对鲎试剂和特异性鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应分别进行干扰试验,建立生脉注射液的细菌内毒素检查法。

1 材料

细菌内毒素国家标准品:中国药品生物制品检定所,批号:981,规格:9000EU/mL。

鲎试剂:厦门鲎试剂厂,灵敏度:0.25EU/mL,批号:

990628;灵敏度: 0.5 EU/mL,批号: 990622;湛江安度斯生物有限公司,灵敏度: 0.25 EU/mL,批号: 0112193;灵敏度: 0.5 EU/mL,批号: 0206141。

特异性鲎试剂: 厦门鲎试剂厂,灵敏度: 0.25 EU/mL,批号: 980709;灵敏度: 0.5 EU/mL,批号: 980717;湛江安度斯生物有限公司,灵敏度: 0.25 EU/mL,批号: 0206141;灵敏度: 0.5 EU/mL,批号: 0212051。

细菌内毒素检查用水: 厦门鲎试剂厂,批号: 990326。湛江安度斯生物有限公司,批号: 0207230。

生脉注射液: 本院制剂室生产,规格: 10 mL/支。每 10 mL 相当于生药红参 1g,五味子 1.5g,麦冬 3g。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度的复核

根据鲎试剂灵敏度标示值 (λ),用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素国家标准品溶解,稀释,制成 2.0 λ , 1.0 λ , 0.5 λ , 0.25 λ 4 个浓度的内毒素标准溶液,进行灵敏度复核试验^[1],结果各厂家、各批号鲎试剂,其灵敏度均与标示灵敏度相符,符合规定。

表 1 干扰预试验结果

Tab 1 Results of preliminary interference test

样品稀释 倍数	鲎试剂批号	灵敏度	样品 1		样品 2		样品 3		阳性 对照	阴性 对照
			PPC	PNC	PPC	PNC	PPC	PNC		
原液	990628	0.25 EU/mL	-	-	-	-	-	-	++	-
	990622	0.5 EU/mL	-	-	-	-	-	-	++	-
	980709(特异)	0.25 EU/mL	-	-	-	-	-	-	++	-
	980717(特异)	0.5 EU/mL	-	-	-	-	-	-	++	-
5倍稀释液	990628	0.25 EU/mL	-	-	-	-	-	-	++	-
	990622	0.5 EU/mL	+	-	+	-	+	-	++	-
	980709(特异)	0.25 EU/mL	+	-	+	-	+	-	++	-
	980717(特异)	0.5 EU/mL	++	-	++	-	+	-	++	-
10倍稀释液	990628	0.25 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	990622	0.5 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	980709(特异)	0.25 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	980717(特异)	0.5 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
15倍稀释液	990628	0.25 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	990622	0.5 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	980709(特异)	0.25 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-
	980717(特异)	0.5 EU/mL	++	-	++	-	++	-	++	-

注: +为阳性结果, -为阴性结果

Note: “+” represents positive reaction; “-” represents negative reaction
可用于干扰试验。

2.4.2 干扰试验 根据干扰预试验结果,将生脉注射液用细菌内毒素检查用水 (BET) 稀释成 1→5 倍、1→10 倍,以 BET 水和供试品的 1→5 倍、1→10 倍稀释液将细菌内毒素标准品分别稀释成 2.0 λ , 1.0 λ , 0.5 λ , 0.25 λ 4 个系列浓度,对各厂家各批号的鲎试剂和特异性鲎试剂进行试验,结果如表 2,表 3。

将试验结果按下式计算 $E_s = \lg^{-1}(\Sigma X_s / 4)$, $E_t = \lg^{-1}$

2.2 细菌内毒素限值 (L) 的确定^[1]

临床上用于急救时,生脉注射液的使用剂量为 80 mL,用 5~10% 葡萄糖注射液适量稀释。根据公式 $L = K / M$ 计算, K 为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K = 5 \text{ EU} / (\text{kg} \cdot \text{h})$; M 为人用每公斤体重每小时最大剂量,以 $\text{mL} / (\text{kg} \cdot \text{h})$ 表示,人均体重按 60 kg 计算。生脉注射液细菌内毒素限值 $L = 5 / (80 \cdot 60^{-1}) = 3.75 (\text{EU} / \text{mL})$ 。

2.3 供试品最大有效稀释倍数的确定

按公式 $MVD = L \cdot c / \lambda$ 计算,当 $\lambda = 0.5 \text{ EU} / \text{mL}$ 时,最大有效稀释倍数 $MVD = 7.5$; 当 $\lambda = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$ 时, $MVD = 15$ 。

2.4 结果

2.4.1 干扰试验预试验 取生脉注射液,用细菌内毒素检查用水分别作 5, 10, 15 倍稀释 (NPC), 分别取生脉注射液和上述 3 种稀释液将细菌内毒素工作标准品制成浓度为 2.0 λ 的生脉注射液阳性对照溶液 (PPC), 以鲎试剂和特异性鲎试剂分别与之反应,结果见表 1。

生脉注射液在各稀释度下均未测出的细菌内毒素,说明

($\Sigma X_t / 4$), 结果显示供试品 1→5 倍稀释液对两个厂家的 $\lambda = 0.5 \text{ EU} / \text{mL}$ 鲎试剂和特异性鲎试剂有抑制作用。

供试品 1→10 倍稀释液对两个厂家的 $\lambda = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$ 鲎试剂作用,结果: 厦门产 $E_s = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$, 平均 $E_t = 0.35 \text{ EU} / \text{mL}$; 而湛江产 $E_s = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$, 平均 $E_t = 0.5 \text{ EU} / \text{mL}$; 对两个厂家的 $\lambda = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$ 特异性鲎试剂作用,结果: 厦门产 $E_s = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$, 平均 $E_t = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$; 而湛江产 $E_s = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$, 平均 $E_t = 0.25 \text{ EU} / \text{mL}$ 。

表 2 干扰试验结果 ($\lambda = 0.5 \text{ EU/mL}$)

Tab 2 Results of inhibition and enhancement test($\lambda = 0.5 \text{ EU/mL}$)

内毒素浓度 (EU/mL)	厦门鲎试剂厂										湛江鲎试剂厂									
	鲎试剂 (990622)					特异性鲎试剂 (980717)					鲎试剂 (0206141)					特异性鲎试剂 (0212051)				
	1.0	0.5	0.25	0.125	稀释液 阴性对照	1.0	0.5	0.25	0.125	稀释液 阴性对照	1.0	0.5	0.25	0.125	稀释液 阴性对照	1.0	0.5	0.25	0.125	稀释液 阴性对照
BET水	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
供试品 (1→5倍稀释液)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
供试品 2 (1→5倍稀释液)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
供试品 3 (1→5倍稀释液)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

注: +为阳性结果, -为阴性结果

Note: "+" represents positive reaction; "-" represents negative reaction

表 3 干扰试验结果 ($\lambda = 0.25 \text{ EU/mL}$)

Tab 3 Results of inhibition and enhancement test($\lambda = 0.25 \text{ EU/mL}$)

内毒素浓度 (EU/mL)	厦门鲎试剂厂										湛江鲎试剂厂									
	鲎试剂 (990628)					特异性鲎试剂 (980709)					鲎试剂 (0112193)					特异性鲎试剂 (0206141)				
	0.5	0.25	0.125	0.06	稀释液 BET水	0.5	0.25	0.125	0.06	稀释液 BET水	0.5	0.25	0.125	0.06	稀释液 BET水	0.5	0.25	0.125	0.06	稀释液 BET水
BET水	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
供试品 1 (1→10倍稀释液)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
供试品 2 (1→10倍稀释液)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
供试品 3 (1→10倍稀释液)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-

注: +为阳性结果, -为阴性结果

Note: "+" represents positive reaction; "-" represents negative reaction

3 讨论

3.1 生脉注射液由红参、五味子、麦冬组成,红参主要化学成分为人参皂苷、人参多糖、麦芽醇、挥发性成分及多种活性肽。而人参二醇组皂苷如 R_c 、 R_g 等,据报道有抗内毒素作用,生脉注射液足量静注,对内毒素攻击后动物的死亡,有明显保护作用^[2]。

3.2 在干扰试验中,1→5倍稀释的生脉注射液对反应有强抑制作用,即使加入 2.0λ 的内毒素也无阳性结果出现。而经 1→10倍稀释后,则可消除对反应的干扰作用,两个厂家的鲎试剂和特异性鲎试剂 E_s 值均在 $0.5 \sim 2.0E_s$ 之间,且各

E_s 值均在 $0.5 \sim 2.0\lambda$ 范围内,但用特异性鲎试剂反应结果比用普通鲎试剂更理想, $E_i: E_s = 1:1$,可完全消除干扰作用。

3.3 根据试验结果,生脉注射液在进行细菌内毒素检查时,经过 10倍稀释后,对灵敏度 $\lambda = 0.25 \text{ EU/mL}$ 的鲎试剂反应可消除干扰,可用细菌内毒素检查法替代家兔热原检查法。细菌内毒素检查法具有灵敏度高,重现性好,快速、简便,费用低等优点,能快速准确地检出热原,用该法检查合格的生脉注射液 50多批,用于临床无一例发生热原反应。生脉注射液的细菌内毒素检查法为:取本品,用细菌内毒素检查用水至少稀释 10倍后,依法检查^[1],每 1mL生脉注射液中含内

菌内毒素应小于 3.75 EU。

参考文献

[1] 中国药典 2000年版 .二部 [S]. 2000:附录 85-86; 204.

[2] 赵新先主编 .中药注射剂学 [M].广州:广东科技出版社,
2000: 590.

收稿日期: 2003-10-20