

鲎试法检查硫酸庆大霉素注射液热原的探讨

杨锡祥 陈连娣

(安徽省淮南市药品检验所 淮南 232007)

摘要 本文通过稀释 40 倍后的硫酸庆大霉素注射液对鲎试法凝集反应过程的干扰试验,证明稀释后硫酸庆大霉素注射液对鲎试剂的灵敏度($\lambda=0.5\text{EU/ml}$)无干扰作用(未超出 $\pm 2\lambda$),可以用鲎试法代替传统的家兔法进行热原检查或进行初试筛选。本实验建立的方法大大提高了热原检查的效率和灵敏度,对实际工作特别是药品生产企业具有很大指导意义。

关键词 硫酸庆大霉素注射液;热原;内毒素;鲎试剂

Study on the pyrogen detection of injection gentamycin sulfate with the method of tachypleus amebocyte lysate test

Yang Xixiang, Cheng Liandi

(Huai nan Institute for Drug Control 232007)

ABSTRACT Through the test of interfere to the process of agglutinate reaction with Injection Gentamycin Sulfate which have been forty times diluted. This experiment proved that there is no interference (not exceeded $\pm 2\lambda$) to the sensitive of Tachypleus Amebocyte Lysate for Endotoxin (Purogen) Detection ($\lambda=0.5\text{EU/ml}$). On the basis of this experiment, a new method can be established for pyrogen detection or applying to primary screening instead of the traditional rabbit test. This method may raise the efficiency and sensitivety of pyrogen test greatly. There will be particularly for drug production manufactured a important reference significance.

KEY WORDS Injection Gentamycin Sulfate, pyrogen, endotoxin, tachypleus amebocyte lysate for endotoxin (pyrogen) detection

热原检查实质上就是内毒素限量检查^[2,3]。本文就鲎试剂法在硫酸庆大霉素注射液热原(即内毒素)检查的方法研究中做一些探讨。

本实验先用鲎试剂溶解液为溶剂测定本批鲎试剂灵敏度,再在相同实验条件下以样品稀释液为溶剂测定本批鲎试剂灵敏度^[5],若二者灵敏度相差小于 2 倍,则认为样品稀释液对鲎试剂的灵敏度无干扰^[3,4]。结果表

明,经过适当的稀释,硫酸庆大霉素注射液对鲎试剂法的凝集反应无干扰作用。作者认为,用鲎试剂法代替家兔法进行热原检查或初试筛选,提高热原检查的工作效率,值得深入研究。

一、实验材料与药品

(一)鲎试剂 厦门鲎试剂厂产品,批号 940317,灵敏度 0.5EU/ml ,规格为 0.1ml/支 。

(二)细菌内毒素工作标准品 厦门鲎试剂厂产品,批号 940401,含量 10EU/支。

(三)鲎试剂溶解水(以下简称溶解水) 厦门鲎试剂厂产品,批号 940329,规格为 2ml/支,内毒素含量 $<0.03\text{EU/ml}$ 。

(四)硫酸庆大霉素注射液 安徽南市第六制药厂产品。批号 941121, 941112, 941216, 941221;规格为 4 万 IU/ml,家兔法热原检查符合规定。

(五)1ml 注射器,恒温水浴器(恒温 37℃),小试管架等。

二、实验方法与结果

(一)实验准备 所有接触液体的注射器与针头洗净后在 250℃ 下加热半小时。实验均在无菌条件下进行。

(二)鲎试剂灵敏度测定

取内毒素工作标准品 1 支加溶解水 1ml 溶解为 10EU/ml,取 0.2ml 再加溶解水 0.8ml 混匀(A 液);取 A 液 0.5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(B 液);取 B 液 0.5ml 再加溶解水混匀(C 液);取 C 液 0.5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(D 液),取 D 液 0.5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(E 液)。

取鲎试剂 4 支分别用 0.1ml 溶解水溶解后,将上述 A,B,C,D 液各取 0.4ml 分别加入 4 支鲎试剂管中,混匀,置 37±1℃ 水浴中保温 1 小时,结果见表 1。

用反应终点浓度对数值计算其标准差:
 $S=0.1507<0.365$ (n=4)

本批鲎试剂灵敏度:

$$\lambda = \log^{-1} \frac{\sum \chi}{n} = 0.4205 \text{ (EU/ml) 未超出}$$

0.5λ~2λ 范围

(三)增强/抑制试验

取内毒素工作标准品一支,加溶解水 1ml,溶解为 10EU/ml。取 0.1ml 再加溶解水 0.9ml 混匀(A 液),取 A 液 0.5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(B 液),取 B 液 0.5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(C 液),取 C 液 0.

5ml 再加溶解水 0.5ml 混匀(D 液)。

取硫酸庆大霉素注射液 0.25ml 加溶解水 0.75ml 混匀,取 0.2ml 加溶解水 1.8ml 混匀。

取鲎试剂分别用上述稀释后的硫酸庆大霉素注射液 0.1ml 溶解后,将上述 A、B、C、D 液各取 0.4ml,分别加入 4 支鲎试剂管中(每管 0.1ml),混匀,置 37±1℃ 水浴中保温 1 小时。四个批号硫酸庆大霉素注射液同法操作,阴性对照用样品稀释液 0.1ml 溶解鲎试剂后,再加溶解水 0.1ml。另以样品 1/10 稀释液做一对照。二管平行试验,结果见表 2。

分别计算标准差 S 和灵敏度 λ,并测定硫酸庆大霉素注射液 1/40 稀释液的 pH 值,结果见表 3。

三、讨论

(一)实验结果表明,稀释 40 倍后的硫酸庆大霉素注射液对鲎试剂的灵敏度有一定影响,使鲎试剂的灵敏度降低约 49%,即有抑制作用,但未超出实测灵敏度的二倍(0.21EU/ml~0.84EU/ml),故可认为稀释 40 倍后的硫酸庆大霉素注射液对鲎试剂灵敏度无干扰作用,硫酸庆大霉素注射液可直接稀释后用鲎试剂法进行热原检查或筛选。

(二)考虑到稀释 40 倍后的硫酸庆大霉素注射液可能含有刚好不足以引起凝集反应的内毒素,故用稀释 10 倍的硫酸庆大霉素注射做一对照,结果均为阴性,说明稀释 40 倍后的样品中,内毒素含量均低于 0.105EU/ml(0.42/4),即使与 0.25EU/ml 这一稀释度的内毒素相加,也不足以引起阳性反应,从而进一步说明了上述结论的正确性。

(三)本实验采用稀释 40 倍的方法是根据家兔法的剂量计算而来,家兔法规定稀释至 10000u/ml 后按 1ml/Kg 剂量给药^[1],给药时间不超过 1 小时。从而可知,家兔每小时每公斤毫升容积 $M = 10000 / 40000 \times$

表 1 鲎试剂灵敏度测定结果

内毒素稀释浓度	A(2EU/ml)				B(1EU/ml)				C(0.5EU/ml)				D(0.25EU/ml)				E(0.125EU/ml)			
内毒素稀释液(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
鲎试剂(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
结果判断	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

表 2 庆大霉素增强/抑制试验结果

样品批号	A(2EU/ml)				B(1EU/ml)				C(0.25EU/ml)				D(0.125EU/ml)				阴性对照	1/10 稀释液对照
941121	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
941112	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
941216	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
941221	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 3 四批样品稀释液 pH 值与测定的灵敏度

样品批号	样品稀释液 pH 值	标准差	灵敏度	灵敏度均值
941121	5.04	0.1504	0.595	} 0.627
941112	5.20	0	0.500	
941216	4.96	0.1738	0.707	
941221	5.41	0.1738	0.707	

1 = 0.25 (ml / Kg), 内毒素限值浓度 $ELC = \frac{K}{M} = \frac{5}{0.25} = 20 (EU/ml)$ (注意: 这里假设家兔与人的致热阈相同), 样品的最大有效稀释倍数 $MVD = ELC / \lambda = 20 / 0.5 = 40$ (倍)^[3]。比较家兔法剂量与按人用剂量计算所得最大有效稀释倍数可见, 即使按儿童最大剂量给药 ($M = 2.5 / 80 \times 2 = 0.0625 ml / Kg$, 则 $ELC = k / M = 5 / 0.0625 = 80 EU/ml$, $MVD = ELC / 0.5 = 80 / 0.5 = 160$), 本法稀释 40 倍后的内毒素检查也具有 4 倍的保险系数, 若 K 值取 10, 则有 8 倍的保险系数。

样品的实际稀释倍数不能超过人用剂量的最大有效稀释倍数, 否则, 即使稀释后对灵敏度无干扰, 测定也将无意义。

(四) 本实验采用的是用样品稀释液溶解鲎试剂, 而内毒素工作标准品的稀释仍用溶解水。这样做是为了简化操作, 与用溶解水溶解鲎试剂, 用样品稀释液稀释内毒素工作标准品效果一样。

(五) 样品稀释液的 pH 值在 4.96 ~ 5.41 范围内对灵敏度影响不明显, 但 pH 值变化对灵敏度有何影响, 还有待进一步考察。

参考文献

[1] 中国药典. 1990 年版. 二部: 698
 [2] 中国药典注释. 1990 年版. 二部. 北京: 化学工业出版社, 1993: 1162~67
 [3] 夏振民译. 欧洲药典. 1987, V. 2. 1. 9
 [4] 夏振民译. 英国药典. 1988, 补遗 XI V 1989
 [5] 卫生部药品标准. 细菌内毒素检查法. 卫生部(1993) 卫药标字 02 号文批准颁布