

试剂应用与进展

司海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2009 年第 1 期 (总第 18 期) 2009 年 12 月 28 日

目 录

BET 应用的验证文件	1
浅析甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液细菌内毒素检查法建立	5
一水乳糖的细菌内毒素检查凝胶法及定量法干扰试验	10
细菌内毒素检查在药品生产质控上的应用(一)	13
“生物探针 3.0”细菌内毒素检测系统介绍	17
细菌内毒素快速检测盒	24
细菌内毒素检测试剂盒 ——专为血液透析、血液中心设计的试剂盒	25

BET 应用的验证文件

Dr. James F. Cooper

在 1999 年 5 月的 LAL Times 中,提出了验证细菌内毒素检查(BET)应用的 9 个步骤。根据美国药典 24 版的讨论,验证非经肠道产品的法规检测方法,例如 BET,不是验证方法的准确性和可靠性,而是证明所选择的检测条件适合达到预期的目的。本文讨论确定验证文件中的关键组成,用于准备正式的申报文件,例如新药应用。对已建立的产品验证报告的要求较少。需要在验证报告中阐述的

部份强调如下,需要特别考虑的产品可能要求附加的文件。

职责:报告的第一部份包含签名、日期和负责审核复核报告的人的职务

目的和范围:报告开头应清楚阐述验证方案的目的,验证方案的目的是用一种以上的方法和试剂确定无干扰检测产品的内毒素所需的验证条件。

BET 方法验证的报告
确定职责

说明目的和范围
显示示范性计算
阐述材料和方法
讨论实验的发现
评估稳健性
说明验证方法
作出结论
引用参考文献

范围定义进行鲎实验验证的产品或产品生产线,产品需完整描述,写明名称、效价和产品号。如果存在一种以上剂量形式,将所有产品类型、效价和分装容量用适当的名称和代码制成一个表格。某个装置的所有的特征可制成一个表格,包括规格、液体路径和尺寸等适用的内容。

计算和统计程序:

应援引药品目录中公布的限值,各国目录的限值可能会不同,影响销售到国外的产品,新药的内毒素限值是用容许限值(K)除以每小时最大剂量(M)这个公式计算的。

MVD, MVC 和检测灵敏度的示范性计算必须清楚写明,在第一步中不能对凝胶法灵敏度 0.0625 EU/mL 及以上进行四舍五入,以防止计算结果过高。某些审核员对实验的安全系数感兴趣,如果 BET 实验室使用不同的凝胶法灵敏度或动态鲎试验标准曲线,应将 λ 、检测灵敏度和 MVC/MVD 制成表格,以便清楚阐

述这个问题。例如,表 1 列出了某内毒素限值为 0.15 EU/mg 和验证浓度为 2 mg/mL 的抗生素的检测灵敏度与 λ 的联系。计算适用于终产品和散装药品。所有的可能性均为有效,因为检测灵敏度(较低值)比内毒素限值高。

表 1 标示灵敏度 vs 检测灵敏度

λ (EU/mL)	方法	PSS* (EU/mg)
0.125	凝胶法	0.06
0.0625	凝胶法	0.03
0.05	动态法	0.025
0.01	动态法	0.005

* PSS = λ /检测浓度;检测浓度为 2 mg/mL.

材料和方法:

有关试剂的所有信息必须写明,包括名称、有效期和供应商。写明试剂和供应商很重要,它们是验证过程的一部分,耗材如移液管、试管和酶标板不应由供应商指定,除非供应商详细说明特定的试管或其它材料。另外,报告应标明耗材符合 BET 实验室的通用标准,例如“玻璃器皿使用经验证的过程除热原。”

验证实验:

应将实验结果制成表格,并进行讨论和评估确保验证方法的适用性。

数据表格可作为附件包括在内,许多国家的法规方法和 FDA 的鲎试验指南要求用指定经销商的鲎试剂对每种产品至少选 3 批进行验证。谨慎的做法是确定至少一个相容的筛选结果,这也是行业惯

例,这个结果是通过通过对每个产品、供应商和考查的方法进行验证获得的。

每个凝胶法验证方案的目的是说明内毒素在水中和在供试品溶液中的终点试验结果是一致的。对于动态鲎实验方案,其目的是要证明内毒素对照在供试品溶液中可以无干扰回收,应将结果制成表格并按产品和批号列明。

应阐述 pH 问题,因为 FDA 在审查时总是会提出这个问题,即使使用了适当的对照。如前述,在验证过程中整个样品制备阶段必须进行 pH 测定,以便证明鲎试剂和供试品混合物的 pH 值为中性。还有,验证方法必须对产品指定的整个 pH 范围有效。例如,美国药典氯化钠甘露醇品种正文中的 pH 范围为 4.5—7.0。应有数据证实验证方法将会中和产品的 pH 值,使其调整到 4.5,且阳性产品对照可完全回收。

表 2 内毒素回收率和 pH 测定研究综述

凝胶法鲎实验			
批号	PWC	PPC	pH
A	λ	0.5 λ	6.9
B	0.5 λ	0.5 λ	7.0
C	λ	λ	7.0
动态鲎实验			
回收(%)		pH	
94		6.8	
112		6.9	
89		6.9	

表 2 列举了用两种鲎实验方法验证三批抗生素的结果,凝胶法实验符合规定:1)阳性水对照(PWC)和阳性产品对照(PPC)的有效终点均在两倍稀释范围内,2)试剂和样品混合物产生中性的 pH 值。回收率是 $100 \pm 25\%$,且反应混合物 pH 值是中性的,因此动态鲎实验验证方案符合规定。

稳健性:

在日常检测中方法的可靠性测量是稳健性的表现。提高一个验证方法的稳健性的最重要的方法是所选择的日常检测的检测浓度由兼容性图表清楚定义,最好是由两种鲎实验方法确认。

为了说明如何使鲎实验方案达到稳健性,我们需要考虑在进行治疗性药品兼容性筛查时会发生什么。在高浓度,药品与鲎试剂的兼容性非常差。然后,有一个 4 倍稀释浓度范围是边缘地带,即由于药品和/或鲎试剂的批间差异造成 PPC 回收率不同。加大稀释降低浓度可达到完全兼容的范围,而检测方法不受差异影响。可使用更灵敏的试剂或鲎实验方法将 MVC 和 MVD 的值延伸到超出限值的范围。

表 3 举例说明了如何定义兼容范围和为验证方法选择一个可靠的检测浓度。使用凝胶法和动态浊度法为效价 40mg/mL 的重组药品筛选试剂的兼容性,从 40mg/mL 开始进行两倍稀释。8mg/mL 以上无有效回收,为不兼容范围。在 8 和

4mg/mL, 2λ PPC 的回收率不同, KTA 回收率为 40—75%; 这两个水平组成兼容的边缘地带, 日常检测可能在估计的污染之下。兼容的浓度范围给出一致的接近 100% 水平的动态回收率, 日常检测浓度选择了 0.8mg/mL, 因为很明显该浓度在兼容范围内, 可方便地进行 1:50 的稀释, 具有大约 5 倍安全系数。安全系数是检测浓度除以 MVC ($0.8 \text{ mg/mL} \div 0.14 \text{ mg/mL} = 5.7$) 或内毒素限值除以检

测灵敏度。

一个稳健的动态法实验过程应始终符合线性和回收标准, 很少或不会产生无效性。动态法试验方案稳健性的关键是兼容的浓度和标准曲线范围的选择。线性回归 2—3 个对数级范围的曲线, 用可靠的标准品制备, 很少产生无效的回归。另外, λ 选择 0.01 EU/mL 或 0.04 EU/mL 可避免与使用酶标板相关的噪音干扰。

表 3 重组药品的兼容范围

浓 度 (mg/mL)			
40 mg/mL	8 4	2 <0.8>	<0.14 (MVC)
不兼容 (抑制)	边缘地带 不可靠的 PPC 回收率)	兼容范围 0.8 mg/mL 被选为检测浓度	超出限值
稀释 0	1:5 1:10	1:20 <1:50>	1:285 (MVD)

附加实验:

如果产品的样品制备或干扰解决需要独特的方法, 验证方案应清楚注明需要特殊添加剂或处理, 并证明它解决了干扰问题。添加剂例如缓冲液和表面活性剂应减至最低。

回归分析方法的选择对动态法试验方法有很大的影响。线性回归已由法规指南确立和公众认可, 相关系数 |r| 和 PPC 回收率共同确保足够的线性以产生可靠的结果。对比之下, 曲线拟合分析未经公众认可, 可靠性较低, 因为它将回收率最小化作为线性的校验, 增加孔污染的可能性。使用曲线拟合的前提是必须通

过验证证实准确性和可靠性。

验证方法:

应按照验证方案制定结构分明且简练的验证过程。验证方法定义最佳的检测浓度或检测稀释倍数、样品和对照品的制备、检测条件的维护和可接受标准。报告应主要叙述特定的日常检测过程, 避免讨论配套用品问题例如玻璃器皿的除热原, 这应由独立的标准操作程序定义。审核人员特别有兴趣知道除添加的内毒素以外, 供试品和干扰控制是否一致的。“Hot Spike(添加内毒素)”技术, 如前述, 可保证样品和对照品的连贯性。

结果的判断和报告必须清晰, 所有关

于对照品和供试品的有效性必须清楚,示范性计算可举例证明如何判断日常检测结果是否与内毒素限值一致。

最后,可简述进行重新验证的原因或参考有关该主题的通用 SOP。由于鲎试剂和产品样品的配方是 BET 验证的焦点,产品配方、试剂或方法的任何改变都会导致重新验证的需要。

结论:

验证方案的结论须说明试剂、方法、兼

容浓度和稀释范围、稳健性和 pH 测定值。例如:“处方药产生的 USP 氯化钠注射液的所有效价,与凝胶法和动态浊度法鲎试剂在浓度为 $\leq 10\text{mg/mL}$ 时是兼容的,不需要进行日常 pH 测定,因为所有样品/鲎试剂混合物 pH 值都在中性范围内。

参考文献:所有相关的法规大纲、指南和供应商文件

(刘少燕译,冯聚锦校审)

浅析甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液细菌内毒素检查法建立

陈 瑜 湛江安度斯生物有限公司

摘 要 目的:建立甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液的细菌内毒素检查(BET)方法。方法:通过实验验证甲磺酸帕珠沙星对细菌内毒素检查有抑制作用,提出在样品稀释过程中加入适量的二价金属阳离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})并改变加样方法,以补充因络合作用而减少的部分,从而消除此类样品对内毒素检查的抑制作用。结果:补充适量 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 可以有效消除样品对 BET 的抑制。结论:甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液可以建立细菌内毒素检查方法。

关键词 甲磺酸帕珠沙星;细菌内毒素检查;抑制作用;稀释剂-I

前言 据了解在开展甲磺酸帕珠沙星注射液 BET 探讨时,很多人都感到

困惑,那就是样品有很明显的抑制作用,而且不同的实验制备方法干扰程度不同。为此,本文针对这个样品进行了探讨浅析,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 样品(S):甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液:100mL 含 0.3g 甲磺酸帕珠沙星、0.9g 氯化钠;内毒素限值(L)=0.5EU/mL。

1.2 鲎试剂:湛江安度斯生物有限公司产品

批号:0711302、灵敏度(λ):0.25EU/mL;规格:0.1mL/支;

批号:0709142、灵敏度(λ):0.06EU/mL;规格:0.1mL/支;

1.3 细菌内毒素检查用水(W):批号:0603080;规格:50mL/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:200707;效价:10000EU/支;中国药品生物制品检定所产品。

1.5 稀释剂-I(X-I):批号 0601110;规格 4mL/支;湛江安度斯生物有限公司产品。

2. 实验方法与步骤:

按中国药典 2005 年版 BET 法操作

2.1 鲎试剂灵敏度复核:经复核,鲎试剂批号 0711302、0709142 灵敏度符合规定。

2.2 样品最大有效稀释倍数(MVD)的计算:

$$MVD_{0.25} = L/\lambda = \frac{0.5\text{EU/mL}}{0.25\text{EU/mL}} = 2(\text{倍})$$

则灵敏度 0.25、0.125、0.06、0.03EU/mL 对应的 MVD 为:

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

2.3 初筛试验:鲎试剂灵敏度可以在

表二 初筛试验结果一

反应项目	A				B				C	D
	S ₂	S ₄	S ₈	S ₁₆	S ₂ E _{0.5}	S ₄ E _{0.5}	S ₈ E _{0.5}	S ₁₆ E _{0.5}		
结果	--	--	--	--	--	--	--	--	++	--

2.4 用稀释剂-I(X-I)制备 S 的初筛实验:

2.4.1 C 溶液的制备:将 RSE 稀释到所需要的 $4\lambda=1\text{EU/mL}$ 、 $2\lambda=0.5\text{EU/mL}$

0.25—0.03EU/mL 之间任意选择,此实验选择 $\lambda=0.25\text{EU/mL}$ 的鲎试剂来进行实验。

2.3.1 内毒素标准溶液(C 溶液)的制备:将 RSE 稀释到所需要的 $4\lambda=1\text{EU/mL}$ 、 $2\lambda=0.5\text{EU/mL}$ 浓度溶液,记为 E₁、E_{0.5},备用。

2.3.2 供试品溶液(A 溶液)的制备:

1.0mL S + 1.0mL w → 2.0mL S₂

1.8mL S₂ + 1.8mL w → 3.6mL S₄

1.8mL S₄ + 1.8mL w → 3.6mL S₈

1.8mL S₈ + 1.8mL w → 3.6mL S₁₆

2.3.3 内毒素供试品溶液(B 溶液)的制备:

0.5mL S + 0.5mL E₁ → 1.0mL S₂E_{0.5}

0.5mL S₂ + 0.5mL E₁ → 1.0mL S₄E_{0.5}

0.5mL S₄ + 0.5mL E₁ → 1.0mL S₈E_{0.5}

0.5mL S₈ + 0.5mL E₁ → 1.0mL S₁₆E_{0.5}

2.3.4 反应测试:取鲎试剂分别与 A、B 及 C 溶液反应,结果见表二

浓度溶液,记为 E₁、E_{0.5},备用。

2.4.2 用 X-I 代替 BET 水将 S 按 2.

3.2 稀释至所需的 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍的溶液(A 溶液),记为 S₂¹、S₄¹、S₈¹、S₁₆¹;同

时配制含 2λ 内毒素的样品内毒素溶液(B 溶液),记为 $S_2^1E_{0.5}$ 、 $S_4^1E_{0.5}$ 、 $S_8^1E_{0.5}$ 、 $S_{16}^1E_{0.5}$ 。详见如下:

A 溶液的制备:

$1.0\text{mLS} + 1.0\text{mLX-I} \longrightarrow 2.0\text{mLS}_2^1$

$1.8\text{mLS}_2 + 1.8\text{mLX-I} \longrightarrow 3.6\text{mLS}_4^1$

$1.8\text{mLS}_4 + 1.8\text{mLX-I} \longrightarrow 3.6\text{mLS}_8^1$

$1.8\text{mLS}_8 + 1.8\text{mLX-I} \longrightarrow 3.6\text{mLS}_{16}^1$

B 溶液的制备:

$1.0\text{mLS}_2^1 + 0.05\text{mLE}_{10} \longrightarrow 1.0\text{mLS}_2^1E_{0.5}$

$1.0\text{mLS}_4^1 + 0.05\text{mLE}_{10} \longrightarrow 1.0\text{mLS}_4^1E_{0.5}$

$1.0\text{mLS}_8^1 + 0.05\text{mLE}_{10} \longrightarrow 1.0\text{mLS}_8^1E_{0.5}$

$1.0\text{mLS}_{16}^1 + 0.05\text{mLE}_{10} \longrightarrow 1.0\text{mLS}_{16}^1E_{0.5}$

2.4.5 反应测试:取鲎试剂分别与 A、B 及 C 溶液反应,结果见表三

表三 初筛试验结果二(X-I 稀释样品)

反应项目	A				B				C	D
	S_2^1	S_4^1	S_8^1	S_{16}^1	$S_2^1E_{0.5}$	$S_4^1E_{0.5}$	$S_8^1E_{0.5}$	$S_{16}^1E_{0.5}$		
结果	--	--	--	--	++	++	++	++	++	--

2.5 干扰验证试验 A(加 X-I):

$E_{0.06}$ 备用。

2.5.1 选用 $\lambda=0.25\text{EU/mL}$ 的鲎试剂,使用稀释剂-I 对 S 的 MVD 浓度作干扰验证。用稀释剂-I 将样品 S 稀释 2 倍记为 S_2^A 。另做一组用 BET 水代替 S 用稀释剂-I 作同样的稀释作为对照(SW)以验证稀释剂-I 对鲎实验有无干扰。

2.5.3 内毒素供试品溶液的制备(B 溶液系列)

取 S_2^A 代替 w,从 E_{10} 稀释到 0.5EU/mL 、 0.25EU/mL 、 0.125EU/mL 、 0.06EU/mL 记为 $S_2^AE_{0.5}$ 、 $S_2^AE_{0.25}$ 、 $S_2^AE_{0.125}$ 、 $S_2^AE_{0.06}$ 备用。

2.5.2 内毒素系列溶液制备(C 溶液系列):

2.5.4 对照溶液的制备

用 w 将内毒素稀释成 10EU/mL 记为 E_{10} ;以及 2λ 、 λ 、 $1/2\lambda$ 、 $1/4\lambda$ 溶液,即 0.5EU/mL 、 0.25EU/mL 、 0.125EU/mL 、 0.06EU/mL 记为 $E_{0.5}$ 、 $E_{0.25}$ 、 $E_{0.125}$ 、

取 Sw 从 E_{10} 稀释到 0.5EU/mL 、 0.25EU/mL 、 0.125EU/mL 、 0.06EU/mL , 记为 $\text{Sw}E_{0.5}$ 、 $\text{Sw}E_{0.25}$ 、 $\text{Sw}E_{0.125}$ 、 $\text{Sw}E_{0.06}$ 备用。

2.5.5 反应测试与结果,见表四

表四 干扰验证试验 A 结果

项目 (EU/mL)	$2\lambda(0.5)$	$\lambda(0.25)$	$1/2\lambda(0.125)$	$1/4\lambda(0.06)$	D/A	反应终点 浓度(EU/mL)
C 系列	++++	++++	----	----	--	0.25
B 系列 S_2^A	----	----	----	----	--	>0.5
对照 Sw	++++	++++	----	----	--	0.25

2.6 干扰验证试验 B(加 X-I):

2.6.1 选用 $\lambda=0.06\text{EU/mL}$ 的鲎试剂对 S MVD 浓度(S_8)作干扰验证,用 X-I 按如下将 3 批 S 分别稀释 8 倍记为 $1S_8^B$ 、 $2S_8^B$ 、 $3S_8^B$ (A 溶液)

$0.2\text{mL S} + 0.8\text{ mL X-I} + 0.6\text{mL w} \longrightarrow 1.6\text{mL S}_8^B$

2.6.2 内毒素系列溶液制备(C 溶液系列):用 w 将内毒素稀释成 16λ 、 8λ 、 4λ 、 2λ 、 λ 、 $1/2\lambda$ 、 $1/4\lambda$ 溶液,即 1.0EU/mL 、 0.5EU/mL 、 0.25EU/mL 、 0.125EU/mL 、 0.06EU/mL 、 0.03EU/mL 、 0.015EU/mL 记为 $E_{1.0}$ 、 $E_{0.5}$ 、 $E_{0.25}$ 、 $E_{0.125}$ 、 $E_{0.06}$ 、 $E_{0.03}$ 、 $E_{0.015}$ 备用。

2.6.3 将 3 批 S 按如下制备内毒素供试品系列(B 溶液系列):

$0.2\text{mL S} + 0.2\text{mL E}_1 + 0.8\text{ mL X-I} + 0.4\text{mL w} \longrightarrow 1.6\text{mL S}_8^B E_{0.125}$

$0.2\text{mL S} + 0.2\text{mL E}_{0.5} + 0.8\text{ mL X-I} + 0.4\text{mL w} \longrightarrow 1.6\text{mL S}_8^B E_{0.06}$

$0.2\text{mL S} + 0.2\text{mL E}_{0.25} + 0.8\text{ mL X-I} + 0.4\text{mL w} \longrightarrow 1.6\text{mL S}_8^B E_{0.03}$

$0.2\text{mL S} + 0.2\text{mL E}_{0.125} + 0.8\text{ mL X-I} + 0.4\text{mL w} \longrightarrow 1.6\text{mL S}_8^B E_{0.015}$

2.6.4 对照 S_w 中 S 用 w 代替,其余按 2.6.3 稀释

表五 干扰验证试验 B 结果

项目 (EU/mL)	$2\lambda(0.5)$	$\lambda(0.25)$	$1/2\lambda(0.125)$	$1/4\lambda(0.06)$	D/A	反应终点浓度 (EU/mL)
C 系列	++++	++++	-----	-----	--	0.25
$1S_8^B$	++++	++++	-----	-----	--	0.25
B 系列	++++	++++	-----	-----	--	0.25
$2S_8^B$	++++	++++	-----	-----	--	0.25
$3S_8^B$	++++	++++	-----	-----	--	0.25
对照	S_w	++++	-----	-----	--	0.25

3. 讨论

3.1 由表二的初筛试验结果一可知甲磺酸帕珠沙星注射液对鲎试剂与内毒素的反应有较强的抑制作用,其原因为:二价阳离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)能激活凝固酶原引起鲎试剂的凝集反应,甲磺酸帕珠沙星注射液能与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 络合形成稳定的络合物,减少鲎试剂激活因子——游离态 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的浓度,使反应钝化,表

现为抑制作用。

3.2 从表三结果可知使用稀释剂—I 制备 S 能有效消除干扰,表明了用稀释剂—I 稀释 S 可补充溶液中因络合反应而减少的 Mg^{2+} ,干扰作用得到消除。

3.3 表四实验结果中 S_2^A 仍有干扰,表明甲磺酸帕珠沙星注射液性质相对复杂,可能有包裹标准内毒素的特性,2.4 实验与 2.5 实验结果不一致,这是否与实

验制备方法有关?

3.4 表五实验结果表明:改变了内毒素供试品溶液的制备方法并扩大了稀释倍数,1)稀释剂-I浓度为50%对鲎实验反应无干扰;2)C系列反应和B系列反应在 2λ 全部阳性(+), $1/4\lambda$ 全部阴性(-),该实验有效;表明该S用稀释剂-I稀释S(稀释剂-I 50%)在8倍稀释液下对鲎试

验不存在干扰作用,因此该S可以选择鲎试剂灵敏度0.06EU/mL,用稀释剂-I稀释8倍来进行细菌内毒素检查。

3.5 笔者在实验过程中发现,甲磺酸帕珠沙星注射液在做细菌内毒素检查时,制备好的内毒素供试品溶液(B溶液系列)应及时与鲎试剂反应,放置时间不宜过长。

一水乳糖的细菌内毒素检查凝胶法及定量法干扰试验

熊向党 湛江安度斯生物有限公司

一种药品进行细菌内毒素检查之前,必须确认对细菌内毒素检查无干扰作用,各国药典中均要求在对某种样品进行细菌内毒素检查前要进行干扰验证试验。在有干扰情况下的细菌内毒素检测结果(凝胶法中的阳性、阴性结果,定量法中的细菌内毒素含量值)都是无效的。

干扰验证试验中,对于样品是否存在干扰的判断标准见下表。

表1 中美两国药典无干扰条件

	中国药典	美国药典
凝胶法无干扰条件	1、A、D 阴性 2、 $0.5\lambda \leq E_s \leq 2\lambda$ $0.5E_s \leq E_t \leq 2E_s$	1、A、D 阴性 2、 $0.5\lambda \leq E_s \leq 2\lambda$ $0.5\lambda \leq E_t \leq 2\lambda$
定量法无干扰条件	1、 $ \gamma \geq 0.98$ 2、 $50\% \leq R \leq 200\%$ 3、 $T_D > T_C$	1、 $ \gamma \geq 0.98$ 2、 $50\% \leq R \leq 200\%$ 3、 $C_C > C_D$

本文通过比较一水乳糖凝胶法与定量法的干扰试验,介绍定量法在样品干扰判断上的优势。

1、材料及器具

鲎试剂:批号:Y2811X, Y2521X, X3241X, 规格:1.2mL/支,灵敏度0.25EU/mL,厂家:美国 Endosafe 公司

内毒素工作标准品:批号:EX81432, EX72972,厂家:美国 Endosafe 公司

细菌内毒素检查用水(BET水):批号:E82380,规格:30mL/瓶,厂家:美国 Endosafe 公司

一水乳糖:批号:419567;

细菌内毒素检测仪:型号:ELx808IU,厂家:美国 BioTek 公司

2、实验方法

2.1 一水乳糖凝胶法干扰试验

初次实验,样品内毒素限值设定在

5EU/g,选用灵敏度为 0.25EU/mL 的鲎试剂,该样品最低有效浓度 $MVC = \lambda/L = 0.05\text{g/mL}$ 。分别制备 0.05 g/mL 浓度样品溶液(A 溶液)、0.25 $\lambda \sim 2\lambda$ 浓度的内毒素溶液(C 溶液)及 0.05 g/mL 浓度样品溶液中含有 0.25 $\lambda \sim 2\lambda$ 浓度内毒素的溶液(B 溶液),将 A、B、C 溶液分别与鲎试剂反应。另外取 BET 水(D 溶液)与鲎试剂反应。结果如下表:

表 2 干扰试验结果

D 溶液	C 溶液			
— —	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	-----
A 溶液	B 溶液			
++	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	++++

因为反应结果异常,又进行下面的不同实验研究。

样品内毒素限值设定到 10EU/g,选用灵敏度为 0.25EU/mL 的鲎试剂,样品最低有效浓度 $MVC = \lambda/L = 0.025\text{g/mL}$ 。反应结果如下表:

表 3 干扰试验结果

D 溶液	C 溶液			
— —	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	-----
A 溶液	B 溶液			
— —	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	++++

样品内毒素限值设定到 20EU/g,选用灵敏度为 0.25EU/mL 的鲎试剂,样品最低有效浓度 $MVC = \lambda/L = 0.0125\text{g/mL}$ 。反应结果如下表:

表 4 干扰试验结果

D 溶液	C 溶液			
— —	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	-----
A 溶液	B 溶液			
— —	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
	++++	++++	++++	++++

2.2 定量法干扰试验

样品内毒素限值设定在 5EU/g, 建立标准曲线浓度为 5、0.5、0.05EU/mL, 样品最低有效浓度 $MVC = \lambda/L = 0.05\text{EU/mL} \div 5\text{EU/g} = 0.01\text{g/mL}$ 。本试验样品检测浓度选择 0.025g/mL。结果如下表。

表 5 鲎试剂与 C、D 溶液反应结果

内毒素浓度(EU/mL)	平均反应时间(s)
0.05	2216.5
0.5	1216.5
5.0	676.5
0(D 溶液)	3260

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 $LgT = 3.0094 - 0.2577LgC$, 其相关系数绝对值 $|r| = 1.0$ 。

表 6 鲎试剂与 A、B 溶液反应结果

样品检测 浓度	A 溶液		B 溶液		
	平均反应时间	原液浓度	平均反应时间	添加内毒素浓度	回收率(R)
0.025g/mL	1940s	3.324EU/g	1071s	0.5EU/mL	150.14%

3、结果分析

3.1 含一定量内毒素的样品对凝胶法干扰判断的影响

表 6 中的定量法检测结果显示, 样品的内毒素含量为 3.324EU/g, 接近 5EU/g 的限值, 回收率为 150.14%, 符合无干扰条件。根据表 6 的结果可计算样品在 0.05g/mL 的检测浓度下内毒素含量为 $3.324\text{EU/g} \times 0.05\text{g/mL} = 0.1662\text{EU/mL}$, 从表 2 凝胶法干扰试验结果看出, 鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)为 0.125EU/mL, 所以会出现表 2 这样的 A 溶液阳性的检测结果。在 0.025、0.0125g/mL 的检测浓度下, 内毒素含量也分别达到 0.0831、0.0415EU/mL, 由于样品本身含有

一定量的内毒素, 导致试验出现了表 3、表 4 这样的 B 溶液 E_t 值偏高的检测结果, 影响我们对该样品干扰情况的判断。

3.2 中美两国凝胶法细菌内毒素检查干扰判断的区别

在样品对细菌内毒素检查是否有干扰的判断上, 中美两国检查法的判断标准略有不同。表 3、表 4 的检测结果, 依据美国药典的标准判断, 因为 E_t 不在 0.5λ 与 2λ 之间, 所以应判断为存在干扰。但如依据中国药典的标准, 因为 E_s 在 0.5λ 与 2λ 之间, E_t 在法规中的要求最低浓度仅为 0.25λ 浓度, 表 3、表 4 的 E_t 都等于 0.25λ , 其值在 $0.5E_s$ 与 $2E_s$ 之间, 所以干扰情况判断为无干扰。

在另外一种情况下也会出现干扰结果判断的不同,当 E_s 终点浓度为 2λ , E_t 终点浓度为 0.5λ , 依据美国药典标准判断为无干扰,依据中国药典标准判断为有干扰。比较妥当的凝胶法无干扰条件应结合中美两国的检查法,在 A、D 溶液均为阴性的前提下,既要求 E_s 、 E_t 均在 0.5λ 至 2λ 之间,也要求 E_t 在 $0.5E_s$ 至 $2E_s$ 之间。

3.3 定量法细菌内毒素检查在样品干扰判断上的优势

凝胶法干扰试验,法规要求 A 溶液必须为阴性结果。当 A 溶液出现阳性结果时,实验员往往难以加以分析解决。因为 A 溶液阳性结果的可能性有两种,一种是因为 A 溶液含有一定量的内毒素,出现这种情况是无法通过凝胶法干扰试验的验证的,除非找到新的不含可测内毒素的样品,但对于一些企业在新药研发初

始阶段热原的控制可能会不太理想,难以解决问题。另外一种原因是因为 A 溶液有假阳性结果,这种情况在国内的法规上还没有提出恰当的解决办法。

定量法在干扰判断上有一定的优势。各国药典检查法没有 A 溶液的内毒素含量的要求,也就是说即使 A 溶液凝胶法呈阳性结果,也可以选来做定量法的干扰试验,可见定量法干扰试验对样品的选择没有挑剔性。虽然美国 FDA 在定量法干扰试验中对 A 溶液的内毒素含量有一定要求,但事实是,即使 A 溶液含有一定量的内毒素,定量法也容易得到理想的回收率来判断干扰情况。另外因为有回收率这只“法眼”,定量法很容易对假阳性结果做出判断,当样品出现假阳性时,回收率的结果就会不理想,往往会大于 200%,超出法规的限制范围。

细菌内毒素检查在药品生产质控上的应用(一)

冯聚锦 湛江安度斯生物有限公司

1. 鲎试验对药品生产质控的意义

1.1 药品生产企业实施 GMP 的意义在于使人们对药品质量的控制从传统的成品检验,上升到对药品生产全过程进行有效监控的现代质量管理模式。美国食品及药物监督管理局(FDA)自 2004 年起大力推行“过程分析技术”(Process Ana-

lytical Technology, PAT),更凸显了医药发达国家对药品生产过程质控的高度重视。

1.2 在医药工业的 GMP 条件下,“热原就是内毒素,控制内毒素就控制了热原”已成为共识。基于这种认识,许多国家的药典已由细菌内毒素检查项取代热

原检查项并且成为了发展的趋势,将会有越来越多的药典品种使用鲎试剂检查。不仅如此,鲎试验法在医药工业上目前是注射药品生产质控的最好方法,它为众多的药品生产企业带来显著的经济效益。

剂最早的国家,也是鲎试剂产量及用量最多的国家。尽管如此,两国在鲎试剂应用的水平、程度及范围上仍有明显的差异。中国药典 2005 年版收载的 BET 品种有 160 多种,而 USP 收载的 BET 品种超过 700 种。

1.3 中国和美国是世界上应用鲎试

	方法学应用的比较				应用领域的比较	
	凝胶法	动态浊度	动态显色	终点显色	终产品检验	生产质控
中国	>90%	5%	— —	— —	>70%	<30%
美国	42%	25%	30%	3%	30%	70%

在医药发达国家,一个注射药品生产体系的建立或 GMP 认证,都要求在生产质控上应用鲎试验方法。我国目前的 GMP 认证还没有这方面的要求,应该说是个缺陷,但发展趋势必然会补充相应的要求。

2. 生产质控的基本特点及要求

2.1 按控制的时机分类:

①事前控制:对正在生产的产品质量控制有效;

②事后控制:对正在生产的产品质量控制无效,只对以后生产的产品质量控制有效。

2.2 按控制的方式分类:

①静态控制:对已完成的生产工序的质控无效,只对以后的生产工序的质控有效;

②动态控制:对正在进行或将要进行的生产工序的质控有效。

2.3 生产质控对检验方法的要求

①采样方便、微量

②操作简单、快速

③检查准确、灵敏

④结果可靠,数据处理自动化

2.4 鲎试验法目前是满足药品生产质控的最好方法

2.4.1 鲎试验的优点:

①采样方便、微量:0.1~1mL

②操作简便、快速:7~60 分钟

③灵敏、准确:最低可测 0.001EU/mL 的内毒素含量,定量检测的范围可涵盖 0.001~1,000EU/mL。

④技术成熟,自动化程度高

2.4.2 鲎试验能使药品生产的热原控制实现动态监控和事前控制。

3. 药品生产过程内毒素的控制方法

3.1 内毒素监控体系

3.1.1 监控对象

3.1.1.1 重要的媒体及原料

①水是制药工业最重要的媒体,是首要的监控对象

②量大的原料

3.1.1.2 生产过程添加的各种辅剂

3.1.1.3 与中间体接触的各种用具、

器皿及终产品的包装容器

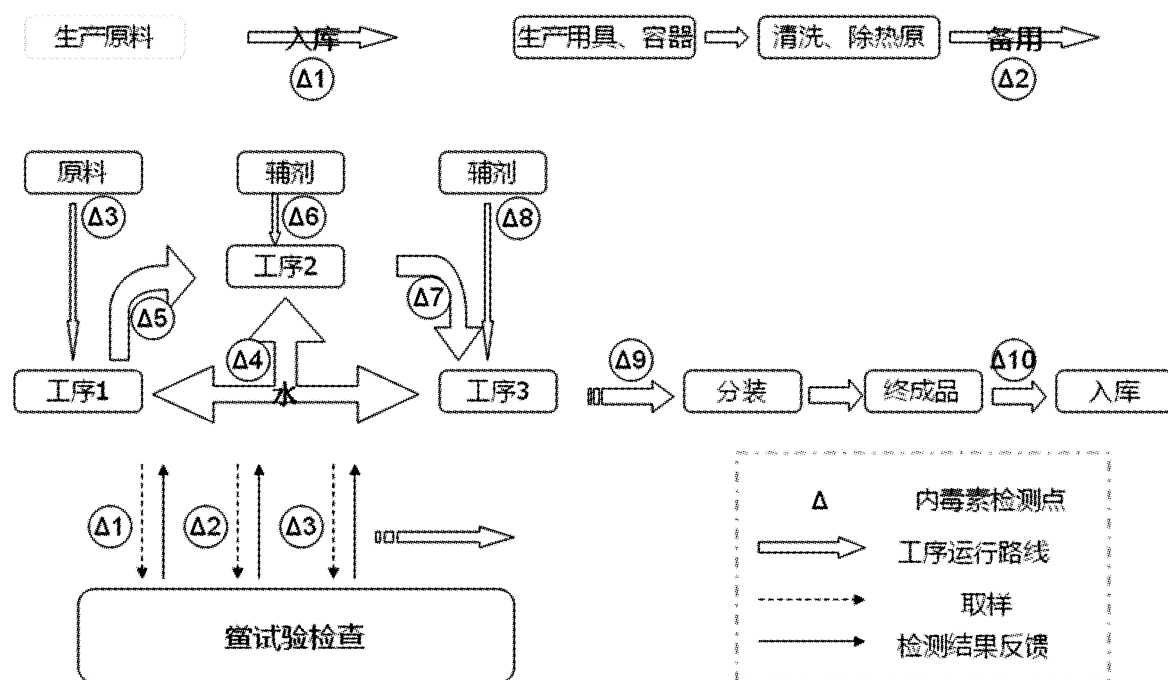
3.1.1.4 各工序前后中间体内毒素水平的变化

至少在生产过程的重要工序之间要设置检测点,例如在除热原工序后设置检测点,检测该工序除热原(干烤、过滤、吸

附)的效果。又如在分装工序前需抽检,确保中间体内毒素水平不超出控制水平才进行分装。

3.1.1.5 烘箱等除热原设备的验证

3.1.2 药品生产过程细菌内毒素监控体系



3.2 建立内毒素监控体系的步骤

①确定药品的内毒素限值L;

②分析药品生产过程,合理设置内毒素监测点;

③制定各监测点合理的内毒素控制水平 L_x ;

④进行干扰性验证试验确定各监测点样品的有效浓度或有效稀释范围,选择所用蜜试剂的灵敏度。

⑤进行日常的内毒素监测检查。

3.3 内毒素控制限值的确定

3.3.1 如果终产品的内毒素限值为

L ,各监测点的内毒素控制水平为 L_x ,则 $L_x < L$ 。

3.3.2 某些原料或中间体在其后的生产工序中将要被稀释,计算其稀释后的内毒素含量 ED ,如果 $ED < 1/4L$,可以允许该原料或中间体的内毒素控制水平 $L_x > L$ 。例如,某种主要原料在生产时将要被稀释10倍使用,如果 L 为 0.5EU/mL ,可以允许该原料的内毒素控制水平 $L_x < 1.25\text{EU/mL}$ 。

3.3.3 如果能确实保证在除热原工序后的中间体的内毒素含量少于 $1/4L$,

可允许该工序前的 L_x 适当大于 L 。

3.3.4 在制定各监控点 L_x 时,应注意热原具有积累性。制药企业需要根据自身的生产条件及工艺水平来制定合理的 L_x 值。在欧美通常以 $1/10L \sim 1/4L$ 作为 L_x 。

3.4 千万不要以药典的内毒素限值作为控制值

据了解,不少企业的质检人员以药典给出的该品种的内毒素限值作为产品质量的控制值或者作为产品出厂放行的合格值。这种做法其实不好,原因如下:

① 药典给出的药品的内毒素限值是药品质量的最低要求。任何有一定质量能力的企业都不应以这最低的要求作为自己产品的标准。

② 细菌内毒素检查是一项生物检查,有较宽的精确范围。特别是凝胶法鲎试验,精确度只有 L 值的 $50 \sim 200\%$,当产品的内毒素含量值接近限值时,容易出现结果的不确定性。

③ 理想的产品放行值应 $\leq 1/4$ 药典限值。

3.5 各监控点样品的干扰验证

3.5.1 目的:找出每个监测点的供试品的无干扰浓度

3.5.2 抽取监测点的适量样品

3.5.3 选择凝胶法鲎试剂的灵敏度或定量鲎试剂的标准直线范围;

3.5.4 计算检测样品的最大有效稀释倍数 MVD

3.5.5 样品与鲎试剂相容性的初筛

试验;

3.5.6 样品与鲎试剂的干扰试验

3.5.7 干扰验证举例(凝胶法):

某生物制品在冷冻干燥前的分装液(S)为 120mg/mL , $L_x < 0.05\text{EU/mg}$ ($L < 0.2\text{EU/mg}$)。

① $L_s < 0.05\text{EU/mg} \times 120\text{mg/mL} = 6.0\text{EU/mL}$;

② 若选用 $\lambda = 0.125\text{EU/mL}$ 的 TAL ,最大有效稀释;

$$MVD_{\lambda} = \frac{L_s}{\lambda} = \frac{6.0}{0.125} = 1 : 48$$

③ 取分装液(S)用 BET 水作 $1:48$ 倍稀释,得供试液(S48);

④ 取 $\lambda = 0.125\text{EU/mL}$ 的 TAL 对 S48 作干扰试验;

⑤ 如果干扰试验结果表明 S48 对 BET 无干扰,就把这个浓度定为 S 的日常监测浓度,即每批产品分装前,取 S 稀释成 S48,用 $\lambda = 0.125\text{EU/mL}$ 的 TAL 作检查。如果检查结果为阳性,表明 S 的内毒素含量超标 ($\geq 0.05\text{EU/mg}$),不能进入分装冻干工序;如果检查结果为阴性,S 可进行分装冻干。

3.6 生产过程细菌内毒素监控的常规检查

① 采样

② 把样品制备成供试液(如前 S48)

③ 鲎试验检查

④ 结果分析

⑤ 将信息反馈至生产控制系统

“生物探针 3.0”细菌内毒素检测系统介绍

熊向党 湛江安度斯生物有限公司

中国药典 2005 年版正式收载细菌内毒素光度测定法,国内开展该方法的企业单位越来越多。光度法细菌内毒素检测除了要用到专门的检测仪器外,还需配备专业的检测软件。如美国 Endosafe 公司的 EndoScan-V 软件、美国 ACC 公司 (Associates of Cape Cod, Inc) 的 Pyros Kinetix 软件,英国 Lab Kinetics Ltd 公司的 ATiLog 软件。“生物探针”是湛江安度斯生物有限公司专门为美国 ELx88IU 超级酶标仪及英国 ATi/LKL/LKM 系列动态试管仪研发的细菌内毒素检测软件,目前软件版本已更新至 3.0 版。本文通过“生物探针”3.0 版本细菌内毒素检测软件的介绍,让读者了解光度法细菌内毒素检测中的相关参数及其意义。

一、用户设置

首次运行“生物探针”软件,用 ZACB 用户登录,登录密码为 zacb1234。登录成功后,即可分别进入各功能模块,包括用户设置、数据采集和数据分析。

先在用户设置里创建新的用户和密码,一般用实验人员的姓名创建新的用户,每创建一个新的用户,软件将在计算机系统中自动生成一个文件名与用户名相同的文件夹,用于保存该用户的数据文件,便于各个用户的数据管理。

二、数据采集(运行测试)

“生物探针”软件可以连接美国 BioTek 公司的 ELx808IU 仪器和英国

Lab Kinetics 公司的 ATi/LKL/LKM 系列仪器。进入数据采集功能模块后,软件自动判断所连接的仪器,进入该型号仪器的数据采集界面。

(一) ATi/LKL/LKM 仪器数据采集

1、ATi/LKL/LKM 仪器数据采集的步骤:

(1)制备各反应溶液;

(2)选择用户登录软件,进入软件数据采集界面;

(3)选择并确认测试方法、采样间隔、反应时间、预设 RT 值、仪器工作波长;

(4)点击“开始”按钮,使软件进入待采集状态;

 开始

(5)将装有反应混合液的反应试管插入仪器各反应孔中;

(6)根据各反应孔中插入的反应试管的反应项目,如阴性对照、内毒素标准及样品等,在软件对应的管号里填写相应的内容。

(7)点击“数据填写检查”按钮,检查各管填写内容是否符合规范;

 数据填写检查

(8)待反应结束后,退出数据采集,也可在反应过程中点击“停止”按钮手动结束数据采集。

2、反应项目的填写

在试管名称列点击鼠标右键,即可弹

出试管名称选择菜单,应根据各管号插入的反应试管的反应项目,填写相对应的试管名称。

管号	试管名称	样品批号
1		
2		
3		
4		
5		
6		

阴性对照
内毒素标准
样品

删除一行

当试管名称为“样品”时,在“稀释倍数/浓度”列填写稀释倍数或样品检测浓度后,点击鼠标右键弹出样品检测浓度的单位选择,如 mg/mL,此时检测报告中,样品的原液浓度即以 EU/mg 为单位。也可直接在此列输入样品的稀释倍数,如 8,此时检测报告中,样品的原液浓度即以 EU/mL 为单位。

管号	试管名称	样品批号	稀释倍数/浓度	标准内
1	样品		0.25 mg/mL	
2	样品		0.25	
3				
4				
5				
6				

×
mg/mL
g/mL
U/mL

3、预设限值(预设 OD 值或预设 RT 值)

动态法中,需要预先设置一个固定的 OD 值或 RT 值,Pyros Kinetix 软件中称为 Threshold OD,EndoScan-V 软件中称为 Onset OD。反应溶液的 OD 值或 RT 值到达预设限值的时间称为反应时间,反

应时间是动态法分析中必须的一个参数。

仪器或试剂厂家一般都会针对自身的产品提供一个预设限值的参考值。同样的软件,当选用不同的检测方法、不同的仪器、不同的检测波长,推荐的预设限值参考值有所不同,下面列出常见的参考值。

生物探针			EndoScan-V		Pyros Kinetix
ATi/LKL/LKM 仪器		ELx808IU 仪器	0.05 (KTA)	0.1 (KCA *)	0.02 (KTA)
405nm	660nm				
92% (KTA *)	95% (KTA)	0.05 (KTA)			

* KTA:动态浊度法分析 * KCA:动态显色法分析

仪器或试剂厂家推荐的预设限值只是一个参考值,用户可根据自身需要设置不同的预设限值,但需要注意的是,一旦

预设限值确定下来,就不能再更改。一般情况下,不同的预设限值对检测结果的影响不大,下表中是生物探针软件分别对某

个 ATi 仪器数据及 ELx808IU 仪器数据 OD 值时的分析结果。
进行分析时,选择不同的预设 RT 值或

预设 OD	相关系数	回收率 (%)	原液浓度 (EU/mL)	预设 RT	相关系数	回收率 (%)	原液浓度 (EU/mL)
0.01	-1.0000	86.44	32.31	98%	-0.9969	88.58	2.050
0.03	-0.9985	86.04	33.31	95%	-0.9958	96.90	2.086
0.05	-0.9975	85.92	33.36	92%	-0.9954	99.50	2.126
0.1	-0.9958	88.92	34.85	85%	-0.9953	101.28	2.166

4、调用标准曲线

调用动态法参考标准曲线

“生物探针”软件允许在数据采集过程中调用存档标准曲线,当样品的 OD (RT)值达到预设 OD(RT)值时,利用调用的存档标准曲线,计算样品的内毒素含量。

数据分析时也可调用标准曲线来计算样品的内毒素含量,各国药典中并未提及关于标准曲线的调用,仅美国食品药品监督管理局(FDA)在 1987 年的鲎试验应用指南及 1991 年的动态法鲎试验应用指南中有存档标准曲线的使用指导方法。在 FDA 指导性文件中,要求首先要验证实验室的标准曲线的稳定性,要求至少连续 3 天的标准曲线均满足一定要求。

一般情况下建议用户每次试验均建立一条标准曲线,如 EndoScan-V 软件没有设计标准曲线调用功能。但 Pyros Kinetix 和 ATiLog 软件不仅设计有调用存档标准曲线的功能,而且有调用手动输入的标准曲线的功能。调用标准曲线时,只需要引用标准曲线的斜率和截距这两个参数就可以计算样品的内毒素含量。

(二) ELx808IU 仪器数据采集

1、ELx808IU 仪器数据采集的步骤:

- (1)制备各反应溶液;
- (2)选择用户登录软件,进入软件数据采集;
- (3)选择并确认仪器工作波长、实验方法、反应时间、预设 OD 值;

确定并发送实验参数

- (4)点击“确定并发送实验参数”按钮,将实验参数输入仪器;
- (5)在测试面板界面选择试管项目,如阴性对照、内毒素标准、样品、样品对照等,然后填写对应的浓度、样品名称、批号、稀释倍数或浓度、添加的内毒素浓度等信息,再在酶标板相应的孔的位置双击鼠标左键,即可完成反应项目的填写;
- (6)将反应溶液、试剂等加入无热原酶标板各孔中,放入仪器;
- (7)点击“开始”按钮,开始数据采集;
- (8)待反应结束后,退出数据采集,也可在反应过程中点击“停止”按钮手动结束数据采集。

2、反应波长

ELx808IU 仪器有多个波长选择,在进行细菌内毒素检测时,可以选择不同的波长进行试验。



当选择“双波长”时,进行的是“波长 2 减波长 1”的“减模式”,即将波长 2 的读数减去波长 1 的读数作为该时刻的 OD 值。如果需要选择 2 个波长进行试验,可选择“多波长”模式,然后将波长 3 设置为“0”即可。

在使用不同波长对同一样品进行细菌内毒素检测时,检测结果误差一般不大。下表是使用不同波长在同一试验中进行细菌内毒素检测的试验结果。

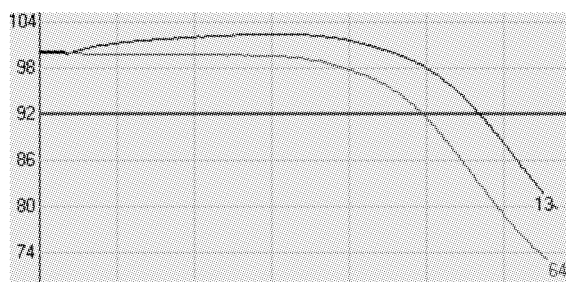
检测波长	样品 1 (EU/mL)	样品 2 (EU/mL)	样品 3 (EU/mL)
340nm	3.44	4.69	5.79
405nm	3.36	4.40	5.20
630nm	3.41	4.27	5.18

3、混匀反应混合液

在细菌内毒素检测试验中,当萤试剂与内毒素溶液混合后,一般要求将混合液轻轻混匀后再放置 37 度恒温环境下反应。ELx808IU 仪器有振板功能,在进行动态法试验时,需打开振板功能使混合液在反应前混匀。动态试管仪没有振动功能,一般将装有混合液的反应试管放置漩涡混合器上轻轻一点,使混合液混匀即可。



如果不将混合液混匀,有可能会出现反应曲线的异常。下图是动态试管仪中,经混匀的混合液(64)与未经混匀的混合液(13)的反应曲线。



三、数据分析

点击“生物探针”软件的“提取数据”按钮,选择并打开数据文件,即可对已经保存的数据文件进行分析。

1、样品检测时数据分析的步骤:

- (1)选择并打开数据文件;
- (2)选择并确认预设 RT 值或预设 OD 值;
- (3)通过标准曲线的相关系数及阴性对照的反应情况判断实验是否有效;
- (4)通过样品的回收率判断样品的检测结果是否有效;
- (5)通过比对样品的“原液浓度”值与样品的限值,判断样品是否合格。

2、数据回归分析

光度测定法分为动态法和终点法,它是利用萤试剂与内毒素的混合物在反应过程中的透光度(或吸光度)变化与内毒素浓度的关系来定量检测内毒素的一种方法,它首选要建立标准曲线。动态法是建立内毒素浓度与反应时间关系的标准曲线,而终点法是建立内毒素浓度与透光度(或吸光度)关系的标准曲线。标准曲线建立的方法一般用线性回归的方式,也有用多项式回归的方式拟合。EndoScan

—V 软件可以分别选用这两种回归分析方法建立标准曲线,“生物探针”采用的是线性回归的方式,如下图。

回归方程 $LgTg=3.0768-0.2726LgC$

3、相关系数(r)

相关系数是衡量标准曲线的两个变量(内毒素浓度与反应时间或内毒素浓度与透光度)的相关程度,它的取值范围在-1~1之间,r的绝对值越是接近于1,说明标准曲线的两个变量的线性相关程度越高、检查结果越准确。各国药典要求 $|r| \geq 0.980$ 。

影响相关系数的因素主要有试剂的质量、检测仪器的性能以及实验人员的操

作水平。

4、回收率

光度法检测时,在样品中添加一定量的标准内毒素,然后通过检测分析计算添加的标准内毒素的检测含量,添加的标准内毒素的检测值与添加的标准内毒素的实际值的比值百分比即为回收率。回收率在细菌内毒素检测分析中反映的是样品对细菌内毒素检测分析的干扰程度,各国药典要求,当回收率在50%~200%之间时,表明无干扰。

我们通过下面的一个例子来分析回收率的计算。

管号	试管名称	样品批号	稀释/浓度	标准内毒素EU/mL	回收率%	达限时间s	平均时间s	变异系数CV%	实测值EU/mL
A1	阴性对照					> 3600	> 3600	0.00	< 0.0158
A2	阴性对照					> 3600			
B1	内毒素标准			0.05		2720	2730	0.52	0.0457
B2	内毒素标准			0.05		2740			
C1	内毒素标准			0.5		1380	1400	2.02	0.5976
C2	内毒素标准			0.5		1420			
D1	内毒素标准			5		812	825	2.23	4.5736
D2	内毒素标准			5		838			
C3	样品头孢噻唑钠	090201	0.156mg/mL			> 3600	> 3600	0.00	< 0.0158
C4	样品头孢噻唑钠	090201	0.156mg/mL			> 3600			
D3	样品头孢噻唑钠	090201	0.156mg/mL	0.5	98.14	1480	1461.5	1.79	0.5065
D4	样品头孢噻唑钠	090201	0.156mg/mL	0.5		1443			

按照药典的说明,样品的回收率 $R = (C_s - C_t) / \lambda_m$,其中 C_t 、 C_s 分别表示通过回归方程计算出的样品溶液及添加了标准内毒素的样品溶液的内毒素浓度。在本例中即分别为 C3、C4 和 D3、D4 管号项目的内毒素实测值:<0.0158(EU/mL)和0.5065(EU/mL)。 λ_m 表示添加的标准内毒素的实际值,本例中即为0.5(EU/mL)。回收率 $R = (0.5065 - 0.0158) / 0.5 = 98.14\%$ 。当样品内毒素浓度低于标准

曲线最低点浓度时计算回收率,“生物探针”软件取样品内毒素浓度的参考值来计算,Pyros Kinetix 软件将样品内毒素浓度归零处理,EndoScan-V 软件有两种方式选择,一种是选择归零处理,另外一种选择是按样品内毒素浓度的有效值计算,即取标准曲线的最低点浓度。同样是本例的数据,在 Pyros Kinetix 软件中,回收率的计算 $R = (0.5065 - 0) / 0.5 = 101.3\%$;在 EndoScan-V 软件中,回收率的计

算 $R = (0.5065 - 0.05) / 0.5 = 91.3\%$,也可以按归零计算, $R = 101.3\%$ 。

影响回收率的因素最主要来自样品本身。鲎试剂与内毒素的反应是一个多级酶促反应,其正常反应需要中性的PH值、一定浓度的钠离子和二价阳离子,样品中如果存在影响这些因素的成份,就会得到不合适的回收率。

5、变异系数

光度法检测时,相同项目一般要求要有多次平行,即多个平行管(孔),然后取该平行管(孔)的平均值作为该项目的检测结果。但平均值与真实值间存在不可避免的误差。因此需要分析检测结果的精密度,对检测结果的可靠性和可信赖度作出合理判断。光度法检测中,用变异系数(相对标准偏差)来考察检测结果的精密度。动态法试验中,变异系数是平行管的反应时间的相对标准偏差,终点法试验

中,变异系数是平行管的OD值或RT值的相对标准偏差。各国药典中没有变异系数的要求,但各厂家一般对于变异系数都有一个建议接受标准值。

影响变异系数的因素主要有操作人员的操作水平、仪器的性能以及试剂的质量等。

6、检测结果有效值的判断

光度法检测中,样品中的内毒素含量是通过标准曲线计算出来的,标准曲线回归分析时,只是对内毒素浓度及对应参数(反应时间或透光度)所决定的曲线段进行数据处理,在给定的标准内毒素浓度区间范围内,回归分析的函数关系应保持单调性,回归分析不能外推,也就是说只有样品的内毒素检测值在建立标准曲线的标准内毒素浓度范围内才是有效值。

我们通过下面的例子来做说明。

管号	试管名称	样品批号	稀释/浓度	标准内毒素EU/mL	回收率%	达限时间s	平均时间s	变异系数CV%	实测值EU/mL	原液浓度	参考值
A4	阴性对照					> 3600	> 3600	0.00	< 0.0037		
A5	阴性对照					> 3600					
B4	内毒素标准			0.05		2102	2077.5	1.67	0.0460		
B5	内毒素标准			0.05		2053					
C4	内毒素标准			0.5		1201	1167.5	1.61	0.5902		
C5	内毒素标准			0.5		1174					
D4	内毒素标准			5		766	757	1.68	4.6021		
D5	内毒素标准			5		748					
E4	样品头孢噻呋钠	090601	0.3125mg/mL			2820	2875	2.71	0.0105	< 0.160 EU/mg	0.034 EU/mg
E5	样品头孢噻呋钠	090601	0.3125mg/mL			2930					

实验中,标准曲线浓度范围是 0.05 ~ 5.0EU/mL,样品头孢噻呋钠在 0.3125mg/mL 检测浓度时的实测值为 0.0105EU/mL,该实测值在标准曲线浓度范围外,因此不能作为一个有效值,它的有效值应该为 < 0.05EU/mL, 0.0105EU/mL 只能作为一个参考值。因此

样品头孢噻呋钠的原液浓度应该为 < 0.16EU/mg (0.05 EU/mL ÷ 0.3125mg/mL),参考值为 0.0105 EU/mL ÷ 0.3125mg/mL = 0.034EU/mg。检测报告最终的检测结果必须以有效值 < 0.16EU/mg 来表示。

细菌内毒素快速检测盒

Rapid TAL Test Kit

中国专利号：200410028071.9



特点：

- 使用方便：每支试剂直接加0.2ml样品复溶兼检测，与国际用法接轨。
- 快速：反应时间仅需20~25分钟。
- 同一试剂多个灵敏度选择：
 - $\lambda = 0.25 \text{ EU/mL}$ ，反应时间20分钟
 - $\lambda = 0.125 \text{ EU/mL}$ ，反应时间25分钟
- 试剂盒内配备一步到位的工作内毒素（GSE），复溶即可使用，无需稀释。
- 使用配套器具，实验如虎添翼：如果选用安度斯公司提供的可调移液器、采样瓶、干式管恒温仪等实验器具，可实现无需任何准备，随时、随地、快速地进行内毒素检测。

Charles River 新的 PTS 高灵敏度内毒素 检测卡片和葡聚糖检测卡片推出市场

——卡片比传统的检测方法可更快获得检测结果

Endosafe®—PTS™是快速的便携式检测系统，与传统检测方法比较，可提供更快、更简便的内毒素检测。现在，随着我们新的 0.005EU/mL 内毒素检测卡片和 PTS 葡聚糖检测卡片的推出，可以获得更高的检测灵敏度和快速的扩展检测能力。

在 20 分钟内可检测低至 0.005EU/mL 浓度的内毒素

新的 FDA
认证的
0.005EU/mL
PTS 卡片预置
了所有 LAL
实验所需要的
试剂，配合

Endosafe®—PTS™便携式分光光度计使用。灵敏度为 0.005EU/mL 的卡片允许更高的最大有效稀释，提高消除产品干扰的能力。定量结果可显示在屏幕上，也可下载到中央数据管理系统。

PTS 系统使用动态显色方法，可检测高至 10EU/mL 低至 0.005EU/mL 的内毒素水平。新的 0.005EU/mL 卡片在内毒素检测技术上是一个实质性的飞跃，因为它与传统的检测方法比较，可为用

户的每个实验节省将近 1 小时的时间。欲获得更多有关 Endosafe®—PTS™系统的信息请访问 Endosafe 网站。

检测葡聚糖污染所需时间少于 30 分钟

我们自豪地宣布一个新的检测方法问世了。该方法可帮助确保产品尽可能不含污染物，近期的调查显示有必要验证葡聚糖的存在，Endosafe®—PTS™(1—3) — β -D 葡聚糖实验是一个专为验证产品无葡聚糖污染而设计的快速检测方法，葡聚糖存在于大多数酵母和霉菌的细胞壁中，葡聚糖污染细胞组织液、酵母蛋白产生、空气质量样品和纤维素过滤器，导致实验结果假阳性，要求超标结果 (OOS) 调查。

Charles River 的新 PTS 葡聚糖实验允许快速简便地定量葡聚糖，能获得更好的过程监控和更快地解决 OOS。Charles River 葡聚糖卡片检测范围为 10—1000pg/mL，获得结果所需时间少于 30 分钟，使用的仪器与内毒素检测和革兰氏鉴别的仪器相同。

PTS 检测平台被全球广泛使用，它是具有成本效益可节省时间的快速检测方案。其它可使用 PTS 检测平台的应用包括革兰鉴别和蛋白浓度检测。

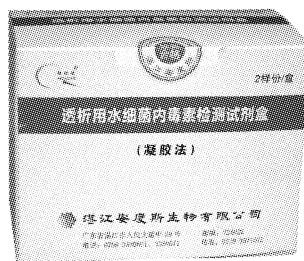


细菌内毒素检测试剂盒

——专为血液透析、血液中心设计的试剂盒

产品特点：

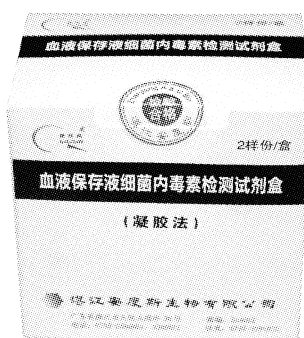
- ★专门针对血液保存液、空血袋、血液透析液及透析用水细菌内毒素检查而设计的试剂盒；
- ★采用经典的凝胶法内毒素检查技术，投资最小，检查成本最低；
- ★实验操作简易便捷，一步到位；
- ★准确、快速（20～60 分钟），结果可靠；
- ★无需专业培训，人人都可胜任使用。



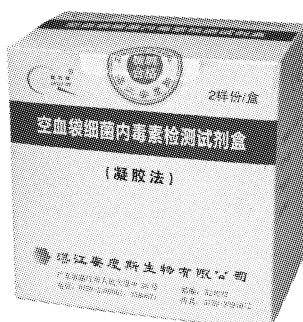
透析用水
细菌内毒素检测试剂盒



血液透析液
细菌内毒素检测试剂盒



血液保存液
细菌内毒素检测试剂盒



空血袋
细菌内毒素检测试剂盒

技术支持：

- ★湛江安度斯生物有限公司拥有覆盖全国的产品销售及技术服务网点；
- ★可为用户提供实验条件建立、人员培训以及技术咨询等全套完善的技术服务。

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) 3380672、3376925

网址：http://www.zacb.com 电子信箱 (Email)：ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn