

# 《进展》创刊号

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2015 年第 2 期 (总第 23 期) 2015 年 12 月 18 日

## 目 录

低内毒素回收率的可能机制 .....	2
活性炭(供注射用)的细菌内毒素检查法研究 .....	7
安度斯公司新增业务介绍 .....	13

## 前 言

2015 年 6 月 5 日国家食品药品监督管理总局发布了 2015 年版《中华人民共和国药典》,新版药典于 2015 年 12 月 1 日起正式实施。新版药典在品种收载、检验方法完善、检测限度设定以及质量、安全控制水平上都有了较大提升。新版药典中细菌内毒素检查法部分也作出了较大的改变,例如仲裁方法,凝胶法干扰试验方法及结果判断,凝胶法半定量结果判断等都发生了变化,检测方法逐步与国际接轨。

本期《进展》译文部分提供了知名学者的研究论文,探讨细菌内毒素检查法中低内毒素回收率的可能机制,阐明低内毒素回收率的机制对恰当应用 BET 法至关重要。另外,2015 版《中国药典》四部药用辅料首次要求检测活性炭(供注射用)的细菌内毒素,许多质检人员对此样品的检查方法感到困惑。本期将详细介绍活性炭(供注射用)的细菌内毒素检查法的具体操作及步骤,希望对读者有所启发,起到抛砖引玉的作用。

《进展》编辑组

二〇一五年十二月十八日

# 低内毒素回收率的可能机制

Masakazu Tsuchiya, PhD (Senior Research Scientist Charles River) \*

## 介 绍

低内毒素回收率( LER) 在 2013 年 4 月份由 Dr. Joseph Chen 首次提出。通过一个含有螯合剂和洗涤剂的基质可以观察到内毒素的屏蔽效应, 内毒素效价不能通过稀释或镁离子置换成功回收, 这是克服螯合导致的抑制的常用方法, 低内毒素回收率给我们带来了一些与鲎试剂检测内毒素的适用性相关的问题:

1. 在某种条件下, 内毒素活性可能发生可逆性的改变。因此可能出现隐藏内毒素活性的风险。
2. 鲎试验可能与热原性没有关联。
3. 如果存在低内毒素回收率, 细菌内毒素检查法( BET) 可能低估产品中内毒素的活性。

由于美国食品药品监督管理局推荐使用 FDA 指南中问题 3 的实验数据建立用于细菌内毒素分析的样品的储存和处理程序, 我们认为对于每个产品做一个保存时间分析研究是有必要的。尽管美国食品药品监督管理局指出纯化细菌内毒

素与天然来源的内毒素存在不同反应性的可能性, 通常使用纯化内毒素比如内毒素工作标准品( CSE) 和美国国家参考标准品( RSE) 进行保存时间研究。CSE 和 RSE 由纯化的脂多糖及添加剂制备而得。低内毒素回收率是受到螯合剂和洗涤剂影响的纯化内毒素的效价变化。低内毒素回收率的机制尚未完全阐明, 但可以预料的是, 螯合剂去除二价阳离子和洗涤剂分散脂多糖与低内毒素回收率有关。

脂多糖是两亲性分子, 在水中以聚集体形式存在。因为脂多糖的聚合度是内毒素生物活性的决定因素之一, 许多研究人员报道了脂多糖形态结构与生物活性之间的关系。因为低内毒素回收率风险与内毒素可逆的生物活性变化相关, 值得回顾之前关于脂多糖聚集体与它的生物活性有关的论文。本文的目的是通过回顾之前的研究, 讨论在低内毒素回收率中内毒素效价的变化。

## 脂多糖聚集体

脂多糖由亲水性的多糖部分和疏水

\* 本文作者 Masakazu Tsuchiya 博士是美国查尔斯河实验室有限公司资深研究科学家及湛江安度斯生物有限公司研发团队首席科学家。



性类脂 A 部分组成。重要的研究表明,内毒素的活性中心是脂多糖的类脂 A 部分。脂多糖单体的分子量约为 10,000 到 20,000,而且不是一致的,因为多糖部分多糖链的重复单位数目的变化。这表明内毒素或脂多糖不是一个一致的单一分子,但代表了革兰氏阴性菌细胞壁中发现的一组物质。此外,脂多糖在溶液中形成聚合物,脂多糖的表观分子量估计为 300,000 到 1,000,000。纯化的大肠杆菌内毒素的水悬浮液不能通过 0.025 $\mu$ m 和 1000 kDa 的分子过滤器。这一结果也支持了具有活性的脂多糖在水中形成聚合体的说法。Brogden 很好地观察了脂多糖的超微结构形态。脂多糖的形态受物理条件(冻干,超声波处理,加热等等)及化学因素(洗涤剂,pH,金属离子等等)的影响。

脱氧胆酸(DOC)可以将脂多糖聚合物分离成单体。研究表明,通过添加脱氧胆酸脂多糖的沉降系数降至 1S(斯韦德贝里,沉降系数单位)。在 2% 脱氧胆酸中大肠杆菌脂多糖的分子量估计为 8820 到 20700。这表明,脱氧胆酸能将脂多糖分散至单体水平。Sweadner 等人的过滤研究也表明在 1% 的脱氧胆酸中的脂多糖能 100% 通过 10KDa 和 100KDa 的分子过滤器,水中的脂多糖是通不过的。这支持了脱氧胆酸破坏脂多糖聚合物至单体水平的假设。有趣的是,透析使得脂多糖结构重组成大的体积(表 1)。因此,脂多糖的聚合度可以通过脱氧胆酸可逆改变。

Galanos 和 Luderitz 证明了,在不同的盐形态下脂多糖的聚合度可以改变。在三乙胺盐形态下的脂多糖的沉降系数是最小的,而在镁和钙盐中脂多糖的聚合体体积非常大。他们在均匀的盐溶液中通过电渗析获得脂多糖。通过简单添加三乙胺不能完成从初始脂多糖到三乙胺盐的转变。

表 1 脱氧胆酸钠中脂多糖聚合度的变化

脂多糖来源	沉降系数		
	水或 Tris 缓冲液	脱氧胆酸 DOC	透析后
<i>E. coli</i> O111:B4	73	0.94	17.9
<i>E. coli</i> O113	NM	1.04	12.8
<i>Shigella flexneri</i> (弗氏志贺菌)	112	1.48	7.5
<i>Salmonella typhimurium</i> (鼠伤寒沙门氏杆菌)	110	1.40	11 + 20
<i>Salmonella minnesota</i> (明尼苏达沙门氏菌)	60 + 106	1.48	21.5
<i>S. minnesota</i> Rd1P-	134 + 186	0.91	34 + 77

DOC:2% 脱氧胆酸钠  
NM:不可测量

### 脂多糖聚合体的体积与生物活性

当脂多糖聚合体的体积变化时,致热原性也发生变化。在 0.5% 到 2% 的脱氧胆酸中脂多糖的致热原性完全丧失,但通过稀释或透析减少脱氧胆酸后可以恢复



(表2)。考虑到脂多糖的聚合度,这些结果表明要引起致热原性需要最小体积的脂多糖。

图1是Ribi等人报告的发热指数对脂多糖沉降系数的标图。可以看到表现出高致热原性的脂多糖聚合体体积的阈值。考虑到这个关系,脂多糖必须聚集才会引起发热。Komuro等人证明,超声波能减小脂多糖聚合体体积,并存在一个表达致热原性和鲎试剂反应性的最适合体积。在小体积的脂多糖聚合体中他们观察到致热原性。这个结果与Ribi等人的报告有差异。他们指出通过洗涤剂屏蔽脂多糖活性中心的可能性。还有一种可能,就是分离的脂多糖在水中部分重新组合,因为脂多糖碎片不含有任何稳定脂多糖聚集条件的添加剂。

在三乙胺盐溶液中的脂多糖显示出更小的聚合体体积和更高的致热原性。在图1中三乙胺盐溶液中脂多糖的沉降系数接近表达致热原性的阈值。结果提示,脂多糖的溶解度影响到脂多糖的生物活性,即使聚合是表达生物活性的必要条件。

Mueller等人建议将聚合体作为内毒素的活性单位。通过使用一个标准为5000Da的透析膜将类脂A单体溶液从聚合体中分离出来。使用的脂质A为三乙胺盐的形式,其分子重量应小于<5000,大概2000左右。他们比较类脂A的聚合体和单体的生物活性,如来自人类单核细胞的TNF- $\alpha$ 产物和鲎试验,并且仅观察

聚合体的活性。

就这些研究而论,脂多糖的聚合度影响它的生物活性,脂多糖的单体不表现出生物活性,聚合体能够表现出生物活性,并且存在一个脂多糖聚合体表达生物活性的最合适体积。

表2 脱氧胆酸钠中脂多糖致热原性的变化

脂多糖来源	发热系数			
	生理盐水	DOC	稀释	透析
Salmonella enteritidis (肠炎沙门氏菌)	29.6	0.0	34.5	20.7
E. coli (大肠埃希氏菌)	32.5	1.6	49.6	50.8
Bordetella pertussis (百日咳博德特氏菌)	21.8	0.0	22.8	28.5

DOC: 0.5% 至 2% 脱氧胆酸钠  
 稀释: 用生理盐水稀释脱氧胆酸中的脂多糖  
 透析: 脱氧胆酸中的脂多糖在生理盐水进行透析  
 脂多糖剂量: S. enteritidis 为 0.1 mg, E. coli 为 0.25 mg, B. pertussis 为 0.5 mg  
 发热指数: 发热曲线下面积

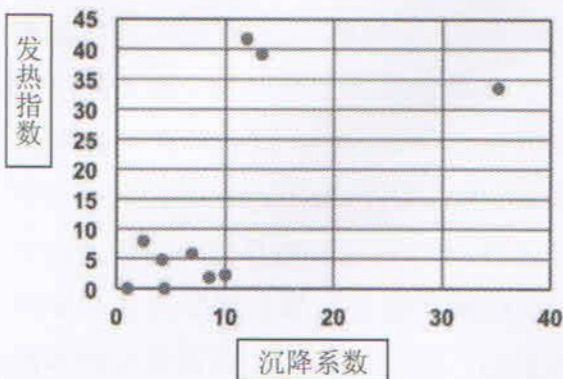


图1 致热原性与脂多糖沉降系数的相关性



### 低内毒素回收率条件下的脂多糖聚合体

1974年 Hannecart - Pokorni 等人报道了在柠檬酸盐和聚山梨酯中脂多糖聚合体的变化。柠檬酸和聚山梨酯的结合是低内毒素回收率条件之一。在柠檬酸盐和聚山梨酯中或者十二烷基硫酸钠(SDS)中,脂多糖的沉降系数约为 10S,尽管脱氧胆酸将脂多糖分散至 1.5S (表 3)。10S 沉降系数接近图 1 中的表达致热原性的阈值。有趣的是,经透析后在柠檬酸盐和聚山梨酯中脂多糖的沉降系数不能恢复到更大的体积,即使在脱氧胆酸中脂多糖的沉降系数显著地增加。这说明了经柠檬酸盐和聚山梨酯改变的脂多糖结构不易恢复。这与低内毒素回收率的观察一致。柠檬酸可能除去二价阳离子,而聚山梨酯分散脂多糖分子。二价阳离子,如镁离子和钙离子,对于保持脂多糖聚合体的结构是至关重要的,洗涤剂可以轻易地从通过去除二价离子弱化的脂多糖聚合体中获得脂多糖分子。

表 3 洗涤剂对脂多糖聚合体的影响

脂多糖来源	透析	发热系数			
		水/tris 缓冲液	DOC	柠檬酸/吐温	2% SDS
Shigella flexneri (弗氏志贺菌)	前	112	1.48	10.2	7.5
	后		7.5	7.6	8 + 10

Salmonella typhimurium (鼠伤寒沙门氏杆菌)	前	110	1.40	7.9	7.2
	后		11 + 20	8 + 12	10.7
Salmonella minnesota (明尼苏达沙门氏菌)	前	60 + 106	1.48	9.4	5.6
	后		21.5	10.8	7.8

DOC:2% 至 3% 脱氧胆酸钠  
柠檬酸/吐温:0.5% 柠檬酸和 0.5% 聚乙二醇山梨醇单月桂酸酯  
SDS:2% 十二烷基硫酸钠

### 生物活性的可逆性

Ribi 等人曾报道在人血浆对脱氧胆酸中的脂多糖致热原性的影响。他们证明了,经稀释之后脱氧胆酸中脂多糖的效价可以恢复。然而,如果脱氧胆酸中的脂多糖加入了人血浆,效价就不能恢复(表 4)。脱氧胆酸在单体水平分散脂多糖,并且直接注射脱氧胆酸中的脂多糖没有表现出致热原性。这些结果表明,人血浆通过稀释阻止脂多糖的重组。

当低内毒素回收率条件下的脂多糖注射入人体后,如果其效价恢复,这会导致一个安全问题。正如 Hannecart - Pokorni 等人证明,在柠檬酸盐和聚山梨醇酯中脂多糖通过透析聚合体其体积是不会改变的,低内毒素回收率条件下脂多糖的生物活性可能不会轻易改变。他们还报道称,用氯仿处理可以恢复脂多糖聚合度。然而,用有机溶剂处理与体内条件不相关。就这些结果而论,低内毒素回收



率条件下脂多糖的效价在体内不可能恢复,并且低内毒素回收率似乎不是一个安全问题。

### 致热原性和鲎试验之间的相关性

家兔热原试验和鲎试验之间的相关性被广泛关注。BET 是通过认识到家兔热原试验和鲎试验之间的相关性而建立的。采用 BET 的主要原因之一,是在鲎试验中预期的假阴性比家兔热原试验少。Wachtel 和 Tsuji 报道,鲎试验比 USP 中家兔热原试验灵敏 3 到 300 倍,并且当内毒素是纯化和效价未降低时这两中方法相关性很好。他们也观察到不同鲎试剂使用效价降低的内毒素相关性的差异。他们建议选择合适鲎试剂来使用。在他们的研究中大部分鲎试剂制备目前还没有商业化。这可能是由于目前用于 BET 的鲎试剂已经经过改良与精选。

因为鲎试验和家兔热原试验都是生物试验方法,方法的变化性比典型的化学分析方法大。而且,因为脂多糖的聚合度,类脂 A 部分的成分以及分子量的一致,内毒素能够导致差异。对于恰当应用 BET,了解这些事实是很有必要的。

表 4 人血浆对 DOC:脱氧胆酸钠  
中脂多糖致热原性的影响

DOC(%)	血浆(mL)	稀释后发热指数
0.0	0.0	29.6
0.0	1.0	36.2

0.5	0.0	35.9
0.5	0.25	1.9
0.5	1.0	0.0
血浆:人血浆		
稀释后发热指数:用生理盐水稀释在脱氧胆酸钠/血浆中脂多糖的发热指数		
脂多糖剂量:S. enteritidis 为 0.1 mg		

### 讨 论

先前的研究表明,脂多糖的聚合度通过化学和物理条件可以可逆地改变。因为脂多糖的聚合度反映出生物活性,如致热原性和鲎试剂反应性,脂多糖的生物活性能够可逆地改变。然而,脂多糖聚合体似乎在人血液中没有发生变化,因为在人体内没有发现这样的条件。人血浆也有助于保持内毒素的效价。对于内毒素安全测试,需要检测的是产品中的内毒素效价。这意味着,产品内毒素的潜在效价不应是 BET 的考虑目标,虽然产品中内毒素含量应该在过程控制中控制。

低内毒素回收率是脂多糖效价变化的一种现象。尽管低内毒素回收率最近才有报导,类似的现象早已被注意到。例如,某些金属离子和微小的残余含量可以降低内毒素的效价。这种现象的机制不是很清楚,鉴于在镁和钙盐溶液中脂多糖部分不溶于水,可能是脂多糖聚合体变为更大体积的聚合体。另一方面,由螯合剂和洗涤剂引起的低内毒素回收率机制可能是脂多糖聚合体变为体积更小的聚合



体。虽然低内毒素回收率和类低内毒素回收率现象的机制可能不同,但这两种情况都可以观察到脂多糖的效价改变。

鉴于鲎试验的使用已有 50 年的历史及鲎试验的灵敏度,在 BET 中低内毒素回收率不是一个安全问题。产品中的内毒素应作为产品中的内毒素效价进行测定。产品中内毒素潜在的效价不应是一个安全性测试,因为它在很大范围内会有变化。通过处理后脂多糖效价恢复并不意味着脂多糖的聚合度可以恢复到与初始的脂多糖一样。通过稀释或透析脱氧胆酸中的脂多糖的致热原性可以恢复,但处理前和处理后脂多糖的沉降系数是不一样的。最重要的是,标准内毒素没有标准聚合度的定义。

低内毒素回收率是一个关于 BET 样

品保存时间研究的问题。低内毒素回收率的主要原因之一是复合基质含有一个螯合剂和一个洗涤剂。实践中低内毒素回收率现象也可能是涉及蛋白质的问题。蛋白质可能导致鲎试剂反应干扰和内毒素效价的变化。如考虑是低内毒素回收率,应先消除鲎试剂反应的干扰。当 BET 中观察到干扰,我们需要考虑是鲎试剂与样品反应的干扰或是低内毒素回收率。BET 应该在样品与鲎试剂反应本身不存在干扰的条件下进行。蛋白干扰通常由不同的机制引起。因此,蛋白质问题应单独处理。考虑到这些因素,对于保存时间研究我们需要建立一个使之适应的条件及合适的内毒素制备方法。

(李树馥译 刘少燕校审)

## 活性炭(供注射用)的细菌内毒素检查法研究

卓培泽(湛江安度斯生物有限公司)

活性炭(供注射用)是一种黑色粉末,无臭、无味、无砂性,具有很强吸附能力的多孔疏松物质。2015 年版《中国药典》四部药用辅料要求检测活性炭(供注射用)的细菌内毒素,包括:活性炭所含内毒素本底值和活性炭对细菌内毒素吸附力检测。许多质检人员对于活性炭的检

测,感到非常困惑。为此,本文针对活性炭供试品溶液的制备、试验用具的选择和供试品的检测进行了探讨浅析,现将试验方法及研究过程介绍如下,以供参考。

### 一、实验材料及仪器

1. 供试品(S):活性炭(供注射用)批号:国产-1、国产-2、进口-1、进口-2。



2. 动态显色法鲎试剂:批号:1410090;检测范围:50~0.005EU/ml;规格:1.25ml/支;生产厂家:湛江安度斯生物有限公司。

3. 细菌内毒素检查用水(W):批号:1409120;规格:50ml/支;生产厂家:湛江安度斯生物有限公司。

4. 细菌内毒素国家标准品(RSE):批号:150600-200707;效价:10000EU/支;生产厂家:中国药品生物制品检定所。

5. 针头过滤器:型号:SLGP033RB;批号:R4AA41572;规格:0.22 $\mu$ m PES膜;生产厂家:默克密理博有限公司。

6. 全玻璃注射器:规格:5ml;生产厂家:金坛市欣悦玻璃仪器有限公司。

7. 动态试管仪:型号:LKM-02-32-T02,生产厂家:英国莱伯金耐特公司。

8. 低速自动平衡离心机:生产厂家:北京医用离心机厂。

## 二、实验方法与步骤:

### 一) 实验准备

试验需要用到的西林瓶、全玻璃注射器、玻璃稀释管、反应管等,洗干净后,采用干热灭菌法(280 $^{\circ}$ C,干烤3小时)去除热原;

二) 标准曲线可靠性试验:按中国药典2015年版BET法操作<sup>[1]</sup>,经复核,动态显色法鲎试剂批号1410090标准曲线可靠性试验符合规定;

### 三) 活性炭所含内毒素本底值

1. 检测标准:称取约75mg活性炭,加入约5ml细菌内毒素检查用水配置成活性炭浓度为1.5%(1.5g/100ml)的混合溶液,旋涡混合9分钟,然后1500转离心5分钟,离心后,取上清液用0.22 $\mu$ m无热原滤膜过滤,取续滤液按照通则1143检测,样品细菌内毒素应小于2EU/g。

### 2. 干扰试验

2.1 内毒素限值(L): $L=2EU/g$ ;

2.2 鲎试剂灵敏度的选择: $\lambda=c \times L=1.5g/100ml \times 2EU/g=0.03EU/ml$ 以上;

### 2.3 反应溶液的制备

本试验使用的动态显色法鲎试剂的检测范围为50~0.005EU/ml,本试验选取的标准曲线浓度为0.01EU/ml、0.1EU/ml、1.0EU/ml,因此活性炭的最小有效稀释浓度(c)为:

$$c = \lambda/L = 0.01EU/ml/2EU/g = 0.005g/ml$$

本干扰试验选取0.015g/ml的活性炭浓度来进行试验。

2.3.1 溶液C的制备:取细菌内毒素国家标准品(RSE)1支,按照使用说明书,加入1mlBET水,旋涡混合15分钟,得到细菌内毒素溶液10000EU/ml,稀释到2000EU/ml,分装0.3ml/瓶。-20 $^{\circ}$ C冷冻保存,备用。将RSE稀释到所需要的1.0EU/ml、0.1EU/ml、0.01EU/ml浓度溶液,记为 $E_{1.0}$ 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$ ,备用。

2.3.2 溶液A的制备:取样品批号进



口-1、进口-2、国产-2,分别按药典要求,离心后取上清液过滤得供试品原液,记为S;

2.3.3 溶液B的制备:分别取0.1mlE<sub>1</sub>加入0.9mlS中,制备含有0.1EU/ml的供试品阳性对照溶液,记为SE<sub>0.1</sub>;

2.3.4 反应测试:取动态显色法试剂2支,复溶后,合并,分别与A、B、C及D溶液(BET水为D溶液,作为阴性对照)反应,结果见表1。

表1 三批活性炭的干扰试验结果

供试品批号	检测浓度(g/ml)	回收率(%)
进口-1	0.015	113.50
国产-1	0.015	106.27
国产-2	0.015	102.05

### 3. 日常检查

由干扰试验结果可知,供试品原液使用动态显色法进行检测,无干扰作用。各反应溶液的制备同干扰试验2.3,结果见表2。

表2 动态显色法试验结果 - 鲎试剂批号1410090

供试品批号	检测浓度(g/ml)	回收率(%)	内毒素检测值(EU/g)
进口-1	0.015	95.50	<0.667
进口-2	0.015	96.15	<0.667
国产-1	0.015	106.27	<0.667
国产-2	0.015	102.05	0.667

### 四)活性炭对内毒素吸附力

1. 检测标准:取细菌内毒素国家标

准品1支,按使用说明书配制成浓度为200EU/ml,20EU/ml的标准内毒素溶液备用,称取约75mg活性炭两份,分别加入约5ml浓度为200EU/ml和20EU/ml的标准内毒素溶液配制成活性炭浓度为1.5%的混合溶液,旋涡混合9min,然后1500转离心5min,离心后,取上清液用0.22 μm无热原滤膜过滤,取续滤液按照通则1143检测,应能使200EU/ml,20EU/ml的标准内毒素溶液内毒素含量均下降2个数量级(吸附率达到99%)。

### 2. 内毒素限值(L)的确定:

按照标准的要求,内毒素含量均应下降2个数量级,即是浓度为200、20EU/ml的标准内毒素溶液经活性炭吸附后,内毒素含量应分别降至2、0.2EU/ml浓度以下。

### 3. 检测方法

3.1 本试验使用的动态显色法鲎试剂的检测范围为50~0.005EU/ml,本试验选取的标准曲线浓度为0.01EU/ml,0.1EU/ml,1.0EU/ml最大有效稀释倍数MVD的计算:

3.1.1 200EU/ml内毒素吸附样品: $MVD = 2.0/0.01 = 200$ ,20EU/ml内毒素吸附样品: $MVD = 0.2/0.01 = 20$ 。本试验选取原液来进行试验。

### 3.2 各反应溶液的制备

3.2.1 溶液C的制备:将RSE稀释到所需要的200EU/ml、20EU/ml、1EU/ml、0.1EU/ml、0.01EU/ml浓度溶液,记为



$E_{200}$ 、 $E_{20}$ 、 $E_1$ 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$ ，备用；

3.2.2 溶液 A 的制备：按照药典要求在各活性炭中分别加入 200、20EU/ml 内毒素溶液，离心取上清液过滤后得供试品原液，分别记为  $S^{200}$ 、 $S^{20}$ ；

3.2.3 溶液 B 的制备：分别取

0.1mlE1 加入 0.9ml $S^{200}$  和  $S^{20}$  中，制备含有 0.1EU/ml 的供试品阳性对照溶液，记为  $S^{200}E_{0.1}$  和  $S^{20}E_{0.1}$ ；

3.3 反应测试：复溶动态显色法试剂，分别与 A、B、C 及 D 溶液（BET 水为 D 溶液，作为阴性对照）反应，结果见表 3。

表 3 动态显色法试验结果 - 鲎试剂批号 1410090

试品批号	稀释倍数	回收率 (%)	内毒素检测值 (EU/ml)	内毒素下降数量级	结论	
进口 - 1	$S^{200}$	1	85.2	0.076	3.42	符合规定
	$S^{20}$	1	91.8	0.011	3.26	符合规定
进口 - 2	$S^{200}$	1	110.65	<0.01	>4.30	符合规定
	$S^{20}$	1	107.06	<0.01	>3.3	符合规定
国产 - 1	$S^{200}$	1	95.08	0.042	3.68	符合规定
	$S^{20}$	1	105.63	<0.01	>3.3	符合规定
国产 - 2	$S^{200}$	1	84.62	0.198	3.00	符合规定
	$S^{20}$	1	125.11	0.033	2.78	符合规定

### 五) 过滤系统评价试验

活性炭的 BET 法中使用到过滤系统，主要是因为制备的 1.5% 活性炭溶液中可能会有悬浮物，如果不采用过滤的方

法，在进行光度法试验时，这种悬浮物会干扰 BET 试验。如下图 1，当供试品溶液中参杂有悬浮物时，会引起反应曲线上漂，导致检测结果不准确。

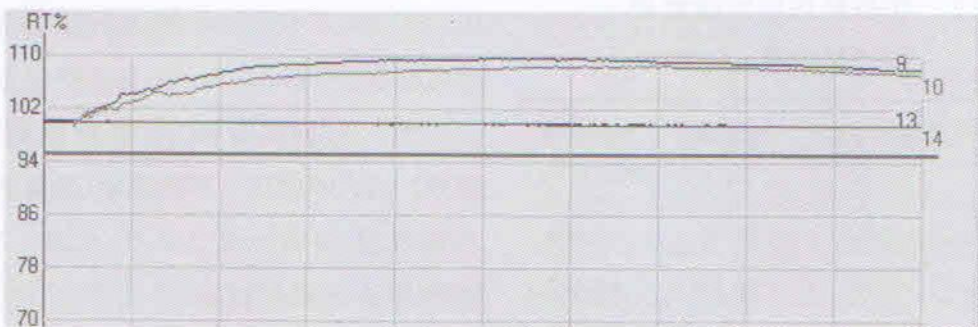


图 1 检测浓度为 0.015g/ml 供试品的反应曲线，供试品中含有漂浮物

过滤系统包括：注射器、过滤器、滤膜和容器。BET 试验中引入了过滤系统，考

虑过滤系统会引入外来的细菌内毒素或引起 BET 的干扰，还有可能对内毒素有



吸附作用,建议对过滤系统进行 BET 评价。

### 1. 过滤系统内毒素含量测定和干扰试验测试

1.1 内毒素限值的确定:活性炭(供注射用)所含内毒素本底值要求小于 2EU/g,即要求滤过液内毒素不超过

0.15EU(2EU/g × 75mg),因此,过滤系统内毒素应至少小于 0.15EU/个,考虑到活性炭本底内毒素,建议过滤系统内毒素含量小于 0.05EU/个。

1.2 用注射器吸取 5ml 细菌内毒素检查用水,过滤,取过滤液进行检测,记为  $S^{w_{滤液}}$ ,结果见表 4。

表 4 动态显色法试验结果 - 鲎试剂批号 1410090

供试品	批号	稀释倍数	回收率 (%)	内毒素检测值 (EU/个)	结论
$S^{w_{滤液}}$	R4AA415721	1	126.83	<0.05	符合规定

### 2. 滤膜对内毒素吸附测试

用注射器吸取 5ml  $E_{0.2}$ ,过滤,取过滤

液(记为  $S^{E_{0.2}滤液}$ )。对  $S^{E_{0.2}滤液}$  和  $E_{0.2}$  采用动态显色法进行检测,结果见表 5。

表 5 滤膜对内毒素吸附测试试验结果 - 鲎试剂批号 1410090

供试品	批号	稀释倍数	回收率 (%)	内毒素检测值 (EU/ml)	相对理论值 (%)
$S^{E_{0.2}滤液}$	R4AA41572	1	90.7	0.181	90.5
$E_{0.2}$	/	1	/	0.208	104

## 三、结论

1. 按照药典要求,制备供试品溶液,采用动态显色法检测滤液原液,3 批样品的回收率分别为 113.5%、106.27% 和 102.05%,无干扰作用,可建立细菌内毒素检查法动态显色法。

2. 四批活性炭所含内毒素本底值测试,内毒素含量均小于 2EU/g,符合规定。

3. 四批活性炭对内毒素吸附力,内毒素下降数量级为 2.78 ~ 4.30,符合规定。

4. 过滤系统内毒素含量小于

0.05EU/个,符合要求;回收率为 126.83%,说明对 BET 无干扰作用;对 0.2EU/ml 浓度内毒素溶液的吸附力,内毒素下降数量级为 0.0433(吸附率小于 1%),符合试验要求。

## 四. 讨论

1. 过滤的目的是除去在溶液中不能分层,漂浮在上清液中的活性炭,检测时如果供试品溶液中含有漂浮的炭粉,会影响光的读取,对动态法的检测有影响,如图 1。如果 1.5% 浓度活性炭溶液离心后



分层明显,可考虑不使用滤膜进行过滤建立细菌内毒素检查法。

2. 药典要求 BET 试验用器具应无内毒素且对试验无干扰作用,目前市面上的过滤器、滤膜等均没有明确标明无内毒素且对 BET 无干扰,因此使用滤膜过滤前应对过滤系统进行内毒素含量测定及干扰的验证。从表4、表5 结果分析,本试验使用的过滤系统,每个内毒素含量小于

0.05EU,表明内毒素含量符合试验要求,回收率为 126.83%,表明对 BET 无干扰作用。

3. 过滤系统除了需确认内毒素的含量、干扰情况外,还要考虑其对内毒素的吸附作用。根据美国 PDA 第 7 号技术报告<sup>[2]</sup>,滤膜的聚合物类型与表面电荷对内毒素吸附能力有着非常大的差异。如表 6 所示:

表 6 0.22 $\mu$ m 膜过滤器的膜种类,亲水性和表面电荷对内毒素吸附的影响

聚合物类型	亲水性	表面电荷	内毒素对数下降值
聚丙烯 (PP)	疏水性	无	1-3
聚乙烯 (PE)	疏水性	无	2.5-3.5
聚偏氟乙烯 (PVDF)	疏水性	无	0.8-1.0
聚四氟乙烯 (PTFE)	疏水性	无	1.2-2.0
硝化纤维 (CN)	亲水性	负电荷	<0.1
醋酸纤维 (CA)	亲水性	负电荷	<0.1
聚碳酸酯 (PC)	亲水性	负电荷	<0.2
聚砜 (PS)	亲水性	负电荷	<0.2
聚酰胺 (PA)	亲水性	正电荷	3.5

可见,并非所有的 0.22 $\mu$ m 滤膜均适用于活性炭的过滤工序,如果使用 PE 和 PA 材质的滤膜,因为其对内毒素吸附能力很强,就失去了对活性炭本底内毒素检测的意义。本试验使用的过滤器滤膜材质为聚醚砜 (PES),使标准内毒素含量下降数量级为 0.0433,使环境内毒素含量下降数量级为 0.0159,吸附率均低于 1%,符合试验要求。滤膜的选择,是这个试验至关重要的一环。应选用无内毒素无干扰且对内毒素吸附能力低的滤膜。本试

验仅验证了滤膜对 0.2EU/ml 浓度内毒素的吸附能力,实际应用中,可考虑高中低多浓度的验证。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S]. 四部. 通则 1143. 北京:中国医药科技出版社版, 2015 年版
- [2] James R. Robinson, et al. Depyrogenation by Microporous Membrane filters. PDA Technial report NO. 7;54-69.



## 安度斯公司新增业务介绍

美国 Accugenix 公司是一个专业从事微生物鉴定的国际先驱企业;英国 Celsis 公司是一个专业从事微生物快速检测的国际领先企业。他们和湛江安度斯一样都同属查尔斯河实验室公司(Charles River Laboratories, Inc.)的子公司。Accugenix 的微生物鉴定以及 Celsis 的微生物快速检测的一切中国业务均由湛江安度斯公司代理。

湛江安度斯生物有限公司是中国最大的细菌内毒素检测产品生产及供应商,全国有 1600 多家制药及医疗器械企业、医疗机构、科研机构以及高等院校用户在使用安度斯公司提供的鲎试剂、真菌检测试剂和细菌检测试剂。2016 年安度斯公司将增加 Accugenix 的微生物鉴定业务以及 Celsis 的微生物快速检测业务,为客户提供更全面、更精确的微生物分析服务。欢迎客户垂询(0759 - 3588858, 3588859)!

微生物鉴定国际先驱——



### 一、Accugenix 介绍

Accugenix 公司致力于微生物鉴定服务,提供准确、快速、经济和符合 cGMP 要求的报告。在过去的二十年里,Accugenix 已经鉴定超过一百万份来自世界各地 1000 多个制造业的微生物样品,积累了丰富的经验,并创建了专属的、实时更新的目前世界上最强大的微生物数据库,几乎涵盖了所有制造业环境微生物,可鉴定包含细菌、酵母和霉菌总计 6800 多种微生物,这让其他商用微生物鉴定系统的数据库仅仅是 Accugenix 的一个子集。目前,全球已有 756 家公司选择 Accugenix 提供的日常微生物鉴定服务。

### 二、Accugenix 微生物鉴定技术

#### 1、基因型鉴定(AccuGENX - ID<sup>®</sup>)

细菌的 16SrRNA 约 1500 个碱基、真菌的 ITS2 约 500 ~ 700 个碱基,含有足够的信息量且大小适中,常用于微生物鉴定。

AccuGENX - ID<sup>®</sup> 基因型鉴定方法:提取微生物 DNA 并对细菌 16SrRNA、真菌 ITS2 区进行扩增和测序,将得到的 DNA 序列与 Accugenix 微生物数据库相比对,得出鉴定到种的鉴定报告,其优点如下:

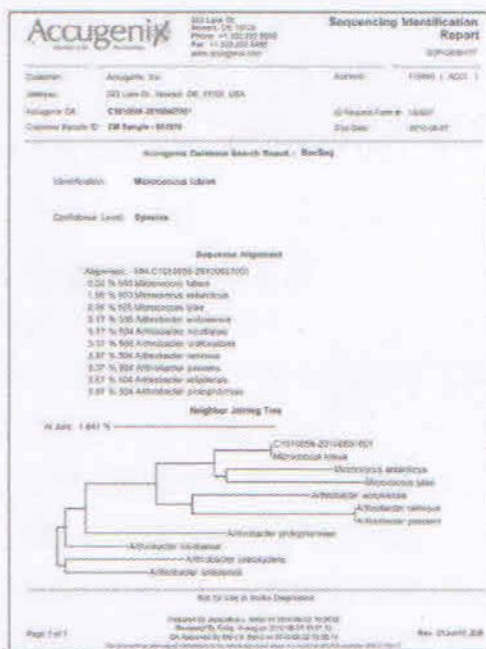
(1)快速:样品处理到出鉴定报告只需 6 个小时。



(2) 准确性高: 出报告率为 98%, 错误率仅为 0.2% (业内最高)。

(3) 测试结果不受样品状况影响: 可以是活的培养物, 也可以是不能培养的提取物或是提取的微生物 DNA。

鉴定报告基于当前 IJSEM 分类法, 可通过系统发育树直观看到与所鉴定微生物亲缘关系最近的 10 种微生物, 符合 CGMP 和美国 21CFR Part11 的要求。



将少量纯化样本与基质混合后, 在脉冲激光照射下发生电离, 产生的离子在电场作用下加速飞过飞行管道, 根据到达检测器的时间不同而被检测。检测信号被计算机转化为核糖体蛋白的蛋白质光谱并与经过验证数据库相比对, 得出鉴定结果。其特点如下:

(1) 快速: 样品处理、图谱采集到获得鉴定结果只需几分钟。

(2) 高通量: 样品测试时间只需 20 s, 一个小时可测 150 个样品。

(2) 准确度高: 出报告率为 98%, 错误率仅为 2%。

(3) 操作简单: 独特且简单的工作流程可满足绝大多数的微生物鉴定, 无需革兰氏染色、氧化酶试验或选择 PCR 引物。

(4) 服务价格低廉: 无需特殊耗材, 实验室常用试剂即可。



## 2、质谱型鉴定法 (AccuPRO - ID)

AccuPRO - ID<sup>®</sup> 是基于 MALDI - TOF - MS (基质辅助激光解吸 - 飞行时间) 质谱技术, 可得到微生物的蛋白质图谱, 而蛋白质离子峰又以高丰度、表达稳定且进化保守的核糖体蛋白为主, 可提供微生物的遗传信息。通过分析微生物的蛋白质图谱能够准确将细菌鉴定到种, 此方法比常规的生化鉴定方法时间更短、准确性也更高。

(5) 专属数据库: 质谱型数据库在不



断更新、扩增,鉴定准确率不断提高。

鉴定报告基于当前 IJSEM 分类法,确定 10 种与其最匹配的微生物,符合 cGMP 和美国 21 CFR Part 11 要求。质谱型数据库也在不断更新、扩增,鉴定准确率不断提高。

### 3、菌株分型(AccuGENX - ST™)

AccuGENX - ST™ 菌株分型鉴定技术是对 AccuGENX - ID 微生物基因型鉴定的补充,对细菌的 16SrRNA、真菌的 ITS2 区以外的目标区域的单、多位点(SLST 或 MLST)进行扩增和测序,可获得更多的微生物信息,提供更高准确度的微生物鉴定。

对微生物进行 AccuGENX - ID 分析,确定该微生物的种或属,再根据具体的种或属选择不同的测序位点(蛋白质编码基因或看家基因),获取更多的序列信息进行菌株分型,可将微生物鉴定到种以下的水平。其特点为:

(1)高精度度:比 AccuGENX - ID 和 AccuPRO - ID 方法更精准,特别适用于 QA/QC - OOS 调查。

(2)高分辨率:采用单、多位点测序技术,特别适用于相似菌株的区分。

(3)高重复性:强大的数据库、完善的 DNA 测序技术和经验丰富的专家使得我们能够获得更高重复性的测试结果。

如果你有一个高度监管的业务,这就需要一个环境监测计划,需要必要的技术和经验来快速、准确地处理你所有的微生物鉴定需求,帮助你改善流程、降低成本,帮助保护你的品牌,我们专业的服务可以帮您:

- 降低每份鉴定报告的成本,同时增加准确性。
- 抵消资本投资的成本,而升级技术。
- 提高运营效率,同时减少合规风险。
- 通过创新的 IT 应用程序,简化流程。

微生物快速检测的领先者——



#### 一、Celsis 简介

Celsis 于 1992 年成立于英国剑桥科学园,目前在全球 65 多个国家有 600 多个销售点。其微生物快速检测产品经过了最广泛样品的验证,在全球范围内运行超过 1 亿次检测,广泛用于乳制品、食品、饮料和医药领域,是微生物快速检测的领

先者。

Celsis 快速微生物检测可在 18 - 24h 内获得微生物限量结果,检测通量高达 120 个样品/小时,可快速对产品放行和污染事件预警,从而能缩短产品生产周期、减少库存和降低企业生产成本。

#### 二、Celsis 微生物快速检测技术



### 1、生物荧光检测技术 RapiScreen

包括微生物在内的一切有生命的物体都会产生 ATP。

(1) ATX 试剂可消除自由 ATP 和体细胞 ATP, 可将背景 ATP 的干扰降低到最低水平, 另外仪器自带振摇功能, 可充分保证试剂的效率。

(2) CellSolver 试剂, 提取微生物细胞中的 ATP。

(3) Sensilux 试剂(含有荧光素酶和荧光素), 荧光素酶利用微生物生长过程中产生的 ATP 催化荧光素并产生荧光, 荧光可被光度计检测, 从而根据相对发光单位 RLU 判定样品是否有微生物污染。

### 2、放大的生物荧光检测技术 AMPiScreen

AMPiScreen 技术采用独有的试剂可放大微生物细胞内的 ATP 水平, 微生物生长加上被放大的信号大大减少了检测时间, 从而可在微生物自然生长前提前得出检测结果。

(1) LuminAMP 试剂, 包含纯化的 ADP, 可被微生物来源的酶催化为 ATP。

(2) LuminEX 试剂, 提取微生物细胞中的 ATP。

(3) LuminATE 试剂(含有荧光素酶和荧光素), 荧光素酶催化荧光素和微生物在生长过程中生成的 ATP 反应并产生荧光。

### 3、Celsis 微生物快速检测的优势

(1) 快速给出结果: “是”或“否”有微生物污染; (2) 3 步走方案: 样品处理—上样检测—结果分析, 操作简单, 易学易用;

(3) 无需照看系统, 使用户能专注于其它更有价值的工作; (4) 线下恒温孵育促成高通量检测(多达 120 个样品/小时); (5) 占地面积小, 易于放置于任何微生物实验室; (6) 符合法规要求, 试剂生产经过 ISO 9001 认证; (7) 远程用户控制系统, 可简单、快速形成检测报告; (8) 独立的数据库, 可满足事后追踪和趋势分析; (9) 无可比拟的检测经验和专业的技术支持团队。

### 三、Celsis 微生物快速检测技术带来的益处

1、高检测通量, 18-24h 内获得微生物限量结果; 2、降低库存要求; 3、降低运营成本要求; 4、提升仓库的利用率; 5、缩短产品生成周期, 显著降低生产成本; 6、对污染事件做出快速反应; 7、显著减少微生物检测过程中的水耗、能耗和废弃物。



Celsis 可检测的产品类型有可过滤/不可过滤产品、可溶/不可溶产品、高 pH/低 pH 产品、油基/水基产品、有色/无色产品、防腐/非防腐产品等。广泛用于乳制品(UHT/ESL 牛奶)、饮料(豆浆、椰奶、功能性饮料、果汁、碳酸饮料)、食品(罐头、酱汁、酱油)、日用(洗涤剂、肥皂、牙膏、化妆品)、医药(输液产品、片剂、糖浆、医疗器械)行业的微生物快速检测。