

# 试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 1999年第1期(总第4期)

1999年1月18日

## 目 录

### ·学术交流·

- 动态比浊法定量检测复方丹参注射液中的细菌内毒素..... (2)
- 抑肽酶的动态比浊法鲎试验验证..... (7)

### ·专题讲座·

- 定量鲎试验法的原理及其应用..... (10)

### ·新产品介绍·

- 新一代内毒素定量测定系统——EDS-98..... (12)
- 动态比色法鲎试剂..... (19)

### ·法规的理解与讨论·

- XIE. 细菌内毒素检查法(98年9月药典会修订稿)..... (22)

### ·简 报·

- Forster T. Jordan 在中检所举办的《定量法鲎试验》学习班上答疑选编..... (24)

### ·产品介绍·

- 美国 Endosafe® 公司鲎试剂系列产品..... (26)
- 美国 Bio-Tek 公司 ELx808 型生化测定仪... (27)
- EDS 系列内毒素测定系统..... (28)

### ·其 它·

- 学习班消息..... (18)
- 第二批国家参考鲎试剂启用..... (23)

### 致读者:

全世界在经济动荡中度过了1998年,人们怀着希冀的心情平静地迎来了本世纪的最后一年——1999年。我们衷心祝愿大家在新的一年里万事如意!

鲎试剂的应用技术仍在不断地发展进步。如同内毒素检查法呈取代热原检查法的趋势一样,内毒素定量检测技术的应用已在与限量检查的应用并驾齐驱,并且大有成为主流方法的趋势。据资料显示,美国在1992年以前鲎试剂应用的方法还是以凝胶限量检查法为主,但今天应用定量检查方法的比例已超过60%。在日本,定量检查法技术的应用已达到70%。我们惊喜地发现,中国近几年来,内毒素定量检查技术的应用已在悄然崛起,越来越多的鲎试剂用户在学习、研究和应用这种技术。为了适应鲎试剂应用技术发展的形势,本期《进展》专刊介绍细菌内毒素定量检测的方法、相关仪器及其应用,希望能对读者了解这一技术有所帮助。

按计划本期《进展》应在去年的第四季度与读者见面,但因故拖延至现在才出刊,我们特此向各位读者致歉!

《进展》编辑部

1999年元月8日

# 动态比浊法定量检测复方丹参注射液中的细菌内毒素

苑庆华 孙淑莲 叶志 唐元泰

(天津市药品检验所 300070)

Application of the Kinetic Turbidimetric Limulus test for  
injectio Salviae Miltiorrhizae composita

Yuan Qinghua, Sun Shulian, Ye Zhi and Tang Yuantai

Drug Administration of Tian Jin

98 Guizhou Road Tian Jin China 300070

We applied the kinetic turbidimetric technique to the detection of bacterial endotoxin in injectio Salviae Miltiorrhizae composita and compared the LAL-test with the rabbit pyrogen test. In the present study: the inhibitory effect was not shown when the gel-clot or Kinetic Turbidimetric techniques were applied. So far as endotoxin-specific TAL reagents which do not show a false-positive reaction with (1—3)  $\beta$ -D-Glucan are used, a definite correlation was found between the results with the two LAL test methods. Results of the LAL Tests showed a significant correlation with that of the rabbit pyrogen test. These results suggest that the LAL-test could be used as an alternative method for the rabbit pyrogen test to injectio Salviae Miltiorrhizae composita

Keywords: Tachypleus amebocyte lysate, rabbit pyrogen test, Kinetic Turbidimetric technique, injectio Salviae Miltiorrhizae composita

**提 要:** 本试验采用测定细菌内毒素的凝胶和动态比浊两种方法的测定分析, 解决了复方丹参注射液在 MVC 时对鲎试剂反应的干扰作用。通过对内毒素的添加干扰试验以及与热原检查法的结果对比分析。认为该样品可用动态比浊法进行定量检测。

**关键词:** 复方丹参注射液 MVC 干扰试验 热原检查 细菌内毒素 动态比浊法

细菌内毒素检查法也称为鲎试验法, 按与内毒素反应机理的不同, 可分为半定量的凝胶法 (gel-clot technique) 和定量的动态比浊法及比色法 (turbidimetric and colorimetric technique)。所谓动态比浊法即根据测定到达事先设定反应液的浊度变化 (透过光量比) 值所需要的时间 ( $T_g$ ) 的一阶对数值与细菌内毒素浓度的对数值成反比例关系, 而进行定量检测的一种体外分析方法<sup>(1)</sup>。目前在国外的应用已十分普遍, 尤其在药品生产的中控阶段使用率占到 80% 左右, 我国在定量动态比浊法方面的研究虽说才刚刚起步, 但已开发出了动态比浊仪和国产高灵敏度 TAL 试剂, 关于用动态比浊法检测注射剂中的内毒素报告国内还很少

见, 现使用北京金山川科技发展有限公司生产的动态比浊仪 EDS-96, 对复方丹参注射液中的内毒素进行动态比浊法检验方法的研究, 试验方法参照 FDA (1987) 年颁布的《人用, 兽用药品和生物制品以及医疗器械的细菌内毒素试验指南》<sup>(2)</sup> 1991 年《人用, 兽用药品和生物制品内毒素试验的暂行规定》<sup>(3)</sup> 以及 JP13 改正<sup>(4)</sup> 上记载的方法进行, 结果如下:

## 一、试验材料及仪器:

1、鲎试剂 (TAL): Lot No.971031  $\lambda = 0.25$  EU/ml 规格 0.5ml/支

湛江安度斯生物有限公司

2、鲎试剂 (TAL): Lot No.960520  $\lambda = 0.25$  EU/ml 规格 0.5ml/支

厦门鲎试剂厂

3、鲎试剂 (TAL): Lot No.960413  $\lambda = 0.03$  EU/ml 规格 0.5ml/支

湛江海洋生物制品厂

4、鲎试剂 (TAL): Lot No.970813  $\lambda = 0.5$  EU/ml 规格 0.5ml/支

湛江海洋生物制品厂

5、鲎试剂 (TAL): Lot No.980108  $\lambda = 0.5$  EU/ml 规格 0.5ml/支

福建东方鲎试剂厂

6、鲎试剂 (TAL): Lot No.971117  $\lambda = 0.06$  EU/ml 规格 0.1ml/支

福建东方鲎试剂厂

7、鲎试剂 (TAL): Lot No.K4891L  $\lambda = 0.03$  EU/ml 规格 5.2ml/支

湛江安度斯生物有限公司

8、细菌内毒素国家参考标准品 Lot No.981 (9000 EU/Amp)

中国药品生物制品检定所

5、细菌内毒素检查用水 Lot.No.Lot1 规格 10ml/Amp

中国药品生物制品检定所

6、复方丹参注射液 Lot No.980112 971106 980114 980115 共 4 批

规格 (1 g/ml) 2ml/支 北京第四制药厂提供

7、复方丹参注射液 Lot No.9508072 河南省信阳大别山制药厂

8、动态比浊仪 EDS-96 北京金山川科技发

表一

不同厂家的 TAL 试剂对同一批号样品的干扰试验

展有限公司

二、试验方法与结果:

1、鲎试剂标示灵敏度的复核

以上各批鲎试剂 (TAL) 经用细菌内毒素国家参考标准品 Lot No. 981 标定结果灵敏度均在  $0.5 - 2\lambda$  之间, 故符合规定。

2、样品细菌内毒素限值的确立:

复方丹参注射液的细菌内毒素限值按  $L = K/M$  计算, 其中  $K = 5.0\text{EU/kg}$  M 为家兔剂量, 但由于各地区的热原标准不同, 因此本次试验按高剂量  $1.0\text{ml/kg}$  进行计算, 其内毒素限值 L 为  $5\text{EU/ml}$ , 由于所用 TAL 试剂的灵敏度  $\lambda$  在  $0.5\text{EU/ml} - 0.03\text{EU/ml}$  之间, 则样品的最大有效稀释倍数  $MVD = L * C/\lambda$  为 10 倍—160 倍。

3、凝胶法的干扰预试验

将复方丹参注射液首先按最大有效稀释倍数 10 倍至 160 倍, 使用细菌内毒素溶解水进行 2 倍稀释, 使其最终稀释倍数分别为 10、20、40、80、160, 然后按所用 TAL 试剂的灵敏度不同, 在其中分别添加  $2\lambda$  的细菌内毒素, 具体操作如下: 细菌内毒素国家参考标准品 Lot No 981. 用溶解水稀释成  $4\lambda$  浓度的内毒素溶液, 分别和  $1/2\text{MVD}$  浓度的样品稀释液进行等体积混合, 使其最终添加浓度为  $\text{MVD}/2\lambda$ , 然后分别用不同厂家的 TAL 试剂进行干扰预试验。并同时设立阳性和阴性对照管。结果见表一:

TAL 试剂 Lot No.	最大有效稀释倍数及内毒素添加液										PC	NC
	10	10/2 $\lambda$	20	20/2 $\lambda$	40	40/2 $\lambda$	80	80/2 $\lambda$	160	160/2 $\lambda$		
971031 0.25EU	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
960520 0.25EU	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
970813 0.5EU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
980108 0.5EU	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-

以上结果表明：复方丹参注射液在 10 - 40 倍间对细菌内毒素反应有抑制作用，而把样品稀释到 80 倍以上时即可排除干扰。另外，经过对其它 2 个样品的试验结果也得出相同的结论。因此在正式试验时，根据所用 TAL 试

剂的不同，需将样品进行 80 或 160 倍稀释，然后使用灵敏度为 0.06EU/ml 或 0.03EU/ml 的鲎试剂。以下使用灵敏度为 0.06EU/ml 的 TAL 试剂，对 5 批复方丹参注射液进行内毒素检查，结果见表二：

表二 使用 0.06EU/ml 的 TAL 试剂的检查结果

样品	980112		980114		980115		971106		9508072		PC	NC
	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ		
Lot No	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ	80	80/2λ		
971117	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
0.06EU	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

4、动态比浊法预试验：

A：标准曲线确定：

用内毒素检查用水对细菌内毒素国家参考标准品 Lot No 981 进行 10 倍和 2 倍稀释，使其细菌内毒素最终浓度在 0.5EU/ml—0.0075EU/ml 之间，然后使用动态比浊仪进行检测，其中每一浓度作 2 管，并同时作阴性对照，试验数据按最小二乘法进行统计分析，所用 TAL 试剂为湛江安度斯 Lot No. K4891L λ = 0.03EU/ml 规格 5.2ml/支。其标准曲线为： $\text{Log } T = 2.85036 - 0.30367 \text{ Log } C$  细菌内毒素浓度范围在 0.5EU/ml—0.0075EU/ml 之间，反应时间在 910sec—3150sec，其相关系数的绝对值  $|r| = 0.99612 > 0.980$ ，而且阴性对照管未出现反应信号，故标准曲线成立。

B：干扰因子试验

由标准曲线知道：最小内毒素浓度  $\lambda_1$  为 0.0075EU/ml，最高内毒素浓度  $\lambda_n$  为 0.5EU/ml，其中添加内毒素浓度的中央值 M，按照公式计算为  $\text{Log } M = (\text{Log } \lambda_1 + \text{Log } \lambda_n) / 2$  计算，而稀释倍数为  $\text{MVD} = C * L / M$ ，根据计算 MVD 和添加内毒素浓度的中央值 M 的对应关系如下所示：

20 倍/0.25    40 倍/0.125    80 倍/0.06  
160 倍/0.03

分别对复方丹参注射液和细菌内毒素国家参考标准品 981 进行稀释，并按上述浓度要求在不同的 MVD 下添加细菌内毒素的 M 浓度值，具体操作分别取上述 2MVD 的溶液浓度和 2M 的内毒素浓度进行等体积混合即可。试验方法按以下表格进行。

反应液	添加浓度	稀释液	反应管数
A	MVD 液	溶解水	2 管以上
B	MVD/M	样品液	2 管以上
C	$\lambda_1$ 、3 浓度以上	溶解水	2 管以上
D	阴性对照	溶解水	2 管以上

其中 C 液统计出的细菌内毒素标准曲线必须和预试验的结果相似, 且相关系数必须在 0.980 以上。

B 液: 由 C 液标准曲线计算出的细菌内毒素浓度值减去 A 液的细菌内毒素浓度值, 除

以添加内毒素浓度中央值 M, 计算回收率。其回收率必须在 50 - 200% 范围内, 而且 A 液的细菌内毒素浓度值要小于添加内毒素浓度 M 值。结果见表三、表四所示:

表三 对 980114 在不同 MVD/M 下的回收率

样 品	MVD/M	A (EU/ml)	B (EU/ml)	回收率 (%)
980114	20/0.25	0.0302	0.2001	67.96%
	40/0.125	0.0103	0.1670	125.4%
	80/0.06	0.0043	0.1013	161.7%
	160/0.03	0.0020	0.0464	148.0%

其中 C 液  $\text{Log } T = 2.85036 - 0.30367 \text{ Log } C \quad \gamma = -0.99612$

表四 对 980115 在不同 MVD/M 下的回收率

样 品	MVD/M	A (EU/ml)	B (EU/ml)	回收率 (%)
980115	20/0.25	0.2804	0.1898	-36.24%
	40/0.125	0.0167	0.1325	92.64%
	80/0.06	0.0047	0.0909	143.67%
	160/0.03	0.0021	0.0523	167.33%

其中 C 液  $\text{Log } T = 2.83851 - 0.31566 \text{ Log } C$   
 $\gamma = -0.9909$

由以上试验结果可以发现: 样品溶液在 40 - 160 倍时无干扰作用, 在 20 倍时由于反应液出现部分沉降现象, 以致回收率偏低而表现出抑制作用。而对于 160 倍, 由于测定浓度在标准曲线的最低检测线外, 故也不易采用, 因

此在正式试验时以 40 或 80 倍稀释进行检测。

C: 定量检查:

根据以上干扰试验结果对复方丹参注射液以 40 倍稀释液进行定量检测为妥, 一是样品液中的内毒素浓度在测定范围以内, 而且反应时间短, 回收率重复性高, 以下对 5 批样品进行定量检测, 结果见表五所示:

表五 对 5 批复方丹参注射液在 40/0.125 下的定量结果

样 品	MVD/M	A (EU/ml)	B (EU/ml)	回收率 (%)	结 果
971106	40/0.125	0.4376	0.5058	54.56%	不合格
980112	40/0.125	0.0086	0.1619	122.64%	合 格
980114	40/0.125	0.0103	0.1670	125.36%	合 格
980115	40/0.125	0.0167	0.1325	92.64%	合 格
9508072	40/0.125	0.1341	0.3283	155.36%	不合格

注: C液  $\text{Log } T = 2.83851 - 0.31566 \text{ Log } C$   
 $\gamma = -0.9909$  而且 A 液的细菌内毒素浓度值在小于添加内毒素浓度 M 值时, 则判为合格, 反之则不合格。

### 5、动态比浊法、凝胶法检查结果以及热

原检查结果的对比分析:

对上述 5 批样品分别进行热原检查, 其家兔剂量按 1.0ml/kg, 即和样品的细菌内毒素限值相对应, 检查结果与动态比浊法和凝胶法的检查结果进行对比分析, 以考查三者之间的一致性。结果见表六:

表六 比浊法、凝胶法结果和热原检查结果的对比分析

方法	Turbidimetric Assay	Gel-Clot technique	Pyrogen Test
样品	40/0.125C (EU/ml)	80 倍 ( $\lambda = 0.06\text{EU/ml}$ )	1 倍 (1.0ml/kg)
971106	0.4376	+	不合格
980112	0.0086	-	合格
980114	0.0103	-	合格
980115	0.0167	-	合格
9508072	0.1341	+	不合格

### 三、讨论

1、由以上试验结果发现复方丹参注射液用细菌内毒素检查, 无论是凝胶法还是定量的动态比浊法均是可行的, 但对于凝胶法根据所用 TAL 试剂的不同, 需将样品稀释 80 倍。且选用 TAL 试剂的最低灵敏度要在 0.06EU/ml 以上, 而对于动态比浊法由于干扰因素小, 只需 40 倍稀释即可进行定量检查, 因此对于复方丹参注射液用动态比浊法更为合适。不仅操作简单, 而且更能直观地观察到样品的变化情况, 尤其是对于边缘样品使用比浊法比使用凝胶法有更大的优点。

2、复方丹参注射液用凝胶法检查, 由于需要将样品事先稀释 80 倍, 而且选用 0.06EU/ml 以上的 TAL 试剂, 因此显得很不方便, 若操作不慎就容易出现假阳性, 相反用动态比浊法检验由于使用计算机监控, 样品中的反应情况在显示屏上很直观地反应出来, 干扰因素比凝胶法要小的多, 而且检测结果与凝

胶法和热原检查结果相一致。因此用动态比浊法检验复方丹参注射液的细菌内毒素是可行的。加之反应周期短, 灵敏、方便, 特别适合产品的中控和成品检查。

### 参考文献:

- (1): 田中重则著 细菌内毒素试验法的基础应用 1995
- (2): Guideline on validation of the limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices: Food and Drug Adm/ (1987)
- (3): Interim guidance for human and veterinary drug products and biologicals; Food and Drug Adm/ (1991)
- (4) 细菌内毒素检查法 第十三改正日本药局方 平成 8 年

# 抑肽酶的动态比浊法鲎试验验证

刘 冰

(湛江安度斯生物有限公司 524022)

抑肽酶是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 鲎试剂中的活性蛋白酶也属于丝氨酸蛋白酶系, 据报道, 抑肽酶对活化的 C 因子、B 因子、G 因子、凝固蛋白酶都存在不同程度的抑制作用。本文采用动态比浊法鲎试验法, 测定不同浓度的抑肽酶对鲎试验的干扰, 在浓度小于等于 250KIU/ml 时, 鲎试验有效。

一、材料: 抑肽酶 5000KIU/瓶 批号: 961101、961002、970302; 鲎试验用水 100ml/瓶 批号: 980804, 湛江安度斯公司; 内毒素标准品 981, 中国药品生物制品检定所; 比浊法鲎试剂 2.2ml/瓶, 批号: 980419A, 凝胶法灵敏度 0.03Eu/ml, 湛江安度斯公司; 试管浊度仪, Toxinometer ET-201, 日本和光纯药株式会社; 生化分析仪 ELX-808UV, 美国 Biotek 公司; 10×75mm 试管、吸管均经 250℃ 至少 2 小时干热除热原, 96 孔微孔平板、吸头未检测到的内毒素。

## 二、方法:

### (一) ELX-808UV 系统

抑肽酶 1:10、1:20、1:40 倍稀释得到 500、250、125KIU/ml 三个浓度; 试验包括 10 倍梯度的标准内毒素浓度 5、0.5、0.05Eu/ml, 阴性对照和上述三个浓度的抑肽酶及其 PPC,

#### (1) 标准曲线

内毒素浓度 (Eu/ml)	反应时间 (S)	内毒素测定值 (Eu/ml)	平均值	CV (%)
5.0	500	4.381	4.345	1.117
	502	4.309		
0.5	782	0.6803	0.6624	3.831
	792	0.6445		
0.05	1490	0.04605	0.04354	8.141
	1532	0.04103		

标准曲线:  $\lg y = -0.23951 \lg x + 2.853$   $\gamma = -0.9945$

Y 为反应时间, X 为内毒素浓度

平行两组测定; PPC 选用 0.5Eu/ml 的内毒素, 即在 100 $\mu$ l 抑肽酶溶液中加入 10 $\mu$ l 5Eu/ml 标准内毒素, 再加入 100 $\mu$ l 鲎试剂;

### (二) Toxinometer ET-201

抑肽酶 1:5、1:10、1:20、1:40 倍稀释得到 1000、500、250、125KIU/ml 浓度, 试验包括内毒素标准系列、阴性对照、和 500、250、125KIU/ml 浓度抑肽酶及其 PPC, 平行两组测定; 内毒素标准系列使用 2 倍梯度的 0.25、0.125、0.06、0.03、0.016Eu/ml 五个浓度, PPC 选用其中点浓度 0.06Eu/ml, 同时该浓度又是凝胶法的 2 $\lambda$  浓度, PPC 的制备采用 50 $\mu$ l 2 倍浓度样品加入 50 $\mu$ l 0.125Eu/ml 标准内毒素于 10×75 反应管中再加入 100 $\mu$ l 鲎试剂, 例如: 50 $\mu$ l 1000IKU/ml 抑肽酶加入 50 $\mu$ l 0.125Eu/ml 标准内毒素, 得到 100 $\mu$ l 含 0.06Eu/ml 内毒素的 500KIU/ml 抑肽酶, 即 500KIU/ml 抑肽酶的 PPC; 反应物 37℃ 保温 1 小时观察凝胶结果。

## 三、结果

(一) ELX-808UV 系统测定 961101 和 970302 两批抑肽酶, 标准曲线为 5~0.05Eu/ml, 阴性控制在一小时内无可测量的内毒素。

(2) 干扰试验

表一 使用 ELX - 808UV 系统的抑肽酶干扰试验结果

样品批号	试验浓度 (KIU/ml)	样 品		PPC		回收率
		反应时间(S) 平均值	内毒素浓度 (Eu/ml)	反应时间(S) 平均值	内毒素浓度 (Eu/ml)	
961002	500	738	0.8642	701	1.0727	41.7%
		737				
		739				
	250	864	0.4800	970	0.8478	71.6%
		845				
		847				
125	970	0.2761	766.5	0.7387	92.5%	
	969					
	971					
970302	500	1259.5	0.09296	977	0.2682	35.0%
		1261				
		1258				
	250	1372.5	0.6512	927.5	0.3330	53.6%
		1376				
		1367				
	125	1526.5	0.04162	899.5	0.3792	67.5%
		1524				
		1529				

PPC 中强化 0.5Eu/ml 标准内毒素, 在该试验中抑肽酶浓度小于、等于 250KIU/ml 时, 回收率即得到大于 50% 的结果, 回收率在 50~150% 之间可判断为无干扰; 本试验的灵敏度为 0.05Eu/ml, 抑肽酶的最低有效浓度  $MVC = \frac{\lambda}{L}$ ,  $L = 1Eu/1000KIU$ ,  $MVC = 50KIU/ml$ ; 为

使日常检查方便有效, 可使用更灵敏的检查, 例如: 1, 0.1, 0.01Eu/ml 的标准曲线, 抑肽酶检查浓度  $T_c = \frac{\text{中点浓度}}{L} = 100KIU/ml$ 。

(二) Toxinometer ET - 201 系统测定

(1) 标准曲线:

内毒素浓度 (Eu/ml)	反应时间 T <sub>g</sub> (min)	凝胶法结果
0.008	- -	- -
0.016	43.2、46.8	+ -
0.031	30.6、35.6	+ +
0.063	24.6、27.6	+ +
0.125	18.6、22.2	+ +
0.250	16.2、17.8	+ +



$$\text{标准曲线: } \lg Y = -0.3507 \lg X + 1.004 \quad \gamma = -0.9962$$

凝胶法反应终点几何平均值 = 0.0228 Eu/ml

## (2) 干扰试验

样品批号 961101, PPC 中强化 0.0625 Eu/ml 内毒素, 该浓度既是标准曲线中点浓度, 又是凝胶法  $2\lambda$  浓度。

表二 干扰试验结果

样品浓度 (KIU/ml)	样 品			PPC			回收率 (%)
	反应时间(min)	凝胶	内毒素含量 (Eu/ml)	反应时间(min)	凝胶	内毒素含量 (Eu/ml)	
125	23.10		0.09353	19.20		0.1584	103.82
	23.0	+		19.0	+		
	23.2	+		19.4	+		
250	19.30		0.1561	17.5		0.2063	80.36
	19.4	+		17.4	+		
	19.2	+		17.6	+		
500	16.0		0.2663*	15.7		0.2811	23.61
	16.2	+		16.0	+		
	16.0	+		15.4	+		

\* 此内毒素含量为外推计算, 不可用作干扰判断。

本试验中所得到的结果判断, 与上例基本一致, 在浓度小于等于 250 KIU/ml 时无抑制作用, 在使用二倍梯度内毒素标准系列时, 回收率在 75 ~ 125% 有效, 因为二倍梯度标准系列相对于十倍梯度的标准系列更加精密。

表三 三批抑肽酶的内毒素含量 (Eu/1000 KIU)

批号	961101	961002	970302
测定值	0.748	2.209	0.333
可信限	0.599 ~ 0.998	1.473 ~ 4.418	0.222 ~ 0.666

注: 测定值是以 125 KIU/ml 浓度的抑肽酶内毒素含量计算。

### 结论:

1、经三批抑肽酶的干扰试验, 验证抑肽酶在小于等于 250 KIU/ml 时对鲎试验已基本无抑制作用, 但在小于等于 125 KIU/ml 浓度时, 可得到更好的回收率; 日常检查可使用低于等于 125 KIU/ml 的浓度。

2、使用 10 倍梯度的标准内毒素系列作干扰试验或日常检查更加实用, 例如批号为 961101 的抑肽酶在 500 KIU/ml 时其内毒素含量已超过 0.25 Eu/ml, 显然若使用 0.25 ~ 0.016 Eu/ml 的标准曲线将无法得到有效的检测结果; 若使试验适合该标准曲线范围, 需将

抑肽酶进一步稀释; 若使用 5 ~ 0.05 Eu/ml 的标准曲线, 该浓度样品中的内毒素可获得有效的检查。

3、在凝胶法干扰试验中, 一般要求样品中内毒素含量须低于检查灵敏度的  $\frac{1}{4}$ , 本文中的凝胶法验证的预试验中, 样品从 1:10 至 1:40 的稀释均呈阳性, 无法作出有效的判断, 而动态浊度法则可得出有效的判断; 理论上, 样品中内毒素含量只要不高于标准曲线中的最高浓度, 都可得到有效的测量, 实际应用中则要求样品中的内毒素含量最好不要超过 PPC 中强化的内毒素浓度。

# 定量鲎试验法的原理及应用

刘冰

(湛江安度斯生物有限公司 524022)

早在1965年, Jack Levin就采用分光光度法定量检测凝胶反应过程的浊度变化,建立了内毒素定量分析的比浊法(Turbidimetric Assay), 1977年 Nachum等在鲎试剂中添加凝固酶模拟底物,发明了更加灵敏的比色分析法(Chromogenic Assay);模拟底物一般为三肽或四肽,含有共同的甘氨酸精氨酸序列,在精氨酸末端连接一显色基团,如鲎三肽 Boc-Leu-Gly-Arg-PNA,模拟底物是显色法的关键,有几十种结构相似的底物都可于显色法分析,按显色基团不同,有PNA(显黄色)、DEAA(偶氮后显蓝色)、S-NNA(橙色)及荧光基团MCA、 $\beta$ -NA、 $\beta$ -NE、INDE等,荧光法相对灵敏,更适用微量分析。除了比色、比浊法,通过定量测定凝胶反应后残余可溶性蛋白也可定量内毒素,如Folin酚染色法(Colorimetric Assay)、火箭电泳法,ELISA法则使用抗C肽抗体测定凝胶蛋白原水解释放出的C肽来间接定量内毒素,该法只须使用微量鲎试剂即可达到很高的灵敏度;在凝胶反应体系中加入荧光素标记凝固蛋白,凝胶反应过程中荧光素分子随凝固蛋白的有序交联而有序化,有序化的荧光素对偏振光产生特异的吸收,据此定量内毒素即为荧光探针法;所有的这几种定量法都要依赖于鲎试剂的酶促反应,只是额外采取一些方法使反应可定量化检测。

在众多的定量方法中,比色法、比浊法以其方便、灵敏而被广泛使用,日本药典、欧洲药典及美国FDA均接受这两类方法用于药品及医疗器械的细菌内毒素检查;早期的比浊、比色法是在一定的时间读取反应物的吸光度值,或终止反应再读取吸光度值,建立内毒素浓度与反应的终点吸光度的数学关系,即终点法;终点法的检测范围一般仅一至二个数量级,其灵敏度是凝胶法的2-5倍;随着电子

技术的飞速发展,给定量鲎试验带来了变革,电子记忆体、处理器和数字化技术使检测并记录显色或凝胶反应全过程的吸光度变化及进行复杂的数据处理成为方便可行的方法,由此产生了动力学分析法,或称动态法;动态法可提供更广阔的检测范围及更灵敏的检测,终点法已逐渐被取代;动态法间歇采集全部反应过程的吸光度数据,根据对数据处理的不同方法,一般有两种常用方法:一,反应时间法(Onset Time);二,速率法(Rate Assay);反应时间法是设定一个临界吸光度,不同浓度内毒素反应到达这一吸光度的反应时间与其浓度值负相关;速率法则是建立内毒素浓度与鲎反应吸光度变化的平均速率或最大速率的线性关系;反应时间法可达到广阔检测范围,而速率法可获取精确的结果;在药品的内毒素控制领域,广阔检测范围可以快速、方便地对未知含量的内毒素定量,因而反应时间法在欧美的药品检查中更常用。

定量法在药品生产中一经应用,各国的药品管理机构即对其应用进行规范及管理。美国FDA在《药品及医疗器械鲎试验的有效性指南》(1987年)中,对定量法作了明确的规定,1991年对动态法作了相关的补充规定,《欧洲药典》1997版也对动态法作了修订,《日本药局方》在规范鲎试验的同时对这几个重大药典力图求同存异,建立了可以为世界范围所普遍接受的鲎试验准则。在这几个药典法规中被普遍接受的原则如下:1、标准曲线使用10倍梯度的至少三个标准内毒素浓度,  $|\gamma| \geq 0.980$ 有效,2、PPC(阳性产品对照)中强化的内毒素应有有效的回收率;3、PPC中强化的内毒素浓度为标准曲线中点浓度或相近值;4、常规的样品检查应包括标准曲线、NC、PPC和样品四项;在具体使用时这三个主要药典法

规仍存在一些差别,见表一。FDA 规定使用 PFC 来规范使用 PPC 中的强化内毒素,这一计

算法,实际上少有使用,对于用户来说标准曲线中点浓度更易于理解。

表一

三个重要药典法规在定量鲎试验方面的主要差异

差 异		FDA 法规 (1991 年)	EP (1997 年)	JP (1996 年)
干扰试验有 效的回收率	二倍梯度 标准曲线	100 ± 25 %	未涉及	100 ± 25 %
	十倍梯度 标准曲线	100 ± 50 %	≥ 50 %	50 ~ 200 %
PPC 中强化的 内毒素浓度		$PFC = \frac{\text{内毒素限值} \times \text{浓度}}{\text{稀释倍数}}$ PFC ≤ 1.0Eu/ml 时, 强化 0.1 ~ 0.5Eu/ml; PFC > 1.0Eu/ml 时; 强化 1.0 ~ 5.0Eu/ml	三点、五点标准曲线 取中点浓度,四点标 准曲线强化第三点浓 度	强化中点浓度即 $(\lambda_n \cdot \lambda_1)^{\frac{1}{2}}$ , $\lambda_n$ 为标准曲线最 高浓度点, $\lambda_1$ 为标准曲 线最低浓度点
存档标准曲线		三次相同的标准曲线 合并,验证一致性 后,可用于日常检查	未涉及	未涉及

定量法鲎试剂是定量法的前提,定量法试剂的一个重要指标是线性范围,在药品质控中,快速、方便是首要的要求,大范围的检测能力能以最少的操作实现定量化,终点显色一般只有 1~2 个数量级范围,动态显色则达 4~5 个数量级,动态浊度法目前也能达到 2.5~3 个数量级,检查的灵敏度相对于凝胶法已有近 10 倍的提高;通常 KCA (动态显色法) 的检测范围为 50~0.005Eu/ml, 0.005Eu/ml 是其灵敏度,若需 0.001Eu/ml 的检查灵敏度,则要使反应延续更长的时间;为了使 KCA 适用于通常的内毒素检查,一般控制 KCA 试剂与 0.005Eu/ml 内毒素的反应时间在 40 分钟左右,更灵敏的试剂并不是必须的;当检查范围超过三个数量级时,为使标准曲线具有更好的相关性,非线性回归也被引入分析,非线性回归目前还没有明确的法规指导,但首先线性的相关系数绝对值应大于等于 0.980,其次回归出的曲线是唯一的。

定量法在药品内毒素控制领域的应用已远远超出了一般的终产品检查范围, FDA 要求在

药品制造过程控制中进行内毒素检查, FDA 已将制造过程控制中的鲎试验作为 GMP 的一部份,在联邦法律 21CFR211.110 中规定“制造过程中的物料,在每一工序的显著始末阶段或经过长期贮存后,都要鉴定其性质、强度、质量和纯度……”这些物料包括主要原料、水、缓冲液、盐、柱分离的样品、赋形剂、防腐剂、溶剂、容器、塞子等,每种物料均须制订合适的内毒素限值,定量法可以快速直观地给出其内毒素含量,因而应用广泛,特别是每种物料的内毒素含量,往往可以反映出该物料质量变化的趋势,总结历史数据,设立警戒限、活动限,可最大限度地避免不良品;此外定量法还用于各种除热原方法的评价如:超滤、干热、柱层析、微滤、吸附等等;在医学领域,鲎试验已成功地用于检查脑脊液、尿液、及各种分泌物中的内毒素及革兰氏阴性菌。血液的内毒素检查是鲎试验的一个最大机遇和挑战,血液中的干扰因素很复杂,而且内毒素含量较低,须经复杂的样品处理和灵敏、专一的检测,显色法已在这方面有着广泛的应用。

# 新一代内毒素定量测定系统——EDS-98

刘冰 冯聚锦

(湛江安度斯生物有限公司 524022)

## 1. EDS-98 的特征

用于细菌内毒素定量检查的系统主要有两类,一是使用微孔平板作反应容器的酶标仪(生化仪),二是试管比浊仪。常规的酶标仪不具备近紫外波长,只适宜作比色测定,若须兼作比浊测定则要选用带近紫外波长的设备,如 Biotek 的 ELx-808UV; 试管比浊仪是最早的专用内毒素定量测定系统,如 LAL-5000、Toxinometer、ATI-320 等都是这类仪器,该系统只须使用与凝胶法鲎试验相同的试管作为反应容器,若采用与凝胶法相同的试剂、样品量,在定量检测的同时还可以观察凝胶反应的结果,Toxinometer ET-201M 较好地实现了这一目标。在国内,除少数用户使用进口的仪器外,比色测定基本上仍停留在使用分光光度计进行的终点比色法上,比浊测定也受到国产浊度仪器性能、功能的限制。国产比浊仪器的开发最初受 LAL-5000 的影响,虽可定量,但反应物总体积为 0.3ml,无论如何分配这 0.3ml,其反应与凝胶法已不相同,还可能带入更多的干扰因素,EDS-98 则更多地受日本 ET-201 的启发,使用单波长检测,0.2ml 的反应总体积,使比浊法、凝胶法可以比较。比浊测定与比色测定不同,鲎试剂的凝胶反应产物无特征吸收峰,在 320~700nm 范围都存在明显的光吸收,波长递减吸光度递增,小于 320nm 的近紫外区内蛋白质、核酸、反应容器等的光吸收会干扰比浊测定,因而一般比浊测定所选用的较灵敏波长为 340nm,若只是单一作比浊测定,宽频谱的白光也可以,如 LAL-5000,EDS-96、BET-32 都是如此,比浊测定的波长选择也没

有严格限制,如 ET-201 使用 660nm 波长,EDS-98 使用 405nm 波长;405nm 处凝胶产物有强吸收,而且也是显色物 PNA 的特征吸收峰,这就实现了 EDS-98 在同一系统中比色、比浊都可作到有效的测定。

EDS-98 是一个鲎反应动力学测定系统,它按一定的时间间隔采集鲎反应全过程的吸光度数据,数据处理不经归一化,采用设定吸光度或透光率,以获取不同浓度内毒素的反应时间,建立内毒素与反应时间的双对数关系。鲎反应动力学曲线是一个 S 形曲线,理想化的反应曲线是不同内毒素浓度的反应曲线只要有足够的时间,反应终始阶段的吸光度差应达到相同水平,即反应终始点吸光度差只与凝固蛋白量有关;在这一假设前提下,处理 S 形曲线时可以归一化,或在拐点处取反应时间,但事实上,反应终始点吸光度差还与内毒素浓度有关,可以达到最大吸光度增量的内毒素浓度只是很小的范围,因而应用归一化法的数据处理会令小范围的标准曲线与大范围标准曲线的参数相去甚远,标准曲线中还可能出现转折点,因此应慎用归一化法。

综上所述,EDS-98 系统使用 0.1ml 试剂 + 0.1ml 样品的反应体积,使得比浊测定与凝胶法可以比较;采用 405nm 波长作为检测波长,同一仪器可兼作比色、比浊及凝胶三种方法分析;数据分析采用设定吸光度获取反应时间的动态法,比归一化法数据处理更为精确及可靠。

## 2. EDS-98 的性能评价

### 2.1 实验材料

	批号	规格	供应商
动态显色 TAL	981008	3.2ml/瓶	湛江安度斯生物有限公司
动态比浊 TAL	980419A	2.2ml/瓶	湛江安度斯生物有限公司
内毒素标准品	NSE981	9000Eu/瓶	中国药品生物制品检定所
无热原水	981018	100ml/瓶, 内毒素含量 < 0.003Eu/ml	湛江安度斯生物有限公司
无热原吸头	981026	250ul、1000ul	湛江安度斯生物有限公司

稀释试管、刻度吸管、反应试管若干、经 250℃干热 2 小时, 24 小时内使用。

EDS-98 系统。

### 2.2 方法

将 NSE981 用 0.9ml 水溶解得 10,000Eu/ml, 旋涡混合至少 15 分钟, 以 1:2 至 1:10 的稀释得到 50、5、0.5、0.05、0.005Eu/ml 标准内毒素系列, 比浊、比色分析均采用此系列作

标准曲线, 以 5Eu/ml 标准内毒素浓度作为待测样品稀释 2.5、10、25、100、250、1000 倍, 在各稀释浓度下分别作内毒素检查, PPC 中强化 0.5Eu/ml 浓度内毒素。

### 2.3 结果

#### 2.3.1 动态比色法

##### 2.3.1.1 标准曲线:

标准内毒素 (Eu/ml)	反应时间 (S)				平均反应时间 (S)	SD	CV (%)
0.005	2497	2610	2696	2578	2595	82.3	3.2
0.05	1530	1553	1523	1547	1538	14.1	0.9
0.5	964	990	969	987	977	12.9	1.3
5	675	700	701	688	691	12.2	1.8
50	467	480	478	466	473	7.3	1.5

标准曲线:  $\lg Y = -0.1827 \lg X + 2.966$

$\gamma = -0.9965$

Y 为反应时间, X 为内毒素浓度

#### 2.3.1.2 含 5Eu/ml 标准内毒素的样品在不同稀释下的内毒素含量测定

稀释倍数	反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素含量 (Eu/ml)	PPC 反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素测定值 (Eu/ml)	回收率 (%)
2.5	786	788	0.44	6.01	754	760	0.86	2.93	105.3
	786				767				
	792				759				
10	968	980	1.6	7.29	866	880	1.4	1.31	106.9
	974				890				
	998				884				
25	1158	1168	0.95	6.96	964	969	0.78	0.774	99.0

稀释倍数	反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素含量 (Eu/ml)	PPC 反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素测定值 (Eu/ml)	回收率 (%)
	1180				978				
	1167				960				
100	1544	1545	1.4	6.03	962	977	0.74	0.742	136.4
	1524				982				
	1566				986				
250	2031	2011	1.2	3.55	956	979	2.3	0.741	145.4
	1984				974				
	2019				1001				
1000	2540	2582	1.8	< 5.0	970	979	2.3	0.731	146.4
	2631				963				
	2576				1005				

2.3.2 动态比浊法

2.3.2.1 标准曲线

标准内毒素 (Eu/ml)	反应时间 (S)				平均反应时间 (S)	SD	CV (%)
50	365	364	361	359	362	2.7	0.8
5	514	513	494	515	509	10.0	2.0
0.5	801	811	811	783	802	13.2	1.6
0.05	1579	1606	1535	1561	1570	29.9	1.9
0.005	3601	3530	3668	3601	3605	50.4	1.6

选用 5 0.5 0.05 0.005Eu/ml 四点作标准曲线回归

标准曲线:  $\lg Y = -0.2841 \lg X + 2.863$   $\gamma = -0.9918$

Y 为反应时间, X 为内毒素浓度

2.3.2.2 含 5Eu/ml 标准内毒素的样品在不同稀释下的内毒素测定

稀释倍数	反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素含量 (Eu/ml)	PPC 反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素测定值 (Eu/ml)	回收率 (%)
2.5	601	618	2.4	4.49	587	586	3.5	2.1640	73.9
	633				613				
	611				564				
	621				580				
10	853	846	1.5	5.96	729	742	1.6	0.942	69.3

稀释 倍数	反应时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素含量 (Eu/ml)	PPC 反应 时间 (S)	平均值 (S)	CV (%)	内毒素测定值 (Eu/ml)	回收率 (%)
	858				737				
	829				748				
	842				755				
25	1288	1283	3.0	3.44	819	843	2.5	0.601	92.8
	1323				864				
	1231				855				
	1288				832				
100	1590	1562	2.6	6.87	886	857	2.4	0.586	99.8
	1530				857				
	1602				837				
	1624				848				
250	2710	2612	5.8	2.81	899	899	1.5	0.480	93.8
	2388				913				
	2700				881				
	2650				902				
1000	3619	3614	1.3	<5.0	882	851	4.8	0.582	116.4
	3577				891				
	3580				806				
	3550				825				

### 3. 结论:

1、在动态比色分析中,内毒素浓度范围从 50 至 0.005Eu/ml 的标准曲线有很好的线性关系 ( $r = -0.9965$ ),样品中内毒素都得到了有效的测定。

2、在动态比浊分析中,虽然从 50 至 0.005Eu/ml 的标准曲线也是一个有效的标准曲线 ( $r = -0.9847$ ),但若使用这一标准曲线,其误差会使有效的测定成为无效,因为测定的范围如此之大,标准曲线的线性关系要求十分精确 ( $r \leq -0.990$ ),因此一般比浊测定

的标准曲线范围为 5 ~ 0.005Eu/ml,低于 0.005Eu/ml 的浓度须更长的反应时间,精确度降低,使用也不方便。

3、所有测定中,平行管的变异系数均小于 10%。而偏差随内毒素浓度降低有所增加。

4. 应用举例:两种抗生素的内毒素动态比浊法测定

使用 EDS-98 系统对链霉素(原料)及头孢拉定(Cephadrine)作动态比浊法内毒素定量测定,方法及结果介绍如下:

#### 4.1 实验材料

链霉素 (原料): 华北制药集团有限公司

头孢拉定 (Cephadrine): 上海施贵宝制药有限公司, 1g/瓶, 批号 9707741。

动态比浊法鲎试剂: 湛江安度斯生物有限公司, 批号 980419A, 2.2ml/瓶, 凝胶法灵敏度为 0.03Eu/ml。

内毒素国家标准品 (NSE): 中国药品生物制品检定所, 批号 981, 9000Eu/支。

细菌内毒素检查用水 (BET 水): 湛江安度斯生物有限公司, 批号: 980804, 100ml/瓶, 内毒素含量 < 0.003Eu/ml。

无热原吸头: 湛江安度斯生物有限公司, 批号 981026, 250 $\mu$ l、1000 $\mu$ l。

#### 4.2 方法及结果

4.2.1 启动 EDS-98 系统预热, 从电脑中调出系统的检测软件。

4.2.2 实验设计取三个 10 倍梯度的标准毒素浓度作标准曲线: 1.0, 0.1 及 0.01Eu/ml。取 NSE 1 支, 按细菌内毒检查法要求用 BET 水稀释成 1.0、0.1 及 0.01Eu/ml 的标准内毒素浓度系列备用。

4.2.3 取链霉素样品, 用 BET 水稀释成 1.0、0.4 及 0.1mg/ml 三种浓度备用, 链霉素的内毒素限值为 0.25Eu/mg, 由于最低有效浓度  $MVC = \frac{\lambda}{L}$ ,  $\lambda$  等于标准曲线的最低内毒素浓度 0.01Eu/ml, 故  $MCV = \frac{0.01Eu/ml}{0.25Eu/mg} = 0.04mg/$

4.2.4 取头孢拉定样品, 用 BET 水稀释成 2.0、0.5 及 0.2mg/ml 三种浓度备用。头孢拉定的内毒素限值  $L = 0.2Eu/mg$ ,  $MVC = \frac{0.01Eu/ml}{0.02Eu/mg} = 0.05mg/ml$ , 稀释的三个样品浓度都大于 MVC。

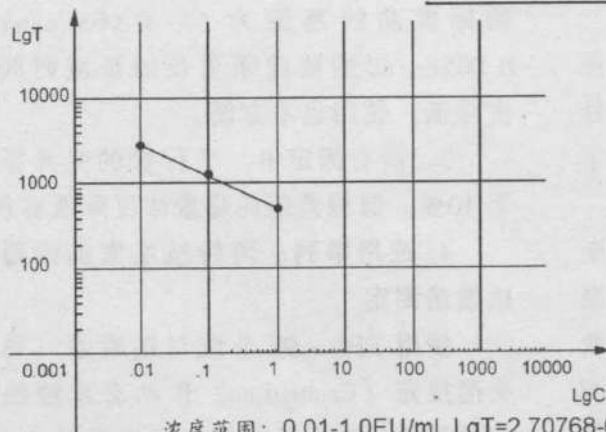
4.2.5 取鲎试剂 1 瓶, 加 2.2ml BET 溶解。取 10 $\times$ 75mm 试管若干, 制备标准曲线管分别加入 0.1ml 鲎试剂和 0.1 标准内毒素溶液; 阴性对照管分别加入 0.1ml 鲎试剂和 0.1ml BET 水; 样品管分别加入 0.1ml 鲎试剂和 0.1ml 稀释好的样品溶液; 阳性产品对照管 (PPC) 分别加入 0.1ml 鲎试剂, 0.1ml 样品溶液和 10 $\mu$ l 1.0Eu/ml 的标准内毒素溶液 (取标准曲线中点浓度 0.1Eu/ml 为 PPC 强化浓度), 平行两组测定, 结果计算时仪器会自动取平均值计算。在电脑屏幕上可以看到反应的任一过程的动态曲线。

4.2.6 将所有试管插入 EDS-98 系统的试管孔中, 系统即自动开始工作, 输入各试管的管号, 名称等参数及设定反应时间。当设定反应时间结束, 仪器即可自动处理各种数据, 打印出反应动态曲线标准、曲线及测定分析报告。

4.2.7 本实验的内毒素标准曲线见表 1。

表 1

### 标准曲线



浓度范围: 0.01-1.0EU/ml LgT=2.70768-0.3651 LgC 相关系数:  $r = -0.99869$

检验日期	981022PM
检验员	刘冰
鲎试剂批号	980419A
鲎试剂灵敏度	0.03
反应器温度	37 $^{\circ}$ C
BET水批号	980804
标准内毒素批号	981
室温	28 $^{\circ}$ C



## 4.2.8 本实验测定结果见表 2。

表 2 EDS-98 细菌内毒素测定系统分析报告

检查日期: 981022PM 检验员: 刘冰  
 鲎试剂批号: 980419A 鲎试剂灵敏度: 0.03EU/ml 反应器温度: 37℃  
 BET 水批号: 980804 标准内毒素批号: 981 室 温: 28℃

管号	名 称	样品批号	样品 (mg/ml)	内毒素 (EU/ml)	回收率 (%)	临界时间 (秒)	内毒素实测值 (EU/ml)
1	阴性对照	- -	- -		- -	> 3600	- -
2	阴性对照	- -	- -		- -	> 3600	- -
3	内毒素标准	- -	- -	0.01	- -	2810	0.0093
4	内毒素标准	- -	- -	0.01	- -	2810	0.0093
5	内毒素标准	- -	- -	0.1	- -	1137	0.1146
6	内毒素标准	- -	- -	0.1	- -	1114	0.1146
7	内毒素标准	- -	- -	1.0	- -	521	0.9341
8	内毒素标准	- -	- -	1.0	- -	524	0.9341
9	链霉素 PPC	- -	1.0	0.1	103.2	822	0.2636
10	链霉素 PPC	- -	1.0	0.1	- -	838	0.2636
11	链霉素	- -	1.0		- -	989	0.1604
12	链霉素	- -	1.0		- -	1002	0.1604
13	链霉素 PPC	- -	0.4	0.1	85.1	1010	0.1491
14	链霉素 PPC	- -	0.4	0.1	- -	1034	0.1491
15	链霉素	- -	0.4		- -	1372	0.0640
16	链霉素	- -	0.4		- -	1413	0.0640
17	链霉素 PPC	- -	0.1	0.1	107	1117	0.1169
18	链霉素 PPC	- -	0.1	0.1	- -	1117	0.1169
19	链霉素	- -	0.1		- -	2790	0.0099
20	链霉素	- -	0.1		- -	2712	0.0099
21	头孢拉定 PPC	9707741	2.0	0.1	119.2	1112	0.1192
22	头孢拉定 PPC	9707741	2.0	0.1	- -	1106	0.1192
23	头孢拉定	9707741	2.0		- -	> 3600	- -
24	头孢拉定	9707741	2.0		- -	> 3600	- -
25	头孢拉定 PPC	9707741	0.5	0.1	118.6	1119	0.1186
26	头孢拉定 PPC	9707741	0.5	0.1	- -	1103	0.1186
27	头孢拉定	9707741	0.5		- -	> 3600	- -
28	头孢拉定	9707741	0.5		- -	> 3600	- -
29	头孢拉定 PPC	9707741	0.2	0.1	117.2	1121	0.1172
30	头孢拉定 PPC	9707741	0.2	0.1	- -	1111	0.1172
31	头孢拉定	9707741	0.2		- -	> 3600	- -
32	头孢拉定	9707741	0.2		- -	> 3600	- -

### 4.3 讨论

4.3.1 从表中可看到, 本实验标准曲线的相关系数  $\gamma = -0.9987$ ,  $|\gamma| > 0.980$ , 相关性很好。

4.3.2 PPC 的内毒素回收率计算:

$$\text{回收率} = \frac{\text{PPC 实测值} - \text{样品实测值}}{\text{标准曲线中点浓度值}} \times 100\%$$

本实验中各浓度样品 PPC 的内毒素回收度都在 50~150% 范围内, 表明在本实验条件下, 所稀释的最高样品浓度 (链霉素 1.0mg/ml, 头孢拉定 2.0mg/ml) 已对动态比浊法内毒素定量测定无干扰, 如果使用凝胶法对链霉

素作内毒素检查, 1.0mg/ml 的样品浓度对检查的干扰强烈, 是不可能进行的, 必须把样品稀释到 0.25mg/ml 浓度以下才能检查。相比之下, 动态定量法可以在较大的样品浓度范围中对内毒素进行测定。

4.3.3 链霉素在不同样品浓度下测定的内毒素含量不完全相同, 但均在允许误差范围内之内, 三个浓度测定的结果都表明内毒素含量远低于 0.25mg/ml 的限值。头孢拉定样品在本实验测定的样品浓度里含不可测内毒素 (临界时间 > 3600 秒), 表明此头孢拉定样品的内毒素含量极低。

## 学习班消息

为了进一步普及推广细菌内毒素定量检查法, 我公司将在近期与上海市药学会、上海市药品检验所联合举办“细菌内毒素定量检查法学习班”。学习班主要内容: 比浊及比色定量法原理、定量检查法有关规程、具体品种的检查示范、定量检查法在药品生产过程质控的应用、定量检查法在临床检验的应用、EDS98 系统的使用方法等。有兴趣参加的同志请尽早与本刊编辑组或上海市药检所联系。

联系电话: (上海)021-64703139 联系人: 胡宏庭、赵凤阁

(湛江)0759-3380671、3380672 联系人: 张永坚、刘冰

## 动态比色法鲎试剂

### I、背景知识

比色法鲎试剂是在凝胶法鲎试剂配方的基础上,加入显色底物如 S-2384、S-2222 等,配方条件也作了部分改进,如凝胶法或比浊法鲎试剂最适宜的反应 pH 值是 7.2,而比色法鲎试剂为 7.6,比色技术令鲎试剂的灵敏度较传统凝胶法至少提高了十倍。比色鲎试剂有二类,一是终点比色法鲎试剂,二是动态比色法鲎试剂。终点法试剂的产物可直接检测,也可进一步偶氮化,例如:PNA 经重氮化,与  $\alpha$  萘乙二胺形成玫瑰红色偶氮化合物,在 545nm 处有更敏锐的特征吸收峰,终点法试剂在 0.005~1Eu/ml 范围的内毒素可进行精确定量,如 ACC 的 Pyrochrom, Endosafe 的 CoA,

Biowhittaker 的 QCL1000 等;动态法鲎试剂则提供了更大的内毒素检查范围,较好的动态法鲎试剂可达四个甚至五个数量级,通常的检查范围是 0.005~50Eu/ml,灵敏度可达 0.001Eu/ml,Endsafe 的 KCA, Biowhittaker 的 KQCL 都是这类试剂,Pyrochrom 虽可用作动态法,但它并不能达到上述的检测范围,它更适于用作终点分析法;动态比色法鲎试剂灵敏、广阔的检测能力充分满足了药品内毒素控制的要求,因而得到了广泛的应用。动态比浊法的检测范围为 1.5~2.5 个数量级,其中 Endosafe 的 KTA<sup>2</sup> 可达 3 个数量级,但与动态比色法相比仍逊色一些,见下表:

方 法	灵敏度 (Eu/ml)	检查内毒素范围(数量级)	常规检查时间
终点比色	0.005 (偶氮法为 0.001)	2	20 min
动态比浊	0.001	3	40 min
动态比色	0.001	4	30 min

此外,比色法鲎试剂是基于颜色来定量内毒素,因而有些干扰凝胶形成或浊度测定的因素并不会影响显色反应,如头孢曲松和某些血液样品在比浊法的检测波长 340nm 处有强吸收,比浊法无法有效测定,而比色法则没有这种干扰。

### II、关于几种检查方法鲎试剂价格的比较

1. 目前对定量法细菌内毒素检查存在一

些不正确的认识:

①做一个样品的内毒素定量检查要 100 美元吗?

②做一个样品的内毒素比色定量检查要 1000 元吗?

#### 2. 各种检查方法鲎试剂价格的比较

以下是国内外各种方法鲎试剂的单次试验费用的比较表:(人民币:元)

	凝 胶 法	动态比浊法	动态比色法
美国	6.02	6.02 ~ 7.47	13.14 (按 0.1ml/次计算) 6.57 (按 0.05ml/次计算)
中国	4.00	4.80	7.50 (按 0.1ml/次计算)

说明：1. 每一支反应试管或每一只反应孔的反应称为一次或单次试验。

2. 上表仅列鲎试剂的费用，不包括其它辅剂，如标准内毒素、水等。

3. 美国凝胶法试剂按 5.2ml/瓶的价格计算，因为这种规格是最常用试剂；中国凝胶法试剂按最常用规格 0.1ml/支的价格计算。

4. 所有试剂都按另售价格计算。

从上表所列的试剂费用比较可看到，定量法试剂费用仅比凝胶法试剂略高而已。

### III. 动态比色法 (KCA) 鲎试剂使用说明书

#### 一、KCA 试剂：

1. 成份：本品为东方鲎阿米巴细胞溶解物的冷冻干燥制品，含有一定量的一价及二价阳离子，缓冲剂和稳定剂。

2. 复溶：用手指轻弹 KCA 试剂瓶，使试剂粉末全部落到瓶底部，小心拉开铝盖开启胶塞，应避免接触污染，用 3.2ml BET 用水溶解 KCA 试剂，塞回胶塞或用其它无热原薄膜封闭瓶口，轻轻摇匀试剂，如果试剂粉末呈黄色或有难溶物则弃去不用。

3. 贮存：冻干的 KCA 试剂应在 2~8℃ 下保存，避免长期暴露在室温下，溶解的 KCA 试剂在 2~8℃ 可最长存放 24 小时，在 -20℃ 以下冻结可贮存 28 天，但只能冻融一次。

4. 注意事项：本试剂为体外检查用品，严禁用于体内用途，勿使试剂与皮肤直接接触。

#### 二、动态检查法

1. 概述：鲎试验是一种方便、灵敏、专一的细菌内毒素检查方法，内毒素与凝胶法鲎试剂 (TAL) 反应可形成易于分辨的凝胶。简便、经济的鲎试验已广泛地用于药品、医疗器械、生物制品的产品检查，原料检验和工艺控制。中国药典 (1995 版) 提供一个标准的鲎试验方法被称为细菌内毒素检查法 (BET)，BET 已初步取代部分注射药品的热原检查项。

比色法鲎试剂中含有凝固酶的模拟显色底物—鲎三肽，由内毒素活化的凝固酶可水解鲎三肽，产生游离状态的 PNA (2, 4-二硝基苯氨) 而使反应物显黄色，显色速率和显色强度与内毒素浓度正相关。若使用内毒素定量检测系统如 EDS-98 系统，KCA 试剂可对内毒素进行动态比色法分析，当反应物显色达到设定的吸光度时，仪器可以记录下反应时间。湛江安度斯公司的 KCA 试剂使用 EDS-98 系统时的预设吸光度通常为 0.05 ~ 0.1 或透光率 Th 为 80 ~ 90%。软件可自动回归计算出内毒素浓度与反应时间的双对数标准曲线，样品的内毒素含量可由仪器自动根据标准曲线定量求出。

2. 样品处理及检测准备：取样、处理、稀释等操作均要求使用无热原器具及溶液，由于内毒素反应需要合适的 pH 值，样品与 KCA 试剂混合物的 pH 值应在 6.5 ~ 8.0，必要时调整样品的 pH 值。中国药典 (95 版) 已建立 5Eu/kg 的内毒素阈剂量 (k)，鞘内用药为 0.2Eu/kg，每种药品的内毒素限值 L 可以由 K/M 计算，M 为临床用药的最大人体剂量，在《中国药典临床用药须知》中，用药剂量已有规定。每种药品的稀释倍数不能超过其最大有效稀释 MVD。MVD 的计算公式为：

$$MVD = \frac{L \cdot P}{\lambda}$$

上式中 P 为药品的效价或有效浓度, λ 为动态法标准曲线的最低点内毒素浓度。

例: 甘露醇 L = 2.5Eu/g, 若动态法标准曲线的内毒素最低点浓度为 0.05Eu/ml, 甘露醇浓度为 20%, 则

$$MVD = \frac{2.5Eu/g \cdot 0.2g/ml}{0.05Eu/ml} = 10$$

即此甘露醇最大可作 1:10 稀释。

3. 干扰试验: 建立标准曲线至少应包括 10 倍稀释的标准内毒素 (CSE 或 RSE) 的三个浓度, 例如: 5、0.5、0.05 Eu/ml。用中点内毒素浓度作阳性产品对照 (PPC), 若内毒素回收率为 100 ± 50% 则无干扰, 回收率大于 150% 为增强, 小于 50% 为抑制; 更大的样品稀释倍数通常可获得有效的回收率, 但最大不能超过 MVD。

4. 日常检查: 日常检查建立标准曲线一般只须两个数量级即三个内毒素浓度, 如 5、0.5、0.05 Eu/ml。而对原料检查或工艺控制时四个数量级的标准曲线也可能用到, 如 50、5、0.5、0.05、0.005 Eu/ml, PPC 使用中点内毒素浓度, 如上例的标准曲线应选用 0.5Eu/

ml, 回收率在 100 ± 50% 范围检查有效。

5. 操作方法: 湛江安度斯公司的 KCA 试剂使用 EDS-98 系统可获得最好的检查效果。每次分析至少应包括标准曲线和阴性对照 (NC), 样品检查和阳性产品对照 (PPC), 至少应平行两组试验。首先启动 EDS-98 系统及软件, 预热至 37℃, 精确移取 0.1ml 内毒素、样品或 BET 用水加入到 10 × 75mm 的硼硅酸盐反应试管底部, 然后加入 0.1ml KCA 试剂, 从阴性对照管开始加, 终止于最高的内毒素浓度管, 轻轻摇匀试管中的混合物, 将试管插入仪器检测孔中, 然后按软件操作程序输入有关检查试剂的信息, EDS-98 可提供自动化的数据处理。

6. 结果: 在动态分析中, EDS-98 系统可以监测反应变化的全过程, 如实记录并显示反应的动态曲线 (S 形曲线), 根据操作者的选择, 可自动绘制反应时间与内毒素浓度的双对数标准曲线; 有效分析的条件包括: 标准曲线的相关系数  $\gamma \leq -0.980$ ; PPC 回收率在 100 ± 50% 范围内; 阴性对照 (NC) 在规定的反应时间内没有可检测到的内毒素。举例如下:

	标准内毒素 (Eu/ml)	平均反应时间 (S)	内毒素含量 (Eu/ml)	回收率
1	50.0	436		
2	5.0	614		
3	0.5	921		
4	0.05	1506		
5	0.005	2551		
NC	—	> 3000	—	
样品	—	802	1.488	
PPC	0.5	758	1.995	101%

标准曲线方程:  $\lg T = -0.1924 \lg C + 2.937$

相关系数:  $\gamma = -0.9960$

### 三、说明:

安度斯公司的 KCA 试剂定量检查内毒素的有效检查范围为 100 ~ 0.001Eu/ml, 许多因素都会影响标准曲线的有效性及其检测范围。首先, 标准曲线能满足检查要求即可, 不必要每次都做到三、四个数量级的范围; 其次, 要达

到安度斯公司 KCA 试剂的极限检测范围, 应使用所推荐的仪器 EDS-98 系统和有关实验用具及操作方法; 同时, 实验用具应采用有效的方法除热原。

湛江安度斯生物有限公司  
一九九八年五月

## 中国药典 2000 年版二部

## 凡例与附录

## XI E 细菌内毒素检查法

(1998 年 9 月药典会修订稿)

本法系利用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机理,以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。内毒素的量用内毒素的单位(EU)表示。

细菌内毒素国家标准品系自大肠杆菌提取精制得到的内毒素,用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度和标定细菌内毒素工作标准品的效价。

细菌内毒素工作标准品系以细菌内毒素国家标准品为基准进行标定,确定其重量的相当效价。每 1ng 工作标准品效价应不小于 2EU,不大于 50EU。用于试验中鲎试剂灵敏度复核,干扰试验及设置的各种对照。

细菌内毒素检查用水系指与灵敏度为 0.03EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂 24 小时不产生凝集反应的灭菌注射用水。

**试验准备** 试验所用器皿需经处理,除去可能存在的外源性内毒素,常用的方法是 250℃ 干烤至少 1 小时,也可用其它适宜的方法。试验所用器皿应确证不干扰细菌内毒素的检查。试验操作过程应防止微生物的污染。

**鲎试剂灵敏度复核试验** 鲎试剂灵敏度定义为在本检查法规定的条件下能检测出内毒素标准溶液或供试品溶液中的最低内毒素浓度,用 EU/ml 表示。

根据鲎试剂灵敏度的标示值( $\lambda$ ),将细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解,在旋涡混合器上混

匀 15 分钟,然后制备成 2.0 $\lambda$ 、1.0 $\lambda$ 、0.5 $\lambda$  和 0.25 $\lambda$  等 4 个浓度的内毒素标准溶液,每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 秒钟,按“检查法”项下试验,每一浓度平行做 4 管,同时用细菌内毒素检查用水做 2 管阴性对照,如最大浓度 2.0 $\lambda$  的 4 管均为阳性,最低浓度 0.25 $\lambda$  的 4 管均为阴性,阴性对照均为阴性,按下式计算反应终点浓度的几何平均值即为鲎试剂的灵敏度的测定值( $\lambda_c$ )。

$$\lambda_c = \lg^{-1} (\sum X/4)$$

式中 X 为反应终点浓度的对数值(lg)。反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度。

当  $\lambda_c$  在 0.5 $\lambda$  ~ 2.0 $\lambda$  (包括 0.5 $\lambda$  和 2.0 $\lambda$ ) 时,方可用于细菌内毒素检查,并以  $\lambda$  为该批鲎试剂的灵敏度。每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。

**供试品干扰试验** 按“鲎试剂灵敏度复核试验”项下,用细菌内毒素检查用水和未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数(MVD)的稀释液分别制成含细菌内毒素工作标准品 2.0 $\lambda$ 、1.0 $\lambda$ 、0.5 $\lambda$  和 0.25 $\lambda$  等 4 个浓度的内毒素溶液。用细菌内毒素检查用水和用供试品溶液或稀释液制成的每一浓度平行做 4 管,另取细菌内毒素检查用水和供试品溶液或稀释液各做 2 管阴性对照。如最大浓度 2.0 $\lambda$  管均为阳性,最低浓度 0.25 $\lambda$  管均为阴性,阴性对照均为阴性时,按下式计算用细菌

鲎试剂应用与进展

内毒素检查用水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值 ( $E_s$ ) 和用供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值 ( $E_t$ )。

$$E_s = \lg^{-1} (\sum X_s/4)$$

$$E_t = \lg^{-1} (\sum X_t/4)$$

式中  $X_s$ 、 $X_t$  分别为细菌内毒素检查用水和供试品溶液或稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值 ( $\lg$ )。

当  $E_s$  在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$  (包括  $0.5\lambda$  和  $2.0\lambda$ ) 时, 且当  $E_t$  在  $0.5E_s \sim 2.0E_s$  (包括  $0.5E_s$  和  $2.0E_s$ ) 时, 则认为供试品在该浓度下不干扰试验, 否则使用更灵敏的鲎试剂, 对供试品进行更大倍数稀释。当鲎试剂、供试品的来源、供试品的配方或生产工艺有变化时, 须重复进行干扰试验。

供试品的最大有效稀释倍数 (MVD) 按下式计算:

$$MVD = CL/\lambda$$

L 为供试品的细菌内毒素限值, C 为供试品溶液的浓度, 或供试品复溶后所得溶液的浓度, 其中当 L 以 EU/ml 表示时, C 为 1.0ml/ml, 当 L 以 EU/mg 或 EU/u 表示时, C 为 mg/ml 或 u/ml。

**检查法** 取装有 0.1ml 鲎试剂溶液的  $10 \times 75\text{mm}$  试管或复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿 5 支, 其中 2 支加入 0.1ml 按最大有效稀释倍数稀释的供试品溶液作为供试品管,

1 支加入 0.1ml 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品制成的  $2\lambda$  浓度的内毒素溶液作为阳性对照, 1 支加入 0.1ml 细菌内毒素检查用水作为阴性对照, 1 支加入 0.1ml 供试品阳性对照溶液 (相当于用被测供试品溶液将细菌内毒素工作标准品制成  $2\lambda$  浓度的内毒素溶液) 作为供试品阳性对照管。将试管中溶液轻轻混匀后, 封闭管口, 垂直放入  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴或适宜恒温器中, 保温  $60 \pm 2$  分钟。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

**结果判断** 将试管从水浴中轻轻取出, 缓缓倒转  $180^\circ$  时, 管内凝胶不变形, 不从管壁滑脱者为阳性, 记录为 (+); 凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性, 记录为 (-)。供试品 2 管均为 (-), 应认为符合规定。如 2 管均为 (+), 应认为不符合规定; 如 2 管中 1 管为 (+), 1 管为 (-), 按上述方法另取 4 支供试品管复试, 4 管中 1 管为 (+), 即认为不符合规定。若第一次试验时供试品的稀释倍数小于 MVD 而结果出现 2 管均为 (+) 或 2 管中 1 管为 (+), 1 管为 (-) 时, 按同样方法复试和判定, 复试时要求其稀释至 MVD。阳性对照为 (-) 或供试品阳性对照为 (-) 或阴性对照为 (+), 试验无效。

\* 注: 下划线部分为 95 版药典检查法未涉及的增改内容。

## 第二批国家参考鲎试剂启用

1994 年制备的中国第一批国家参考鲎试剂 (Reference TAL) 已使用完毕。中国药品生物制品检定所 1998 年上半年组织了制备第二批国家参考鲎试剂的公开招标。第二批国家参考鲎试剂的候选品经中检所检定, 并组织有关单位进行协作标定, 已于 1998 年下半年正式启用。此批参考鲎试剂的规格为 2.2ml/瓶, 灵敏度以内毒素国家标准品 981、内毒素国际标准品 94/850 以及美国内毒素标准品 EC-6 标定均为  $\lambda = 0.06\text{Eu/ml}$ 。

第一批及第二批国家参考鲎试剂都是由湛江安度斯生物有限公司制备。国家参考鲎试剂由中检所发放使用。

## Forster T. Jordan 在中检所举办的《定量法鲎试验》 学习班上答疑选编

去年9月底美国 Endosafe 公司总经理 Forster T. Jordan 先生访华，在中检所举办的定量法鲎试验学习班上作了“定量鲎试验”学术报告，并与与会人员讨论鲎试验中的一些问题，本刊刊载 Jordan 先生对一些典型问题的解答，供未能参加本次研讨班的药检同仁参考。

问题一：动态比浊法鲎试剂与凝胶法鲎试剂有什么不同，是否凝胶法鲎试剂都可用于定量法？

以 Endosafe 的产品为例，Endosafe 生产五种灵敏度凝胶法鲎试剂，0.25、0.125、0.06、0.03、0.015EU/ml，其中前三种灵敏度试剂只用作凝胶法，0.03、0.015EU/ml 的试剂可兼用作凝胶法和动态比浊法，但比浊法的灵敏度只有 0.01EU/ml，线性范围仅二个数量级。Endosafe 的 KTA<sup>2</sup> 试剂——一种专用的动态比浊法 LAL，灵敏度达 0.005EU/ml，线性范围为 5~0.005EU/ml，已接近动态比色试剂的检测范围。

问题二：请介绍一下美国在定量检查方面所使用的仪器，以及各鲎试剂生产厂家生产的定量用 LAL 的区别？

美国 ACC 公司的 LAL-5000 是第一台动态试管比浊仪，但它使用 1 份 LAL 加 4 份样品，其工作状况并不好；日本 Wako 公司（和光）的 Toxinometer 试管比浊仪采用 1:1 的试剂样品比例，但价格太贵（约 25,000 美元/套），而且软件不理想；ATI-320 试管比浊仪使用 8×75 的非标准反应试管，现在该系统已很少使用；KQCL 系统——一种用于比色法的 96 孔恒温生化分析仪，只能用作比色分析，最近它已作了些改进，可用作比浊分析，该系统的问题是提供不均匀的温度；Molecular Device 的

Thermomax 是 Endosafe 经销的第一种生化仪，可用作比浊、比色分析，但其恒温性能仍不理想；最近 Endosafe 与 Biotek 合作并经销其 ELX-808UV 生化分析仪，它采用阶段加热技术可提供均匀稳定的温度，而且不必预热反应板。

试剂：

ACC 的 Pyrotell-T 是一种专为 LAL-5000 设计的 KTA 试剂，1:4 的试剂、样品比例令其受到干扰作用的困扰，Pyrochrom 是 ACC 与日本生化学公司合作开发的比色试剂（可用作终点、动态两种分析），但它的性能很不稳定。ACC 公司被日本生化学公司兼并后，其新的比色试剂还没见到。

Biowhittaker 公司的 KTA 试剂 Pyrogen-5000 在美国很少使用，其线性范围很窄，不超过 1.5 个数量级，而且须使用特制的缓冲液来溶解；KQCL 是一个很好的 KCA 试剂，线性范围至少达四个数量级，不过该试剂溶解后的有效期很有限，应立即使用，不能冷藏或冻结贮存。

Endosafe 的 KTA 试剂（动态比浊试剂）是一种凝胶比浊兼用试剂，线性范围为二个数量级，灵敏度 0.01Eu/ml；Endosafe 的 KTA<sup>2</sup> 没有凝胶法合适的灵敏度，其线性范围从 5 至 0.005Eu/ml 三个数量级；Endochrom-K 是 Endosafe 的 KCA 试剂（动态比色试剂），其线性范围为 50~0.005Eu/ml 四个数量级，而且可



冻融一次。

问题三：凝胶、比色、比浊三者测试结果不同时怎样判断结果，在美国有没有不同厂商的鲎试剂对同一样品测试结果不同的情况，结果如何判断？

不同检测方法结果不一致时，FDA认为应取测量值最高者。这种差别主要是因为这三种方法都存在一定误差，凝胶法为50~200%；动态法，FDA可接受的误差为±50%，通常实际误差为±25~30%；例如凝胶法测定值为5Eu/ml，其真值可能在2.5~10Eu/ml的范围；动态法测定值为5Eu/ml，其真值则可能在3.3~10Eu/ml范围。同理，真值为5Eu/ml的样品，凝胶法的测定值可能在2.5~10Eu/ml范围，而KTA测定值可能是3.3Eu/ml，KCA可能是7.2Eu/ml，这些值也都在许可的误差范围内；正因为这种误差使许多药厂将凝胶法检查设在MVD/2下进行，如果限值为0.5Eu/ml，药厂内部限值为0.25Eu/ml，这样检测值误差的上限也不会超过限值。定量法检查一般是用标准曲线中点来决定样品的稀释倍数，并不是在MVD下进行检查（其检查灵敏度比MVD下检查高4~100倍）。

在美国，不同厂商的鲎试剂对同一样品也会产生不同的检测结果，其原因也是由于上述的误差，解决这种差异的方法是提高检查灵敏度。例如：限值为100Eu/ml的样品，稀释10倍，使用0.125至0.5Eu/ml的鲎试剂检查，即使用三个鲎试剂厂商的鲎试剂可能会给出三个不同结果，厂商A：2.5~5Eu/ml；厂商B：5Eu/ml；厂商C：10Eu/ml，但所有的结果对于100Eu/ml的限值来说都是阴性结果；内毒素的检测只是一个安全性控制。（定量法也只是提供一种更为有效、快捷、直观的控制手段）

问题四：美国的基因工程药品是否采用LAL检查，其干扰是增强还是抑制？

鲎试验已广泛用于基因工程药品检查，基因工程药品在分离、纯化过程中如果与纤维素类物质如棉花、滤膜等长期接触，可能会含有LAL-RM，特别是以真核生物——酵母作为基因工程载体的产品，会在产品中污染酵母多糖，这两类物质可增强鲎反应或导致假阳性结果，在这种情况下，需要采用内毒素专一的鲎试验法；FDA对鲎试验的葡聚糖反应也缺乏足够的判断依据，因为FDA的鲎试剂参考品（lot 13）也是葡聚糖反应鲎试剂，当厂家对产品的阳性结果提出质疑时，FDA的lot 13同样阳性，FDA对此也束手无策；Endosafe的GB缓冲液则可以阻断葡聚糖反应，消除葡聚糖引起的增强或假阳性，GB只是阻断G因子激活，而最安全的内毒素专一试剂是无G因子试剂，Endosafe正向FDA申请一个新的LAL配方，无G因子的LAL—Endospecy，希望FDA能尽早批准。

问题五：定量法对于胶体或有颜色的产品其内毒素检测是否受到影响，如何消除？

KCA的检测波长为405nm，血红蛋白在405nm处存在吸收，所以KTA对血红蛋白更实用。脂类样品通常混浊，显然使用KCA分析更好；消除干扰的主要方法是提高检查灵敏度，扩大样品稀释倍数，对样品1:10稀释使用0.05Eu/ml灵敏度与1:100稀释使用0.005Eu/ml灵敏度，其检查灵敏度是相同的，而1:100比1:10稀释的干扰会更少甚至消除。

问题六：有时大输液的细菌内毒素检查不合格时为什么二次消毒（115℃30min）后又能合格？

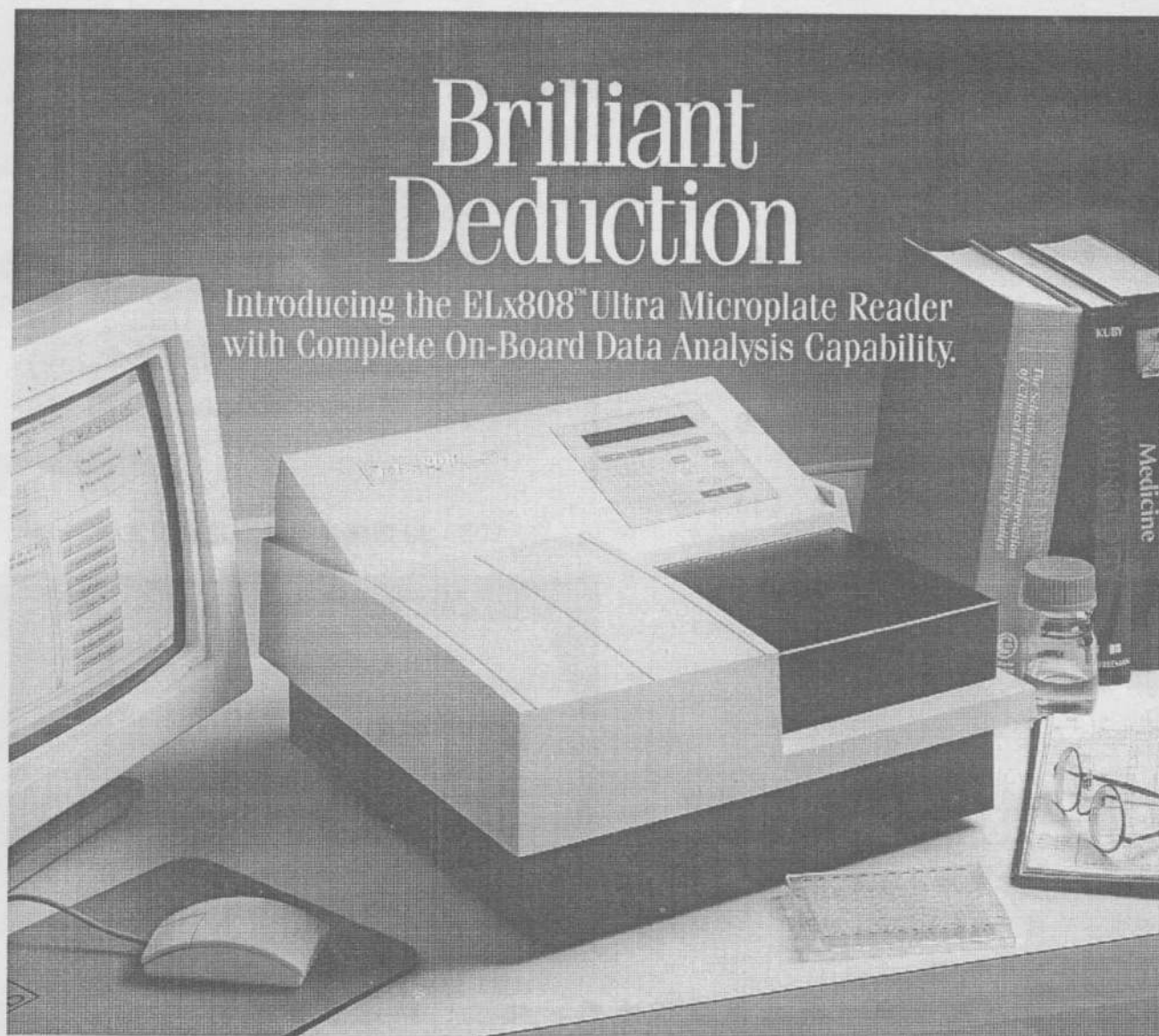
内毒素在pH值大于等于8时的环境中，灭菌条件也会使其灭活一半以上，pH值在酸性条件下，高压灭菌也能破坏少量内毒素；对于耐碱的原料使用0.005M NaOH 121℃ 15分钟可有效地灭活内毒素，但不会灭活葡聚糖。

## 美国 Endosafe® 公司 鲎试剂系列产品目录

GEL - CLOT LAL REAGENT							
5.2mL/ Vial	Sensitivity * EU/mL	PACK OF 6		CASE OF 12		BOX OF 100	
		Code	Cost	Code	Cost	Code	Cost
	0.015	R15015P	\$ 225.00	R15015C	\$ 435.00	R15015B	\$ 3,500.00
	0.03	R15003P	225.00	R15003C	435.00	R15003B	3,500.00
	0.06	R15006P	225.00	R15006C	435.00	R15006B	3,500.00
	0.125	R15012P	225.00	R15012C	435.00	R15012B	3,500.00
	0.25	R15025P	225.00	R15025C	435.00	R15025B	3,500.00
* All sensitivities available in 50 Tests/Vial; 300 Tests/Pack; 600 Tests/Case.							
1.2mL/ Vial	Sensitivity * EU/mL	PACK OF 6		CASE OF 12			
		Code	Cost	Code	Cost		
	0.03	R12003P	\$ 67.00	R12003C	\$ 124.00		
	0.06	R12006P	\$ 67.00	R12006C	\$ 124.00		
	0.125	R12012P	\$ 67.00	R12012C	\$ 124.00		
	0.25	R12025P	\$ 67.00	R12025C	\$ 124.00		
* All sensitivities available in 10 Tests/Vial; 60 Tests/Pack; 600 Tests/Case.							
0.2mL/ Vial	Sensitivity * EU/mL	PACK OF 25		CASE OF 50			
		Code	Cost	Code	Cost		
	0.015	R13015P	\$ 83.00	R13015C	\$ 160.00		
	0.03	R13003P	83.00	R13003C	160.00		
	0.06	R13006P	83.00	R13006C	160.00		
	0.0125	R13012P	83.00	R13012C	160.00		
	0.25	R13025P	83.00	R13025C	160.00		
* All sensitivities available in Single Test Vial; 25 Tests/Pack; 50 Tests/Case.							
KINETIC TURBIDIMETRIC ANALYSIS							
Product	PACK OF 6		CASE OF 12		BOX OF 100		
	Code	Cost	Code	Cost	Code	Cost	
KTA	R15015P	225.00	R15015C	\$ 435.00	R15015B	\$ 3,500.00	
	R15003P	225.00	R15003C	435.00	R15003B	3,500.00	
	R15006P	225.00	R15006C	435.00	R15006B	3,500.00	
KTA <sup>2</sup>	R19000P	270.00	R19000C	540.00	R19000B	4,300.00	
KINETIC CHROMOGENIC ANALYSIS							
Endochrome - k			Code			Cost	
256 - TEST KIT			R1708K			\$ 410.00	
8 - 3.2ml Vials LAL							
2 - 10ng Control Standard Endotoxin (CSE)							
3 - 30ml LAL Reagent Water							
LAL REAGENT - 320 TESTS			R1710K			475.00	
10 - 3.2ml Vials Endochrome - K LAL							
LAL REAGENT - 3, 200 TESTS			R17100K			4,600.00	
100 - 3.2ml Vials Endochrome - K LAL							
CONTROL STANDARD ENDOTOXIN (CSE) E. coli							
			pack	Code		Cost	
500 ng/Vial			6/pack	E110		\$ 80.00	
10 ng/Vial			6/Pack	E120		72.00	
Positive product Controls (for Single Test)			25/Pack	PC100		80.00	
Lot - specific Certificate of Analysis included.							
ENDOTOXIN INDICATORS *							
		CASE OF 12		EACH			
		Code	Cost	Code	Cost		
2,000 EU		EW2K	\$ 98.00				
10,000 EU		EW10K	98.00				
100,000 EU		EW100K	98.00				
1 million EU				EW1M	\$ 24.00		
2.5 million EU				EW2.5M	37.00		
10 million EU				EW10M	37.00		
* For dry - heat oven validations							
LAL REAGENT WATER *							
		PACK OF 6		CASE OF 12			
		Code	Cost	Code	Cost		
30 mL bottle (< .001 EU/mL)				W130	\$ 50.00		
100 mL bottle (< .001 EU/mL)				W110	67.00		
500 mL bottle (< .005 EU/mL)		W150	\$ 58.00				
Use for reconstituting LAL reagent							
ENDOTOXIN - FREE TESTS TUBES							
				Code		Cost/Pack	
Depyrogenated flint glass tubes With caps;							
10 x 75mm			25/Pack	T100		\$ 11.50	
Depyrogenated flint glass tubes Wrapped in aluminum foil;							
10 x 75mm			50/Pack	T200		11.50	
Depyrogenated borosilicate dilution tubes (no caps);							
8 x 75mm			50/Pack	T500		11.50	
10 x 75mm			50/Pack	T400		11.50	
130 x 100mm			32/Pack	T300		18.50	
180 x 150mm			14/Pack	T800		15.50	
ACCESSORY PRODUCTS							
				Code		Cost/Pack	
Depyrogenated glass Pipettes;							
1ml			10/Pack	P100		\$ 11.00	
2ml			10/Pack	P200		12.50	
5ml			10/Pack	P500		14.00	
10ml			10/Pack	P1000		19.50	
Eppendorf® Pipette Tips (validate to .001EU)							
Individually wrapped			50/Pck	D100		9.50	
30ml 0.1M Tris Buffer			12/Pck	BT103		105.00	
5ml 0.25M Tris Buffer			6/Pck	BT101		41.00	
5.5ml Endotoxin - Specific Buffer			6/Pck	BT120		46.50	
KINETIC SYSTEM							
				Code		Cost Each	
Bio - Tek Eb606 Incubating Microplate Reader				M200		\$ 11,550.00	
Endosafe Endotoxin Software				M300		1,950.00	
Microplate Heating block				M100		360.00	
Calibration Plate				M400		465.00	
Power Cord Set				M500		10.50	
Instrument Lightbulb				M800		72.00	
30ml 405nm Standard for microplate qualification				SP100		12.50	
30ml 340nm Standard for microplate qualification				SP200		12.50	
Qualification of Kinetic Reader						Price on Request	

# 美国 Bio - TeK 公司 ELx808 型生化测定仪

(动态比浊、比色法适用)



- Optional incubation to 50°C
- On - board curve - fitting, validation and protocol definition
- Endpoint, kinetics and scanning capability
- Up to 75 assay definitions and 10 test results may be stored on - board
- UV, internal barcode and robotics interface options
- Compact footprint conserves bench space

## EDS 系列细菌内毒素测定系统

### 1、EDS-99 细菌内毒素测定系统

本产品是专为广大基层单位设计的中档价位细菌内毒素定量测定系统。

技术参数:

内毒素检查范围: 0.001 - 1000Eu/ml

检查分辨率: 优于 2%

适用方法: 凝胶法, 动态浊度法

反应物量: 0.1ml 鲎试剂 +  
0.1ml 供试品

恒定温度:  $37.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$

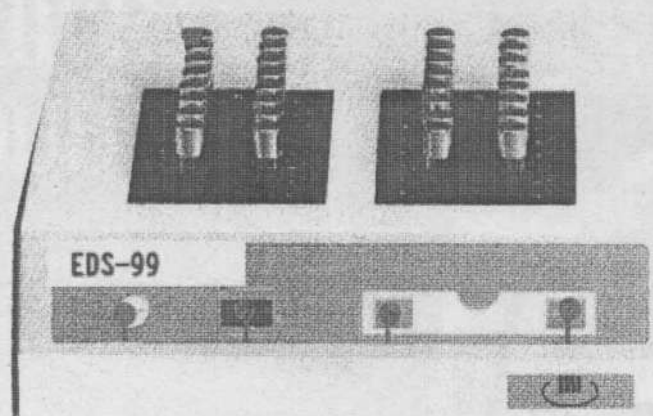
试管数量: 32 个

试管孔径:  $\Phi 10.0 - \Phi 10.1\text{mm}$   
可插安瓿

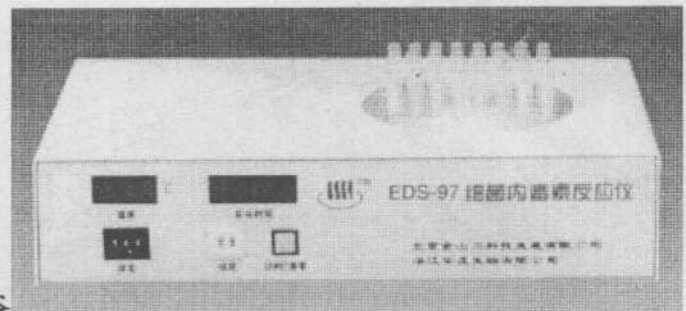
电源电压:  $220\text{V} \pm 10\%$

功率: < 200W

重量: 约 10kg



EDS-99 细菌内毒素测定系统主机



EDS-97 细菌内毒素反应仪

### 2、EDS-97 细菌内毒素反应仪

本品为干热式恒温反应器, 取代恒温水浴箱作细菌内毒素限量检查。温控  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 32 孔, 适用于试管和安瓿, 具有自动计时功能。

- 湛江安度斯生物有限公司提供比色、比浊、凝胶法鲎试剂
- EDS 主机免费质保三年, 终身保修; 免费技术培训或上门安装及培训 (EDS-97 除外)
- 协助用户建立生产过程中的内毒素控制体系, 定期为用户提供国内外 BET 发展最新动态

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) 3380671 3380672 转

Email: ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn