

鲨试验应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2014年第1期(总第21期) 2014年11月28日

目 录

鲨试验的干扰类型及消除方法	2
生物止血流体膜的细菌内毒素检查法研究	7
BET 培训班信息	12

致 读 者

久违了,亲爱的读者朋友们,《进展》又和大家见面了。

2014年即将进入尾声。回顾2014,中国已进入4G时代;阿里巴巴纳克达斯上市,双十一再创571亿神话;北京APEC会议绘就亚太地区未来发展蓝图……世界日新月异。同样地,细菌内毒素检查技术也不断向前发展。在我国,自1988年卫生部颁布细菌内毒素检查法以来,BET法在药品生产与质量控制中扮演着极其重要的角色,对提高药品质量,保证药品安全具有重要的作用。目前,BET法的应用逐步扩大至临床检验、食品安全、环境卫生等领域。

使用鲨试验方法对任何样品进行检测前,必须充分验证该样品对试验无干扰作用,这样的检测结果才视为有效。许多研究人员在新药研发过程中试图建立其细菌内毒素检查方法,但发现有很大的干扰,不知如何去消除干扰。本期《进展》将详细介绍鲨试验的常见干扰类型,干扰是如何产生的,以及针对不同干扰类型所采取的不同的消除方法。因篇幅所限,将分期刊载,以飨读者。

《进展》编辑组

二〇一四年十一月二十八日

鲎试验的干扰类型及消除方法

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

鲎的阿米巴细胞溶胞物含有丝氨酸蛋白酶,丝氨酸蛋白酶与革兰氏阴性细菌内毒素或真菌葡聚糖接触时依次被激活。丝氨酸蛋白酶是被研究最深入的蛋白水解酶的一组酶。作为一种酶,鲎试验需要最佳的激活条件,例如,适合的温度,pH值,离子强度等。不幸运的是,大多数药品的研制不是为了易于进行鲎试验,而是为了最大化患者的治疗效果,长期稳定性和短期(重组)稳定性。因此,许多药品产生一些超出最佳鲎试验范围的试验条件从而在鲎试验过程中表现出抑制或增强。

鲎试验抑制干扰会导致假阴性的结果。由于假阴性,某个样品含有内毒素,但此样品中的化学物质阻止 LAL 酶系统的激活结果不能观察到信号(出现凝胶或颜色)。从公众健康的角度来看,这是极其危险的。一个含有潜在热原的产品可能会被放行到市场中。FDA 和 USP 意识到假阴性的存在,因此在每个鲎试验中引入供试品阳性对照(PPC)。

增强会导致假阳性结果。由于假阳性,制药原料中不含有内毒素,但含有一种可以激活 LAL 酶系统的物质。从公众健康的角度来看,这并没有什么危害。然而,从制药企业的角度来看,这会造成经济损失,产品可能会被不必要地报废。

鲎试验实验室除了要面对酶抑制/增强作用对的问题外,同时也必须考虑内毒素的生物活性。必须谨记,内毒素本身是一个极其活跃的生物分子。体积和大分子结构是决定其生物活性极其重要的因素。影响内毒素结构的因素也可以对鲎试验产生抑制或增强作用。

本文将重点介绍一些对鲎试验产生干扰的因素。

抑制干扰

一些对鲎试验产生抑制作用比较常见的因素已经在表 9.1 中列出。同时也注明了对什么产生干扰(LAL 或是内毒素)。最后,表 9.1 举出一些可以克服干扰的最简单的方法。可以看到,经常使用

*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。

的方法是用细菌内毒素检查用水(LRW)来稀释供试品。

表 9.1 抑制鲎实验的物质

干扰因素	干扰对象/消除干扰方法
pH	LAL 干扰/用 LRW 或缓冲液稀释
渗透性	LAL 干扰/用 LRW 稀释
螯合剂	LAL 干扰/用 LRW 或含有 Mg^{2+} 的缓冲液稀释
Ca^{2+}	LAL 干扰/用 LRW 或 1mM EDTA 稀释剂稀释
酶抑制物	LAL 干扰/用 LRW 稀释或加热处理同时用 LRW 稀释
重金属	LAL 和/或内毒素干扰/用 LRW 或 1mM EDTA 稀释剂稀释
高浓度表面活性剂	LAL 和/或内毒素干扰/用 LRW 或生理盐水稀释
蛋白质	LAL 和/或内毒素干扰/用 LRW 或生理盐水稀释
脂质体	LAL 和/或内毒素干扰/用 LRW 或生理盐水稀释

在鲎试验中,用 LRW 稀释供试品来克服干扰是最常用而又是最重要的方法之一。供试品稀释通常是基于这样的事实,即所有的供试品有一个允许的内毒素水平,即内毒素限值。内毒素限值的概念和用于确定最大有效稀释倍数(MVD)或最低有效浓度(MVC)的计算,这些内容已经在第 5 章“计算内毒素限值,最大有效的稀释倍数和最低有效浓度”中提到。在任何鲎试验实验室中,用 LRW 来稀释供试品可以克服 90% 的鲎试验干扰问题。如果一种新原料或终产品在检测时出

现干扰,通常一开始都是用 LRW 稀释供试品。这是一种很简单而且经济的方法。

源于 pH 的抑制

鲎试验是一个酶反应系统。鲎试验反应混合物的 pH 会影响到激活酶的速度。目前统一 BET 法参考制造商的建议而不是一个比较宽的 pH 范围,例如 6 到 8 之间,这是最适合的,因为每个鲎试剂生产商的配方是不同的,每种试剂都会有自己的最佳反应条件。

当一个产品第一次进行鲎试验时,检测它的 pH 值是非常重要的。了解一些关于此产品的新原料配方也是同等的重要。了解产品的配方你就可以估计产品的可滴定酸度。含弱有机酸如醋酸、山梨酸、乳酸的中间产品或最终产品的配方会增加可滴定酸度。有机酸(或碱)的存在可赋予产品缓冲能力,即使刚用 LRW 稀释。

如果未经稀释的供试品的 pH 值在 LAL 制造商推荐的 pH 范围之外,那么下一步就要制备系列或者十倍(1:10)稀释的供试品溶液,最高为(但不能超过)MVD 或 MVC。如果已经稀释过的供试品的 pH 在鲎试剂供应商推荐的 pH 范围内,那么由于 pH 造成抑制是极不可能的。然而,如果已经稀释的供试品的 pH 在所推荐的 pH 范围之外,那么检测供试品和 LAL 的混合液的 pH 是非常重要的。经认证供应商的鲎试剂配方中可能已经包含蛋白酶和 pH 缓冲液可以中和供试品(或

已经稀释的供试品)的 pH。如果供试品和 LAL 混合液的 pH 在所推荐的范围之外,供试品的 pH 需要通过添加酸或碱或通过使用缓冲稀释液来中和。

有机酸比如 Tris(三羟甲基氨基甲烷缓冲液)或 Hepes(羟乙基哌嗪乙硫磺酸)普遍用于鲎试验实验室。LAL 缓冲液例如 Tris 或 Hepes 可以从所有经过认证的 LAL 供应商购买。各个供应商提供的不同 LAL 缓冲液的浓度和 pH 范围有所不同,他们的 LAL 缓冲液都是设计与他们的试剂配套使用的。Tris 和 Hepes 缓冲液也可以独立配制。在使用前,独立配制的缓冲液应该有一个引入的内毒素限值和一个配制缓冲液细节和内容的 SOP。鲎试验实验室常用的缓冲液浓度范围为 25 到 100mM。

使用缓冲稀释液可以为鲎试验提供很多优势。最显著的优势就是中和供试品本身。然而,除了酸碱中和作用外,缓冲液的使用可以赋予鲎试验方法必需的一致性和稳健性。在图 9.1 中显示了鲎试验方法必需的一致性和稳健性。

如图 9.1,柠檬酸作为一种原料来检测。引入说明书中的原料内毒素限值限制了用 LRW 来稀释有机酸的倍数。可以看到,必须用 1N NaOH 来调整 pH 值。在 LRW 中添加 NaOH 必须精确。在这个例子中肯定需要重复滴定。为了达到一个大约 7.2 的目标 pH 值,1N NaOH 的体积量将介于 2.8ml 和 3.0ml 之间。然而,用

50 mM Hepes 缓冲液替代 LRW 去稀释,可为 LAL 反应混合液关键的 pH 值范围 7.0 到 7.5 提供额外的缓冲能力。增加的缓冲能力为鲎试验方法提供了稳健性,并且减少了检验员的制备误差。

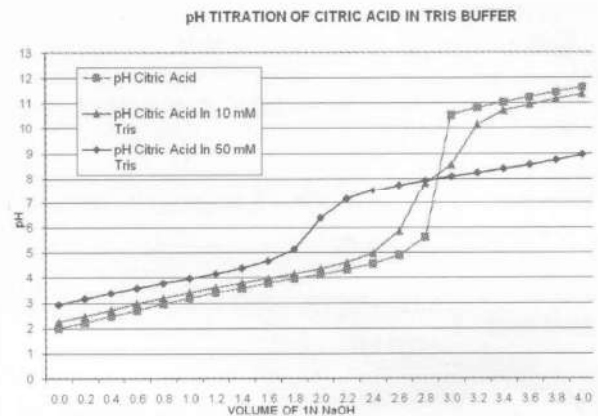


图 9.1 柠檬酸的 pH 滴定

源于高渗透性的抑制

高浓度的盐或糖常常抑制鲎试验反应。这些物质的抑制视浓度而定,在任何 BET 方法中都可看到。浓度为 70%、50% 的葡萄糖溶液等等会对鲎试验产生抑制。对于这些产品,葡萄糖浓度太高,理论上,会将 LAL 蛋白质中的水分子脱出,从而使蛋白质变性。对于浓度为 5% 甚至是 3% 的 NaCl 来说也是同样的道理。一般来说,如果在给病人注射前,终产品需要稀释,那么在进行鲎试验前也需要稀释。

源于螯合剂的抑制

螯合剂是一种可与某些金属离子结合的可溶性复合物。这样它们阻止金属离子的激活以致不能正常地与其它分子、

元素或 LAL 中的蛋白质产生反应。在制药工业上,螯合剂是相当普遍的,比如柠檬酸、柠檬酸钠或 EDTA 都可以在生产半成品缓冲液甚至是在最终产品配方中找到。柠檬酸和 EDTA 绑定二价离子比如 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 。对于鲎试验来说 Mg^{2+} 是一个重要的辅助因子,经认证的 LAL 制造商的所有 LAL 配方中都包含有 Mg^{2+} 。缺少 Mg^{2+} ,内毒素不能激活鲎试剂。供试品中的螯合剂会绑定 Mg^{2+} ,因此阻止内毒素激活鲎试剂。

为了克服螯合剂的抑制,可以用 LRW 对供试品进行稀释,或者用含有 50mM Mg^{2+} (例如 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$) 的缓冲液对供试品进行稀释。

回到上面所提到的柠檬酸原料的例子,为了鲎试验成功,Hepes 缓冲液必须含有 50mM Mg^{2+} 。在这种情况下,Hepes 提供了缓冲能力,同时,添加的 Mg^{2+} 满足了柠檬酸的螯合需求。

源于配方中含有 Ca^{2+} 的抑制

谨防含有 Ca^{2+} 的产品! Ca^{2+} 对鲎试验有非常强烈的抑制作用。有趣的是,对于内毒素激活鲎试剂来说, Mg^{2+} 是一个重要的辅助因子,而 Ca^{2+} 是一个抑制因子。 Ca^{2+} 的强烈抑制作用的确切的机理尚不明确,在这里只是推断。

我们知道,在很多酶系统机制里, Ca^{2+} 起着十分重要的作用。例如,钙调蛋白和类钙调蛋白磷酸二酯酶,都被 Ca^{2+}

激发,它们参与多种细胞调节过程,如肌肉收缩,炎性反应,和神经反应。据报道,阿米巴细胞溶解物束缚内毒素绑定的蛋白共享某些钙调蛋白生物特性的并表现出依赖 Ca^{2+} 的激活。鲎内毒素绑定蛋白表现为一个初始内毒素受体,并激发腺苷酸环化酶(cAMP)。通过依赖 Ca^{2+} 性机制激活 cAMP 表明,在 LAL 的基本原料阿米巴细胞溶解物中也可能会出现其他的调节过程。

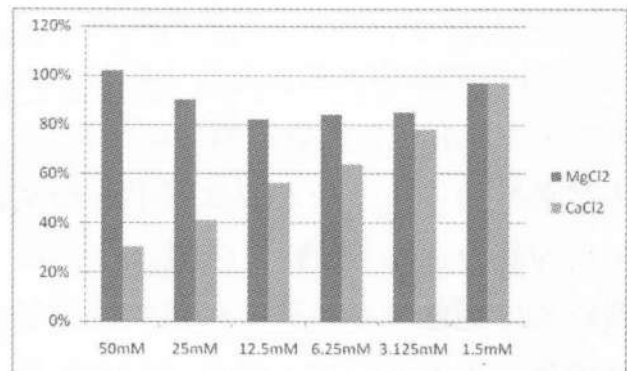


图 9.2 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$ 溶液的回收率

图 9.2 描述了一个实验,检测两种简单的无机溶液 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$ 的回收率。这两种无机溶液的物理化学性质(pH,离子强度)完全一样。然而,对 LAL 的抑制作用正好是互为相反的。

从图中可以看到,即使在 50mM 这样一个最高检测浓度, $MgCl_2$ 对 LAL 也没有抑制作用。而在另一方面 $CaCl_2$ 从 50mM 直到 6.25mM 的这些浓度,表现出强烈的抑制作用。在浓度大约为 3.125mM 时, $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 的回收率基本一致。

含有 CaCl_2 并表现出抑制的供试品必须通过稀释来克服 Ca^{2+} 的抑制作用。如果你发现稀释到 MVD 都解决不了问题,不能再进一步稀释,那么考虑使用低浓度的螯合剂,比如 EDTA。螯合剂的浓度应限制在大约 1mM 左右,使得 Mg^{2+} 可以激活 LAL。

源于蛋白酶抑制物的抑制

制药工业中,用人的血浆生产的产品(人血清白蛋白,静脉注射免疫球蛋白 G 等等)生产时是以人的血浆作为原料。人的血浆中含有丝氨酸蛋白酶抑制剂,阻止内毒素激活 LAL。在人的血浆中一些常见的抑制物是 α -1 抗胰蛋白酶, α -2 巨球蛋白和抗凝血酶 III。灭活血浆中的抑制物的最简单的方法之一就是,用 LRW 稀释 10 倍,然后在 $70 \pm 2^\circ\text{C}$ 下加热 10 分钟。

源于重金属的抑制

许多金属,如铝、铁和锌在鲎试验实验室可以经常看到。大多时候,它们包含在治疗性大分子的配方中。某些时候,因为疏忽它们成为污染物被带入,从容器和试验设备滤出。无论哪种方式,由于酶的干扰作用或是通过改变内毒素自身的结构,都会对鲎试验产生抑制作用。

金属是生命中必不可少的元素。例如,人体中包含大分子的金属,包括有铁(铁传递蛋白和血红蛋白),锌(碳酸酐酶),铜(肝铜蛋白)。有机金属化合物被

广泛使用。例如,Cisplatin(含铂化合物)是使用最广泛的抗癌药物之一。聚合锌作为抗艾滋病药物使用。含聚合物的金属越来越多地被用作合成药物制剂的运载工具。这些聚合物可能会干扰 LAL 的酶系统。重金属盐可以与蛋白质发生反应并形成一种不可溶的金属蛋白复合物从而使蛋白质变性。这种反应的一个实际例子,就是使用 AgNO_3 防止新生儿眼睛淋病感染。另一个例子是有机汞盐如硫柳汞,硫柳汞被用作伤口抗菌素和作为疫苗制剂的防腐剂。有趣的是,当出现急性重金属中毒时会利用重金属与蛋白质反应的性质的逆作用解毒。在这种情况下,让可能吞下了相当数量重金属的人在诱导呕吐之前服用一些蛋白质,比如牛奶或鸡蛋清,作为一种解毒剂。在 LAL 实验室,这个道理同样可以用来克服源于重金属的抑制。如果某产品中的重金属对鲎试验产生干扰,稀蛋白稀释剂如临床级别的 HSA(人血清白蛋白)可以作为一种稀释剂来稀释样品。添加的蛋白可以绑定重金属盐从而中和鲎试验中的干扰。推荐使用浓度为 0.1% (W/V) 的蛋白稀释剂。

铁盐也可以来自不锈钢或铁容器的过滤。另一方面,铝常常来自于日常 LAL 设备检测的不锈钢针容器。这两种金属盐对内毒素的体积和结构产生干扰。据报道,锌、铜、铁、铝盐可以降低国家参考标准品的活性。有趣的是,它们对使用的

工作标准品制剂影响却少有报道。

度为 1mM 的 EDTA。

如果遇到重金属对鲎试验产生干扰的情况,推荐使用稀蛋白稀释剂,螯合剂以及磷酸缓冲液。再次强调,推荐使用浓

(李树徐译 刘少燕校审)

生物止血流体膜的细菌内毒素检查法研究

陈伟江(湛江安度斯生物有限公司)

摘要目的:建立生物止血流体膜的细菌内毒素检测(BET)方法。**方法:**通过实验验证生物止血流体膜对细菌内毒素检查有增强作用,其干扰来源于葡聚糖与供试品本身黏性,提出在使用抗增液或特异性鲎试剂以消除供试品中存在的葡聚糖类物质造成的增强干扰同时,选择显色法鲎试剂进行检测,以消除由于供试品高黏性引起的促凝作用。**结果:**选择具有内毒素特异性的动态显色法试剂对供试品进行检测可以有效消除供试品对 BET 的干扰。**结论:**生物止血流体膜可以建立细菌内毒素检查方法。

关键词:生物止血流体膜;细菌内毒素检查;葡聚糖问题;供试品促凝作用

生物止血流体膜是一种用于手术切口、创面及外伤创面的冲洗,起到辅助止血的作用,促进创面愈合的产品,其组分中含有氧化纤维素、海藻酸钠、氯化钠等,且黏性较高。在进行 BET 时,发现其存在明显的增强作用,而且其增强作用的来源并不单一。本文对该供试品 BET 方法进行探讨浅析,现将实验方法及研究过程介绍如下,以供参考。

1 实验材料

1.1 供试品(S):生物止血流体膜:50mL;批号:20140804;内毒素内控限值(L)为 0.5EU/mL。

1.2 凝胶法鲎试剂:湛江安度斯生物有限公司产品

批号:1407042、灵敏度(λ):0.125EU/mL;规格:0.5mL/支;

批号:1409050、灵敏度(λ):0.06EU/mL;规格:1.2mL/支;

批号:1311282、灵敏度(λ):0.03EU/mL;规格:1.25mL/支;

批号:1405090、灵敏度(λ):0.015EU/mL;规格:1.25mL/支。

1.3 动态显色法鲎试剂:批号:1312260;检测范围:50-0.005EU/mL;规格:1.25mL/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

1.4 葡聚糖检测鲎试剂:批号:1401092;检测范围:500-10pg/mL;规格:0.25mL/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

1.5 细菌内毒素检查用水(W):批号:1407210;规格:100mL/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

1.6 细菌内毒素参考标准品(RSE):批号:200707;效价:10000EU/支;中国食品药品检定研究院产品。

1.7 (1-3)- β -D 葡聚糖标准品:批号:1303141;效价:3750pg/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

1.8 抗增液:批号:1406110;规格:

0.6mL/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

1.9 超级酶标仪:型号:ELx808IU;美国 BioTek 公司。

1.10 动态试管检测仪:型号:LKM-02-32;英国 Lab Kinetics 公司。

2 实验方法与步骤:

2.1 灵敏度复核试验:根据中国药典2010 版附录 XI E 细菌内毒素检查法,复核实验所用鲎试剂的灵敏度测试值 λ_c 是否在其标示灵敏度 λ 的可接受范围内,结果见表一。

表一 凝胶法鲎试剂灵敏度复核试验

试剂批号	λ	内毒素浓度(EU/mL)							NC	λ_c
		0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075	0.003		
1407042	0.125	++++	++++	-----	-----				--	0.125
1409050	0.06		++++	++++	-----	-----			--	0.06
1311282	0.03			++++	++++	-----	-----		--	0.03
1405090	0.015				++++	++++	++++	-----	--	0.0075

2.2 供试品最大有效稀释倍数(MVD)的计算:供试品的内毒素内控限值为0.5EU/mL,其对应 $\lambda = 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015$ EU/mL 的 MVD 见表二:

表二 供试品最大有效稀释倍数(MVD)

λ (EU/mL)	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
MVD(倍)	1	2	4	8	16	32

2.3 供试品干扰初筛试验:鲎试剂灵

敏度可以在0.5-0.015EU/mL之间任意选择,本实验选择 $\lambda = 0.015$ EU/mL 的鲎试剂进行实验。

2.3.1 内毒素标准品(溶液C)的制备:将RSE稀释至所需的 $4\lambda, 2\lambda$ 浓度,浓度分别为0.06EU/mL、0.03EU/mL,记为 $E_{0.06}$ 和 $E_{0.03}$ 备用。

2.3.2 供试品溶液(溶液A)的制备:将供试品溶液原液稀释至2、4、8、16、32

倍,分别记为 S_2 、 S_4 、 S_8 、 S_{16} 、 S_{32} 。

记为 $S_2E_{0.03}$ 、 $S_4E_{0.03}$ 、 $S_8E_{0.03}$ 、 $S_{16}E_{0.03}$ 、 $S_{32}E_{0.03}$ 。

2.3.3 供试品阳性对照(溶液 B)的制备:将供试品原液至 16 倍稀释液与 4λ 浓度内毒素标准品等比混合的方法制备含有 2λ 浓度内毒素的供试品阳性对照,

2.3.4 反应测试:用鲎试剂分别与 A、B、C、D(D 为细菌内毒素检查用水)溶液分别反应,结果见表三。

表三 凝胶法干扰初筛试验 1

反应项目	A					B					C	D
	S_2	S_4	S_8	S_{16}	S_{32}	$S_2E_{0.03}$	$S_4E_{0.03}$	$S_8E_{0.03}$	$S_{16}E_{0.03}$	$S_{32}E_{0.03}$	$E_{0.03}$	W
结果	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--

2.3.5 依照 2.3.1 至 2.3.4 方法,将供试品稀释倍数扩大至 512 倍重新进行测试,结果见表四。

表四 凝胶法干扰初筛试验 2

反应项目	A					B					C	D
	S_{32}	S_{64}	S_{128}	S_{256}	S_{512}	$S_{32}E_{0.03}$	$S_{64}E_{0.03}$	$S_{128}E_{0.03}$	$S_{256}E_{0.03}$	$S_{512}E_{0.03}$	$E_{0.03}$	W
结果	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	--

2.4 供试品中葡聚糖含量测试。

倍,记为 S_2 、 S_4 、 S_8 、 S_{50} 、 S_{250} 。

2.4.1 葡聚糖标准品制备:将(1-3)- β -D 葡聚糖标准品稀释制备成 100pg/mL 溶液,作为对照,记为 STD100。

2.4.3 使用特异性葡聚糖检测试剂在动态试管仪进行检测,分抗增液组与无抗增液组,结果见表五。

2.4.2 将供试品稀释 2、4、8、50、250

表五 供试品葡聚糖含量检测

反应项目	STD100	S_2	S_4	S_8	S_{50}	S_{250}	对照组
结果	93.0	<5	<5	22.9	250.3	>500	无抗增液组
Pg/mL	<5	<5	<5	<5	<5	<5	抗增液组

注:标准曲线范围 5 ~ 500pg/mL;检测结果为稀释液的检测值。

2.5 供试品干扰初筛试验(使用抗增液)

0.125、0.06、0.03、0.015EU/mL 的鲎试剂对供试品进行干扰初筛试验,试剂使用抗增液复溶。

2.5.1 使用四个批次,灵敏度分别为

2.5.2 依照 2.3.1 至 2.3.4 的方法制 溶液。

备与所用鲎试剂灵敏度相适应的 A、B、C

2.5.3 实验结果见表六。

表六 三批试剂的供试品干扰初筛试验

试剂批号	λ	A								B	C	D
		S ₄	S ₈	S ₁₆	S ₃₂	S ₆₄	S ₁₂₈	S ₂₅₆	S ₅₁₂	PPC *	E ₂ λ	NC
1407042	0.125	++	++	++	++	+-	--			++	++	--
1409050	0.06		++	++	++	--	--			++	++	--
1311282	0.03		++	++	++	--	--	--	--	++	++	--
1405090	0.015				++	++	--	--	--	++	++	--

注:PPC 包含了溶液 A 所对应浓度的供试品阳性对照,不同批次的溶液 B 浓度不同,其结果均为阳性。

2.6 动态显色法干扰初筛试验

2.6.3 标准曲线信息见表七,供试品

2.6.1 建立标准曲线浓度为 1、0.1、

检测结果见表八。

0.01EU/mL,供试品的最大有效稀释倍数
依照公式

表七 鲎试剂与溶液 C、D 反应结果

计算: $MVD = cL/\lambda = 1\text{mL}/\text{mL} \times 0.5\text{EU}/\text{mL} \div 0.01\text{EU}/\text{mL} = 50(\text{倍})$

内毒素浓度 (EU/mL)	1	0.1	0.01	0 (溶液 D)
平均反应时间 (s)	574	1002.5	1848.5	>3600

2.6.2 本实验供试品浓度选择为 2

倍、4 倍、8 倍三个浓度。

表八 动态显色法供试品干扰初筛试验结果

供试品 检测浓度	A			B		
	平均反应时间(s)	检测值	原液浓度	平均反应时间(s)	λm	回收率
S ₂	1015.5	0.102 EU/mL	0.204 EU/mL	829	0.1	124.8%
S ₄	1225.5	0.049 EU/mL	0.195 EU/mL	900	0.1	115.5%
S ₈	1466.5	0.024 EU/mL	0.192 EU/mL	947.5	0.1	110.1%

3 讨论

阳性,其内毒素含量计算值 >8EU/mL,大

3.1 从表三和表四的干扰初筛试验
结果分析,该供试品的溶液 A 系列全部呈

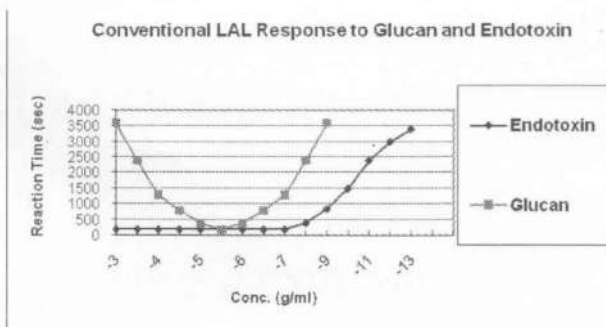
于供试品的限值 0.5EU/mL。因为供试
品的组分中含有氧化纤维素、海藻酸钠,

这些组分均是常见的葡聚糖类物质的来源,该供试品经热原检测合格,因此怀疑供试品存在葡聚糖的增强干扰问题。

鲎试剂中存在两条反应途径:其一为C因子--B因子--凝固酶原反应途径(C因子途径),由细菌内毒素激活;而另一为G因子--凝固酶原反应途径(G因子途径),由(1-3)- β -D葡聚糖和(1-4)- β -D葡聚糖激活。

其反应特性见图1,图中以供试品(内毒素标准品或葡聚糖标准品)浓度为横轴,单位为mg/mL,以反应时间为纵轴,单位为秒。鲎试剂与内毒素反应时,随内毒素的浓度减少,所需反应时间增加,呈负相关关系;而鲎试剂与葡聚糖反应时,供试品浓度与相应反应时间呈抛物线变化,当葡聚糖含量非常小或非常大时,鲎试剂反应性很弱,但在特定浓度区间,鲎试剂的反应性相对较高。

图1 常规鲎试剂与葡聚糖和内毒素的反应



3.2 使用已封闭C因子途径的特异性葡聚糖检测鲎试剂对供试品进行检测,从表五的结果分析,供试品中检测出葡聚糖,且随着稀释倍数的加大,该葡聚糖的

反应活性随之加大。符合鲎试剂与葡聚糖反应的规律。

从抗增液对照组分析,所有反应项目均无反应,表明抗增液起到了阻断G因子反应途径的作用,可有效抑制葡聚糖类物质的干扰作用。

3.3 从表六的结果分析,使用抗增液阻断供试品中葡聚糖的反应后,供试品溶液A的反应终点为64倍,计算浓度为1EU/mL,相比未使用抗增液(表四)的对照组(内毒素 > 8EU/mL)已显著下降。从四个不同批次的结果分析,其内毒素检测结果为5.6至1EU/mL,呈现出使用试剂灵敏度越低其检测结果越高的趋势。分析各灵敏度试剂的反应终点浓度的几何平均值,均在32至64倍之间。因为该供试品存在较大的黏性,可能对凝胶的形成起促凝的作用,因此该阳性结果可能是假阳性结果。

3.4 表七和表八是使用动态显色法鲎试剂对生物止血流体膜检测的结果,该动态显色法鲎试剂具备内毒素特异性,不与葡聚糖类物质反应,且反应原理是基于检测显色底物的生成,影响凝胶形成的干扰因素对显色法的影响较小。

对表七的内毒素浓度(C)数据与反应时间(T)数据作回归分析,得标准曲线方程 $LgT = 2.755 - 0.254LgC$,其相关系数绝对值 $|r| = 0.9996 > 0.980$,且阴性对照反应时间 > 标准曲线最低浓度反应时间,试验有效。表八的测试结果显示,

供试品的 2、4、8 倍稀释液回收率分别为 124.8%、115.5%、110.1%，符合无干扰条件，内毒素原液浓度分别为 0.204、0.195、0.192 EU/mL。依照表六的凝胶法终点反应浓度进行计算，其 32 倍至 64 倍稀释液内毒素含量约为 0.00625 至 0.00313 EU/mL，上述任何一种灵敏度的鲎试剂都不应该在此浓度产生阳性。因

此，凝胶法的阳性结果应该是由于供试品具有的促凝作用导致的。

3.5 综上所述，生物止血流体膜可以使用细菌内毒素检查法进行检测；本研究推荐使用动态显色法鲎试剂对样品的 8 倍稀释液作内毒素检测，供试品对试验无干扰。

BET 培训班信息

新版 GMP 以及即将发行的 2015 版《中国药典》都增添了药品生产过程质量控制的内容和要求。细菌内毒素和热原是药品及医疗器械生产过程需要重点监控的对象。为满足企业的需求，我公司拟在 2015 年第二季度举办多期“BET 技术在生产监控上的应用培训班”，主要培训内容如下：

- BET 基础知识
- 光度法 BET 技术
- 快速 BET 技术
- 生产过程的内毒素监控

培训班每期两天，具体开班时间及地点待定。有兴趣参加培训者敬请关注后续信息。

湛江安度斯生物有限公司

2014 年 11 月 28 日