

# 热原检测方法介绍

郑茂恩<sup>1</sup>, 帖妍玥<sup>2</sup>, 李兰波<sup>1</sup>, 李建梅<sup>1</sup>

(1 山东省医学科学院山东省实验动物中心, 济南 250002 2 内蒙古国际蒙医医院, 呼和浩特 010055)

[收稿日期] 2010- 12- 30 [文献标识码] A [文章编号] 1002- 1280(2011)05- 0051- 03 [中图分类号] R927. 12

**[摘要]** 简单介绍了两种常用热原检测——家兔法和细菌内毒素法的特性。随着临床要求越来越高, 细胞法检测热原将随着技术的发展逐步应用到实践中。

**[关键词]** 热原; 鲎试剂; 细胞

## Detection Methods of Pyrogen

ZHENG Mao-en<sup>1</sup>, TE Yan-yue<sup>2</sup>, LI Lan-bo<sup>1</sup>, LI Jian-mei<sup>1</sup>

(1 Shandong Laboratory Animal Center of Shandong Academy of Medical Sciences Jinan 250002, China;

2 Inner Mongolian International Mongolian Hospital, Huhhot 010055, China)

**Abstract** The characteristics and features of the rabbit and the endotoxin methods were introduced briefly. With the increasingly demand for clinical, the cell pyrogen method will be gradual as the into practice as the technology development. This paper made these brief Introduction.

**Key words** pyrogen; tachyleus anebocyte lysate(TAL); cell

热原(pyrogen)系指由微生物产生的能引起恒温动物异常升高的致热性物质。目前,对于热原国内外仍未有完全统一的认识,但从国内外文献报道中普遍认为:它是指细菌内毒素的脂多糖。欧洲药典委员会副主席 J Van Noordwijk 提出:“严格地讲,不是每一种热原都具有脂多糖的结构,但所有已知的细菌内毒素脂多糖都有热原活性”。在药品生产质量管理规范(GMP)条件下,药品生产的质量控制一般可以接受的观点是:不存在细菌内毒素意味着不存在热原。

目前检测方法已经从动物试验、定性法发展到定量法,常用的检测方法主要是家兔法和细菌内毒素检测法(鲎试剂),但随着生物技术的发展,细胞检测法将逐渐的被应用。

### 1 家兔法

1.1 家兔法的建立 热原检测是保证药品安全的重要检验项目之一。1923年 Seibert 第一次提出用家兔检测热原方法,1942年美国药典首先将家兔法

作为药品的热原检测,在保障药品质量和用药安全中发挥了重要作用。热原检测是生物制品质量评价中的一项重要内容,能客观反映各类药品和生物制品中热原在生物体内引起发热情况的特点<sup>[1]</sup>,并能直观反映出药品中的热原导致实验兔升温情况。

家兔热原检测的优点是能够反映热原引起的哺乳动物复杂的升温过程,该方法不但能检测出细菌内毒素的致热原,也能检查出非细菌内毒素的致热原<sup>[2]</sup>,并且适用于检查较多种类的热原物质。

1.2 家兔法的发展和影响因素 影响家兔热原质检测实验结果的因素很多,如饲养环境、试验环境和家兔自身的因素,家兔的正常体温也是一个重要的影响因素<sup>[3]</sup>。家兔热原检测法是以注射供试品使家兔体温改变为基础<sup>[4]</sup>。因此,家兔体温的稳定性和均一性对试验结果非常重要,如饲养合格兔应具备温度比较恒定的动物室和试验室,试验操作要求较严格,应有熟练的操作技巧,才能使试验结果可靠;兔的正常体温随着季节的变化也有所差异,夏季

的正常体温高于冬季的正常体温, 并且存在着显著差异; 同时新兔和用过的兔也存在显著差异<sup>[5]</sup>。

家兔检测内毒素的灵敏度为 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 试验结果接近人体的真实情况, 但操作繁琐、费时, 灵敏度低, 结果重复性差, 不能定量反映热原物质的含量, 只能给出阴性或阳性的结果, 其结果好坏依赖于兔子品系的选择和实验条件的控制, 费用高, 应用范围有限和使用活体动物实验产生的伦理道德问题等。加之我国中药品种较多, 无法排除细菌内毒素法中的干扰, 必须使用家兔热原法进行检查, 是目前我国药品和生物制品质量评价中常用的方法<sup>[5]</sup>。

如某些抗生素、血液制品、生物制品本身存在影响家兔正常体温的问题, 而这种方法本身就是一种限度试验, 不能定量, 无法标准化, 人为影响很大, 因此建立一种准确、规范的检查方法势在必行<sup>[6]</sup>。

## 2 细菌内毒素检测法(鲎试剂法)

随着社会的进步、科技的发展, 制药工业飞速前进, 新品种不断增加, 临床用药要求越来越高, 家兔检测法的局限性日益突出。1968年, 美国学者 Levin 和 Bang 建立了细菌内毒素检测方法, 并广泛应用于医药、卫生等领域中, 该技术的成功和应用可谓是药品质量监控的一场革命。近年来, 对细菌内毒素的研究日趋深入, 已从分子水平阐明细菌内毒素的化学结构、活性机制, 随着细菌内毒素检查法系统工程的标准化和简便、快速、灵敏、重现性好等优点, 现在已成为药品检验中热原检测家兔法的替代方法, 药品越来越多的家兔热原检查法被细菌内毒素检查法所取代<sup>[7-9]</sup>。

### 2.1 细菌内毒素(Bacterial Endotoxin Test, BET)

内毒素进入人体血液循环中对人体健康的危害性很大, 常见的疾病如发热、感染性疾病、肠道性疾病、肝炎和胰腺炎以及多器官功能衰竭等。研究表明, 这些疾病的发生、发展与血浆中的内毒素水平呈正相关。因此, 定量动态观察血液中内毒素水平, 有利于疾病的早期诊断和治疗<sup>[10-11]</sup>。

细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁上的一种脂多糖(Lipopolysaccharide) LPS和微量蛋白(Protein)的复合物, 它是细菌死亡或解体后才释放出来的一种具有内毒素生物活性的物质<sup>[12]</sup>。

细菌内毒素检测法是根据鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机制, 以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法, 是控制药品质

量的一项重要检查项目。细菌内毒素检测法主要包括两种方法, 即凝胶法和光度测定法(浊度法和显色基质法), 其中广泛使用、权威的方法是凝胶法。

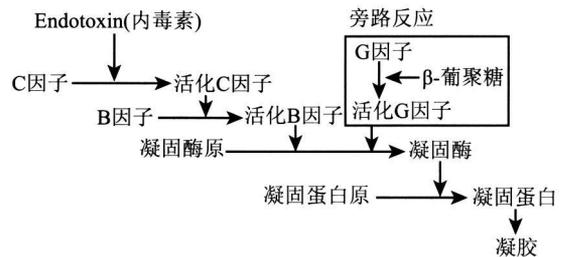


图 1 内毒素的反应机理

2.2 细菌内毒素的影响因素 目前, 鲎试剂检测法的影响因素甚多, 包括时间、温度、pH 值、实验器具、操作程序、处理作用、多糖、蛋白等。随着实验技术的进一步改进, 临床要求的进一步提高, 细菌内毒素检测得到更加广泛的应用<sup>[13]</sup>。这种方法是建立在标准化的基础之上, 方法较简单经济, 可在适当的浊度范围内进行半定量测定, 结果准确度高、重复性好、具有可比性, 其缺陷为特异性不强, 精密度和定量性较差<sup>[14-16]</sup>。

鲎试剂检测法检测的灵敏度为 0.0001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 操作简单易行, 试验费用低, 结果迅速可靠, 检查内毒素特异性强、灵敏度高, 因药物的 pH 值, 溶媒及药物中的附加剂(如表面活性剂、抗氧化剂等)等影响, 适用于注射剂生产过程中的热原控制和家兔法不能检查的某些细胞毒性药物制剂<sup>[17-18]</sup>, 但其对革兰氏阴性菌以外的内毒素不灵敏, 鲎试验法的假阳性反应较多, 所以目前尚不能完全取代家兔法。

### 3 细胞检测法

随着临床要求越来越精确和制药行业的快速发展(生物制品药物, 细胞治疗制剂等), 现有的热原检测方法凸显出了它的不足。家兔法不易标准化和定量、重复性和灵敏度差、受某些药品本身的药理活性及理化性质的影响较大等缺点。细菌内毒素法只能检测出细菌内毒素, 对某些产品进行检测时会得出假阴性结果, 此外鲎资源也非常有限, 因此研究新的热原检测方法是一种趋势。为了改善现有检测方法的不足, 细胞检测法逐渐走入人们的视野。

细胞检测法主要以人源细胞在体外进行热原检测为基础, 其原理为热原物质能引起人源细胞释放一些与发热反应有关的细胞因子, 通过免疫化学方法定量检测这些因子的含量变化就能定量反映

出热原物质的存在与否。按细胞的来源不同可分为三大类:白细胞系法、人外周血单个核细胞法和全血法。本方法与家兔热原检查法和鲎实验法进行比较,能检测出革兰氏阳性菌,如金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸而鲎实验却不能,相信在不久的将来,该方法有可能作为法定的检测方法用于药品、生物制品和医疗器械的热原检查之中<sup>[19]</sup>。

新方法具有 BET 高灵敏度和家兔法宽检测谱和重现性好等优点,与家兔法相比,新方法更加灵敏、费用更低,并能直接反映人对多种热原的反应,与细菌内毒素检测法相比,不仅仅局限于革兰氏阴性菌产生的细菌内毒素的检测,对各种热原质均能检测。在欧洲,目前有 6 种最突出的系统被确认,试验表明他们是安全的、不使用动物的、更有效的热原检测方法,可以作为热原检查替代方法<sup>[20]</sup>。

细胞检测法的优点: 1) 不使用动物; 2) 能真实地模拟人体对热原的反应; 3) 能检测出较多种类的热原物质; 4) 能定量或半定量; 5) 能被广泛地应用; 6) 操作简单可行<sup>[21]</sup>。

研究表明新的热原方法可以用于热原检测,但是还有一定的局限性: 1) 细胞不同时代不同批次之间存在一定的差异; 2) 没有标准品和权威试剂盒,对人的致热阈值也不太清楚,其限制不易确定; 3) 对细胞生长有干扰的不易用此法检测; 4) 特别注意生物安全问题。

总之,利用细胞在体外进行热原检测是目前国际上研究新热原检测方法的趋势,与此同时也存在着一些阻碍新方法发展的因素,如试验中试剂、血清的热原去除问题,非内毒素热原物质标准品研制的缺乏与滞后,对各物质引起人体发热反应的机理研究得不够透彻,如何对某些能干扰细胞法的样品(如细胞毒性试剂),只有诸如此类问题得到解决,才能有更好的应用前景。

#### 4 小结

目前,家兔法和细菌内毒素检测方法也需要逐步的改善,细胞检测法还需要进一步的验证和论证。热原检测之间存在着差异,决定了他们检测的应用范围和检测的侧重点以及检测的精确度不一样,但是随着分子生物学和其他学科的交叉发展,热原的检测法会越来越完善,越来越准确。

#### 参考文献:

[1] 徐文瑜,任珺,杜颖,等. 家兔性别与体温变化对热原检查结果的影响[J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(3): 26-29

- [2] 沈娟,武向锋,王文俊,等. 家兔细菌内毒素致热的灵敏度变化研究[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(5): 441-443
- [3] 项庆军,李策生,胡勇,等. 不同基础体温的家兔对热原检查结果的影响[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37(4): 28-31
- [4] 吴清洪,陈丽,那顺巴亚尔,等. SPF级新西兰兔用于热原检查的试验探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 174-176
- [5] 杜颖,徐文瑜,任珺,等. 热原检查用家兔正常体温的统计分析[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(1): 17-19
- [6] 谢东,杨戒骄. 注射用头孢西丁钠细菌内毒素检查法与热原检查法的比较[J]. 暨南大学学报, 2009, 30(2): 207-209
- [7] 张义伟. 细菌内毒素检查的几点体会[J]. 中国实用医药, 2010, 5(3): 86-87
- [8] WANG G Y, TANG JK, PAN Z X. Study on Bacterial Endotoxins Test of Disodium Cantharidin and Vitamin in B6 Injection [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志), 2009, 29(11): 1950-1952
- [9] CHEN H. Bacterial Endotoxin Test in Diammonium Glycylglycinate Injection [J]. Pharmaceutical and Clinical Research (药学与临床研究), 2007, 15(6): 506-508
- [10] 童郁. 内毒素检测研究进展 [Z]. 浙江省医学会医学微生物与免疫学及医学病毒学学术年会.
- [11] Tang N, Zhang D, Sun W X. Application of the Bacterial Endotoxin Test for Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Injection [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医国药), 2009, 20(10): 2629-2630
- [12] 焦炳华,余庆. 内毒素的结构及其与功能的关系 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1987, 9(4): 168-170
- [13] 杨忠思,吴振军,杜滨. 热原和细菌内毒素检查研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(2): 142-144
- [14] 郭萌,李冠民,黄清泉. 细菌内毒素研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 397-401
- [15] 于婷,蔡彤,张国来,等. 细菌内毒素国家标准品原料的制备及其理化性质和生物学活性的分析 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(5): 388-391
- [16] Jiang Ly, Tang Q, Du X, et al. Investigation of Testing Method for Bacterial Endotoxins in Myaphenolate Injection [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志), 2008, 28(3): 490-493
- [17] Shi JY. Study on Bacterial Endotoxin Test Establishment and Methodology of Acetaminophen Injection [J]. Strait Pharmaceutical Journal (海峡药学), 2009, 21(10): 35-37
- [18] Zhao W j, Gao J, Ji Y. Application of Bacterial Endotoxin Test to Suxamethonium Chloride Injection [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army (解放军药学学报), 2008, 24(2): 181-182
- [19] 黄清泉,刘文英,丁黎,等. 体外人全血热原检测方法的研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(5): 372-374
- [20] 何开勇,高华,季晖. 新的体外热原试验方法研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 777-781
- [21] 贺庆,高华. 新的热原检测方法-细胞法介绍 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 494-497