

对活性炭（供注射用）吸附液体中细菌内毒素能力的研究

林金海 陈晓佳 丁友玲*

(福州新北生化工业有限公司 福州 350101)

摘要 在生产注射剂的原辅材料和工艺中常会混入细菌内毒素，除去注射剂中的细菌内毒素十分重要。本文对活性炭（供注射用）吸附细菌内毒素的能力进行了研究，结果表明活性炭（供注射用）可吸附液体中一定量的细菌内毒素，使 200 和 20 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液内的细菌内毒素含量均下降 2 个数量级（吸附率达 99%）。因此，使用活性炭（供注射用）吸附细菌内毒素在注射剂生产中有一定的应用意义和价值。

关键词 细菌内毒素 活性炭（供注射用）吸附力

中图分类号：R951; TQ460.64

文献标志码：A

文章编号：1006-1533(2018)21-0012-04

Study on the capacity of adsorption of bacterial endotoxin in liquid by activated charcoal (for injection)

LIN Jinhai, CHEN Xiaojia, DING Youling*

(Fuzhou Xinbei Biochemical Industrial Co., Ltd., Fuzhou 350101, China)

ABSTRACT Bacterial endotoxin is often mixed in the raw materials and in the process for the production of injectable drugs. It is crucial to eliminate the bacterial endotoxin in the injectable drugs. The capacity of adsorption of bacterial endotoxin by activated charcoal (for injection) in liquid was studied. The result showed that certain amount of bacterial endotoxin in liquid could be adsorbed by activated charcoal (for injection) and the contents of bacterial endotoxin in standard solution containing 200 and 20 EU/ml bacterial endotoxin could be decreased by two orders of magnitude (the adsorption rate reached 99%). Therefore, the adsorption of bacterial endotoxin by activated charcoal (for injection) possesses application significance and value in the production of injectable drugs.

KEY WORDS bacterial endotoxin; activated charcoal (for injection); adsorption capacity

活性炭（供注射用）无臭、无味、无砂性，具有纯度高、过滤速度快等特性，具有优良的脱色、净化、纯化等性能。本研究根据 2015 年版中国药典四部药用辅料中“活性炭（供注射用）”的要求，对活性炭吸附液体中细菌内毒素的能力进行评价。活性炭（供注射用）所含细菌内毒素的本底值 < 2 EU/g，其能吸附液体中一定量的细菌内毒素，吸附率达 99%，在注射剂生产中具有一定的应用意义和价值。

1 材料和仪器

1.1 材料和试剂

活性炭（供注射用）（福建元力活性炭股份有限公司）；

*通信作者：丁友玲，高级工程师，主要从事细菌内毒素检测等临床诊断试剂的研究。E-mail: xb838888@163.com

鲎试剂 [福州新北生化工业有限公司，批号 17030412，0.1 ml/支，灵敏度 (λ) = 0.03 EU/ml；批号 17042312，0.1 ml/支， λ = 0.06 EU/ml；批号 17031612，0.1 ml/支， λ = 0.25 EU/ml]；细菌内毒素国家标准品（中国食品药品检定研究院，批号 150800-201601，10 支/盒，9 000 EU/支）；细菌内毒素检查用水（福州新北生化工业有限公司，批号 17032021，100 ml/瓶）。

1.2 仪器

DK-600 型电热恒温水槽（上海精宏实验设备有限公司）；XW-80A 旋涡混合器（上海精科实业有限公司）；800 型离心机（上海手术器械厂）；SLGU033RB 针头式过滤器（默克密理博有限公司，批号 R5PA67055，聚偏氟乙烯滤膜规格 0.22 μ m）；一次性医用注射器（江苏康友医用器械有限公司）。其他如定量刻度移液管、试管等均按规定清洗、烘干并于 250 $^{\circ}$ C 下干烤 1 h，以除去热原。

2 方法与结果

2.1 预备实验

2.1.1 鲎试剂 λ 考察

按照 2015 年版中国药典四部通则 1 143 “细菌内毒素检查法”^[1], 取鲎试剂并分别用 0.1 ml 的细菌内毒素检查用水复溶, 然后将各批复溶的鲎试剂分为 4 列, 每列 4 支, 再在各列中分别加入相应的 2 λ 、1 λ 、0.5 λ 和

0.25 λ 的细菌内毒素国家标准品溶液, 于 (37±1) °C 水浴中恒温处理 (60±2) min 后取出观察结果。另用细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照品。记录结果, 按式实测灵敏度 (λc) = antilg ($\Sigma X/4$) 计算 λc , 结果见表 1。

由表 1 可知, 3 个批号鲎试剂的 λc 均符合在 0.5 λ ~ 2 λ 范围内的要求, 均可用于细菌内毒素检查, 并以标示的 λ 使用。

表1 鲎试剂 λ 复核结果^{a)}/(EU·ml⁻¹)

鲎试剂 批号	λ	外加细菌内毒素浓度							阴性 对照品	λc
		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075		
17031612	0.25	++++	++++	-----	-----				---	0.25
17042312	0.06			++++	++++	-----	-----		---	0.06
17030412	0.03				++++	++++	-----	-----	---	0.03

注: a) 表中“+”表示形成凝胶且倒置时凝胶不变形, “-”表示未形成凝胶或虽形成凝胶、但倒置时凝胶变形

2.1.2 活性炭 (供注射用) 预处理

活性炭使用前通常需进行必要的预处理, 以确保或提高其效用。对活性炭 (供注射用), 使用前可于 100 ~ 105 °C 下干燥 5 h, 然后移置干燥器中放冷 30 min, 以提高其除热原能力。

2.1.3 活性炭溶液干扰实验

精确称取 75.0 mg 已预处理过的活性炭 (供注射用)

至试管中, 加入 5 ml 细菌内毒素检查用水, 铝箔纸封口后置旋涡混合器上混合 9 min, 然后于 1 500 r/min 下离心 5 min, 用一次性医用注射器吸取上清液, 并选用 0.22 μ m 的无热原滤膜过滤上清液, 得浓度 (C) = 0.015 g/ml 的活性炭溶液^[2]。按 2015 年版中国药典四部通则 1 143 “细菌内毒素检查法”中“干扰实验”项所述, 使用鲎试剂 (λ = 0.03、0.06 和 0.25 EU/ml) 对 C = 0.015 g/ml 的活性炭溶液进行干扰实验, 结果见表 2。

表2 活性炭溶液干扰实验结果^{a)}/(EU·ml⁻¹)

鲎试剂	样品	外加细菌内毒素浓度				阴性 对照品	Es	Et
		2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ			
λ = 0.25 EU/ml	细菌内毒素检查用水	++	++	--	--	---	0.25	
	活性炭溶液 (C = 0.015 g/ml)	++++	++++	-----	-----	---		0.25
λ = 0.06 EU/ml	细菌内毒素检查用水	++	++	--	--	---	0.06	
	活性炭溶液 (C = 0.015 g/ml)	++++	++++	-----	-----	---		0.06
λ = 0.03 EU/ml	细菌内毒素检查用水	++	++	--	--	---	0.03	
	活性炭溶液 (C = 0.015 g/ml)	++++	++++	-----	-----	---		0.03

注: a) 表中 Es 为含细菌内毒素标准品的细菌内毒素检查用水反应终点浓度的几何平均值, Et 为含细菌内毒素标准品的活性炭溶液反应终点浓度的几何平均值; “+”表示形成凝胶且倒置时凝胶不变形, “-”表示未形成凝胶或虽形成凝胶、但倒置时凝胶变形

由表 2 可知, 干扰实验的 Es/Et 均在 0.5 ~ 2.0 范围内, 表明 C = 0.015 g/ml 的活性炭溶液对鲎试剂 (λ = 0.03、

0.06 和 0.25 EU/ml) 无干扰作用。

· 专家论坛 ·

2.2 活性炭（供注射用）所含细菌内毒素本底值（活性炭溶液细菌内毒素）检查

$C = 0.015 \text{ g/ml}$ 的活性炭溶液的细菌内毒素含量应 $< 2 \text{ EU/g}$ ，即限值为 $2 \text{ EU/g}^{[2]}$ 。选用 $\lambda = 0.03 \text{ EU/ml}$ 的鲎试剂检查时，最大有效稀释倍数 = $C \times \text{限值} / \lambda = 1$ 。按 2015 年版中国药典四部通则 1 143 “细菌内毒素检查法”进行实验，结果见表 3。

表3 活性炭溶液细菌内毒素检查结果^{a)}

鲎试剂	活性炭溶液	PPC	NPC	PC	NC
$\lambda = 0.03 \text{ EU/ml}$	$C = 0.015 \text{ g/ml}$	++	--	++	--

注：a) 表中 PPC 为阳性对照供试品（含 2λ 细菌内毒素标准的活性炭溶液），NPC 为阴性对照供试品（活性炭溶液），PC 为阳性对照品（含 2λ 细菌内毒素标准的细菌内毒素检查用水），NC 为阴性对照品（细菌内毒素检查用水）；“+”表示形成凝胶且倒置时凝胶不变形，“-”表示未形成凝胶或虽形成凝胶、但倒置时凝胶变形

由表 3 可知，阳性对照品和阳性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阳性，阴性对照品和阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，判定实验有效。鉴于阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，表明细菌内毒素含量 $< 0.03 \text{ EU/ml}$ ，即活性炭（供注射用）中的细菌内毒素含量 $< 2 \text{ EU/g}$ ，符合 2015 年版中国药典四部药用辅料“活性炭（供注射用）”中对其所含细菌内毒素本底值的要求。

2.3 活性炭（供注射用）吸附细菌内毒素能力的测定实验

2.3.1 供试品溶液 I、II 的制备

取 $9\ 000 \text{ EU/支}$ 的细菌内毒素国家标准品 1 支，分别制备 200 和 20 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液。精确称取 2 份 75.0 mg 已预处理过的活性炭（供注射用）并分置 2 支试管中，然后分别加入 5 ml 的 200 EU/ml 和 5 ml 的 20 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液，配制成活性炭浓度为 0.015 g/ml 的混合液，旋涡混合 9 min 后于 $1\ 500 \text{ r/min}$ 下离心处理 5 min ，取上清液，用 $0.22 \mu\text{m}$ 的无热原滤膜过滤上清液，得供试品溶液 I、II^[2]。

2.3.2 供试品溶液 I 的细菌内毒素检查

对供试品溶液 I，选用 $\lambda = 0.25 \text{ EU/ml}$ 的鲎试剂检查细菌内毒素，最大有效稀释倍数 = $C \times \text{限值} / \lambda = 8$ 。

按 2015 年版中国药典四部通则 1 143 “细菌内毒素检查法”进行实验，结果见表 4。

表4 供试品溶液 I 的细菌内毒素检查结果^{a)}

鲎试剂	供试品活 外加细菌内		PPC	NPC	PC	NC
	性炭浓度 /	毒素浓度 /				
	($\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$)				
$\lambda = 0.25 \text{ EU/ml}$	0.015	200	++	--	++	--

注：a) 表中 PPC 为阳性对照供试品（含 2λ 细菌内毒素标准的活性炭溶液），NPC 为阴性对照供试品（活性炭溶液），PC 为阳性对照品（含 2λ 细菌内毒素标准的细菌内毒素检查用水），NC 为阴性对照品（细菌内毒素检查用水）；“+”表示形成凝胶且倒置时凝胶不变形，“-”表示未形成凝胶或虽形成凝胶、但倒置时凝胶变形

由表 4 可知，阳性对照品和阳性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阳性，阴性对照品和阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，判定实验有效。鉴于阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，表明浓度为 200 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液内的细菌内毒素含量下降了 2 个数量级（吸附率达 99% ），符合 2015 年版中国药典四部药用辅料“活性炭（供注射用）”中对其细菌内毒素吸附力的要求。

2.3.3 供试品溶液 II 的细菌内毒素检查

对供试品溶液 II，选用 $\lambda = 0.06 \text{ EU/ml}$ 的鲎试剂检查细菌内毒素，最大有效稀释倍数 = $C \times \text{限值} / \lambda = 3.2$ 。将供试品溶液 II 稀释 3 倍，按 2015 年版中国药典四部通则 1 143 “细菌内毒素检查法”进行实验，结果见表 5。

表5 供试品溶液 II 的细菌内毒素检查结果^{a)}

鲎试剂	供试品活 外加细菌内		PPC	NPC	PC	NC
	性炭浓度 /	毒素浓度 /				
	($\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{EU}\cdot\text{ml}^{-1}$)				
$\lambda = 0.06 \text{ EU/ml}$	0.015	20	++	--	++	--

注：表中 PPC 为阳性对照供试品（含 2λ 细菌内毒素标准的活性炭溶液），NPC 为阴性对照供试品（活性炭溶液），PC 为阳性对照品（含 2λ 细菌内毒素标准的细菌内毒素检查用水），NC 为阴性对照品（细菌内毒素检查用水）；“+”表示形成凝胶且倒置时凝胶不变形，“-”表示未形成凝胶或虽形成凝胶、但倒置时凝胶变形

由表 5 可知，阳性对照品和阳性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阳性，阴性对照品和阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，判定实验有效。鉴

于阴性对照供试品的细菌内毒素检查结果均为阴性，表明浓度为 20 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液内的细菌内毒素含量下降了 2 个数量级（吸附率达 99%），符合 2015 年版中国药典四部药用辅料“活性炭（供注射用）”中对其细菌内毒素吸附力的要求。

3 结语

本研究对活性炭（供注射用）吸附细菌内毒素的能力进行了评价，结果表明活性炭（供注射用）对鲎试剂无干扰作用，且其能吸附细菌内毒素，使浓度为 200 和 20 EU/ml 的细菌内毒素标准溶液内的细菌内毒素含量均下降 2 个数量级（吸附率达 99%），符合 2015 年版中国药典四部药用辅料“活性炭（供注射用）”中对其细菌内

毒素吸附力的要求。使用活性炭（供注射用）吸附细菌内毒素在注射剂生产中有一定的应用意义和价值。当然，在注射剂生产中应尽量不使用活性炭（供注射用），以防活性炭（供注射用）本身及其中的残留物影响注射剂的质量。但若注射剂中的细菌内毒素难以用其他方法除去时，使用活性炭（供注射用）吸附可能是一个选项。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 通则 1143 细菌内毒素检查法 [M]// 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 154-157.
- [2] 国家药典委员会. 药用辅料活性炭（供注射用）[M]// 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 541-542.

(收稿日期: 2018-05-04)

(上接第2页)

2000 年后，《中国药典》不断扩大鲎试剂检测药品的应用范围，但是许多药品中常常含有对鲎试剂干扰的物质。为了克服鲎试剂的旁路反应对多糖敏感容易产生假阳性的问题，2004 年新北经过刻苦攻关又成功研发了只对细菌内毒素敏感的 P 型抗干扰鲎试剂。

随着国内滥用抗生素状态的严重，以及免疫性缺陷疾病和脏器移植的患者数量增多，临床上急需特异性较强的细菌内毒素检测和真菌多糖检测的试剂盒。当时国内许多厂家急于将鲎试剂制备成试剂盒应用于临床，多使用原来第二代的比浊定量法鲎试剂配备试剂盒。但人血清中由于有许多蛋白或凝血因子，它们均会对鲎试验反应有干扰，而且病人的血清常伴有浊度或溶血，这些都会影响鲎试剂比浊定量法的判定。

丁友玲在日本留学时，师从国际研究鲎试剂顶级专家——日本九州大学岩永贞昭教授，他是第四代终点显色基质法的发明者。为了将最先进的研发成果转化为产品，丁友玲又一次站在攻关的风口浪尖上，她带领新北

研发团队并建立国家级院士工作站。她结合日本留学时学习的先进技术和中国的国情研发新产品，经过夜以继日的攻关，2006 年在国内研发成功了第四代终点显色法鲎试剂。同时为了生产出临床上符合率高、重现性好的试剂盒，必须对血清处理方法进行改进。又经过几年的研发，新北确立了（多）碱试剂法的血清处理方法，配套终点显色基质法将鲎试剂成功应用于临床。经过对照实验证明，这种试剂临床符合率和重现性都优于浊度法试剂盒，并克服了浊度法试剂盒经常在临床检测中出现假阳性的缺点。新北 2015 年获得了细菌内毒素检测试剂盒（终点显色法）和（1,3）-β-D- 葡聚糖检测试剂盒（终点显色法）的注册证，填补了国内空白。

如今，新北已从当年的幼苗成长为大树。公司产品被销往全国各地，占有全国三分之一鲎试剂市场份额；公司研发的各种鲎试剂产品获得多项国家专利和国家及省市级学术奖励。新北正在不断提升产品质量、改进产品包装，即将进军国际主流市场。

(收稿日期: 2018-09-28)

(上接第11页)

- and kinetics of its coagulation by endotoxin [J]. *Thromb Diath Haemorrh*, 1968, 19(1): 186-197.
- [13] Sekine S, Imaizumi H, Masumoto K, *et al.* Usefulness of endotoxin activity assay for early diagnosis of sepsis [J/OL]. *Crit Care*, 2015, 19(Suppl 1): P49 [2018-04-13]. doi: 10.1186/cc14129.
 - [14] 蒋庆军. 内毒素检测在内毒素血症中的应用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(33): 5229-5232.
 - [15] Kang M, Tsunoda M, Saito M, *et al.* Early diagnosis of sepsis

due to Gram-negative infection with the endotoxin activity assay [J/OL]. *Crit Care*, 2014, 18(Suppl 2): P74 [2018-04-13]. doi: 10.1186/cc14077.

- [16] 国家药典委员会. 通则 1143 细菌内毒素检查法 [M]// 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 155-156.
- [17] 焦炳华, 余庆. 内毒素的化学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.

(收稿日期: 2018-07-09)