

试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2006年第1期(总第15期) 2006年3月28日

目 录

启动动态鲎试验系统	1
青霉素钠质量分析	4
使用不同波长作动态比浊法细菌内毒素检测的比较	6
细菌内毒素实验常见问题解答(一)	9
干热条件与内毒素灭活关系的研究	11
内毒素指示剂	14
血液保养液细菌内毒素检查辅剂—稀释剂(Ⅲ)	16

启动动态鲎实验系统

James F. Cooper^[1] and Foster T. Jordan^[2]

为了改进鲎实验数据的管理,制药和医疗器械行业继续从凝胶法鲎实验转向动态法鲎实验。然而,很多 BET 实验室在作出开展动态鲎实验这一重要决定上尚未准备好。而充分的准备是确保动态鲎实验的开展达到预期目标所必需的。本文对鲎实验程序定稿前应作的选择进行讨论并提出建议。如果一开始就作出明智的选择,则更能保证动态鲎实验体系按要求进行且顺利启动。

表 1 动态鲎实验执行要点

检测灵敏度	稳健性
范围	成本
速度	试剂

表 1 列出在开始动态鲎实验前需提及的六大要点。大多数要点是相互关联的,且必须作为整体来考虑。按照优先级别将它们排列出来有助于获得更好的整体观点。在准备选择试剂前应先考虑其它 5 大要点,即灵敏度、范围、速

[1] James F. Cooper (詹姆斯·库珀), 把 BET 法应用于药品检查的创始人, 美国研究 BET 应用的著名学者, 现任美国 ENDOSAFE 公司的全球科技顾问。

[2] Foster T. Jordan (福斯特·乔丹), 美国 ENDOSAFE 公司总经理, 美国 BET 著名学者。

度、稳健性及成本。

灵敏度

BET的灵敏度由两个因素决定。对于浸出液和医疗器械抽提液来说,标准曲线的最低点(动态萤实验的 λ)和稀释液的量决定其灵敏度。对于内毒素限值以EU/mg来表示的产品来说, λ 的选择和原料的检测浓度决定灵敏度。对于这类产品,产品特定灵敏度(PSS)的计算公式可以很方便的用来计算BET的灵敏度,

$$PSS = \lambda(\text{EU/ml}) / \text{检测浓度}(\text{mg/ml})$$

用当前凝胶法实验的检测浓度代入上面的公式可用来确定一特定的 λ 是否提供足够的灵敏度,即用新的 λ 除以经验证(凝胶法)的检测浓度。不要采用过度保守的内毒素限值,因为这需要更高的灵敏度。也不可以任意增加到最大的限度,有一个实际存在的原因迫使我们顾及脊柱内给药,如令人烦恼的抑制问题或修订的检测。灵敏度越高,获得无效实验结果和假阳性的风险越大。任意提高灵敏度不利于良好的BET实验管理。如需要高灵敏度($<0.01\text{EU/ml}$)则选择显色萤试剂较好,因为它有更好的信噪比,这能够将假阳性的发生减至最少。

标准曲线范围

十年前,用于酶标仪的动态萤试剂被推广时鼓励萤试剂用户采用5个点的宽范围标准曲线,即包括一个50-0.005EU/ml的4-log范围。但我们一直都知道,这个范围不是BET实验室需要的最佳范围。早期在使用动态法时经常得到无效实验结果,通常典型的结果是增强,PPC的回收超出允许范围。其主要原因是使用了宽范围标准曲线,超过了萤试剂的灵敏度和内毒素标准的稳健性。还有,由于浓度为50EU/ml的标准品与萤试剂的反应太快,如果要准备一整块酶标板的加样,实验就会有问题。现在最

富经验的实验室会选择2-3个log范围的标准曲线。

对于只进行一种检测类型的实验室,选择一个标准范围并简化实验方案是有好处的。但是,如果要完成不同种类的实验,明智的做法是考虑为实验选择最好的标准曲线。例如,如果实验中包括水、原材料和产品的检测、重组基因材料内毒素水平的监控及设备验证的支持,那么谨慎的做法是使用两个或两个以上标准曲线范围及最适合这种检测的实验模板。使用更新版本的软件,如Endoscan-V,多个模板的存储和安全性出现问题的可能性比以前小。

速度

对于动态系统,标准曲线最低点的达限时间是检测速度的指标。 λ 和预设OD值、仪器设置都会影响反应速度。预设OD值决定阈值在OD上的改变,该阈值需发出信号来显示阳性反应。如果逆转时间是确定优先级中的主要因素,你需选择一个适中的标准曲线范围及一个低预设OD值来增加实验的次数,而不用购买额外的酶标仪。低预设OD值可能会增加出现假阳性的风险。

稳健性

在BET实验室,稳健性意味着萤实验极少出现无效结果、假阳性及超出指定范围(OOS)的结果。它受3个因素选择的影响,即范围、试剂和回归分析。5-0.05EU/ml的2个log范围的标准曲线是所有标准曲线中最稳健的。动态显色试剂对于 $\lambda \leq 0.01\text{EU/ml}$ 的曲线是有利的,因为其信号更稳健。回归分析的选择对稳健性也有影响。多项式回归可将宽范围标准曲线导致的无效结果减至最少。遗憾的是,这种回归显示不出试剂的好坏,而且在最低浓度时失去效价。这些因素导致背景噪音及酶标板噪音造成假阳

性,从而带来不必要的 OOS 调查。但是,如果用户在进行多项式回归分析前按照严格的线性要求(见下述管理条例部分),测量的内毒素值会更准确。

在验证某产品的鲎实验方法上采取谨慎的做法可影响其稳健性。如果产品首先在接近于干扰水平的浓度或稀释倍数进行验证,那么如前所述,用动态鲎实验方法重新验证实验以便找出一个更合适的、更稳健的检测浓度是非常有意义的。

成本

尽管 KCA 与 KTA 的价格差距缩小了,但 KCA 试剂中显色底物的价格仍然是这两种方法成本上的一个影响因素。对于中等范围的标准曲线,KCA 与 KTA 比较并没有显著的优势,就成本而言,KTA 无疑是最佳选择。对于更宽更灵敏的动态曲线,因为 KCA 的速度和其更稳健的信号,KCA 略显优势。最经济的方法是选择一套能始终如一地运行、稳健的且极少出现无效结果的检测体系。使用良好的技术及高质量的配套产品,Endosafe 的 KTA2 在 $\leq 0.01\text{EU/ml}$ 范围内有良好的表现。

试剂

仔细考虑以上讨论的要素后,才开始选择试剂。如果对于一个 BET 实验室来说,宽范围的标准曲线及高灵敏度是优先考虑的话,KCA 方法将是最佳选择,因为在这种情况下,它有最好的稳健性。同样是为了稳健性的缘故,如果不用考虑成本,应选择 KCA。如果更喜欢用中等范围的标准曲线,而且速度也不成为考虑因素的话,那么应选择 KTA 方法,因为它的成本最低但性能好。

对那些还在努力解决葡聚糖与鲎试剂反应

的问题的 BET 实验室,特异性试剂的选择取决于检测的目的。为了将葡聚糖作为污染物去除,如在过滤器中洗涤,应选择一种能与葡聚糖反应的试剂来确认它的存在,但在检测一种含葡聚糖的产品时,如羟甲基纤维素,要选择一种只与内毒素反应的检测方法。

管理条例要求

统一的动态 BET 要求包括:1)3 个或 3 个以上的标准浓度;2)线性 $|r|$ 为 0.98 或更好;3)阳性对照的回收率为 50% ~ 200%;4)供应商推荐的孵育温度。遗憾的是,这些标准对于动态鲎实验来说只是不充分的最低标准, $|r|$ 的要求太过宽松易于令人误解,因为如果 $|r|$ 低于 0.99,回收率很少能符合标准。对于 2 个 log 的标准曲线,线性应该大于或等于 0.997,对于 3 个 log 的标准曲线(4 个浓度点),线性应该大于或等于 0.995。如果不满足这些条件,就应该寻求优化线性的条件。另外,通过设置一个适当的变异系数,如 $\leq 10\%$,来限定差异是很重要的,这样,两个结果差异极大的孔就可以作为无效值而不是 OOS。表 2 中列出的理想的仪器设置和分析标准能将无效实验结果减至最少。

表 2 动态 BET 方法理想的仪器设置及分析标准

标准曲线范围	2-3 log
λ	$\geq 0.01\text{EU/ml}$
标准间隔	10 倍
预设 OD 值	≥ 0.03 个单位(30m OD)
回归分析	线性
反应时间	< 60 mins
变异系数	$\leq 10\%$

总之,在引入动态鲎实验体系时谨慎选择鲎试剂、仪器设置、动态检测仪及标准曲线范围,是可以保障实验的有效性的。

(熊向党译,刘少燕、冯聚锦审校)

青霉素钠细菌内毒素分析

陈瑜 韦群 冯聚锦(湛江安度斯生物有限公司)

郭贵芳 曹艳玲(哈药集团哈药总厂)

某厂家对青霉素钠产品做细菌内毒素检查(BET)时发现,有几批产品使用不同批号的鲎试剂或不同厂家的鲎试剂检查有不同的结果。该厂家要求我们帮助对这些产品作分析,以判断它们的内毒素含量是否合格。我们对该厂的数批青霉素产品作了如下实验分析。

1. 实验材料

1.1 样品(S):青霉素钠,内毒素限值(L): 0.01EU/100U, 含量:96%,1670U/mg。

样品编号:1#、2#、3#、4#、5#、6#、7#、8#。

1.2 细菌内毒素国家标准品(RSE):981, 9000EU/支,中国生物制品检定所。

1.3 鲎试剂(TAL):

1)批号 0508150、0509060, λ :0.125EU/ml,规格:0.1 ml/支;批号 060217SB(除 G 因子 TAL), λ :0.25EU/ml,规格:0.5 ml/支,均为湛江安度斯生物有限公司(A公司)产品。

2)批号 H450L, λ :0.125EU/ml,规格:5.2ml/瓶,为 CHARLES RIVER Endosafe 公司(B公司)产品。

3)批号 0511020, λ :0.125EU/ml,规格:0.1 ml/支,为另一 TAL 厂家(C公司)产品。

1.4 抗增液(KS):批号 0307250,规格 0.6 ml/支,A公司产品。

1.5 (1-3) β -D 葡聚糖标准品(Glucan):批号 L84562,1mg/ml,B公司产品。

2. 实验方法

以下所有实验均按中国药典 2005 年版细

菌内毒素检查法要求操作。

2.1 实验一:青霉素钠样品对不同 TAL 的反应比较。

2.1.1 TAL 灵敏度复核实验(结果见表一)

表一:

TAL		标准内毒素浓度 (EU/ML)					
批号	厂家	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	NC
0508150	A	++++	++++	-----	-----	-----	---
0509060	A	++++	++++	-----	-----	-----	---
H450L	B	++++	++++	-----	-----	-----	---
0511020	C	++++	++++	-----	-----	-----	---
060217SB	A	++++	++++	-----	-----	-----	---

以上五批 TAL 灵敏度复核的结果均符合 BET 法要求。

2.1.2 样品检查

1)样品检测浓度:取 1.2mg/ml

2)检查结果:(见表二)

表二:

TAL		反应项目	样品编号							
批号	厂家		1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
0508150	A	S	---	+	---	---	---	---	---	---
		PPC	++++	+	+	+	+	+	+	+
0509060	A	S	---	---	---	---	---	---	---	---
		PPC	++++	+	+	+	+	+	+	+
H450L	B	S	---	---	---	---	---	---	---	---
		PPC	++++	+	+	+	+	+	+	+
0511020	C	S	---	+	+	+	+	---	+	---
		PPC	++++	+	+	+	+	+	+	+

2.2 实验二:对实验一检查结果呈阳性的样品(2#、3#)用抗增液(G 因子旁路抑制剂)

复溶 TAL 再检查,进行 β -葡聚糖类物质鉴别。

2.2.1 样品编号:2 #、3 #,检测浓度为 1.25mg/ml

2.2.2 用 BET 水稀释 β -葡聚糖标准品至 0.1mg/ml 浓度

2.2.3 制备 0.25EU/ml 的标准内毒素溶液 ($E_{0.25}$)

2.2.4 检查结果见表三

表三:

TAL		BET 水复溶 TAL				KS 复溶 TAL			
批号	厂家	β 葡聚糖标准	$E_{0.25}$	2 #	3 #	β 葡聚糖标准	$E_{0.25}$	2 #	3 #
0508150	A	++	++	++	--	--	++	++	--
0509060	A	++	++	--	--	--	++	--	--
0511020	C	++	++	++	++	--	++	++	--

2.3 实验三:样品与除 G 因子 TAL 的反应实验。

2.3.1 样品编号:2 #、3 #;检测浓度: 3.12mg/ml、1.56mg/ml

2.3.2 检查结果见表四

表四

TAL 批号	反应项目	样品浓度: 3.12mg/ml		1.56mg/ml	
		2 #	3 #	2 #	3 #
060217SB	S	--	--	--	--
	PPC	++	++	++	++
	NC				--
	PC				++
	β 葡聚糖标准				--

2.4 实验四:样品对 TAL 的反应性与时间的关系。

2.4.1 样品编号:2 #;检测浓度:1.56mg/ml

TAL 批号:0508150

2.4.2 实验方法:

1) 把样品制备成 1.56mg/ml 溶液,室温

(20℃)放置 0.5 小时及 5 小时,然后作 BET。

2) 把样品制备成含 2 λ (0.25EU/ml)标准内毒素的 1.56mg/ml 浓度溶液(PPC),室温(20℃)放置 0.5 小时及 5 小时,然后作 BET。

3) 制备 0.25EU/ml 的标准内毒素溶液 ($E_{0.25}$),室温(20℃)放置 0.5 小时及 5 小时,然后作 BET。

2.4.3 实验结果见表五

表五:

反应项目	放置时间(小时)	反应结果
2 # 样品溶液 (1.56mg/ml)	0.5	++
	5	--
PPC	0.5	++
	5	++
$E_{0.25}$	0.5	++
	5	++

3. 讨论:

3.1 实验一结果表明,青霉素钠样品确实存在着对不同 TAL 反应差异的现象。特别是 2 # 样品,对不同批号以及不同厂家的 TAL 反应有不同的结果。我们强烈关注的是,这类样品中所含的能使鲎试验阳性的物质是内毒素还是非内毒素反应物(TAL-RM)? 为此我们进行了一系列的分析鉴别试验。

3.2 从表三看到,用 BET 水复溶的 TAL 对 β -葡聚糖反应;用 KS 复溶的 TAL 对 β -葡聚糖不反应,也不影响对内毒素($E_{0.25}$)的反应。2 # 样品对用 BET 水或 KS 复溶的 TAL 都反应(阳性),表明 2 # 样品所含的鲎试验反应物不是 β -葡聚糖,可能是内毒素或是其它的 TAL-RM。3 # 样品对用 BET 水复溶的 TAL 反应,对用 KS 复溶的 TAL 不反应(阴性),表明 3 # 样品所含的鲎试验反应物是 β -葡聚糖。

3.3 从表四看到,除 G 因子 TAL 只对内毒素反应,不与 2#、3# 及 β -葡聚糖反应。这表明 2#、3# 样品所含的鲎试验反应物不是内毒素。

3.4 从表五看到,2# 样品溶液的鲎试验反应能力会随放置时间衰减,反应结果由阳性变为阴性,而标准内毒素(PPC 及 $E_{0.25}$)没有这种现象。此实验结果进一步验证了 2# 样品所含的鲎试验反应物不是内毒素。

3.5 我们已知道,普通的鲎试剂有两条凝集反应途径:

途径一:内毒素 \rightarrow C 因子 \rightarrow B 因子 \rightarrow 凝固酶 \rightarrow 凝胶

途径二:非内毒素反应物(TAL-RM) \rightarrow G 因子 \rightarrow 凝固酶 \rightarrow 凝胶

研究已证实(1-3) β -D 和(1-4) β -D 葡聚糖是 TAL-RM,当然还有其它的 TAL-RM。使用安度斯

公司的抗增液(KS)复溶 TAL,能使 TAL 具有抗(1-3) β -D-葡聚糖干扰的能力,极显著地提高 TAL 对内毒素反应的特异性。研究表明大多数的 BET 假阳性是由这种 TAL-RM 引起的。但 KS 对其它的 TAL-RM 无效。因此,只有无 G 因子 TAL 或除 G 因子 TAL 才是真正意义上的 BET 特异性鲎试剂。

另一方面需要指出的是,鲎试剂的差异是一个客观事实。鲎试剂是一种生物试剂,姑且不论鲎试剂的制备技术及制备工艺差异能导致鲎试剂产品的性能或质量差异,仅是鲎试剂原料的差异目前人们就难以消除。鲎试剂的原料都是来自十几只甚至几十只鲎的阿米巴细胞混合液,每只鲎的体质差异就有可能导致最终鲎试剂产品的差异。

使用不同检测波长作动态比浊法 细菌内毒素检测的比较

熊向党 (湛江安度斯生物有限公司)

在中国药典 2005 年版细菌内毒素检查法中,对光度测定法使用的仪器的波长没有作具体要求,欧洲药典、日本药局方及美国药典对此也没有作要求。目前国际上使用的细菌内毒素检测仪一般使用 405nm(蓝紫色光)或 660nm(红色光)波长。因动态显色法鲎实验中生成的 PNA(黄色物质)对 660nm 波长基本不吸收,所以 660nm 不能用于动态显色法鲎实验,只用于动态比浊法鲎实验,405nm 波长对这两种方法都适合。日本 ET-201 型细菌内毒素动态测定仪使用的是 660nm 波长,英国 Lab Kinetics 公司的 ATi

系列动态仪,采用 405nm、660nm 等不同波长,国内生产的细菌内毒素动态测定仪也有 405nm、660nm 等不同波长。使用不同波长的检测仪做内毒素检测,检测结果是否相同呢?本文使用 405nm 及 660nm 波长的仪器,通过对小牛血清及脑蛋白的动态比浊法鲎实验,探讨不同波长细菌内毒素检测的影响。

1. 材料及器具

动态比浊法鲎试剂:批号 0504280,规格 1.25ml/支,检测范围 10 ~ 0.03EU/ml,湛江安度

斯产品。

内毒素工作标准品(CSE):批号 2005-10,规格 100EU/支,中国药品生物制品检定所制备。

细菌内毒素检查用水(BET水):批号 0601190,规格 50ml/瓶,湛江安度斯产品。

小牛血清:批号 0302048,内毒素限值 L = 5EU/ml,某厂家产品。

脑蛋白:批号 051214,内毒素限值 L = 0.5EU/ml,某厂家产品。

ATi-320 型动态试管仪,英国 Lab Kinetics 公司产品

型号: ATi-321-05-001 波长 660nm, ATi-320-05-036 波长 405nm。

2. 实验方法

2.1 小牛血清的动态比浊法试验

2.1.1 内毒素溶液系列(C溶液)的制备

按照药典 BET 法要求,将 CSE 用 BET 水稀释至 2、0.25 及 0.031EU/ml,检测灵敏度 $\lambda = 0.031\text{EU/ml}$ 。

2.1.2 供试品溶液(A溶液)的制备

小牛血清最大有效稀释倍数 $MVD = L/\lambda = 5/0.031 = 160$ (倍),本试验选择样品的 50 倍及 100 倍稀释液做供试品溶液。

用 BET 水将小牛血清稀释至 50、100 倍。

2.1.3 供试品阳性对照溶液(B溶液)的制

取一定量的样品 25 倍稀释液与等量的 0.5EU/ml 内毒素溶液混合,旋涡混合至少 30 秒,制备成样品 50 倍稀释的供试品阳性对照溶液。同样制备 100 倍稀释液的供试品阳性对照溶液。

2.1.4 将 A、B、C 溶液分别与鲎试剂反应,每浓度平行 2 管,BET 水(D溶液)与鲎试剂反应,平行 2 管。在两台不同波长仪器上反应。结果见表 1、2、3、4。

表 1 C、D 溶液反应结果(405nm)

内毒素浓度(EU/ml)	反应时间(S)	平均反应时间(S)
0.031	2184	2200
	2216	
0.25	1018	1005
	992	
2.0	536	538
	540	
0(D溶液)	> 3600	> 3600
	> 3600	

对表 1 的内毒素浓度(C)数据及反应时间(T)数据作回归分析,得标准曲线方程 $LgT = 2.8214 - 0.3385LgC$,其相关系数绝对值 $|r| = 0.9979$ 。

表 2 A、B 溶液反应结果(405nm)

供试品批号	稀释倍数	供试品		供试品阳性对照			
		平均反应时间	内毒素实测值	平均反应时间	添加内毒素浓度	内毒素实测值	回收率(R)
0302048	50	1146.5	9.9879	847.5	0.25	24.2114	113.79%
	100	1491.5	9.2587	907.5	0.25	39.5129	121.02%

表 3 C、D 溶液反应结果(660nm)

内毒素浓度(EU/ml)	反应时间(S)	平均反应时间(S)
0.03125	2542	2487
	2432	
0.25	1095	1083
	1071	
2.0	590	585
	580	
0(D溶液)	> 3600	> 3600
	> 3600	

对表 3 的内毒素浓度(C)数据及反应时间(T)数据作回归分析,得标准曲线方程 $LgT = 2.8564 - 0.3480LgC$,其相关系数的绝对值 $|r| = 0.9963$ 。

表4 A、B溶液反应结果(660nm)

供试品批号	稀释倍数	供试品		供试品阳性对照			
		平均反应时间	内毒素实测值	平均反应时间	添加内毒素浓度	内毒素实测值	回收率(R)
0302048	50	1312	8.9756	942	0.25	23.8282	112.22%
	100	1695.5	9.1449	991.5	0.25	41.4709	122.06%

2.2 脑蛋白的动态比浊法试验

脑蛋白的最大有效稀释倍数 $MVD = L/\lambda = 0.5/0.031 = 8$ (倍),本试验在不超其 MVD 的稀释倍数 4 倍及 8 倍下做检测。

按照实验 2.1 相同的方法制备脑蛋白供试品反应所需的 A、B、C 溶液,与鲎试剂在两台不同波长仪器上反应。结果见表 5、6、7、8。

表5 C、D溶液反应结果(405nm)

内毒素浓度(EU/ml)	反应时间(S)	平均反应时间(S)
0.031	2389	2273.5
	2158	
0.25	1027	1032.5
	1038	
2.0	554	555.5
	557	
0(BET水)	>3600	>3600
	>3600	

对表 5 的内毒素浓度(C)数据及反应时间(T)数据作回归分析,得标准曲线方程 $LgT = 2.8343 - 0.3389LgC$,其相关系数绝对值 $|r| = 0.9976$ 。

表6 A、B溶液反应结果(405nm)

供试品批号	稀释倍数	供试品		供试品阳性对照			
		平均反应时间	内毒素实测值	平均反应时间	添加内毒素浓度	内毒素实测值	回收率(R)
051214	4	1515.5	0.3805	967.5	0.25	1.4329	105.24%
	8	2022.5	0.3246	968.5	0.25	2.8555	126.55%

表7 C、D溶液反应结果(660nm)

内毒素浓度(EU/ml)	反应时间(S)	平均反应时间(S)
0.031	2443	2479
	2515	
0.25	1161	1125.5
	1090	
2.0	578	587
596	>3600	>3600
0(D溶液)	>3600	

对表 7 的内毒素浓度(C)数据及反应时间(T)数据作回归分析,得标准曲线方程 $LgT = 2.8606 - 0.3464LgC$,其相关系数绝对值 $|r| = 0.9977$ 。

表8 A、B溶液反应结果(660nm)

供试品批号	稀释倍数	供试品		供试品阳性对照			
		平均反应时间	内毒素实测值	平均反应时间	添加内毒素浓度	内毒素实测值	回收率(R)
051214	4	1666.5	0.3625	978	0.25	1.6889	132.64%
	8	2106	0.3692	1046.5	0.25	2.7791	120.50%

3. 讨论

3.1. 用不同波长检测小牛血清及脑蛋白的内毒素含量如下表

供试品	稀释倍数	405nm	660nm	RSD%
小牛血清	50	9.9879EU/ml	8.9756EU/ml	7.55%
	100	9.2587EU/ml	9.1449EU/ml	0.87%
脑蛋白	4	0.3805EU/ml	0.3625EU/ml	3.43%
	8	0.3246EU/ml	0.3692EU/ml	9.09%

根据药典 BET 法要求,各供试品的内毒素回收率都在 50% ~ 200% 内,表明对 BET 试验无干扰。不同波长测得小牛血清及脑蛋白内毒素含量相对标准偏差都在 10% 内,考虑到操作误差等因素,说明使用不同波长作这两种样品的

动态比浊法细菌内毒素检测,结果基本一致。

3.2 如果被检测的药品有颜色,在使用不同波长检测时可能会有不同的影响。如检测红色或黄色样品,使用 660nm 波长仪器比使用

405nm 波长仪器更理想,但一般通过样品稀释的方法,使样品趋于透明,也可以消除样品颜色给实验带来的影响。

细菌内毒素检查实验常见问题解答(一)

熊向党

2005 年湛江安度斯生物有限公司在全国多个地区举办了 05 版药典细菌内毒素检查法及新技术学习班。学员在学习过程中提出很多在细菌内毒素检查工作中遇到的问题,其中有与凝胶法相关的,也有与光度测定法相关的。我们将这些问题以问(Q)答(A)的形式刊登,供读者参考。

Q:对实验器皿如何进行除热原处理?

A:1、实验器皿首先要进行清洁处理,除去可能黏附的凝胶蛋白等;2、将初步清洁后的器皿放入专用洗液中浸泡,如在铬酸洗液中浸泡 4 小时或三效热原灭活剂浸泡 2 小时;3、用自来水将浸泡后的器皿冲洗干净;4、用蒸馏水或纯化水冲洗;5、干燥后 250℃干烤至少 1 小时。

Q:对 180℃烤箱,如何验证其除热原效果?

A:180℃烤箱不能达到药典检查法的要求,药典检查法要求对细菌内毒素检查使用的器皿的除热原条件是 250℃干烤至少 1 小时。

使用内毒素指示剂可验证烤箱对内毒素灭活效力(LgRd),美国药典要求 $LgRd \geq 3$,欧洲药典要求 $LgRd \geq 4$ 。具体的验证方法可参阅内毒

素指示剂的使用说明书。

Q:BET 实验对实验环境有什么要求?是否一定要在洁净实验区的超净工作台内进行实验?

A:BET 实验要求在清洁的实验室环境下操作,避免直接的风向对流造成污染;不一定要在洁净实验区的超净工作台内进行实验。当然,实验环境越好,对实验造成污染的可能性越小。用于凝胶法的恒温反应器需放置在温度稳定、无振动的环境中。用于光度法的动态仪需放置在温度稳定、无振动且无强光照射的环境中。

Q:鲎试剂灵敏度复核实验是否一定要做?鲎试剂生产商不能保证鲎试剂灵敏度合格吗?

A:药典检查法要求 BET 实验室在使用新批号的鲎试剂或实验条件发生有可能影响实验结果的改变时,一定要做灵敏度复核实验。鲎试剂灵敏度复核实验的目的有两个:1、验证实验室条件及实验人员的操作技能是否满足 BET 实验的要求;2、验证试验中使用的每一批试剂(鲎试剂、内毒素标准品及检查用水)是否满足 BET 实验的要求。鲎试剂用户在 BET 实验中使用的

器具,包括稀释管、移液管等是否会给 BET 实验带来污染, BET 实验人员对溶液的稀释、制备方法是否正确, BET 实验中使用的鲎试剂、内毒素标准品(特别是鲎试剂与内毒素标准品供应厂商不同时)是否满足实验要求,这些都可以通过鲎试剂灵敏度复核实验来验证。

Q:药典或标准未给出细菌内毒素限值的产品,应如何确定限值?

A:可根据药品的最大用药剂量来计算。检查法中内毒素限值的计算公式, $L = K/M$;其中 L 是指内毒素限值, K 是指按规定的给药途径,人体每公斤体重每小时可接受的最大内毒素剂量, M 是指人体每公斤体重每小时最大用药剂量。如,某静脉注射药品的最大剂量为 $1\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{h}$, 则其内毒素限值 $L = K/M = 5/1 = 5(\text{EU}/\text{mg})$ 。

Q:如果内毒素标准品效价为 180EU/支,复溶时一定要加 1ml 检查用水复溶吗?

A:国内内毒素标准品只标示生物效价,如 180EU/支。在复溶标准品时,可根据需要加入适量的检查用水溶解标准品。如在 180EU/支的内毒素标准品内加入 1ml 检查用水则得到 180EU/ml 浓度的标准内毒素溶液;若加入 0.9ml 检查用水,则得到 200EU/ml 浓度的标准内毒素溶液。正确的方法应按照内毒素标准品说明书的指示使用。

Q:凝胶法鲎试剂复溶时用同一支移液管取检查用水会污染到检查用水吗? 鲎试剂复溶后是否需放到旋涡混合器上混合?

A:在鲎试剂复溶过程中,如果移液管反复的来回接触鲎试剂和检查用水,有可能会将鲎试剂带入到检查用水中,从而“污染”检查用水,对实验结果产生影响。每支凝胶法鲎试剂需要加入的复溶液量很少,一般为 0.1ml。在复溶凝

胶法鲎试剂时,应使用微量移液器连接无热原吸头或无热原毛细管加样,而不用移液管加样。用刻度移液管加样的缺陷主要是加样精确度差。

鲎试剂复溶后不能放到旋涡混合器上去混合,因为强烈混合容易使复溶后的鲎试剂产生泡沫,影响凝胶的形成。实际上只需将鲎试剂复溶后静置 1~2 分钟鲎试剂就可变澄清。

Q:建立新产品的细菌内毒素检查方法时,鲎试剂灵敏度应如何选择? 怎样由兔法转换为细菌内毒素检查法?

A:首先通过干扰初筛实验筛选出产品的无干扰浓度范围,进而通过干扰实验来验证无干扰浓度从而确定鲎试剂的灵敏度(λ)。如,某产品通过干扰初筛实验得到其无干扰浓度范围为 $\text{MVD}_{0.25} \sim \text{MVD}_{0.03}$ ($\text{MVD}_{0.25}$ 表示 λ 为 0.25EU/ml 对应的最大有效稀释倍数),通过干扰实验验证在 $\text{MVD}_{0.25}$ 浓度下无干扰,则选择灵敏度为 0.25EU/ml 的鲎试剂在 $\text{MVD}_{0.25}$ 浓度下做日常检查实验。产品要由兔法转换为 BET 检查法,首先应根据最大剂量计算确定样品的内毒素限值,然后选 3 批产品,按照检查法要求做干扰实验,在验证无干扰的条件下进行细菌内毒素检查。

Q:开启内毒素标准品后需要用手拿着安瓿在旋涡混合器上混合 15 分钟,感到麻烦。等待试验结果需 1 小时,时间太长。有没有更方便快捷的办法?

A:内毒素标准品复溶后需旋涡混合一定时间,可以选择带有圆孔振板的旋涡混合器,将复溶后的内毒素标准品封口后,插入圆孔振板内固定在旋涡混合器上混合,无须用手拿着。也可以用胶布把安瓿固定在混合器上混合。

常规 BET 凝胶法实验反应时间为 1 小时, 若需快速得到检测结果, 可根据需要选择快速检测方法, 如凝胶快速检测试剂的反应时间为 20~25 分钟; 终点比色法的反应时间为 20 分钟左右; 动态比浊法的反应时间为 30~40 分钟。

Q: 供试品阳性对照的制备方法有无具体要求? 是否可以用样品直接复溶标准品的方法制备?

A: 药典 BET 法没有具体要求供试品阳性对照的制备方法。一般采用等比稀释的方法来制备供试品阳性对照溶液, 如制备供试品阳性对照溶液 $S_{10}E_{2\lambda}$ (10 倍稀释的供试品溶液内含有 2λ 浓度的内毒素溶液), 取一定量 S_5 与等量的 $E_{4\lambda}$ 混合, 旋涡混合至少 30 秒即可; 也可以用 S_{10} 复溶效价为 2λ 的内毒素标准品, 旋涡混合一定时间即可。任何制备方法, 只要通过干扰实验

验证其对 BET 实验结果无影响, 都可以采用。

Q: 如果实验结果为合格品, 能否说明它不含干扰物质, 从而不用做干扰实验?

A: 药典 BET 法要求, 在进行新药的内毒素检查试验前, 或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时, 须进行干扰实验。当鲎试剂、供试品的配方、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时, 须重新进行干扰实验。不能因为实验结果为合格品就不做干扰实验。

Q: 供试品来源不变, 但批号不同, 是否需要做干扰实验?

A: 如果供试品的生产配方、生产工艺等都无变化, 仅仅是批号不同, 且其它实验条件(鲎试剂等)都无变化, 无须重新做干扰实验。

干热条件与内毒素灭活关系的研究

韦 群(湛江安度斯生物有限公司)

一、前言:

干热法是目前制药工业广泛采用的对耐热材料的除热原方法。该法不易使其它杂质进入产品, 而且条件易于控制, 是一种简单、有效的灭热原方法。内毒素指示剂是一种用于干热设备验证以及干热过程验证的专用试剂。有不少用户询问: 干热温度、时间怎样设定? 除热原的效果与温度、时间的关系怎样? 是否还可以按九五版药典除热原的条件进行除热原? 不同来源内毒素的指示剂验证效果是否相同? 安瓿包

装的指示剂使用时是否需要开启? 精制内毒素与环境内毒素的灭活条件是否相同? 等等。本文笔者希望通过一系列的实验数据和广大用户对上述问题进行探讨。

二、实验材料:

1. 内毒素指示剂:

- a. 批号 0302120, 用纯脂多糖(LPS)制备, 标示效价 10,000EU/支
- b. 批号 0207160, 用环境内毒素制备, 标示效价 2,500EU/支

2. 鲎试剂(TAL):

a. 批号 0110152, 0.65ml/支, $\lambda = 0.0625\text{EU/ml}$ b. 批号 0206031, 0.1ml/支, $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$

以上试剂均为湛江安度斯生物有限公司产品。

3. 干热烤箱: 101-2 型不锈钢电热鼓风干燥箱, 工作室容积 $550 \times 550 \times 450\text{mm}$, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司产。

三、实验目的:

1. 观察不同的干热温度对内毒素的灭活作用。

2. 观察同一温度不同干热时间对内毒素的灭活作用。

3. 观察不同来源内毒素制备的指示剂对干热的耐受能力。

4. 观察指示剂包装形式对热力穿透的影响。

四、实验设计见下表:

实验编号	干热温度(°C)	干热时间(分钟)						备注
1	250	5	8	10	15	30	60	实验目的 1-3
2	220	30	60	90	120			
3	200	30	60	90	120			
4	180	30	60	90	120			
5	250	5	8	10	15	30	60	实验目的 4

五、内毒素指示剂的效价验证:

1. 未经干热的内毒素指示剂的效价验证要求: 由于内毒素指示剂不含任何稳定剂、赋形剂和分散剂, 干燥的内毒素吸附在玻璃瓶壁上, 即使经过长时间的旋涡混合也难以回收其全部的填充量, 故要求回收的内毒素实测值应不低于 50% 标示值即可。回收率的计算公式如下:

$$\text{回收率} = \frac{\text{可回收的内毒素量}(Re)}{\text{标示量}} \times 100\%$$

2. 未经干热的内毒素指示剂的效价测试: 分别用 1.0mlBET 水复溶指示剂, 按使用要

求作旋涡混合, 然后用 TAL 验证效价。结果见下表。

内毒素指示剂	TAL	稀释倍数(D)	40000	80000	160000	320000	640000
0302120	0110152	内毒素浓度(EU/ml)	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
		反应结果	++	++	++	--	--

可回收的内毒素: $Re = \lambda \times D \times 1.0\text{ml} = 0.0625 \times 160000 \times 1.0 = 10000\text{EU/瓶}$, 回收率为 100%。

内毒素指示剂	TAL	稀释倍数(D)	2500	5000	10000	20000	40000
0207160	0206031	内毒素浓度(EU/ml)	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06
		反应结果	++	++	++	--	--

可回收的内毒素: $Re = \lambda \times D \times 1.0\text{ml} = 0.25 \times 10000 \times 1.0 = 2500\text{EU/瓶}$, 回收率为 100%。

六、干热方法:

烤箱处空载状态, 将烤箱温度按所需温度设定, 开始加热。将内毒素指示剂的包装安瓿从曲颈处折断, 用铝铂封口并做好标记。待温度升至设定温度时(以烤箱顶部的水银温度计为准), 放入内毒素指示剂, 待温度回升(开启烤箱门时温度会有所下降)后开始计时。分别按制定时间进行干热, 每支指示剂干热时间到达即将其取出。

七、实验结果:

实验 1. (干热温度 250°C): 取经干热的指示剂, 开启每支加入 1.0mlBET 水, 旋涡混合 10 分钟, 然后与 TAL 反应, 结果见下表:

内毒素指示剂	TAL 批号	干热时间 (min)					
		稀释倍数 (D)					
0302120 (LPS)	0110152	原液	--	--	--	--	--
		1:10	--	--	--	--	--
		1:160	--	--	--	--	--
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	--	--	--	--
		1:10	--	--	--	--	--

结果分析: 内毒素衰减值 ($LgRd$) 的计算公式为: $LgRd = LgRe - LgRs$, 其中 Re 为干热前可回收的内毒素, Rs 为干热后的内毒素残余量。

$$R_s = \lambda \times D \times 1.0 \text{ml.}$$

①干热时间为 5 分钟时:

a. 批号 0320120 指示剂(LPS)的残余量 $R_s < 0.0625 \times 1 \times 1.0 < 0.0625 \text{EU/瓶}$, 内毒素衰减
 值 $\text{LgRd} > \text{LgRe} - \text{LgRs} > \text{Lg10000} - \text{Lg0.0625} > 5.2$, 即 $\text{LgRd} > 5.2$ 。

b. 批号 0207160 指示剂(环境内毒素)的残余量 $R_{s1} < 0.25 \times 10 \times 1.0 < 2.5 \text{EU/瓶}$, $R_{s2} \geq 0.25 \times 1 \times 1.0 \geq 0.25 \text{EU/瓶}$, 内毒素衰减
 值 $\text{Lg2500} - \text{Lg2.5} < \text{LgRd} \leq \text{Lg2500} - \text{Lg0.25}$, 即 $3 < \text{LgRd} \leq 4$ 。

②干热温度为 250℃时,干热时间 5 分钟以上,对两种来源的内毒素灭活都大于三个数量级。

实验 2.(干热温度 220℃);

内毒素指示剂	TAL 批号	干热时间 (min)				
		稀释倍数 (D)	30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	--	--	--
		1:10	++	--	--	--
		1:160	--	--	--	--
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	--	--

结果分析:

①干热时间为 30 分钟,指示剂 0302120 的残余量为 $R_{s1} < \lambda \times D \times 1.0 < 0.0625 \times 160 \times 1 < 10 \text{EU}$, $R_{s2} \geq 0.0625 \times 10 \times 1 \geq 0.625 \text{EU}$, 内毒素衰减
 值 $\text{Lg10000} - \text{Lg10} < \text{LgRd} \leq \text{Lg10000} - \text{Lg0.625}$, 即 $3 < \text{LgRd} \leq 4.2$ 。

②干热时间为 90 ~ 120 分钟,指示剂 0207160 的残余量为 $R_{s1} < \lambda \times D \times 1.0 < 0.25 \times 10 \times 1.0 < 2.5 \text{EU}$, $R_{s2} \geq 0.25 \times 1 \times 1.0 \geq 0.25 \text{EU}$, 内毒素衰减
 值为: $\text{Lg2500} - \text{Lg2.5} < \text{LgRd} \leq \text{Lg2500} - \text{Lg0.25}$, 即 $3 < \text{LgRd} \leq 4$ 。

③对于纯 LPS,干热温度 220℃,30 分钟以上灭活效力大于三个数量级,如要求四个数量级的灭活效力,干热时间应在 1 小时以上;而对于环境内毒素,在同样温度下要达到大于三个

数量级的灭活效力至少需要 90 分钟。

实验 3.(干热温度 200℃):

内毒素指示剂	TAL 批号	干热时间 (min)				
		稀释倍数 (D)	30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	+-	--
		1:160	++	--	--	--
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++

结果分析:

①对于纯 LPS,200℃干热 60 分钟以上灭活效力才能大于三个数量级;如要求大于四个数量级,干热时间需要 120 分钟。

②对于环境内毒素,200℃干热 120 分钟, $R_s > 0.25 \times 10 \times 1 > 2.5 \text{EU}$, $\text{LgRd} < \text{Lg2500} - \text{Lg2.5} < 3.0$, 即灭活效力小于三具数量级。

实验 4.(干热温度 180℃):

内毒素指示剂	TAL 批号	干热时间 (min)				
		稀释倍数 (D)	30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++
		1:160	++	++	++	++
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++

结果分析:干热温度 180℃,干热时间 120 分钟,对两种来源内毒素的灭活效力均小于三个数量级。

实验 5.(干热温度 250℃):指示剂开启(折断安瓿颈)与不开启对灭活效力的影响。

内毒素指示剂	TAL 批号	干热时间 (min)						状态	
		稀释倍数 (D)	5	8	10	15	30		60
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	--	--	--	--	--	折断安瓿颈
		1:10	--	--	--	--	--	--	
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	+++	+++	+++	+-	--	不开启	
		1:10	--	--	--	--	--		

结果分析:同样的环境内毒素指示剂,开启状态 250℃干热 5 分钟即可达到三个数量级的灭活效力;8 分钟可达到四个数量级灭活效力;而不开启状态至少要干热 30 分钟才能达四个

数量级的灭活效力。

八、讨论：

根据以上实验的结果，可以得出以下结论：

1. 内毒素的灭活作用与温度直接相关，温度越高，灭活效果越好。如在 250℃ 时，干热 5 分钟就可使内毒素衰减 $LgRd$ 大于 3。

2. 灭活效果也与干热时间有关。在适当的温度下，延长干热时间有利于提高灭活效果。如在 220℃ 时，干热 90 分钟也可以达到内毒素衰减 $LgRd$ 大于 3 的效果。但温度过低，即使延长干热时间，灭活效果也不明显。如在 200℃ 时，干热 120 分钟， $LgRd$ 仍小于 3。

3. 不同来源种类的内毒素其灭活效果也不同。环境内毒素抵抗灭活的能力远强于纯脂多

糖(LPS)。通常内毒素指示剂都用纯 LPS 制备的，这是因为指示剂作为一种标准物质产品，其原料应具有可标化性及溯源性。但要注意的是，你的干热设备及干热程序即使通过内毒素指示剂的验证，并不意味着它们对环境内毒素有同样的灭活效果。更高更严格的要求应是使用由环境内毒素制备的内毒素指示剂来作干热设备及干热程序的验证。

4. 内毒素指示剂应在开启状态下进行干热灭活，这样有利于热力穿透，得到更好的灭活效果。

5. 本实验的干热烤箱装载模式为空载状态。如果是有载或满载状态，灭活效果可能会有所变化。

内毒素指示剂

一、背景知识

去除热原有两类方法，一、灭活热原，二、分离热原。后一种方法包括常用的蒸馏、冲洗、超滤、反渗、吸附、层析等方法，这一类方法一般较温和，除了蒸馏和吸附须较高温度外，其它方法一般都在室温或更低的温度下进行。前一类方法则较剧烈，须用酸、碱、氧化剂、烷化剂处理或者 170℃ 以上的干热；干热法在产品中不会引入其它杂质，而且条件易于控制，一般耐热的玻璃包装材料首选干热法除热原，隧道式烘箱使用后干热生产过程可自动化连续进行。

干热可以同时除菌除热原，内毒素比细菌芽孢更加耐热，以内毒素的衰减来评价灭菌效

果是完全有保证的；不同来源的革兰阴性菌内毒素在干热条件下失活的动力学行为也很相近，这样可以方便地建立一个验证用内毒素指示剂；干热除热原的效果与温度直接相关，在不低于 170℃ 条件下，内毒素即可被较大程度地破坏，短时间的干热一般使用 200℃ 以上的高温，248℃ 8 分钟、220℃ 21 分钟、210℃ 42 分钟即可实现内毒素灭活 1000 倍；美国药典已推荐在干热程序中使用内毒素指示剂评价干热的有效性，内毒素指示剂中可回收的内毒素与干热后残余内毒素应至少相差三个数量级，干热过程才有效。

二、内毒素指示剂

内毒素指示剂是干燥在玻璃瓶中的一定量的内毒素,一般每瓶为 2,000 ~ 100,000EU,不含任何稳定剂和赋形剂;由于内毒素的固体内容物很少,所以指示剂看上去象个空瓶。干燥的内毒素吸附在玻璃壁上,由于没有含内毒素分散剂,指示剂溶解后须较长时间的旋涡混合,即使如此内毒素也较难恢复其全部的填充量,指示剂中内毒素量的实测值只是可回收的内毒素量,回收率 = [(可回收的内毒素 / (标示量)) × 100%,回收率不应低于 50%。有报道,使用低浓度吐温溶液溶解指示剂可以显著提高回收率,但应注意干热后检测残余内毒素时也应使用同一吐温溶液溶解指示剂。

内毒素指示剂用于烘箱验证时应合理布置于烘箱内,隧道式烘箱应在模拟正常生产条件下分别在生产的前、中、后各阶段加入指示剂验证,若在生产过程中采取随机检查的方法,指示剂应与产品有效隔离,且应有明显标识。干热后指示剂中的内毒素为残余内毒素,设内毒素衰减为 Rd,残余内毒素为 Rs,回收的内毒素为 Re;

$$\lg R_d = \lg R_e - \lg R_s,$$

按美国药典 $\lg R_d \geq 3$ 干热程序有效。

三、内毒素指示剂使用说明(例)

1、成分:

从大肠杆菌 O55:B₅ 提取的细菌内毒素。

2、效价:

见每批号产品所附的效价测定报告书。

3、用途:

用于干热灭活内毒素程序验证,最高可以验证干热设备对内毒素一百万倍($\lg R_d = 6$)的灭活效力。美国药典规定 $\lg R_d \geq 3$,欧洲药典规定 $\lg R_d \geq 4$ 。

4、使用方法:

除去内毒素指示剂的标签,开启(折断安瓿颈),用铝箔封闭瓶口,将内毒素指示剂置于干热设备内,经过一个干热程序后,取出内毒素指示剂测定其残余内毒素量(R_s)。

5、分析准备:

取经干热后的内毒素指示剂和未经干热的指示剂分别加 1.0ml 细菌内毒素检查用水,置于旋涡混合器上旋涡混合 10 分钟,然后进行梯度稀释,每往下一梯度稀释前被稀释液应旋涡混合 30 ~ 60 秒。待测样品溶液制备好后,应立即进行细菌内毒素检查,测定残余内毒素量(R_s)和未经干热的内毒素指示剂的可回收内毒素量(R_c)。

6、分析方法:

A:凝胶法限量检查:

取指定批号的鲎试剂,其标示灵敏度为 0.25EU/ml;将未干热的指示剂溶液梯度稀释至 0.5EU/ml,用作阳性对照;将干热后的指示剂溶液按未干热前的效价梯度稀释至 250EU/ml 作为样品;按细菌内毒素检查法的规定进行检查,阳性对照为阳性,样品检查为阴性,则表明干热程序已达到 1,000 倍的灭活内毒素效力($\lg R_d > 3$);检查出现任何其它结果均无效。若要求更高的灭活效力验证可适当减少已干热的指示剂溶液的稀释倍数。如要求 $\lg R_d > 4$,则需将干热后的指示剂溶液按未干热前的效价梯度稀释至 2500EU/ml 浓度,作为样品检查。

B:凝胶法半定量检查

将未经干热的内毒素指示剂溶液 10 倍梯度稀释到接近所选用的鲎试剂灵敏度(λ),再 2 倍梯度稀释成 $4\lambda, 2\lambda, \lambda, 0.5\lambda, 0.25\lambda$ 的内毒素系列溶液,然后进行内毒素半定量检查,根据反应终点的稀释倍数计算未经干热内毒素指示剂的可回收内毒素量;将经干热后的内毒素指示剂溶液 2 倍梯度稀释至能使半定量检查中出现阴性

结果的内毒素浓度系列,进行内毒素半定量检查,根据反应终点稀释倍数计算残余内毒素量。

例如:鲎试剂标示灵敏度 $\lambda = 0.25 \text{ EU/ml}$

未经干热的内毒素稀释系列:

稀释倍数(D): 25,00 5,000 10,000 20,000
40,000
内毒素浓度(EU/ml): 1.0 0.5 0.25 0.125
0.06

反应结果: ++ ++ ++ -- --

可回收内毒素: $R_c = \lambda \cdot D \cdot 1.0 \text{ ml} = 0.25 \times 10,000 \times 1.0 = 2,500 \text{ EU/瓶}$

经干热的残余内毒素稀释系列:

稀释倍数(D): 1 10

反应结果: -- --

D=1时,残余内毒素: $R_s = \lambda \cdot D \cdot 1.0 \text{ ml} < 0.25 \times 1 \times 1.0 < 0.25 \text{ EU/瓶}$

内毒素衰减: $\lg R_d = \lg R_c - \lg R_s > \lg 2500 - \lg 0.25 > 4.0$

D=10时,残余内毒: $R_s = \lambda \cdot D \cdot 1.0 \text{ ml} < 0.25 \times 10 \times 1.0 < 2.5 \text{ EU/瓶}$

内毒素衰减: $\lg R_d = \lg R_c - \lg R_s > \lg 2500 - \lg 2.5 > 3.0$
该干热程序有效。

C:定量分析法:

动态浊度、动态显色法都可以使用,标准曲线内毒素梯度作二个数量级即可,一般在 $5 \sim 0.05 \text{ EU/ml}$ 范围,未经干热内毒素溶液稀释到 0.5 EU/ml 检测,残余内毒素溶液可直接检测或适当稀释再检测,然后根据结果计算 R_c 、 R_s 和 $\lg R_d$ 。

例如: $R_c = 2,500 \text{ EU/瓶}$

$R_s < 0.05 \text{ EU/瓶}$

$\lg R_d > \lg 2,500 - \lg 0.05 > 4.7$

7、注意事项:

本品仅用于人体外实验,严禁以任何方式用于人体。

血液保养液细菌内毒素 检查辅剂——稀释剂(III)

熊向党

一、用途

稀释剂(III)是一种细菌内毒素检查辅助剂,用于消除枸橼酸盐类抗凝剂及血液保养液对细菌内毒素检查的干扰。中国药典的细菌内毒素检查法允许通过适宜的方法排除实验的干扰。

二、原理

血液保养液的抗凝机理是利用枸橼酸盐与

血液中的钙离子结合成可溶而不可电离的枸橼酸钙,使游离状态的钙转变成结合状态的钙而失去其生理功能,血液得以保持不凝状态。鲎试剂与内毒素的顺利反应需维持适宜的二价阳离子浓度。当保养液与鲎试剂混合时,枸橼酸盐会结合鲎试剂里的钙离子,从而影响到鲎试剂的活性。作抗凝剂或血液保养液细菌内毒素检查时,往往需要选择较高灵敏度的鲎试剂,以获得较大的稀释倍数(MVD),降低供试品中枸橼酸盐的浓度来消除对检查的干扰作用。

稀释剂(III)是湛江安度斯生物有限公司研

究开发专门用于血液保养液的细菌内毒素检查辅剂,它能补充鲎试剂中因与样品结合而失去的钙离子浓度,维持鲎试剂的活性。用本稀释剂(III)稀释抗凝剂、血液保养液供试品作细菌内毒素检查,可以使用常用灵敏度的鲎试剂,无需对供试品作较高倍数的稀释,使检查结果更准确可靠。

三、使用方法

以血液保养液 I 为例介绍稀释剂(III)的使用方法。

1. 设样品为 S,国家药品监督管理局的国家药品标准中规定血液保养液 I 的内毒素限值(L)为 5.56EU/ml。

2. 选用 $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$ 的鲎试剂按规定对 S 作干扰试验,判断 S 对细菌内毒素检查是否有干扰。

按照药典检查法的要求,将内毒素标准品稀释至 2λ 、 λ 、 0.5λ 及 0.25λ 的系列浓度,记为 C 溶液。使用稀释剂(III)对 S 作 11 倍稀释(记为 S_{11}),然后再用无热原水将 S_{11} 作 2 倍稀释(记为 S_{22}),记为 A 溶液。取等量的 S_{11} 和一定浓度的内毒素溶液漩涡混合,制备成分别含有 2λ 、 λ 、

0.5λ 及 0.25λ 内毒素浓度的 S_{22} 溶液,记为 B 溶液。分别取 A、B、C 溶液与鲎试剂反应,按照药典检查法要求,观察是否有干扰。如果无干扰,在日常检查时,就可以用稀释剂(III)稀释 S 为 S_{11} ,再用无热原水稀释成 S_{22} ,选用 $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$ 的鲎试剂按规定进行检查。

3. 如果选用 $\lambda = 0.5\text{EU/ml}$ 的鲎试剂,可用稀释剂(III)将 S 稀释为 S_{11} ,对 S_{11} 作干扰实验。其中,供试品的阳性对照溶液采用 0.2ml 浓度为 20λ 的内毒素溶液与 1.8ml 稀释剂(III)稀释的 S_{11} 溶液混合制备。如果无干扰,在日常检查时,按照上述方法制备 S_{11} ,选用 $\lambda = 0.5\text{EU/ml}$ 的鲎试剂按规定进行检查。

四、注意事项:

1. 本品为无菌无热原溶液,仅供体外试验使用,切勿用于人或动物。

2. 每种样品应至少做三个批号的干扰验证试验。如果样品的来源改变或样品的生产工艺改变,应重做干扰验证试验。

3. 本品仅配套本公司鲎试剂使用,切勿将本产品用于其他厂家的鲎试剂产品。

湛江安度斯生物有限公司鲎试剂系列产品目录

产品号	凝胶法鲎试剂		产品号	内毒素指示剂(干热验证)	
T-01	0.1ml/支	10支/盒	F-301	2,500EU/支	10支/盒
T-05	0.5ml/支	10支/盒	F-303	10,000EU/支	10支/盒
T-12	1.2ml/支	8支/盒	临床内毒素检测系列		
T-22A	2.2ml/支	8支/盒	BK-001	人血液内毒素检测盒	10人份/盒
T-22B	2.2ml/瓶	10瓶/盒	实验操作器械		
T-52	5.2ml/瓶	10瓶/盒	S-0101	精密可调移液器	200-1000 μ l
动态浊度法鲎试剂			S-0102	精密可调移液器	50-250 μ l
KT-120	1.2ml/支	8支/盒	S-1001	无热原吸头	250 μ l
KT-220	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-1002	无热原吸头	1000 μ l
动态显色法鲎试剂			S-1003	无热原空安瓿	5ml
CT-220	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-1004	无热原空安瓿	2ml
CT-320	3.2ml/瓶	10瓶/盒	S-1012	无热原空瓶	10ml
内毒素工作标准品			S-0501	无热原玻璃毛细管	0.1ml
E-010	10EU/支	10支/盒	S-0502	无热原玻璃毛细管	0.2ml
E-050	50EU/瓶	10瓶/盒	S-0201	旋涡混合器	XW-80A型
内毒素检查用水			S-0401	试管浮板	10孔
W-002	2.0ml/支	10支/盒	S-0601	干式恒温反应仪 TAL-40C	40孔
W-005	5.0ml/支	10支/盒	S-0602	干式恒温反应仪 TAL-40D	40孔
W-050	50ml/瓶		定量检测系统		
W-100	100ml/瓶		S-0603	ATi 动态试管仪	32孔/单波长
内毒素检测用辅剂			S-0604	ATi 动态试管仪	32孔/双波长
F-101	稀释剂I(阳离子调节剂)	4.0ml/支	S-0605	ATi 动态试管仪	32孔/可换波长
F-102	稀释剂II(PH调节剂)	4.0ml/支	S-0606	ATi 动态试管仪	64孔/单波长
F-103	稀释剂III	4.0ml/支	S-0607	ATi 动态试管仪	96孔/单波长
F-201	抗增液(G因子抑制剂)	0.6ml/支	S-0608	ATi 动态试管仪	128孔/单波长

销售电话:0759-3380671(直线)

0759-3391071、3391072、3380672 转 8989、8899

开户行:中国银行湛江分行霞海支行

帐号:825201410808

ATi/LKL 动态试管仪

世界上第一台用于细菌内毒素定量检查的 LAL-5000 型动态试管仪是由美国 ACC 公司 (Associate of Cape Cod, Inc.) 于上世纪七十年代推出, 该仪器的制造商就是英国莱伯金耐特公司 (Lab Kinetics LTD.)。经过二十多年的发展, 莱伯金耐特公司已成为世界上最大的专业生产细菌内毒素检测仪器的厂商, 其产品遍布世界各地的医药实验室。

ATi 系列及 LKL 系列动态试管仪是莱伯金耐特公司最新一代产品。ATi/LKL 系列动态试管仪充分利用了计算机的能力、现代光电学及现代温控领域的最新技术, 使仪器能够在运行条件下精确控制时间、温度及数据采集等参数, 可获得最大限度的检测精确度, 是目前用于细菌内毒素定量分析的理想工具。

ATi/LKL 系列试管仪与其它厂家的同类产品显著不同之处在于它可提供一系列不同波长检测光源的试管仪给用户选择, 有单波长的、双波长的, 最多达七波长的试管仪, 波长从 300 ~ 700nm 范围可任意选择。如此大幅度的检测光波长选择, 可以对更多种类的样品以及更复杂的样品作细菌内毒素定量测定, 使这一检查方

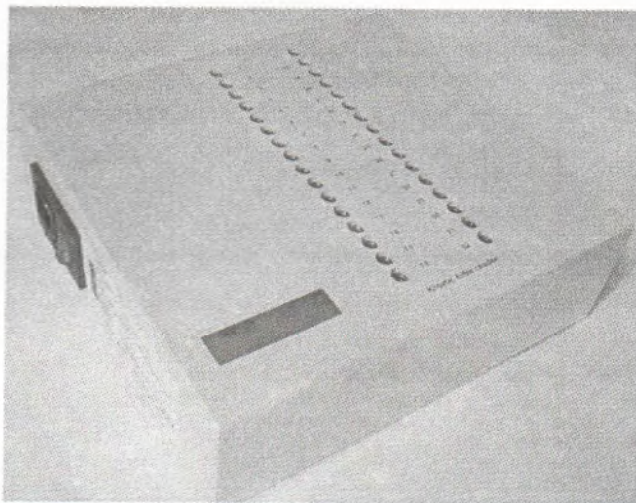
法不仅可以在药品检查上应用, 更扩展到医学临床检查及其它领域应用。

ATi/LKL 系列产品为不同需要的用户提供了极大的选择空间, 它有 32 孔、64 孔、96 孔甚至 128 孔的试管仪, 而且每种规格的产品都可以波长选择。它的每台仪器都可以通过简单的连接与另一台仪器联机工作, 达到扩充试管孔数的目的。

ATi/LKL 系列动态试管仪有许多先进的功能及优越性能, 有兴趣的读者不妨登录英国莱伯金耐特公司公司的网站浏览, 它的网址是: <http://www.labkinetics.com>

一般来说, 国外的高科技产品价格都相当昂贵, 但 ATi/LKL 系列产品的价格只是比国内同类产品略高。如果按其价格性能比计算, 它的价格要远低于国内同类产品价格。

湛江安度斯生物有限公司是英国莱伯金耐特公司产品在中国唯一的代理。湛江安度斯公司为中国的 ATi/LKL 系列动态试管仪用户提供强大的技术支持, 高品质的试剂供应以及良好的售后服务。



TAL-40 型试管恒温仪简介

《中国药典》2002年版细菌内毒素检查法要求:反应试管应“垂直放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 适宜恒温器中,保温 60 ± 2 分钟”。根据这一要求,湛江安度斯生物有限公司研制开发了一种专用于凝胶法细菌内毒素检查的实验设备——TAL-40 型试管恒温仪。与传统使用的恒温水浴箱比较,TAL-40 型试管恒温仪有如下特点:

1、仪器的加热块采用高密度铝合金挤压成型,具有热容量大,热阻小,加热均匀的特点,是精密温控的理想材料。

2、仪器采用最先进的薄膜加热技术及脉冲控温技术,使温度极稳定均匀,温控精度达到 $37 \pm 0.15^\circ\text{C}$,试管孔间温差 $\leq 0.1^\circ\text{C}$ 。传统使用的恒温水浴箱的温控精度只有 $\pm 1^\circ\text{C}$,且温度分布不均匀,靠近发热管位置的水温高,偏离发热管位置的水温低,容易造成鲎试剂反应的差异。

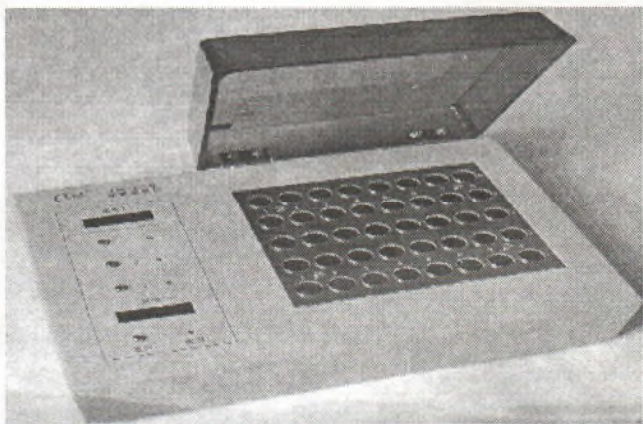
3、仪器设有三档独立的定时装置,用户可在 0~100 分钟内任意调节计时时间;每档定时

装置均可显示定时时间,且有独立的蜂鸣提示音。仪器 40 只试管孔可同时使用一档定时装置,也可以分成最多三组先后不同的时间使用各自的定时装置。

4、仪器装有独特的遮光防尘盖,使用时试管免封口,使实验操作更方便快捷。如果使用传统的恒温水浴箱,试管必须封口,否则水蒸汽或小水珠会进入试管内造成污染,给每支试管一一封口,既麻烦费时又影响实验精度。

5、仪器在出厂前已调校好恒定的温度,用户无需调校仪器温度。每次使用前只需提前 15~20 分钟开启仪器预热,仪器温度在仪器温度显示屏上显示。本仪器属节能产品,最大功率 190W,工作状态能耗小于 15W。

6、每台仪器有 40 只试管孔。D 型仪器适合使用 2ml 安瓿作反应试管;C 型仪器适合使用 $10 \times 75\text{mm}$ 标准反应试管。仪器外型美观,体积小,方便使用。



湛江安度斯生物有限公司
《鲎试剂应用与进展》编辑组

地址:湛江市人民大道中 38 号 邮 编: 524022 电话: (0759) 3391071、3391072 转
网址: <http://www.zacb.com> 电子信箱: Email: ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn