

试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2015 年第 1 期 (总第 22 期) 2015 年 05 月 28 日

目 录

鲎试验的干扰类型及消除方法	1
一种难溶性样品的细菌内毒素检查法研究	9
2015 美洲鲎试剂(LAL)应用培训班信息	15
药品生产中控细菌内毒素快速检测方案	16

鲎试验的干扰类型及消除方法

John Dubczak* (Charles River Laboratories, Charleston, SC, USA)

(接上期)源于表面活性剂的抑制

内毒素是一个两亲物,即它有极性和非极性末端。聚集的内毒素分子具有高度的稳定性。电子显微镜显示,内毒素聚集状态呈片状、立方体,倒六角结构如胶团和囊泡。表面活性剂影响内毒素结构

的大小并可以改变溶液中内毒素的活性。

据报道,脱氧胆酸钠可以将内毒素降解为单体形式(约 20000 道尔顿),单体是无毒性的。去除脱氧胆酸钠(通过透析)后,内毒素的大分子结构(>300000 道尔顿)及生物活性就可以恢复。

*本文作者约翰·达布扎克是美国查尔斯河实验室集团旗下 Endosafe 公司的总经理。Endosafe 公司是世界制药行业著名的 LAL 生产企业。

表面活性剂还可以干扰 LAL 的蛋白质。蛋白质(尤其是大分子蛋白质)具有三维螺旋结构。由于蛋白质分子中特殊氨基酸带电的 R 基团,它们通常带有负电荷和正电荷。蛋白质中也含有一个大的疏水区域,非极性 R 基团在疏水区聚集试图脱离蛋白质周围的极性水分子。表面活性剂可以绑定到疏水区并使许多负电荷覆盖在蛋白上。结果是,表面活性剂致使蛋白质变性。

高浓度的表面活性剂会对鲎试验产生干扰。只能够通过用 LRW(细菌内毒素检查用水)或生理盐水稀释来消除干扰。

源于蛋白质的抑制

内毒素容易绑定到蛋白质上。绑定到蛋白受体比如蛋白 CD14、CD16、CD18 都有文件记载。其他蛋白质如 HSA, α 1-球蛋白, α 1-脂蛋白, 乳铁蛋白和溶菌酶与内毒素也有相互作用,这是众所周知的。针对脂质 A 和多糖 O 及 R 区域的 IgM 和 IgG 抗体是有明显的临床意义的高定向相互作用的例子,脂多糖绑定到蛋白质上涉及到疏水和静电相互作用。

内毒素与蛋白质的相互作用是非常

难以预料的。很明显,它由蛋白质自身的性质决定(抗脂质 A IgM 抗体将有能力中和内毒素的生物活性)。然而,即使蛋白质不会影响内毒素的生物活性,某些特性可能也会改变。例如,吸附到 HSA 上的内毒素可能会吸附到聚苯乙烯试管上从而降低样品的活性。为了消除蛋白质的抑制干扰,需要用 LRW 或者生理盐水对样品进行稀释。

源于脂质体的抑制

脂质体是球面人工脂质双分子层,可以作为许多药物的运载工具。它们可以是简单的双分子层(单膜)形成一个含水核心或者它们可能是许多同中心双分子层结构。不管哪种形式,脂质体检测对鲎试验室具有挑战性。一般来说,不经过稀释的脂质体不能检测。脂质体的胶体性质的干扰凝胶的形成。通过动力学分析,乳浊度干扰光度检测。脂质体进行鲎试验时需要稀释。使用稀释剂的类型取决于需要检测完整的脂质体或是“破裂”的脂质体。打破一个脂质体释放出封装在里面的药物从而使药物以及脂双分子(或类脂双层的成分)进行鲎试验分析。决定

检测完整的脂质体或破裂的脂质体是基于药物本身的特定应用。

检测完整的脂质体是相对简单。简单地用合适的稀释剂以 1:10 或 1:100 稀释,这对完整脂质体来说通常足够了。生理盐水通常是脂质体合适的稀释剂。

如果有必要裂解或打破脂质体制剂,那么用溶剂或表面活性剂破坏双分子层结构。溶剂如 DMSO(二甲基亚砜),乙醇或甲醇是首选。表面活性剂可用于裂解脂质体,但可能也出现另一些试验的复杂性。另一方面,简单的溶剂可以稀释到无抑制浓度。

为了裂解一个简单的脂质体制剂,需要用适当的溶剂配制 1:2 稀释液。然后以 1:100 或 1:1000 稀释脂质体/溶剂的混合物进行动态测试。脂质体进行鲎试验时生理盐水或合适的缓冲液是常见的

稀释剂。这些稀释剂优于 LRW,因为它们可以减少假阳性反应。在某些脂质体制剂中可以找到酸磷脂如磷脂酰甘油。磷脂酰甘油可以绑定并随后激活 C 因子。高离子强度的溶液如生理盐水或 100mM 缓冲液缓和与 C 因子的弱结合,从而消除干扰。然而,同样的方法不能缓和在内毒素和 C 因子之间形成的极强的复合物,它们可以非常有效地消除或减少常常与这些复杂的药品的鲎试验相关的干扰。

增强干扰

表 9.2 中列出一些对鲎试验有增强作用的比较常见的因素。表 9.2 中也显示出中和或消除鲎试验增强干扰的一些方法。虽然表中所列方法较少,但是对含有增强物质的产品的解释和处理过程却很复杂。

表 9.2 对鲎试验有增强作用的物质

干扰因子	LAL 或内毒素干扰	消除方法
β 葡聚糖	LAL 干扰	用葡聚糖阻断缓冲液稀释
丝氨酸蛋白酶	LAL 干扰	加热处理和用缓冲液稀释
表面活性剂	内毒素和 LAL 干扰	用生理盐水稀释

源于 β -1-3 葡聚糖的增强

β 葡聚糖是葡萄糖聚合物,通过 β 糖苷键相连。 β 葡聚糖常见于植物(纤维素)和真菌(酵母)的细胞壁。用纤维过滤器过滤(尤其是纤维素深度过滤器)的药品极有可能含有葡聚糖。来自于酵母细胞组织和蛋白质基础产品的生物制品,经过离子色谱交换也有可能含有葡聚糖。 β 葡聚糖是普遍存在的,可以在各种药物活性成分和不活跃的赋形剂中找得到。然而已知 β 葡聚糖具有免疫调节的特性,通常在药物制剂中的浓度也没有对临床产生不良影响。

所有经认证的 LAL 与内毒素和 β -1-3 葡聚糖都产生反应。所有经认证的 LAL 也会用官方内毒素标准品进行强有力的效价测试。然而,法规并没有要求对 LAL 进行葡聚糖灵敏度测试,而且也没有一个公认的葡聚糖参考标准品。因此,LAL 用户必须要意识到大多数不同批号的 LAL 之间和不同认证供应商供应的 LAL 与葡聚糖的反应会有非常大的差别。

葡聚糖活性的决定因素有两个:葡聚糖分子的大小以及 LAL 试剂中 G 因子的浓度。

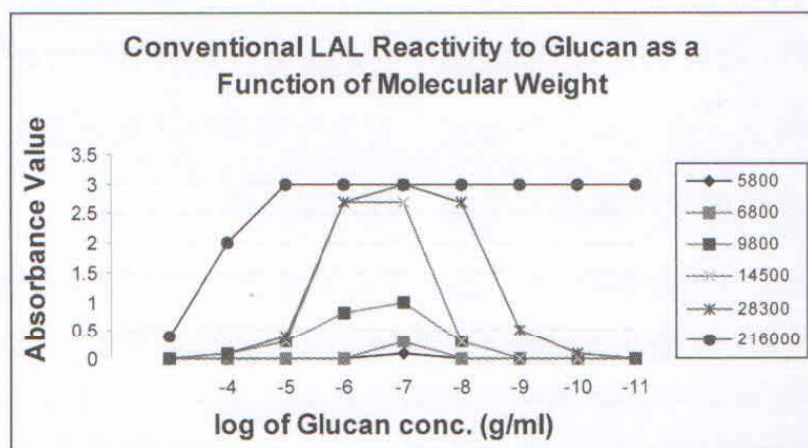


图 9.3 葡聚糖的分子量对常规鲎试剂活性的作用

图 9.3 说明了葡聚糖分子大小和激活程度之间的关系。可以看到,葡聚糖分子量与 LAL 的激活程度成正比关系,即随着葡聚糖分子量的增大,LAL 的活性也增大。分子量最小的葡聚糖(5800 道尔顿)LAL 的活性最小(干扰),而分子量特

别大达到 216000 的葡聚糖,不能达到一个反应终点。这归因于它的微水溶性,通常与 β 葡聚糖有关。即使在亚微克浓度,216000 道尔顿的葡聚糖继续缓慢溶于水性溶液从而激活 LAL。

图 9.3 还表明, β 葡聚糖激活 LAL 呈一个经典的钟形曲线,即葡聚糖浓度决定激活程度。葡聚糖的最佳浓度取决于 LAL 试剂自身的 G 因子数量。摩尔比率约为 10:1 时 LAL 中 G 因子的最大活性达到峰值。再次强调,LAL 制造商不会在葡聚糖活性方面描述他们的试剂的特性。不同批号的 LAL 和不同制造商的 LAL 中的 G 因子的浓度会有不同。

源于葡聚糖存在的 LAL 干扰体现在多个方面。在凝胶法试验中,葡聚糖的干扰体现在供试品阴性对照呈阳性,即供试品阳性。在 2λ 供试品阳性对照中看不出增强作用(较高的回收率)。在定量法试验中,葡聚糖污染体现在以下两种方式之一。举个例子,某个供试品的检测结果可能是阴性(没有检测到内毒素),但回收率是无效的,通常大于 200%。这个检测结果用已知的葡聚糖与被添加入供试品阳性对照中的内毒素对 LAL 的协同作

用来解释。另一个例子是,一个供试品检测呈阳性结果(不合格),回收率可能高也可能不高。

上述的两种情况应该进行调查。调查的目的是确定 LAL 的激活是由于存在葡聚糖还是存在一个不可接受的内毒素浓度。为了将葡萄糖激活 LAL 与内毒素激活 LAL 区分开来,必须进行对比试验。用葡聚糖阻断稀释剂与不用葡聚糖阻断稀释剂进行对比试验。如果对比试验的结果差别很大,很可能存在 β 葡聚糖。

葡聚糖阻断缓冲液可以从所有认证的 LAL 制造商购买到。为了了解葡聚糖抑制剂对葡聚糖产生阻断作用的机制,我们需要返回到图 9.3 的数据。可以看到,高浓度的葡聚糖(高摩尔比率)抑制 G 因子的激活。LAL 制造商提供的葡聚糖阻断缓冲液含有毫克水平的 β 葡聚糖。当葡聚糖抑制剂用来复溶 LAL 或用来稀释样品,进入到鲎试验的毫克水平浓度 β 葡聚糖抑制了反应混合物激活 G 因子,因此使得 LAL 只与内毒素反应。

葡聚糖污染的后果之一就是会产生迥然不同的试验结果。例如,一个含有微量葡聚糖的产品某一次检测阴性,供试品

阳性对照的回收率也可接受。同样的产品,同样的生产工艺,用同一个供应商不同批号的 LAL 或者用不同供应商的 LAL 检测结果可能为阳性。再次强调,LAL 是基于内毒素活性来生产与标准化的,不是葡聚糖活性。试验结果的不一致使得要加强实验室之间原材料的检测。在供应商实验室,含有微量葡聚糖的原材料鲎试验检测合格,但在他们客户接收原材料的实验室可能不合格。

源于丝氨酸蛋白酶的增强

丝氨酸蛋白酶是研究得最广泛的蛋白水解酶。它们被划分为两个家族—胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶。胰蛋白酶族是最大的家族,包括其他胰蛋白酶,蛋白酶,弹性蛋白酶在内,以及许多调节血液凝固和纤维蛋白溶解的因子。

根据处于较容易断裂位置的氨基酸的类型对胰蛋白酶族成员的进行划分胰蛋白酶和胰蛋白酶类的酶主要在精氨酸和赖氨酸残基的碳基一侧断裂。在 LAL 凝固蛋白,凝固蛋白酶原,产生的不溶性凝胶里,激活的 LAL 凝固酶也在精氨酸或赖氨酸氨基酸残基的羧基一侧断开。

胰蛋白酶和胰蛋白酶类的酶的蛋白水解作用几乎相同。胰蛋白酶断裂 LAL 凝固蛋白酶原,因此产生假凝胶或假阳性浊度信号。

胰蛋白酶常用于再悬浮附着组织培养细胞,将蛋白质吸收进短肽,以及某些疫苗制剂的制备。在鲎试验之前必须对含有胰蛋白酶或其他丝氨酸酶的样品进行灭活。灭活胰蛋白酶最好和一致的方法之一是,用 PH 为 7.4 的缓冲液稀释样品,并在 75℃ 下加热 15 分钟。一旦加热处理,建议用 PH 为 7.4 的缓冲液进一步稀释。调整样品的稀释倍数,使得胰蛋白酶的浓度为 0.01mg/ml 或者 0.001mg/ml,便于 LAL 检测。

源于表面活性剂的增强

本文包括一节“源于表面活性剂的抑制”的内容,现在却是增强?这两种结果都会发生吗?答案是绝对的。这是鲎试验的特性。稀释表面活性剂的稀释浓度可能导致增强。增强可能是由于内毒素或 LAL 蛋白酶的影响。

内毒素通常以大分子形式存在(300,000 到 1000,000 道尔顿)。有二价阳离

子存在时,它们形成非常大的囊泡(超过1000,000 道尔顿)。弱非离子型的表面活性剂如吐温 20 或吐温 80 以及其他阳离子表面活性剂,可能降低这些大型三维内毒素结构为小分子。这样做,会增加内毒素的生物活性。一个带有特定数量暴露的类脂 A,非常大的内毒素分子结构会进行重组,增加了类脂 A 活性部位的数量,但没有改变内毒素自身的实际摩尔浓度。结果,相对于不含有表面活性剂的样品,含有表面活性剂的样品会增加 LAL 的活性。

研究表明,类脂 A 的 1-6-D-氨基葡萄糖二糖基干与 C 因子紧紧结合,LPS

对 C 因子的高亲和力以致高离子强度不能将已形成的复合物分离开来。酸性磷脂也能激活 C 因子。然而,酸性磷脂/C 因子复合物结合不紧密,高离子强度溶液如生理盐水可以将其分开。

表面活性剂常用于生物制药和疫苗的蛋白质纯化过程。含有磷酸结构的阴离子表面活性剂与 C 因子结合从而激活 LAL。含有这些表面活性剂残留物的产品经稀释会激活 LAL。举一个蛋白质产品的例子,在纯化过程中使用表面活性剂,用 LRW 和生理盐水对样品稀释进行鲎试验,如下所示:

样品稀释倍数	LRW 稀释	生理盐水稀释
1:100	393.1	178.4
1:1000	790.4	177.6
1:10000	1251.8	143.8

可以看到,用 LRW 稀释样品,内毒素水平的非化学计量增加。用葡聚糖阻断

剂获得同样的结果,排除葡聚糖的干扰。然而,生理盐水稀释进行检测,显示出一个内毒素经一系列稀释的基于剂量的典型反应结果。显著的增强归因于检测样品中残留的表面活性剂。来自生物制药工艺的疫苗和蛋白质产品,显示出非化学计量 LAL 数据,可能需要用生理盐水稀释。

结论

鲎试验是利用了鲎阿米巴细胞中的凝固酶,是检测革兰氏阴性菌内毒素最灵敏的方法,对于制药企业和医疗器械企业来说内毒素是最大的热原。尽管鲎试验

非常灵敏,但也有干扰。本文的目的是介绍一些在实验室 LAL 用户遇到的较常见的干扰类型。值得注意的是,一些鲎试验干扰并不总是与“酶”的干扰有关。几种因素如铝金属和表面活性剂对内毒素的生物活性也有很大的影响。意识到鲎试验干扰产生的根源,可以使得鲎试验方法更加稳健。稳健的实验方法更经济(减少重复试验的次数),同时也降低 cGMP 实验室创建异常报告的数量,减少与管理条例不符的风险。

(李树馥译 刘少燕校审)



新一代内毒素便携式检测系统

- ◆ 用户友好界面, 彩色触屏
- ◆ 安全的可激活WiFi系统, 快速的定量结果可远程打印
- ◆ 符合美国药典/欧洲药典的细菌内毒素检查法要求
- ◆ 增强的符合21版联邦法典的报告特征
- ◆ 改进的软件及传感原理, 提高稳定性
- ◆ 内嵌操作系统, 增强的处理能力和内存
- ◆ 密码保护, QC管理控制

一种难溶性样品的细菌内毒素检查法研究

李树徐(湛江安度斯生物有限公司)

摘要目的:建立莫西克汀的细菌内毒素检查光度法方法。

方 法:莫西克汀是一种难溶于水的样品,我们使用浓度为95%乙醇溶解莫西克汀,应用光度法建立莫西克汀的细菌内毒素检查法。

结 果:使用浓度为95%的乙醇对莫西克汀进行溶解,然后稀释到一定浓度进行内毒素检测可消除干扰。

结 论:莫西克汀可以建立细菌内毒素检查光度法方法。

关 键 词:莫西克汀;细菌内毒素检查;光度法;难溶物质;95%乙醇;离心

莫西克汀是一种白色或类白色无定形粉末,几乎不溶于水,极易溶于乙醇,微溶于己烷,是一种难溶物质。许多质检人员对莫西克汀进行细菌内毒素检测时,对此难溶于BET水的供试品内毒素检测方法学建立感到困惑。为此,本文针对莫西克汀这个供试品进行了探讨浅析,现将试验方法及研究过程介绍如下,以供参考。

1. 实验材料及仪器

1.1 供试品(S):莫西克汀;内毒素限值(L)为0.1EU/mg。

1.2 动态浊度法鲎试剂:湛江安度斯生物有限公司产品,批号:1402282,1411260
检测范围:10~0.01EU/ml;规格:1.25ml/支。

1.3 细菌内毒素检查用水(W):批号:1409120;规格:30ml/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

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

1.5 乙醇(95%):批号140421;西陇化工股份有限公司产品,经检测不含细菌内毒素。

1.6 动态试管仪:型号:ATi321-05-001,英国莱伯金耐特公司产品。

1.7 低速自动平衡离心机:北京医用离心机厂生产。

2. 实验方法与步骤:

2.1 标准曲线可靠性试验:按中国药典 2010 年版 BET 法操作^[1],经复核,鲎试剂批号 1402282、1411260 符合规定,标准曲线可靠性试验结果见表 1,表 2。

表 1 批号 1402282 试剂标准曲线可靠性试验结果

反应项目	反应时间(S)	内毒素测定值(EU/ml)	CV(%)
内毒素标准品 0.01EU/ml	2435.5	0.0090	2.23
内毒素标准品 0.1EU/ml	1111	0.1231	0.89
内毒素标准品 1EU/ml	611	0.9014	0
阴性对照	>3600	<0.0019	0

标准曲线回归方程: $\lg T = 2.7725 - 0.3003 \lg C$,相关系数 $r = -0.9970$,其中 T 为反应时间,C 为内毒素浓度。

表 2 批号 1411260 试剂标准曲线可靠性试验结果

反应项目	反应时间(S)	内毒素测定值(EU/ml)	CV(%)
内毒素标准品 0.01EU/ml	2525.5	0.0088	0.59
内毒素标准品 0.1EU/ml	1203	0.1297	0.35
内毒素标准品 1EU/ml	710.5	0.8780	1.49
阴性对照	>3600	<0.0024	0

标准曲线回归方程: $\lg T = 2.8360 - 0.2754 \lg C$,相关系数 $r = -0.9952$,其中 T 为反应时间,C 为内毒素浓度。

2.2 动态浊度法干扰初筛试验:本试验使用的动态浊度法试剂的检测范围为 10 ~ 0.01EU/ml,本试验选取的标准曲线浓度为 0.01EU/ml,0.1EU/ml,1EU/ml,因此莫西克汀的最低有效浓度(MVC)为:

$$MVC_{0.01} = \lambda/L = \frac{0.01 \text{ EU/ml}}{0.1 \text{ EU/mg}} = 0.01 \text{ mg/ml}$$

本干扰初筛试验选取 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.6 mg/ml 的莫西克汀浓度来进行试验。

- 2.2.1 内毒素标准溶液(溶液 C)的制备:将 RSE 稀释到所需要的 1EU/ml、0.1EU/ml、0.01EU/ml、0.2EU/ml 浓度溶液,记为 E_1 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$ 、 $E_{0.2}$,备用。
- 2.2.2 供试品溶液(溶液 A)的制备:称取批号 141208-1 样品 100mg,由于莫西克汀几乎不溶于水,这里加入 1ml 浓度为 95% 乙醇溶解,莫西克汀立即完全溶解,即得原液浓度为 100mg/ml,先用 BET 水将原液稀释至 10 倍,溶液遇 BET 水立即析出,所以将供试品的 10 倍稀释液用离心机以 1500r/min 转速离心 10 分钟,取上清液,然后再稀释至浓度 1.6mg/ml, 0.8mg/ml, 0.4mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml, 记为 $S_{1.6\text{mg/ml}}$, $S_{0.8\text{mg/ml}}$, $S_{0.4\text{mg/ml}}$, $S_{0.2\text{mg/ml}}$, $S_{0.1\text{mg/ml}}$ 。
- 2.2.3 内毒素供试品溶液(溶液 B)的制备:将浓度为 3.2mg/ml, 1.6mg/ml, 0.8mg/ml, 0.4mg/ml, 0.2mg/ml 供试品与浓度为 0.2EU/ml 的内毒素溶液等比混合制备成含有 0.1EU/ml 的供试品阳性对照,记为 $S_{1.6\text{mg/ml}}E_{0.1}$, $S_{0.8\text{mg/ml}}E_{0.1}$, $S_{0.4\text{mg/ml}}E_{0.1}$, $S_{0.2\text{mg/ml}}E_{0.1}$, $S_{0.1\text{mg/ml}}E_{0.1}$ 。
- 2.2.4 反应测试:取动态浊度法试剂分别与溶液 A、B、C 及 D(BET 水为溶液 D,作为阴性对照)反应,结果见表 3。

表 3 动态浊度法干扰初筛试验结果

供试品浓度(mg/ml)	回收率(%)	内毒素检测值(EU/mg)
1.6mg/ml	30.60	<0.100
0.8mg/ml	22.10	<0.050
0.4mg/ml	56.00	<0.025
0.2mg/ml	94.00	<0.013
0.1mg/ml	117.70	<0.006

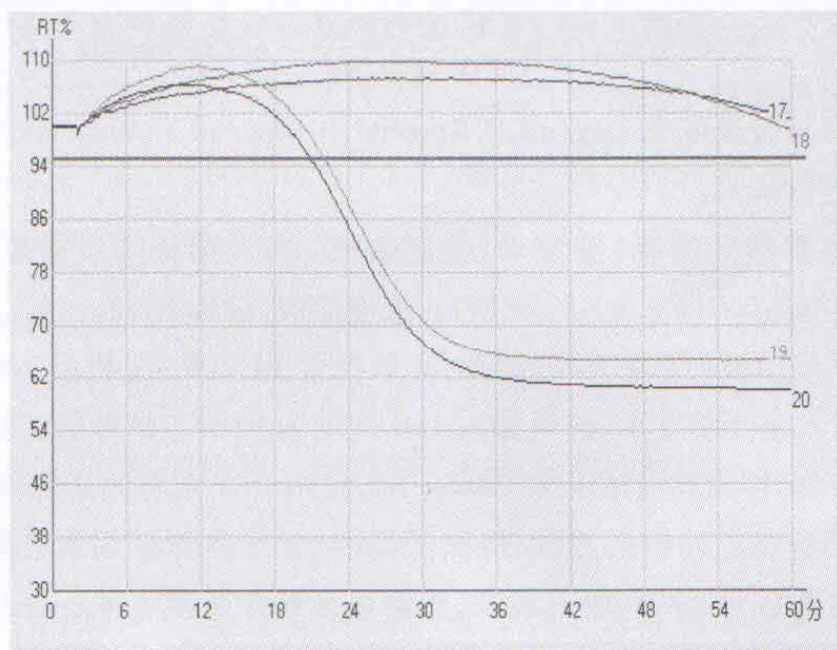


图1 检测浓度为0.4mg/ml 供试品的反应曲线

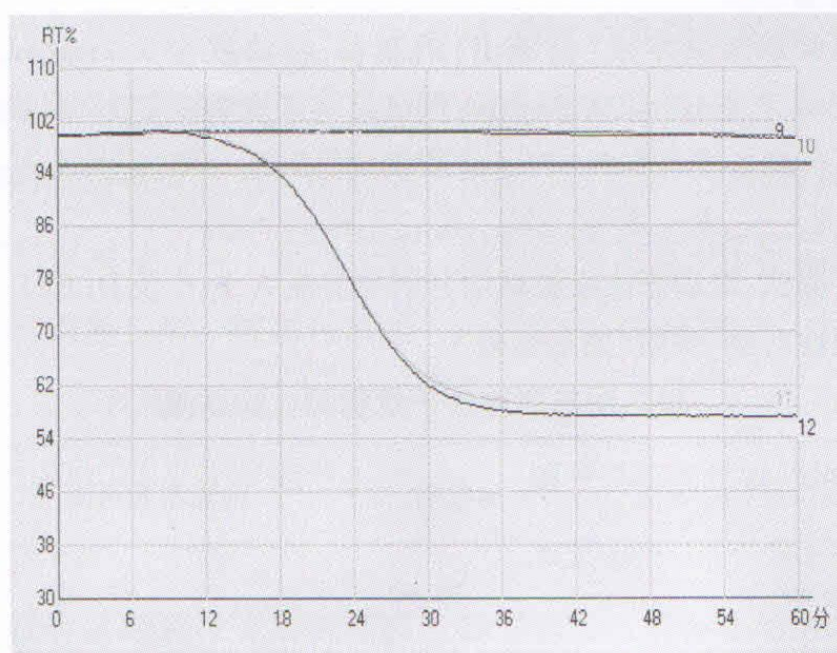


图2 检测浓度为0.1mg/ml 供试品的反应曲线

2.3 样品处理方法的有效性验证:由干扰初筛试验结果可知,用浓度为95%的乙醇溶解莫克西汀,得莫克西汀的初始浓度为100mg/ml,然后用BET水稀释10倍,使用离心机以1500r/min转速离心10分钟,取上清液,将离心后的10倍稀释上清液稀释至0.1mg/ml,在此浓度下进行检测供试品的回收率为117.70%,无干扰作用。本试验通过预先添加内毒素的方法验证该样品处理方法对内毒素检测有无影响。

- 2.3.1 内毒素标准溶液(溶液 C)的制备:取一支细菌内毒素国家标准品,效价为 10000EU/支,稀释制备成 2000EU/ml、1EU/ml、0.1EU/ml、0.01EU/ml、浓度溶液,记为 E_{2000} 、 E_1 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$,备用。
- 2.3.2 供试品溶液(溶液 A)的制备:称取 2 份批号 141208-1 样品各 100mg,分别加 1ml95% 乙醇溶解,得原液浓度为 100mg/ml,将其中一份供试品从原液稀释至 0.1mg/ml,记为 $S_{0.1\text{mg/ml}}$ 。另一份备用。
- 2.3.3 取 0.1ml E_{2000} 加入到 2.3.2 步骤制备的备用溶液中,得到浓度为 100mg/ml,内毒素含量为 200EU/ml 的供试品溶液,同样地,然后用 BET 水稀释将其至 10 倍,使用离心机以 1500r/min 转速对 10 倍稀释液离心 10 分钟,取上清液。将上清液稀释至 0.1mg/ml,即稀释了 100 倍,理论内毒素含量为 0.2EU/ml,记为 $S_{0.1\text{mg/ml}} E_{0.2}$ 。
- 2.3.4 反应测试:取动态浊度法试剂分别与 BET 水、 E_1 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$ 、 $S_{0.1\text{mg/ml}}$ 和 $S_{0.1\text{mg/ml}} E_{0.2}$ 溶液反应,结果见表 4。

表 4 样品处理方法有效性验证试验结果

反应项目	内毒素实际检测值(EU/ml)	内毒素理论值(EU/ml)
$S_{0.1\text{mg/ml}}$	<0.0020	<0.0020
$S_{0.1\text{mg/ml}} E_{0.2}$	0.1480	0.2000

回收率计算: $R(\%) = 0.148/0.2 * 100\% = 74\%$

- 2.4 供试品(S)的干扰试验:用 2 批批号为 1402282、1411260 的动态浊度法试剂对批号为 141208-1、141007-4、1410007-3 三批供试品 $S_{0.1\text{mg/ml}}$ 作干扰试验,各溶液的制备方法同 2.2 动态浊度法干扰初筛试验,结果见表 5,表 6。

表 5 使用批号 1402282 试剂对 3 批莫克西汀的干扰试验结果

供试品批号	检测浓度(mg/ml)	回收率(%)	内毒素检测值(EU/mg)
141208-1	0.1mg/ml	123.90	<0.100
1410007-4	0.1mg/ml	135.80	<0.100
1410007-3	0.1mg/ml	109.00	<0.100

表 6 使用批号 1411260 试剂对 3 批莫克西汀的干扰试验结果

供试品批号	检测浓度(mg/ml)	回收率(%)	内毒素检测值(EU/mg)
141208-1	0.1mg/ml	118.90	<0.100
1410007-4	0.1mg/ml	127.80	<0.100
1410007-3	0.1mg/ml	101.00	<0.100

3. 讨论

- 3.1 表 1 及表 2 表明批号 1402282 及批号 1411260 动态浊度法试剂的标准曲线可靠性试验阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,根据线性回归分析,标准曲线的相关系数的绝对值分别为 0.9970,0.9960,均大于 0.980,符合药典规定。
- 3.2 表 3 结果表明,使用 95% 乙醇溶解的供试品的检测浓度为 0.4mg/ml,0.2mg/ml,0.1mg/ml 时,回收率分别为 56.00%,94.00%,117.70%,均在 50% ~ 200% 之间,光度法试验能查看供试品整个反应过程的动态曲线,从图 1 看出,供试品检测浓度为 0.4mg/ml 时,反应曲线向上漂,反应曲线异常,结果不可靠,原因是由于 0.4mg/ml 供试品溶液中仍有少量不溶微粒,影响透光。图 3 为浓度 0.1mg/ml 供试品的反应曲线,此浓度下溶液微粒基本消除,不影响透光,反应曲线正常。因此可认为该供试品在 0.1mg/ml 浓度下检测无干扰。
- 3.3 表 4 结果为样品处理方法有效性验证试验结果,本试验通过在 95% 乙醇溶解供试品中添加 0.2EU/ml 的标准内毒素,回收率为 74%,因此可证明使用 95% 乙醇溶解莫克西汀对鲎试验无干扰作用,同时也证明了将原液稀释至 10 倍后有析出,1500rpm/min 对 10 倍稀释液离心 10 分钟,取上清液再稀释至 0.1mg/ml 检测的过程对鲎试验无影响。2010 年版中国药典二部附录 XI 细菌内毒素检查法中认为“可通过对供试品进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法(如过滤、中和、透析或加热处理等)排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性,要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验。”^[2]因此,对于莫克西汀此类难溶于 BET 水的供试品,我们可以用某些有机溶剂(含不可测内毒素)将其溶解后再进行细菌内毒素检查,但要证明有机溶剂对样品中的内毒素无破坏

作用使其失去活性,同时也要证明试验中的其他处理方法如离心、过滤、加热等等对内毒素检测无干扰。

3.4 表 5 及表 6 结果证实,通过用 2 个不同批号的动态浊度法试剂对三批莫克西汀进行干扰试验,使用批号 1402282 动态浊度法试剂回收率分别为 123.90%、135.80%、109.00%,使用批号 1411260 动态浊度法试剂回收率分别为 118.90%、127.80%、101.00%,说明用 95% 乙醇溶解供试品进行动态浊度法检测内毒素是可行的。

参考文献

[1][2] 中国药典[S]二部. 附录 XIE. 99. 北京:中国医药科技出版社版. 2010 年版

2015 美洲鲎试剂(LAL)应用培训班信息

为了帮助国内的 LAL 用户提高 BET 的技术水平,了解 LAL 的应用及相关法律法规,了解当今 BET 技术的发展,我公司将于 2015 年 7 月 28 日至 30 日(28 日报到)在上海举办美洲鲎试剂应用培训班,邀请美国著名的鲎试剂企业恩度斯弗公司(Charles River Endosafe, Inc.)的鲎试验专家为培训班授课。具体内容包括 LAL 试验的干扰与验证、OOS 管理、鲎试验的法律法规的最新发展、BET 创新的卡片技术等精彩内容。有兴趣参加培训班者请电话联系 0759 - 3588868 报名参加。

湛江安度斯生物有限公司

2015 年 5 月 28 日

药品生产中控细菌内毒素快速检测方案

基本原理

动态显色法(KCA)鲎试剂具有灵敏度高、检测范围宽、线性好以及抗干扰能力强等特点。在国外，多数光度法用户使用KCA鲎试剂。

KCA试剂含有人工合成的显色寡肽，经内毒素活化的凝固酶可水解显色寡肽，分离出对硝基苯胺(pNA)使反应溶液显黄色，显色时间或速率与内毒素浓度正相关。使用光度仪对药品反应溶液进行动态光度分析，将其光度变化与该药品的判定曲线进行比对，

可快速判定样品是否合格，大大提高药品在生产质控中BET的效率。



特点

- 1、使用动态显色法试剂，有更高的检测灵敏度和更宽的检测范围，贮存一条标准曲线可适配多种样品检测。
- 2、快速判定检测：动态检测数据实时与判定曲线比对，在软件界面即时显示判定结果（合格标记为绿色，不合格标记为红色）。最快5分钟可判定样品合格与否。
- 3、方便快捷的操作：一步法制备标准曲线，准确性更高，线性更好。一步法制备产品阳性对照，操作更方便快捷。
- 4、高的性价比：实验成本与凝胶法相当甚至更低。真正实现应用高端技术实验低成本。

