

3. 两种方法测定结果比较 将两法同时测定的上述18批10%GS含量结果进行比较: ①上数第二层比较: 旋光法测定的结果与折光法有极显著性差异 ($P < 0.01$), ②底层比较: 旋光法与折光法有显著性差异 ($P < 0.05$)。说明折光法不能代替旋光法用于测定含糖输液成品含量。

参 考 文 献

1. 南京药学院药剂学教研组编, 药剂学, 第二版。北京: 人民卫生出版社, 1985: 510~511
2. 中华人民共和国药典, 二部, 1985: 510, 511
3. 南京药学院主编 药剂学, 第一版, 北京: 人民卫生出版社, 1978: 295

LT 法检测 6 种大输液热原的研究

解放军146医院 马守江 孙迪清 潘 起 栾廷洁 王义存

细菌内毒素的鲎试验法 (LT法) 已载入中国药典, 由于首次收载, 90版中国药典只允许 2 种放射药品, 注射用水等 4 种大输液参照部颁标准用LT法检查热原, 扩大应用亟待研究。本文考查了20%甘露醇等 6 种大输液对鲎试验的影响, 建立了 6 种大输液热原检查的LT法。

一、实验材料

1. 器材 细菌内毒素测定仪XNC-I型, 试管75×10; 江苏无锡洛社实验电器厂; 实验用玻璃量具均经270℃、30min无热原处理。

2. 试剂 鲎试剂(TAL): 批号901009, 灵敏度 $\lambda = 0.5 \text{Eu/mlh}$; 内毒素: E B₄ O₁₁₁: 100Eu/ml, 上海生物制品研究所; TAL溶解剂: 批号900306, 厦门鲎试剂厂; 实验用大输液RT法检查热原均为阴性, LT法阴性 (均未进行稀释)。

3. 动物 家兔, 符合药典用于热原检

查的要求。

二、实验方法

1. 6 种大输液对鲎试验的影响

取20%甘露醇、50%GS、复方氯化钠、葡萄糖氯化钠、1%普鲁卡因、甲硝唑注射液适量, 用TAL溶解剂分别稀释1、2、5、10倍, 加入内毒素使含量均为5EU/ml, 各取0.1ml与0.1ml TAL液混匀于75×10试管中, 迅速置XNC-I型测定仪内, 37±1℃孵化, 按终点判断标准监测每支试管生成凝胶时间。配制浓度为5Eu/ml的内毒素水溶液作为阳性对照, 同时做阴性对照管2支, 重复3次。

终点判断标准: 以0.1ml浓度为100Eu/ml的内毒素液与0.1ml TAL液混合形成的坚实凝胶为标准管, 供试品浊度及荧光与标准管一致时, 翻转试管180℃, 此时, 形成的凝胶刚好不被破坏, 即达反应终点, 结果见表1。

表1 不同浓度的6种大输液鲎试验凝胶时间(h)

稀 释 倍 数	1	2	5	10
20%甘露醇	0.4514	0.4972	0.5361	0.5361
1%普鲁卡因	/	1.0639	0.7917	0.5365
50%GS	/	0.7222	0.5861	0.5361
复方氯化钠	0.5361	0.5361	0.5361	0.5361
葡萄糖氯化钠	0.5361	0.5361	0.5361	0.5361
甲硝唑	0.9623	0.6667	0.5357	0.5365
阳性对照管			0.5361	

由表1看出, 20%甘露醇对鲎试验有增强效应; 50%GS、1%普鲁卡因、甲硝唑存在不同程度的抑制效应, 而复方氯化钠和葡萄糖氯化钠对鲎试验无影响。

2. 一般测定方法的建立

表1中注射液刚能消除其对鲎试验干扰的稀释倍数, 作为最大有效稀释度(MVD)⁽¹⁾, 计算检测上述各注射热原所要求TAL的最低敏感度, 见表2。

表2 供试品的C、K、MVD、 λ 表

供试品	C	K	MVD	λ
2%甘露醇	0.5	5	5	0.1
1%普鲁卡因	0.6	5	10	0.6
50%GS	0.5	5	10	0.05
复方氯化钠	10ml/kg(M)	5	1	0.5
葡萄糖氯化钠	0.5	5	1	0.5
甲硝唑	0.35	5	5	0.15

C: FDA作为人用和兽用药, 生物制品以及医疗器械成品的内毒素试验的TAL法验证准则中规定的内毒素限量。

λ : TAL灵敏度。

K: 静脉用药 $K = 5 \text{ Eu/kg}$

M: 免剂量在单次或一小时内最大的人用量。

MVD: 最大有效稀释度: 产品效价 $K/\lambda M$ 或产品效价 X 内毒素限量 $/\lambda$ 。

检测20%甘露醇、50%GS、复方氯化钠、葡萄糖氯化钠、1%普鲁卡因、甲硝唑注射液热原时, 分别用灵敏度0.1、0.05、0.5、0.5、0.6、0.15 Eu/mlh 的TAL依法⁽²⁾检测即可。对TAL灵敏度要求较高的20%甘露醇、50%GS、甲硝唑可采用标准限量凝胶时间法进行测定。

3. 标准限量凝胶时间法

检测最大有效稀释范围内要求 λ 值较小的检品热原, 若无合适灵敏度的TAL供选择时, 采用做一阴性对照管, 使之含内毒素浓度与检品所要求TAL灵敏度值相同, 监测

标准阳性管的凝胶时间, 以该时间为标准判断结果, 称标准限量凝胶时间法。

操作方法: 取检品限量浓度(与检品要求 λ 值相同)内毒素液、阴性对照液、样品液0.1ml, 分别与0.1ml TAL液混匀于 75×10 试管中, 置入测定仪内, $37 \pm 1^\circ \text{C}$ 孵化, 监测标准限量管凝胶时间, 作为标准限量时间。此时, 将供试品翻转 180° 判断结果。第二次使用同一批TAL检测相同的样品时, 标准限量时间是已知的, 只需在到达终点时间时判断结果即可。阴性管2h内不准出现阴性。

结果判断: 凡形成坚实凝胶的检品, 所含内毒素超过最低限量, 不合格。

未形成坚实凝胶的检品, 所含内毒素未超过最低限量, 合格。

4. LT法与RT法比较

我们对上述6种100批大输液依上法进行热原检查与兔法(RT法)比较。两法符合率为91%, 其中20%甘露醇、50%GS、甲硝唑均采用标准限量凝胶时间法, 未出现假阴性的结果(见表3)。

讨 论

1. 实验证实, 10%GS对鲎试验仍有微弱的抑制效应。因LT法与RT法灵敏度的差异(100倍)比10%GS抑制效应引起TAL敏感度的变化大的多, 尽管存在抑制效应, 10%GS不会出现假阴性。这一点与卫生部协作组提供的报告结果相同。⁽³⁾

由于 Ca^{++} 在鲎试验凝胶过程中的作用机制及 Ca^{++} 浓度与鲎试剂敏感度之间量的关系尚不完全清楚, 目前国内外均采用RT法检测复方氯化钠注射液热原。本实验证实, 该制剂对鲎试验无影响。这与TAL本身含 Ca^{++} 浓度(0.02~0.05M)相对于复方氯化钠中 Ca^{++} 浓度(0.002M), 后者可被前者的差异所掩盖而忽略的结论相吻合。

2. 研究证实, 同一批TAL检测相同浓度内毒素成胶时间是恒定的。不同的检品

表3 L T法、RT法检测6种大输液热原结果比较

供 试 品	批 数	L T法			K T法		
		+	-	阳性率(%)	+	-	阳性率(%)
2%甘露醇	10	3	7	30	1	9	1
1%普鲁卡因	8	0	8	0	0	8	0
5%G S	5	0	5	0	0	5	0
复方氯化钠	23	3	20	13	0	23	0
葡萄糖氯化钠	50	4	46	8	0	5	0
甲硝唑	4	0	4	0	0	4	0
总 计	100	10	90	10*	1	99	1*

* 为平均阳性率值

中加入等浓度的内毒素同时进行试验,可清楚地观察到样品对鲎试验的抑制或增强效应。基于这一原理,本文讨论了6种大输液对鲎试验的影响。

3. 不同灵敏度TAL与同一浓度内毒素反应凝胶时间是不同的。利用标准限量凝胶时间法检测供试品热原,对于不同来源灵敏度不同的TAL,只需监测一次标准阳性管的凝胶时间,第二次检查同一供试品,以此时间为标准进行检查判断结果。但每次试验设标准限量管仍属必要。

4. 现行细菌内毒素检查法检测样品热原均作最低灵敏度要求。TAL灵敏度是以1h检测出的内毒素最低浓度进行定义的。实际上,该法是以λ值为最高浓度进行内毒

素限量检查,而内毒素浓度与凝胶时间之间又存在良好的线性关系,标准限量凝胶时间法就是依据这一原理确定检品内毒素限量,通过凝胶时间进行检查的。

5. pH值对鲎试验有影响,本实验所用溶剂均采用具有一定缓冲能力的TAL溶剂稀释检品,以确保在相同条件下考查各样品对鲎试验的影响。

参 考 文 献

1. Munson T E In, Bacterial Endotoxins, Alan R Liss Inc 1985: 211
2. USP 21th NF 16th, 1984, P1165
3. 夏振民等, 中国药学杂志 1989; 24 (4): 223

鲎试剂检测普鲁卡因注射液中微量内毒素的实验研究

济南军区总医院药剂科 张卫星 张岩 高燕 郭建华

由于临床静脉复合麻醉及其它方面应用的需要,医院制剂室经常制备含量为0.5~2%的普鲁卡因输液剂,供临床静脉滴注使用,故对其热原检查应极严格。《中国人民解放军制剂规范》八五版规定用家兔法检查其热原⁽¹⁾,方法不仅成本高、重现性差,

且极易使受试家兔中毒死亡,故基层检验和临床单位不易采用。卫生部部颁标准细菌内毒素检查法可检查四种大输液内毒素限量,作为热原检查的初试方法,⁽²⁾由于普鲁卡因对鲎试剂凝集反应的影响,使其应用受到限制,本文采用双向超滤技术,将注射液中的