

鲎试验检测放射性药品热原的研究*

夏振民 顾淑琴

何欣若 王振山 范广誉

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

(中国科学院原子能研究所同位素部, 北京)

许文福 刘端华 丁友玲

(福建省药品检验所, 福州)

提要 各国药典规定的药品热原检查法为家兔升温试验, 由于放射性药品中放射核素半衰期及射线的生物效应的限制, 采用规定的方法遇到很多困难。鲎试验是利用一种低等海洋动物“鲎”的血细胞溶解物与微量细菌内毒素(热原的主要来源)起凝胶化反应从而检测出微量内毒素的一种实验技术。本文报道了用东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)提取的鲎血细胞溶解物, 以微量载玻片鲎试验法, 考核了国产放射性药品共13种50批, 并与家兔法进行了比较。其中38批两法结果一致, 占76%。结果认为, 鲎试验可作为检测放射性药品热原的一种方法, 具有灵敏、快速、简便的特点。

目前各国药典规定的热原检查法, 均系将一定剂量供试品, 静脉注入家兔体内, 在规定时间内, 观察家兔体温升高的一种试验方法(简称家兔法)。这种方法用于检测放射性药品热原时, 遇到很多困难。首先, 含有高浓度放射核素的放射性药品, 由于其射线的生物效应, 一方面能引起家兔升温, 使结果难于分析; 另一方面放射核素的污染以及对实验人员的辐射, 都是很难避免的。其次, 放射性药品中放射核素的半衰期($T_{1/2}$)的限制, 尤其是目前临床核医学广泛应用的短半衰期放射核素(^{99m}Tc $T_{1/2}=6.0$ 小时, ^{113m}In $T_{1/2}=99.5$ 分), 无法在使用前完成热原检查, 因为检查期间, 由于放射核素的衰变, 放射活性大部分丧失。因此, 热原检查是目前各国控制放射性药品质量中, 存在的困难问题之一。

近年来, 国外在检测药品热原方面出现了一种新技术——鲎试验法(Limulus test), 它是利用一种栖生海洋的节肢动物“鲎”的血细胞溶解物(鲎试剂)与微量细菌内毒素(热原的主要来源)起凝胶化反应, 来测定内毒素的方法。

1956年 Bang⁽¹⁾观察到美洲鲎(*Limulus polyphemus*)在革兰氏阴性细菌作用下, 因为全身血液凝固而死亡。12年后, Liven和 Bang⁽²⁾初步阐明上述鲎血凝固的原因是由于革兰氏阴性细菌内毒素激活鲎血细胞溶解物中的一种酶, 使可溶性蛋白变成凝胶, 并首次制备了鲎血细胞溶解物, 建立了鲎试验方法。1972年 Cooper⁽³⁾报道, 利用美洲鲎的血细胞溶解物检测放射性药物和生物制品中的热原。据 Wachtel⁽⁴⁾报道, 美国食品和药品管理署(FDA), 已经允许将鲎试验用于放射性药品、疫苗和注射用水的热原检查。

最近日本学者 Shishikura⁽⁵⁾从世界现存三属五种鲎中的四种, 即东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)、泰国马来群岛鲎(*Tachypleus gigas*)、美洲鲎(*Limulus polyphemus*)和东南亚鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*)制备了凝集原(Coagulogens), 经过生物化学和免疫学的比

本文于1979年12月3日收到。

* 本文曾在中国药学会第四届全国学术会议上宣读, 1979年11月, 南京。

较研究,认为这四种鲎的凝集原,都能在凝固酶(Glutting enzyme)作用下变为凝胶,在凝集机理方面有相似的功能,并且分子量相同。这一研究成果是用东方鲎代替美洲鲎制备溶解物的理论依据。

我们⁽⁶⁾从东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)制备了鲎血细胞溶解物。结合本实验室条件,并参考 Okuguchi⁽⁷⁾的报道,建立了微量鲎试验技术——载玻片法⁽⁸⁾。本文报道利用自制鲎血细胞溶解物,采用微量载玻片法,检测了国产 13 种 50 批放射性药品,并与家兔法检查结果相比较,对放射性药品中影响试验的因素进行了初步分析。

材 料 和 方 法

鲎血细胞溶解物东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)见图 1,由福建省长乐县江田公社松下大队渔民捕获。无菌操作采血。以 0.02 M 茶碱 3% NaCl 经 Tris-HCl 缓冲液调至 pH 7.2 的无菌无热原溶液为抗凝剂,与血液 1:1 混合。离心分离血细胞(见图 2)。用 pH 7.6 3% NaCl 无菌无热原溶液洗 2 次,加入血细胞体积约 2~4 倍量的注射用水,置 0°~4°C,24 小时,离心分离上清液,经冷冻干燥即得。灵敏度以大肠杆菌(*E.coli* O₁₁₁ B₄)内毒素(该内毒素经中国药典热原检查法测定,致热活性为 5~10 ng/kg)标定为 1~10 ng/ml,鲎血细胞溶解物用前以注射用水溶解至冻干前体积。



图 1 东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)之外观 (1:8)

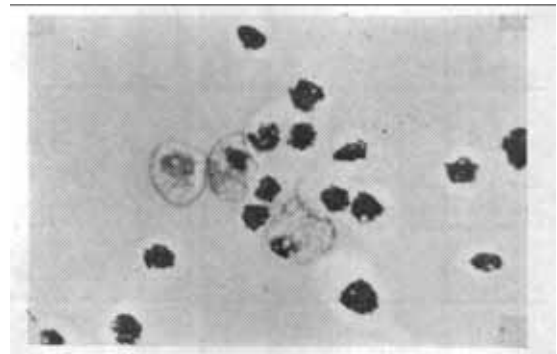


图 2 东方鲎(*Tachypleus tridentatus*)血细胞显微照

放射性药品为国产常规供临床核医学诊治的高锝酸钠(^{99m}Tc)、胶体金(¹⁹⁸Au)、铬酸钠(⁵¹Cr)、胶体磷酸铬(³²P)、二乙三胺五醋酸镱(¹⁶⁹Yb)、枸橼酸镱(¹⁶⁹Yb)、氯化铯(¹³¹Cs)、碘玫瑰红钠(¹³¹I)、邻碘马尿酸钠(¹³¹I)、磷酸钠(³²P)、氯化铟(^{113m}In)等注射液,以及用于制备胶体金注射液的原料明胶和正在研制的新品种硒-蛋氨酸(⁷⁵Se)注射液,共 13 个品种 50 批样品。

鲎试验法采用载玻片法,取约 10 μl 鲎血细胞溶解物,滴于载玻片上,在此液滴上加等体积供试品(或阴、阳性对照品),用针头搅匀,使液滴呈中央凸起,并消除液滴中的气泡,将载玻片平放在一个置于 37°C 水浴中的密闭湿润室中(湿润室可用一密闭容器,底部垫一层浸湿的棉花,用合适的支架支撑载玻片即可),保温 30~45 分钟,然后轻轻取出载玻片,

平放在架子上,用1滴染液*,滴加在反应混合物上,1~2分钟后,用盖玻片小心覆盖并移至光亮背景上,用肉眼观察,结果判断见另文⁽⁸⁾报道。

家兔热原检查法按中国药典77年版热原检查法。注射剂量,除高锝酸钠(^{99m}Tc)注射液为0.5 ml/kg外,其余均为0.1 ml/kg。若遇有“复试”者,均判为不符合热原检查规定(即阳性),不再复试。

鲎法与家兔法均以同批同瓶样品为供试品。

结 果

表1为鲎法与家兔法检测13种50批放射药品热原的结果。

表1 放射性药品热原检测结果

放射 性 药 品 名 称	批 数	鲎 法	兔 法	两 法	
		(+)	(+)	(+)	(-)
高锝酸钠(^{99m} Tc)	9	6	4	4	3
胶体金(¹⁹⁸ Au)	6	2	1	1	4
胶体磷酸锆(³² P)	4	1	1	1	3
明 胶	5	3	2	2	2
铬酸钠(⁵¹ Cr)	4	0	0	0	4
二乙三胺五醋酸镱(¹⁶⁹ Yb)	3	0	0	0	3
氯化铯(¹³⁷ Cs)	2	0	0	0	2
硒-蛋氨酸(⁷⁵ Se)	2	2	1	1	0
碘-玫瑰红钠(¹³¹ I)	4	4	2	2	0
邻碘马尿酸钠(¹³¹ I)	6	0	2	0	4
枸橼酸镱(¹⁶⁹ Yb)	1	0	1	0	0
氯化铟(^{113m} In)	1	0	1	0	0
磷酸钠(³² P)	3	0	1	0	2

表2为鲎法与家兔法检测13种50批放射药品热原结果的比较。两法均呈阳性者共11批,均呈阴性者共27批,两法相符者共38批,占76%;仅鲎法阳性者为7批(即假阳性),仅家兔法阳性者为5批(即假阴性),两法不相符共12批,占24%。

表2 鲎法、家兔法放射性药品热原检测结果比较

比 较 项 目	批 数	百 分 数
两法阳性	11	76%
两法阴性	27	
两法一致	38	
仅鲎法阳性	7	24%
仅兔法阴性	5	
两法不一致	12	

讨 论

鲎试验法检测细菌内毒素是最近10年发展起来的一项新技术、新方法,作为检测药品

* 染液: 0.1克溴酚兰+20 ml 95%乙醇+80 ml pH7.4磷酸缓冲液。

热原的方法,目前国外文献报道,用于放射性药品是比较一致的意见。从我们检测的 13 种 50 批放射性药品热原的结果来看,鲎法具有简便、迅速、灵敏的特点,尤其是采用微量载玻片法,对于检测放射性药品有着特殊的优越性 (1) 所需要的鲎试剂和供试品的用量少 (约 10 μ l),便于检测大量样品;(2) 快速得到结果 (30~45 分钟);(3) 减少了放射核素的污染和对实验人员的辐射剂量。

在两法比较结果中 (表 2),符合率较低 (76%),甚至出现了 5 批假阴性。我们认为,这是由于对供试品未进行必要的处理,以适于鲎试验反应条件所造成的。例如 4 批碘玫瑰红钠(^{131}I)注射液,鲎法全部呈阳性,而家兔法仅 2 批阳性,当用试管法代替载玻片法试验时,家兔法与鲎法结果不符的 2 批,试管法均为阴性,与家兔法结果一致。这是由于载玻片法观察结果时,加入的染液与碘玫瑰红钠反应,在玻片上出现颗粒沉渣,干扰结果的判断,造成假阳性。因此我们认为载玻片法不适于碘玫瑰红钠(^{131}I)注射液的热原检查,应采用试管法。又如,6 批邻碘马尿酸钠(^{131}I)注射液,鲎法均呈阴性,而家兔法 2 批为阳性(“复试”),1 批枸橼酸镱(^{169}Yb)和 1 批氯化铟($^{113\text{m}}\text{In}$)注射液,鲎法也呈阴性,家兔法则为阳性。上述 3 种供试品溶液 pH 偏低(邻碘马尿酸钠 pH 5,枸橼酸镱 pH 4.5,氯化铟 pH 1.5),鲎试验反应的最佳 pH 值为 6.25~7.25⁽⁹⁾。因此在用鲎法检测这些样品时,首先应调节供试品溶液的 pH,然后再增加一个抑制对照(供试品加已知浓度内毒素),避免出现假阴性。

尽管我们对结果中两法不相符的影响因素进行了上述初步验证,我们认为,即使两法结果相符很好,试图以鲎法代替家兔法,是不妥的。虽然由于制药工业的发展,药品种类的增多(如放射性药物、抗肿瘤药物,抗菌素类等)家兔法的局限性日益被人们所认识。但是,家兔法终究可反映热原质引起哺乳动物复杂的升温反应过程,而鲎试验则以试管内的生化反应为基础的,仅对革兰氏阴性细菌内毒素具有高度敏感性,而有些药物(如酶制剂、血液制剂、抗菌素类等)往往干扰鲎试验的结果,也存在一定的局限性。因此我们认为,鲎法与家兔法互为补充试验则更为合适,而鲎试验的建立,无论在查明放射性药品不良反应的原因,还是在放射性药品生产过程中杜绝热原污染,确保药品质量方面⁽¹⁰⁾,已经作出了相当贡献,鲎试验在检测放射性药品热原方面是有积极意义的。

参 考 文 献

1. Bang FB: A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 98:325,1956
2. Liven J, et al: Clottable protein in limulus its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thrombos Diathes Haemorrh* 19:186, 1968
3. Cooper JF, et al: The limulus test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals. *Bull Parent Drug Assoc* 26:153, 1972
4. Wachtel RE, et al: Comparison of limulus amoebocyte lysate and correlation with the United States Pharmacopeial Pyrogen test. *Appl Environm Microbiol* 33:1265, 1977
5. Shishikura F, et al: Comparative study on horseshoe crab coagulogens. *J Exp Zoology* 206:241, 1978
6. 夏振民等: 东方鲎血细胞溶解物的制备及其灵敏度测定。福建医药杂志 1:35, 1979
7. Okuguchi S: Improvement of the micromethod for the limulus lysate test. *Microbiol Immunol* 22: 113,1978
8. 夏振民等: 微量鲎试验技术——载玻片法。药学通报 14:450,1979
9. Masayoshi K, et al: Preparation of pre-gal from the amoebocytes of Japanese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) with the Anti-aggregating effect of methylxanthines. II *YAKUGAKU ZASSHI* 94:298,1974
10. Cooper JF, et al: Bacterial endotoxin as a cause of aseptic meningitis following radionuclide cysternography. *J Nucl Med* 14:387, 1973

STUDIES ON THE LIMULUS TEST FOR DETECTION OF ENDOTOXIN(PYROGEN) IN RADIOPHARMACEUTICALS

Xia Zhenmin and Gu Shuqin,

(National Institute for the Control of *Pharmaceutical and Biological*
Products, Ministry of Health)

He Xinruo, Wang Zhenshan and Fan Guangyu

(*Institute of Atomic Energy, Chinese Academy of Science*)

Xu Wenfu, Liu Duanhua, and Ding Youling,

(*Fujian Institute of Drug Control*)

ABSTRACT

Pyrogen testing is one of the most difficult problems encountered in quality control of radiopharmaceuticals. The increased use of short-life radiopharmaceuticals presents formidable problems in pyrogen testing by the official method because of the rapid physical decay of most radionuclides, the large volume of required test solution, the radiation exposure and waste-disposing problems.

The Limulus test is a rapid, sensitive and simple method for detection of bacterial endotoxin (pyrogen).

We prepared amebocytes lysate from Horseshoe crab of China i. e. *Tachypleus tridentatus*. Its sensitivity was found to be 1~10 ng/ml for *E. coli* O₁₁₁B₄ endotoxin. An improved micromethod of slide test was used as a modified Limulus test in our laboratory. In testing 50 batches of radiopharmaceuticals for pyrogen by rabbit and Limulus methods, the results of 38 batches were in agreement with each other.

Preliminary results indicate that the Limulus test is a rapid, sensitive and simple method for detection of pyrogen in radiopharmaceuticals.