

药试剂应用与进展

周海韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2003 年第 2 期 (总第 12 期)

2003 年 5 月 18 日

目 录

2005 年版中国药典细菌内毒素检查法修改草案	1
干热条件与内毒素灭活关系的研究	6
对几批热原检查异常的人血白蛋白的细菌内毒素分析	9
细菌内毒素限值的计算	12
ATi/LKL 动态试管分析仪	13
TAL-40 试管恒温仪	16

【编者按】药典收载的细菌内毒素检查法是从事药品细菌内毒素检查(BET)所必须遵循的重要法规。万事皆需与时俱进。细菌内检查法也不例外,自药典收载以来,每一版它的内容都有作修改。每经一次修订,它会变得更科学,更严谨,更趋与国际接轨。

21 世纪的第一年在 BET 领域内最有影响的事情是美国药典(USP)、欧洲药典(EP)和日本药局方(JR)达成的一个“BET 的国际协调方案”,也可以称为“统一的 BET 法”(详见本刊 2001 年第 1 期)。这一协调方案是当今世界医药经济高速发展,全球医药贸易一体化大背影下的产物。“统一的 BET 法”已于 2001 年起分别在 USP、EP 及 JP 同时生效。它的问世无疑对中国药典 2005 年版 BET 法的修订产生重大影响。

本期《进展》刊载了由中国药品生物制品检定所药理室撰写的《2005 年版中国药典细菌内毒素检查法修改草案》,以飨读者。广大从事 BET 工作的读者若对此修改草案有任何意见或建议,请将你的宝贵意见寄至“北京天坛西门,邮编:100050,中国药品生物制品检定所药理室,张国来或蔡彤”收。也可以寄来本刊编辑部转交。

2005 年版中国药典细菌内毒素检查法修改草案

中国药品生物制品检定所药理室

本法系利用从鲎的变形细胞中提取的试剂来检测或量化由革兰氏阴性菌产生的细菌内毒素。以判断供试品中细菌内毒素的含量是否符合规定的一种方法。细菌内毒素检查有两种方法:凝胶法和光度测定法。后者包括浊度法和显色基质法,是分别利用细菌内毒素在与鲎试剂形成凝胶过程中具有相关的浊度变化以及利用两者反应过程中产生的凝固酶能使特殊底物显色,从而定量测定细菌内毒素的方法。可使用其中任何一种方法进行试验。当测定结果有争议时,除有专门说明外,以凝胶法结果为准。

细菌内毒素的量用内毒素单位(EU)表示。

细菌内毒素国家标准品系自大肠杆菌提取精制而成,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是以细菌内毒素国家标准品为基准标定其效价,用于试验中鲎试剂灵敏度复核、干扰试验及设置的各种阳性对照。细菌内毒素工作标准品中每 1ng 细菌内毒素的效价应不小于 2EU,不大于 50EU。

细菌内毒素检查用水是指与灵敏度为 0.03EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下 24 小时不产生凝集反应的灭菌注射用水。用于细菌内毒素定量测定用的细菌内毒素检查用水,含内毒素的量应小于 0.005EU/ml。

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°C 干烤至少 1 小时,也可用其它适宜的方法,并应确证不干扰细菌内毒素的检查。如果要使用塑料器械,如微孔板和与自动微量加样器配套的吸头,要使用标明无内毒素并且对试验不干扰的器械。试验操作过程应防止微生物的污染。

(注:在本章中,“管”的意思包括其它任何反应容器,如微孔板中的孔。)

供试品溶液的制备 某些供试品需进行复溶、稀释或在水性溶液中浸提。对于过酸、过碱

或本身有缓冲能力的供试品,需调节被测溶液(或其稀释液)的 pH 值,一般要求供试品溶液的 pH 值在 6.0~8.0 的范围内。可使用酸、碱溶液或鲎试剂生产厂家推荐的适当的缓冲剂来调节 pH 值。酸或碱溶液要用检查用水在除去内毒素的容器中进行配制。缓冲剂必须经过认证无内毒素和无干扰因子。

内毒素限值的建立 药品、生物制品的细菌内毒素限值(L)一般按以下公式确定:

$$L = K/M$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值,以 EU/ml, EU/mg 或 EU/u 活性单位表示;

K 为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,以 EU/(kg·h) 表示。注射剂, $K = 5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 其中放射性药品注射剂, $K = 2.5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 鞘内用注射剂, $K = 0.2\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$;

M 为人用每公斤体重每小时最大剂量,以 ml/(kg·h)、mg/(kg·h) 或 U 活性单位/(kg·h) 表示,人均体重按 60kg 计算,注射时间不小于 1 小时,按 1 小时计算。

确定最大有效稀释倍数(MVD)

最大有效稀释倍数是供试品被允许的最大稀释倍数,在此稀释倍数下可进行内毒素限值的检测。使用以下公式来确定 MVD:

$$\text{MVD} = \text{CL}/\lambda$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值;

C 为供试品溶液的浓度。当 L 以 EU/ml 表示时,则 C 等于 1.0ml/ml,当 L 以 EU/mg 或 U/u 表示时,C 的单位需为 mg/ml 或 u/ml。

λ 为在凝胶技术中鲎试剂的标示灵敏度(EU/ml),或是在光度检测中所使用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

方法一:凝胶法

凝胶法是通过在有内毒素存在的情况下鲎试剂产生凝集反应来检测或定量内毒素。在标

准环境中,能够使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度就是鲎试剂的标示灵敏度,用 EU/ml 表示。为了保证实验的精确性和有效性,要先复核鲎试剂的灵敏度和完成干扰试验。

鲎试剂灵敏度复核 当使用新一批鲎试剂或试验环境中发生了可能会影响检验结果的变化时,须进行鲎试剂灵敏度复核试验。

根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ),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,然后制成 2.0λ 、 λ 、 0.5λ 和 0.25λ 四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。取装有 0.1ml 鲎试剂溶液的 10mm × 75mm 试管或复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿,等体积加入内毒素标准溶液。每一个浓度平行做 4 管,同时在 2 管中加入 0.1ml 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 适宜恒温器中,保温 60 分钟 \pm 2 分钟。

将试管从恒温器中轻轻取出,缓缓倒转 180° 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 (-)。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

当最大浓度 2.0λ 管均为阳性,最低浓度 0.25λ 管均为阴性,阴性对照管为阴性时,试验方为有效。按下式计算反应终点浓度的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)。

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

式中 X 为反应终点浓度的对数值(\lg)。反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个为阳性结果的浓度。

当 λ_c 在 $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ (包括 0.5λ 和 2.0λ) 时,方可用于细菌内毒素检查,并以 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

干扰试验 按表 1 制备溶液 A、B、C 和 D,使用的供试品溶液应为无可检验出的内毒素且不超过最大有效稀释倍数(MVD)的溶液,操作按鲎试剂灵敏度复核项下。

只有当溶液 A 和 D 的所有平行管都为阴性,并且溶液 C 的结果在鲎试剂灵敏度复核范围

内时,试验方为有效。按下式计算溶液 C 的反应终点浓度的几何平均值(E_s)和用供试品溶液制成的内毒素溶液 B 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 C 溶液和 B 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 0.5λ 和 2.0λ) 时,且当 E_t 在 $0.5E_s$ 和 $2.0E_s$ (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。如果供试品溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰,将供试品溶液进行不超过 MVD 的进一步的稀释后,再重复干扰试验。使用更高灵敏度的鲎试剂并对供试品进行更大倍数的稀释有可能排除干扰。

干扰也可通过其他适当的方法排除,如过滤、中和、透析或加热处理等。为确保所选择的处理方法可以有效的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。

当鲎试剂、供试品的来源、配方、生产工艺有变或当试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时,须重新进行干扰试验。

表 1 凝胶法干扰试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液	-	-	-	4
B	2λ /供试品溶液	供试品溶液	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ /检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/检查用水	-	-	-	2

溶液 A: 准备进行检查并且未检出内毒素的供试品溶液

溶液 B: 干扰试验

溶液 C: 鲎试剂标示灵敏度的对照

溶液 D: 检查用水做的阴性对照

凝胶法检查法

1) 凝胶限量试验

按表 2 制备溶液 A、B、C、D。

表 2 凝胶限量试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/添加了内毒素的溶液	平行管数
A	无/供试品溶液	2
B	2λ/供试品溶液	2
C	2λ/检查用水	2
D	无/检查用水	2

使用稀释倍数为 MVD 并且已经排除干扰的供试品稀释液来制备溶液 A 和 B(样品阳性对照)。溶液 B 和 C(阳性对照)含有相当于 2λ 浓度的标准内毒素。溶液 D(阴性对照)为检查用水。

结果判断 保温 60 分钟 ± 2 分钟后观察结果。只有当样品阳性对照溶液 B 和阳性对照溶液 C 的平行管都为阳性,阴性对照溶液 D 的平行管为阴性时,试验方为有效。

当溶液 A 的两个平行管都为阴性时,供试品溶液符合规定。当溶液 A 的两个平行管都为阳性时,供试品不符合规定。当溶液 A 的两个平行管中的一个为阳性另一个为阴性时需进行复试。在复试中,溶液 A 需做 4 支平行管,当所有平行管都为阴性时,供试品溶液符合规定。

凝胶半定量试验

本方法是通过确定终点浓度来量化供试品溶液中的内毒素。按表 3 制备溶液 A、B、C 和 D。

表 3 凝胶半定量试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液	检查用水	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
B	2λ/供试品溶液		1	2λ	2
C	2λ/检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无检查用水	-	-	-	2

溶液 A:没有超过 MVD 并且通过干扰试验

的供试品溶液。其随后的稀释也不得超过 MVD。用检查用水进行 2 倍系列稀释,从通过干扰试验的稀释倍数开始再稀释至 1、2、4 和 8 倍。

溶液 B:含 2λ 浓度标准内毒素的溶液 A(样品阳性对照)。

溶液 C:含 2λ、λ、0.5λ 和 0.25λ 浓度标准内毒素的两个检查用水系列。

溶液 D:检查用水(阴性对照)

结果判断 当试验符合以下三点时方为有效(1)阴性对照溶液 D 的所有平行管为阴性(2)样品阳性对照 B 的所有平行管为阳性(3)溶液 C 的终点浓度的几何平均值在 0.5λ - 2λ 之间。

用溶液 A 中每一系列平行管的终点稀释倍数乘以 λ,即算出每个系列的终点溶度,所有平行管的终点浓度的几何平均值即为供试品溶液的内毒素浓度(按“灵敏度的复核”中的公式)。如果试验检验的是供试品的稀释液,则计算原始溶液内毒素浓度时要将结果乘上稀释倍数。

如果试验中供试品溶液的结果都为阴性,则记录内毒素浓度为小于 λ(如果检验的是稀释过的样品,则记录为小于 λ × 该样品的最低稀释倍数)。如果结果都为阳性,记录内毒素的浓度为大于或等于最大的稀释倍数乘以 λ(例:在表 3 中,原始稀释倍数 × 8 × λ)。

当内毒素浓度小于规定的限值时,样品符合要求。

方法二:光度测定法

光度测定法分为浊度法和显色基质法。

浊度法是检测浊度增长的光度试验。根据检测原理,可分为终点浊度法和动态浊度法。终点浊度法的原理是反应混合物的内毒素浓度和其在孵育终止时的浊度(吸光度或透光率)之间存在着量化关系。动态浊度法是检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度所需要的反应时间,或是检测浊度增长速度的方法。

显色基质法是检测鲎试剂与内毒素反应时从选定的显色肽中释放出的有色团。根据检测原理,分为终点显色法和动态色法。终点显色

法的基础是反应混合物的内毒素浓度和其在孵育终止时释放出的有色团的数量之间存在的量化关系。动态显色法是检测反应混合物的颜色到达某一项预先设定的吸光度所需要的反应时间,或是检测颜色增长速度的方法。

所有的光度测定试验都要求在特定的仪器中进行,温度一般为 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

为保证浊度和显色试验的精确性和有效性,要预先进行标准曲线的校验试验以及试验溶液的干扰试验。当试验环境中发生了任何可能会影响检验结果的改变时,试验的有效性就要求重新检验。

校验标准曲线的标准性 用标准内毒素配成溶液并制成至少 3 个浓度的稀释液(稀释度不得大于 10),最低浓度不得低于所用试剂的标示检测限。每一稀释步骤的混匀时间同细菌内毒素检查法凝胶法的要求,每一浓度至少做 3 支平行管。同时要求做 2 支阴性对照。当阴性对照在反应时间内不发生反应,将全部数据进行线性回归分析。

根据线性回归分析,标准曲线的相关系数(r)的绝对值应大于或等于 0.980,试验方为有效。

光度技术的干扰试验 选择标准曲线中点或一个靠近中间的内毒素浓度。按表 4 制备溶液 A、B、C 和 D。供试品和试剂的加样量、供试品和试剂的比例以及保温时间等,参照所用仪器和试剂的有关说明进行。每种溶液至少做 2 个平行管。

表 4 光度技术干扰试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度	加入内毒素的溶液	平行管数
A	无	供试品溶液	不少于 2 个
B	标准曲线的中点浓度(或附近的点)	供试品溶液	不少于 2 个
C	至少 3 个浓度(最低一点设定为 λ)	检查用水	每一浓度 不少于 2 个
D	无	检查用水	不少于 2 个

溶液 A: 稀释倍数未超过 MVD 的供试品溶液,

溶液 B: 加入了标准曲线中点或靠近中点的一个内毒素浓度的,和溶液 A 有相同稀释倍数的供试品溶液,

溶液 C: 如“校验标准曲线的标准性”项下描述的,用于制备标准曲线的标准内毒素溶液,

溶液 D: 检查用水(阴性对照)

按所得线性回归方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量 C_t 和 C_s ,再按下式计算该试验条件下的回收率(R)。

$$R = \frac{C_s - C_t}{\lambda m} \times 100\%$$

从包含添加内毒素的供试品溶液中减去溶液本身的平均的内毒素浓度,可计算出添加内毒素的平均回收率。当内毒素的回收率在 50~200% 之间,则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰。

当内毒素的回收率不在指定的范围内,须按“凝胶法干扰试验”中的方法去除干扰因素。并要利用凝胶法干扰试验来验证处理的有效性。

光度法检查法

按照“光度法的干扰试验”中的操作步骤进行检测。

使用溶液 C 生成的标准曲线来计算溶液 A 的每一个平行管的内毒素浓度。

试验必须符合以下三个条件方为有效:

1) 系列溶液 C 的结果要符合“光度技术预试验”下的“校验标准曲线的标准性”中的要求;
2) 用溶液 B 中的内毒素浓度减去溶液 A 中的内毒素浓度后,计算出的内毒素的回收率要在 50~200% 的范围内。

3) 溶液 D(阴性对照)在规定的反应时间内没有可检测到的内毒素。

当溶液供试品所有平行管的平均内毒素浓度乘以稀释倍数和浓度后,小于产品的内毒素限值时,供试品溶液符合规定。

干热条件与内毒素灭活关系的研究

韦 群(湛江安度斯生物有限公司 质控部)

一、前言:

干热法是目前制药工业广泛采用的对耐热材料的除热原方法。该法不易使其它杂质进入产品,而且条件易于控制,是一种简单、有效的灭热原方法。内毒素指示剂是一种用于干热设备验证以及干热过程验证的专用试剂。有不少用户询问:干热温度、时间怎样设定?除热原的效果与温度、时间的关系怎样?是否还可以按九五版药典除热原的条件进行除热原?不同来源内毒素的指示剂验证效果是否相同?安瓿包装的指示剂使用时是否需要开启?精制内毒素与环境内毒素的灭活条件是否相同?等等。本文笔者希望通过一系列的实验数据和广大用户对上述问题进行探讨。

二、实验材料:

1. 内毒素指示剂:

a. 批号 0302120,用纯脂多糖(LPS)制备,标示效价 10,000Eu/支

b. 批号 0207160,用环境内毒素制备,标示效价 2,500Eu/支

2. 鲎试剂(TAL):

a. 批号 0110152,0.65ml/支, $\lambda = 0.0625\text{Eu/ml}$

b. 批号 0206031,0.1ml/支, $\lambda = 0.25\text{Eu/ml}$

以上试剂均为湛江安度斯生物有限公司产品。

3. 干热烤箱:101-2型不锈钢电热鼓风干燥箱,工作室容积 550 × 550 × 450mm,上海浦东荣丰科学仪器有限公司产。

三、实验目的:

1. 观察不同的干热温度对内毒素的灭活作用。

用。

2. 观察同一温度不同干热时间对内毒素的灭活作用。

3. 观察不同来源内毒素制备的指示剂对干热的耐受能力。

4. 观察指示剂包装形式对热力穿透的影响。

四、实验设计见下表:

实验编号	干热温度(℃)	干热时间(分钟)						备注
		5	8	10	15	30	60	
1	250	5	8	10	15	30	60	实验目的 1~3
2	220	30	60	90	120			
3	200	30	60	90	120			
4	180	30	60	90	120			实验目的 4
5	250	5	8	10	15	30	60	

五、内毒素指示剂的效价验证:

1. 未经干热的内毒素指示剂的效价验证要求:由于内毒素指示剂不含任何稳定剂、赋形剂和分散剂,干燥的内毒素吸附在玻璃瓶壁上,即使经过长时间的旋涡混合也难以回收其全部的填充量,故要求回收的内毒素实测值应不低于 50% 标示值即可。回收率的计算公式如下:

$$\text{回收率} = \frac{\text{可回收的内毒素量(Re)}}{\text{标示量}} \times 100\%$$

2. 未经干热的内毒素指示剂的效价测试:

分别用 1.0mlBET 水复溶指示剂,按使用要求作旋涡混合,然后用 TAL 验证效价。结果见下表。

内毒素指示剂	TAL	稀释倍数(D)	40000	80000	160000	320000	640000
			内毒素浓度(Eu/ml)				
0302120	0110152		0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
		反应结果	++	++	++	--	--

可回收的内毒素: $\text{Re} = \lambda \times D \times 1.0\text{ml} = 0.0625 \times 160000 \times 1.0 = 10000\text{Eu/瓶}$, 回收率为

100%。

内毒素指示剂	TAL	稀释倍数(D)	2500	5000	10000	20000	40000
0207160	0206031	内毒素浓度(Eu/ml)	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06
		反应结果	++	++	++	--	--

可回收的内毒素: $Re = \lambda \times D \times 1.0ml = 0.25 \times 10000 \times 1.0 = 2500Eu/瓶$, 回收率为 100%。

六、干热方法:

烤箱处空载状态,将烤箱温度按所需温度设定,开始加热。将内毒素指示剂的包装安瓿从曲颈处折断,用铝铂封口并做好标记。待温度升至设定温度时(以烤箱顶部的水银温度计为准),放入内毒素指示剂,待温度回升(开启烤箱门时温度会有所下降)后开始计时。分别按制定时间进行干热,每支指示剂干热时间到达即将其取出。

七、实验结果:

实验 1.(干热温度 250℃):取经干热的指示剂,开启每支加入 1.0mlBET 水,旋涡混合 10 分钟,然后与 TAL 反应,结果见下表:

内毒素指示剂	TAL 批号	稀释倍数(D)	干热时间 (min)					
			5	8	10	15	30	60
0302120 (LPS)	0110152	原液	---	---	---	---	---	---
		1:10	---	---	---	---	---	
		1:160	---	---	---	---	---	
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	---	---	---	---	---
		1:10	---	---	---	---	---	

结果分析:内毒素衰减值($LgRd$)的计算公式为: $LgRd = LgRe - LgRs$, 其中 Re 为干热前可回收的内毒素, Rs 为干热后的内毒素残余量。
 $Rs = \lambda \times D \times 1.0ml$ 。

①干热时间为 5 分钟时:

a. 批号 0320120 指示剂(LPS)的残余量 $Rs < 0.0625 \times 1 \times 1.0 < 0.0625Eu/瓶$, 内毒素衰减值 $LgRd > LgRe - LgRs > Lg10000 - Lg0.0625 > 5.2$, 即 $LgRd > 5.2$ 。

b. 批号 0207160 指示剂(环境内毒素)的残

余量 $Rs_1 < 0.25 \times 10 \times 1.0 < 2.5Eu/瓶$, $Rs_2 \geq 0.25 \times 1 \times 1.0 \geq 0.25Eu/瓶$, 内毒素衰减值 $Lg2500 - Lg2.5 < LgRd \leq Lg2500 - Lg0.25$, 即 $3 < LgRd \leq 4$ 。

②干热温度为 250℃时,干热时间 5 分钟以上,对两种来源的内毒素灭活都大于三个数量级。

实验 2.(干热温度 220℃);

内毒素指示剂	TAL 批号	稀释倍数(D)	干热时间 (min)			
			30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	--	--	--
		1:10	++	--	--	--
		1:160	--	--	--	--
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	--	--

结果分析:

①干热时间为 30 分钟,指示剂 0302120 的残余量为 $Rs_1 < \lambda \times D \times 1.0 < 0.0625 \times 160 \times 1 < 10Eu$, $Rs_2 \geq 0.0625 \times 10 \times 1 \geq 0.625Eu$, 内毒素衰减值 $Lg10000 - Lg10 < LgRd \leq Lg10000 - Lg0.625$, 即 $3 < LgRd \leq 4.2$ 。

②干热时间为 90 ~ 120 分钟,指示剂 0207160 的残余量为 $Rs_1 < \lambda \times D \times 1.0 < 0.25 \times 10 \times 1.0 < 2.5Eu$, $Rs_2 \geq 0.25 \times 1 \times 1.0 \geq 0.25Eu$, 内毒素衰减值为: $Lg2500 - Lg2.5 < LgRd \leq Lg2500 - Lg0.25$, 即 $3 < LgRd \leq 4$ 。

③对于纯 LPS,干热温度 220℃,30 分钟以上灭活效力大于三个数量级,如要求四个数量级的灭活效力,干热时间应在 1 小时以上;而对于环境内毒素,在同样温度下要达到大于三个数量级的灭活效力至少需要 90 分钟。

实验 3.(干热温度 200℃):

内毒素指示剂	TAL 批号	稀释倍数(D)	干热时间 (min)			
			30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	+-	--
		1:160	++	--	--	--
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++

结果分析:

①对于纯 LPS, 200℃干热 60 分钟以上灭活效力才能大于三个数量级; 如要求大于四个数量级, 干热时间需要 120 分钟。

②对于环境内毒素, 200℃干热 120 分钟, $R_s > 0.25 \times 10 \times 1 > 2.5Eu$, $LgRd < Lg2500 - Lg2.5 < 3.0$, 即灭活效力小于三具数量级。

实验 4. (干热温度 180℃):

内毒素指示剂	TAL 批号	稀释倍数 (D)	干热时间 (min)			
			30	60	90	120
0302120 (LPS)	0110152	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++
		1:160	++	++	++	++
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	++	++	++
		1:10	++	++	++	++

结果分析: 干热温度 180℃, 干热时间 120 分钟, 对两种来源内毒素的灭活效力均小于三个数量级。

实验 5. (干热温度 250℃): 指示剂开启 (折断安瓿颈) 与不开启对灭活效力的影响。

内毒素指示剂	TAL 批号	稀释倍数 (D)	干热时间 (min)						状态
			5	8	10	15	30	60	
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	++	-----	-----	-----	-----	-----	折断安瓿颈
		1:10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
0207160 (环境内毒素)	0206031	原液	+++	+++	+++	+++	+++	---	不开启
		1:10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

结果分析: 同样的环境内毒素指示剂, 开启状态 250℃干热 5 分钟即可达到三个数量级的灭活效力; 8 分钟可达到四个数量级灭活效力; 而不开启状态至少要干热 30 分钟才能达四个数量级的灭活效力。

八、讨论:

根据以上实验的结果, 可以得出以下结论:

1. 内毒素的灭活作用与温度直接相关, 温度越高, 灭活效果越好。如在 250℃时, 干热 5 分钟就可使内毒素衰减 $LgRd$ 大于 3。

2. 灭活效果也与干热时间有关。在适当的温度下, 延长干热时间有利于提高灭活效果。如在 220℃时, 干热 90 分钟也可以达到内毒素衰减 $LgRd$ 大于 3 的效果。但温度过低, 即使延长干热时间, 灭活效果也不明显。如在 200℃时, 干热 120 分钟, $LgRd$ 仍小于 3。

3. 不同来源种类的内毒素其灭活效果也不同。环境内毒素抵抗灭活的能力远强于纯脂多糖(LPS)。通常内毒素指示剂都用纯 LPS 制备的, 这是因为指示剂作为一种标准物质产品, 其原料应具有可标化性及溯源性。但要注意的是, 你的干热设备及干热程序即使通过内毒素指示剂的验证, 并不意味着它们对环境内毒素有同样的灭活效果。更高更严格的要求应是由环境内毒素制备的内毒素指示剂来作干热设备及干热程序的验证。

4. 内毒素指示剂应在开启状态下进行干热灭活, 这样有利于热力穿透, 得到更好的灭活效果。

5. 本实验的干热烤箱装载模式为空载状态。如果是有载或满载状态, 灭活效果可能会有所变化。

征 稿 启 示

本刊旨在为广大读者提供鲎试剂在制药工业及药检方面应用与发展的信息, 也是广大读者交流经验和学术讨论的园地。我们殷切希望广大读者积极撰文来稿交流。凡有关细菌内毒素检查和和鲎试剂应用的文章皆可以投稿(已经在其它刊物发表的请注明刊物名称和期号), 形式不拘。来稿一经录用即奉稿酬。

对几批热原检查异常的人血白蛋白的 细菌内毒素分析

万华(湛江安度斯生物有限公司 研究发展部)

人血白蛋白是临床上常用的血液制品。《生物制品规程》要求其成品使用热原检查法(PT),原液采用细菌内毒素检查法(BET)。有三个厂家的三批白蛋白产品在做 PT 检查时,结果异常,见下表:

样品编号	规格	PT 结果
A	10g/50ml	初试不合格,复试合格,再检又不合格
B	10g/50ml	初试不合格,复试合格
C	5g/25ml	初试不合格,复试合格

笔者针对上述三批白蛋白样品的免法检查结果,做了凝胶法以及定量法 BET 分析。

1. 实验材料

1.1 样品:见上表

1.2 试剂:1)鲎试剂(TAL):批号 0203011,灵敏度 $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$, 0.1ml/支 ;批号 0303141, $\lambda = 0.125\text{EU/ml}$, 0.1ml/支 ;定量法 TAL:批号 0105190, $\lambda = 0.06\text{EU/ml}$, 0.65ml/支 。2)细菌内毒素检查用水(W):批号 0212260, 25ml/瓶 。3)抗增液:批号 0203220, 2ml/瓶 (用于定量 TAL 溶解)。TAL、W 与抗增液均为湛江安度斯生物有限公司产品。4)内毒素工作标准品(CSE):批号 2002-12, 100EU/支 ;定量法 CSE:批号 2002-7, 150EU/支 ;均为中国药品生物制品检定所制备。细菌内毒素检查用具一套,按规定除热原。

1.3 仪器:ATI-320 型动态试管仪,英国莱伯金耐特公司(Lab Kinetics Ltd)产品。

2. 凝胶法 BET

2.1 内毒素限值(L)计算

根据《生物制品规程》的规定,原液的内毒素限值为 2EU/ml ;成品采用免法检查,剂量为 0.6g/kg 。对成品做 BET,根据免法剂量计算白

蛋白样品的内毒素限值(L)如下:人血白蛋白的浓度为 0.2g/ml ,

$$L = 5.0\text{EU/kg} \div (0.6\text{g/kg} \div 0.2\text{g/ml}) = 1.67\text{EU/ml}$$

2.2 干扰初筛试验

样品(S)的最大有效稀释: $MVD_{0.5} = L/\lambda_{0.5} = 1.67\text{EU/ml} \div 0.5\text{EU/ml} = 3.34$ 倍,其余的以此类推。干扰初筛实验的结果见下表:

TAL 0203011, $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$

S 的稀释倍数		3.2	6.4	12.8	25.6	NC
对应 MVD		$MVD_{0.5}$	$MVD_{0.25}$	$MVD_{0.125}$	$MVD_{0.06}$	--
样品 A	NPC 系列	--	--	--	--	PC($E_{0.5}$)
	PPC 系列	++	++	++	++	++
样品 B	NPC 系列	++	++	--	--	
	PPC 系列	++	++	++	++	
样品 C	NPC 系列	++	++	--	--	
	PPC 系列	++	++	++	++	

结果分析:从上表可以看出,样品 A 对 BET 相容性很好;样品 B 和样品 C 中内毒素含量比较高,大约在 $0.25\text{EU/ml} \times 6.4 = 1.6\text{EU/ml}$ 左右,样品被稀释到 12.8 倍时 NPC 才出现阴性,这表明可以将样品稀释 12.8—25.6 倍做干扰试验。

2.3 干扰试验

对于样品 A 可以选择灵敏度 $\lambda = 0.5 - 0.06\text{EU/ml}$ 的 TAL 做干扰试验,本实验仍然选择 $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$ 的 TAL;对于样品 B 和样品 C,选择 $\lambda = 0.125\text{EU/ml}$ 的 TAL 进行干扰试验。干扰试验的操作按 BET 法要求进行,试验结果如下:

TAL 0203011, $\lambda = 0.25\text{EU/ml}$

E 系列		$E_{0.5}$	$E_{0.25}$	$E_{0.125}$	$E_{0.06}$	NC
反应结果		++	++	--	--	--
样品 A	S/E 系列	$S_{6.4}E_{0.5}$	$S_{6.4}E_{0.25}$	$S_{6.4}E_{0.125}$	$S_{6.4}E_{0.06}$	NPC($S_{6.4}$)
	反应结果	++	--	--	--	--

TAL 0303141, $\lambda = 0.125\text{EU/ml}$

E 系列		E _{0.25}	E _{0.125}	E _{0.06}	E _{0.03}	NC
反应结果		++	++	--	--	--
样品 B	S/E 系列	S _{12.8} E _{0.25}	S _{12.8} E _{0.125}	S _{12.8} E _{0.06}	S _{12.8} E _{0.03}	NPC(S _{12.8})
	反应结果	++	++	++	--	--
样品 C	S/E 系列	S _{12.8} E _{0.25}	S _{12.8} E _{0.125}	S _{12.8} E _{0.06}	S _{12.8} E _{0.03}	NPC(S _{12.8})
	反应结果	++	++	++	--	--

(注: E 右下标数字表示内毒素浓度, S 右下标数字表示样品的稀释倍数)

结果分析: 样品 A 的 S/E 系列反应终点比 E 系列低一档, 样品 B 和样品 C 的 S/E 系列反应终点比 E 系列高一档, 按照干扰试验的判断标准, 可以认为样品 A、B 和 C 在此浓度下对 BET 没有干扰。

2.4 样品日常检查

使用 TAL 0303141, $\lambda = 0.125 \text{ EU/ml}$, 将样品 A、B 和 C 分别稀释到 12.8 倍进行 BET, 结果见下表:

样品编号	NPC(S _{12.8})	NC	PC(E _{0.25})	PPC(S _{12.8} E _{0.25})
A	--	-	++	+
B	--	-	++	+
C	--	-	++	+

检查结果表明, 样品 A、B、C 的实测内毒素含量均小于按免法剂量计算出来的内毒素限值 L₀。

3. 定量 BET

采用动态浊度法对以上三个样品做定量 BET。选定建立标准曲线的内毒素浓度分别为 2.0、0.25 及 0.03125 EU/ml 三点。样品的最大稀释倍数 $MVD_{0.03} = L/\lambda_{0.03} = 1.67 \div 0.03 = 53.3$, 根据凝胶法干扰试验的结果, 选择把样品分别稀释 13.2 倍进行动态浊度试验。

3.1 标准曲线制备:

取 CSE(批号 2002-7) 1 支, 按标示效价稀释成 E_{0.03}、E_{0.25} 及 E_{2.0}。取浊度定量 TAL(批号 0105190) 与内毒素系列浓度分别在 ATI-320 型动态试管仪上反应, 每一浓度重复两管, 各动态反应曲线见图 1, 标准曲线见图 2。

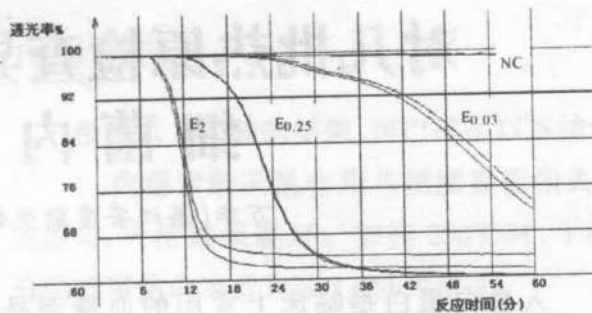
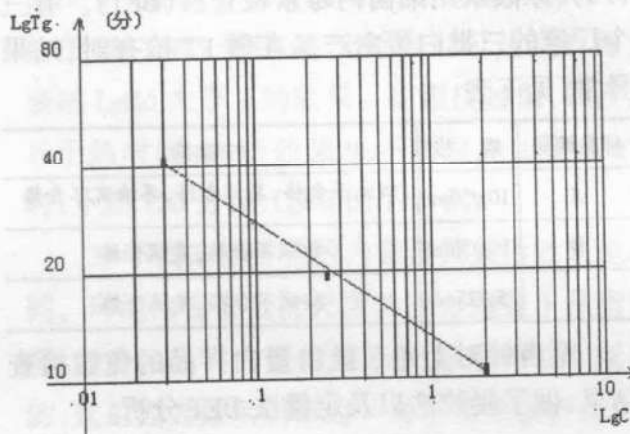


图 1



浓度范围: 0.03~2.0 EU/ml
 $LgT = 2.88952 - 0.32727 LgC$
 相关系数: $r = -0.99822$
 临界值: 92%

图 2

3.2 样品检查:

取样品 A、B 和 C 分别稀释 13.2 倍, 记为 A_{13.2}、B_{13.2} 及 C_{13.2}。取 TAL(0105190) 与各样品稀释液分别在 ATI-320 型动态试管仪上反应, 每一浓度重复两管, 同时做两管 PPC 观察回收率。各样品的动态反应曲线见图 3。

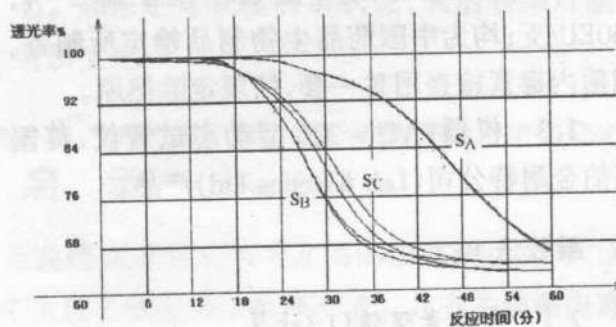


图 3

3.3 样品检查的结果见下表:

编号	名称	剂量	稀释倍数	加入内毒素 (EU/ml)	回收率	临界时间 T92 (秒)	内毒素实测值 (EU/ml)
1	阴性对照	---	---	---	---	>3600	< 0.0072
2	阴性对照	---	---	---	---	>3600	< 0.0072
3	样品	A	13	---	---	2656	0.2662
4	样品	A	13	0.25	1.047	2998	0.2882
5	样品	A	13	0.25	1.047	1131	3.713
6	样品	A	13	0.25	1.047	1147	3.713
7	样品	B	13	---	---	1446	1.631
8	样品	B	13	---	---	1503	1.631
9	样品	B	13	0.25	1.249	988	5.752
10	样品	B	13	0.25	1.249	999	5.752
11	样品	C	13	---	---	1572	1.419
12	样品	C	13	---	---	1508	1.419
13	样品	C	13	0.25	1.145	1033	5.198
14	样品	C	13	0.25	1.145	1018	5.198

结果分析:定量法 BET 要求:1)标准曲线的相关系数 $|r| > 0.980$;2)回收率要求在 50%—200%之间;3)NC(阴性对照)的内毒素含量小于标准曲线的最低点浓度。本实验的标准曲线的相关系数 $|r| = 0.99822$, $A_{13.2}$ 、 $B_{13.2}$ 及 $C_{13.2}$ 的回收率分别为 104.7%、124.9%、114.5%, NC 的内毒素含量 $< 0.03\text{EU/ml}$, 各项条件符合规定,因此,实验有效。由兔法剂量计算出来的样品的内毒素限值 $L = 1.67\text{EU/ml}$, 从上表可以看出,除了样品 A 的内毒素含量较低之外,样品 B 和样品 C 的内毒素含量分别为 1.631EU/ml 和 1.419EU/ml , 很接近限值,即我们通常说的样品的内毒素含量处于限值的临界状态。

4. 讨论

4.1 凝胶法和定量法两种 BET 方法检查的结果均表明:这三批人血白蛋白样品的内毒素含量低于由兔法剂量计算出来的限值 $L = 1.67\text{EU/ml}$ 。

4.2 定量检查法与凝胶法的主要区别在于:定量法检查能直观地反应待测样品中的内毒素含量的多少,而凝胶法只能对结果作定性的判断。从上述实验对两种方法的检查结果来进行比较,可以看出定量检查结果很让人放心,因为其结果可以使大家做到心中有“数”。比如样品 B 和样品 C,通过凝胶法的检查结果来看,既可以认为是样品的内毒素含量比较多,也可以认为是因为样品有少许增强作用,但是通过定量法检查结果可以明确的知道是样品 B 和 C

的内毒素含量较高,都非常接近限值了。另外,定量检查法过程很清晰,方法比较简洁,因此,所花时间相对较少,而且检查过程以及结果处理完全通过仪器来执行,所以比较客观,相比之下,凝胶法检查结果需要人为的观察,主观因素影响很大,从这些方面来说,定量法是优于凝胶法的。

4.3 人血白蛋白是从人血液中提取制得的血液制品,由于兔与人之间存在着个体的差异,所以,用兔法检查时,相当于将两种不同的血液系统进行反应,因此,这种检查的科学性是值得怀疑的。比如样品 A,经过 BET 检查后,发现其内毒素含量很低,但是兔法检查时,时而合格,时而不合格,这种情况正好印证了以上说法,同时也让人对兔法实验的稳定性感到怀疑。还有另一种可能是样品 A 还含有非内毒素热原。

4.4 在本实验中,使用了能够消除 β -葡聚糖干扰的抗增液。人血白蛋白对细菌内毒素检查的干扰因素主要有如下两类:1, β -葡聚糖的影响,大家知道,鲎试剂不是专一与内毒素反应的试剂,它也能与 β -葡聚糖反应,原因是鲎试剂中存在着 G 因子旁路反应,而 β -葡聚糖能激活 G 因子,进而也能使鲎试剂发生凝固。 β -葡聚糖来源于真菌的细胞壁,当人体受到真菌感染时, β -葡聚糖会进入血液,因而在用血液制备人血白蛋白时,存在着被 β -葡聚糖污染的可能性。其次,国内目前一般采用低温乙醇法,研究表明,乙醇很容易被 β -葡聚糖污染,因而,在人血白蛋白的生产工艺中,也有被 β -葡聚糖污染的可能。2,血液成分的影响,血液成分很复杂,一些成分对细菌内毒素反应有强烈的抑制作用,一些成分对细菌内毒素反应有很强的增强作用。在实验时,需要根据不同的情况,对样品作一些处理,更有利于 BET 检查。

药品细菌内毒素限值(L)及其相关计算

熊向党(湛江安度斯生物有限公司 研究发展部)

为了保证用药安全,对注射药品规定了相应内毒素限值(L)。当药品所含内毒素低于该值时,按规定的途径给药是安全的,否则就有可能引起热原反应。有不少的检验人员询问,药品的内毒素限值如何确定?本文小结药品细菌内毒素限值及最大有效稀释倍数的基本计算。

1. 药典规定细菌内毒素检查项的品种的限值确定

药典已经规定细菌内毒素检查项的品种,在药典正文中给出相应的L值。

例如:铬酸钠注射液,药典规定细菌内毒素检查项为:取本品适量,依法测定(附录 XI E),每1ml中含细菌内毒素应小于40EU。即铬酸钠注射液的内毒素限值为: $L = 40\text{EU/ml}$ 。

2. 药典没有规定细菌内毒素检查项的品种的限值计算

中国药典2000年版的细菌内毒素检查法应用指导原则规定,药品、生物制品的细菌内毒素限值(L)一般按以下公式确定:

$$L = K/M$$

式中:L为供试品的细菌内毒素限值,以EU/ml、EU/mg或EU/u表示;K为按规定的给药途径,人用每公斤体重每小时最大可接受的内毒素剂量,以EU/(kg·h)表示。注射剂, $K = 5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,其中放射性药品注射剂, $K = 2.5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,鞘内用注射剂, $K = 0.2\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$;M为人用每公斤体重每小时最大剂量,以ml/(kg·h)、mg/(kg·h)或u/(kg·h)表示,人均体重按60kg计算,注射时间小于1小时,按1小时计算。

对于中国药典中没有规定内毒素检查项的品种,可以从美国药典或美国FDA的《LAL试验指南》中查找其L值作为参考。

2.1 对于药典规定热原检查项的药品,应该用兔法检查,但在生产质控中,仍然可以利用鲎试验的优越性,采用鲎试验法来控制热原。此时L值计算,可用兔剂量来代替人剂量。

例如:葡甲胺,药典规定其热原检查项为:取本品,加灭菌注射用水制成每1ml中含0.12g

的溶液,依法检查(附录XID),剂量按家兔体重每1kg注射5ml,应符合规定。在该药品生产质控中,可以充分利用鲎试验的灵敏性与快捷性进行细菌内毒素检查。此时L值的计算可用兔剂量来代替人用最大剂量。

$$L = K/M = \frac{5.0\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})}{0.12\text{g/ml} \times 5\text{ml}/(\text{kg}\cdot\text{h})} = 0.0083\text{EU/mg}$$

但在终产品的检查时仍然需采用药典所规定的兔法检查。当某种药品要用细菌内毒素检查法代替热原检查时,应该用人的最大剂量计算L值,而不是用兔剂量。

2.2 对一种新药,建立细菌内毒素检查法时,用人的最大剂量来计算L值。

例如:注射用头孢曲松钠舒巴坦钠,成人最大剂量为1500mg/次,则其L值为:

$$L = \frac{5.0\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})}{1500\text{mg}/(60\text{kg}\cdot\text{h})} = 0.20\text{EU/mg}$$

注射用头孢孟多酯钠,成人每日剂量为2.0~8.0g,分3~4次给药,一日最高剂量不超过12g。则其L值计算为:

$$L = \frac{5.0\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})}{(12000\text{mg}/3)/(60\text{kg}\cdot\text{h})} = 0.075\text{EU/mg}$$

2.3 对于大输液(LVP),通常L值都为0.5EU/ml。

3. 最大有效稀释倍数(MVD)的计算

3.1 限量检查法

中国药典2000年版的细菌内毒素检查法规定,供试品的最大有效稀释倍数(MVD)按下式计算:

$$\text{MVD} = \text{CL}/\lambda$$

式中:L为供试品的细菌内毒素限值;C为供试品溶液的浓度,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的单位为mg/ml或u/ml; λ 为鲎试剂灵敏度的标示值。

以 $\lambda = 0.5\text{EU/ml}$ 为例,铬酸钠注射液的MVD为:

$$\text{MVD}_{0.5} = \frac{40\text{EU/ml}}{0.5\text{EU/ml}} = 80(\text{倍})$$

(转下页)

ATi/LKL 动态试管分析仪

世界上第一台用于细菌内毒素检查的 LAL-5000 型动态试管分析仪是由美国 ACC 公司 (Associate of Cape Cod, Inc.) 于上世纪七十年代推出,该仪器的制造商就是英国莱伯金耐特公司 (Lab Kinetics Ltd.)。经过二十多年的发展,莱伯金耐特公司已成为世界上最大的专业生产细菌内毒素检测仪器的厂商,其产品遍布于世界各地的医药实验室。

ATi 系列及 LKL 系列动态试管分析仪是莱伯金耐特公司最新一代的产品。ATi / LKL 系列动态试管分析仪充分利用了计算机的能力、现代光电学及现代温控领域的最新技术,使仪器能够在运行条件下精确控制时间、温度及数据采集等参数,可获得最大限度的检测精确度,是目前用于细菌内毒素定量分析的理想工具。

ATi/LKL 系列试管仪与其它厂家的同类产品显著不同之处在于它可提供一系列不同波长检测光源的试管仪给用户选择,有单波长的、双波长的,最长达七波长的试管仪,波长从 300 ~ 700nm 范围可任意选择。如此大幅度的检测光波长选择,可以对更多种类的样品以及更复杂的样品作细菌内毒素定量测定,使这一检查方

法不仅可以在药品检查上应用,更扩展到医学临床检查及其它领域应用。

ATi/LKL 系列产品为不同需要的用户提供了极大的选择空间,它有 32 孔、64 孔、96 孔甚至 128 孔的试管仪,而且每种规格的产品都可以波长选择。它的每台仪器都可以通过简单的连接与另一台仪器联机工作,达到扩充试管孔数的目的。

ATi/LKL 系列动态试管仪有许多先进的功能及优越性能,有兴趣的读者不妨登录英国莱伯金耐特公司的网页浏览,它的网址是: [Http://www.labkinetics.com](http://www.labkinetics.com)

一般来说,国外的高科技产品价格都相当昂贵,但 ATi/LKL 系列产品的价格只是比国内同类产品略高。如果按其价格性能比计算,它的价格要远低于国内同类产品价格。

湛江安度斯生物有限公司是英国莱伯金耐特公司产品在中国唯一的代理。湛江安度斯公司为中国的 ATi/LKL 系列动态试管仪用户提供强大的技术支持,高品质的试剂供应以及良好的售后服务。

(接上页)

葡甲胺的 MVD 为:

$$\text{MVD}_{0.5} = \frac{0.12 \times 1000\text{mg/ml} \times 0.0083\text{EU/mg}}{0.5\text{EU/ml}} = 2(\text{倍})。$$

3.2 定量检查法

中国药典 2000 年版的细菌内毒素检查法应用指导原则规定,按下式计算供试品溶液的最大有效稀释倍数(MVD):

$$\text{MVD} = \text{LC}/\lambda_1$$

式中:L 为供试品的细菌内毒素限值;C 为供试品溶液的浓度,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 的单位为 mg/ml 或 u/ml; λ_1 为标准曲线中的最低内毒素浓度。

例如:标准曲线的内毒素浓度 (EU/ml):

0.0313, 0.25, 2.0

铬酸钠注射液 MVD 为:

$$\text{MVD} = \frac{40\text{EU/ml}}{0.0313\text{EU/ml}} = 1280(\text{倍});$$

葡甲胺 MVD 为:

$$\text{MVD} = \frac{0.12 \times 1000\text{mg/ml} \times 0.0083\text{EU/mg}}{0.0313\text{EU/ml}} = 32(\text{倍})。$$

细菌内毒素限值的规定,保证了药品的安全使用。在 L 值计算的时候会碰到免剂量、人用最大剂量、常用剂量等等,究竟采用哪种剂量,笔者的意见是,终产品应按药典规定的检查项检查;新药建立细菌内毒素检查法时,用人用最大剂量来确定 L 值。

湛江安度斯生物有限公司简介

湛江安度斯生物有限公司是由美国著名的鲎试剂企业 C R Endosafe 公司在华投资建立的高科技企业,专业生产鲎试剂及配套产品。C R Endosafe 公司是美国著名的三大鲎试剂生产企业之一,由鲎试剂创始人之一、国际知名的权威学者詹姆斯弗·库珀博士(Dr. James F·Cooper)创建。该公司现已成为美国鲎试剂(LAL)市场最大的供应商,其产品以良好的稳定性,广泛的适用性以及优越的抗干扰性能享誉国际医药工业界。

作为 Endosafe 公司在中国的分厂,湛江安度斯生物有限公司拥有一流的技术人才,先进的仪器设备,现代化的生物产品生产车间以及良好的生产环境:

- 一流的专业技术人员:65%职员具有生物化学、药学、冷冻等专业的学士或硕士学位;
- 先进的仪器设备:美国 Vivtis 公司最新一代的冷冻干燥机,控制产品残余水份 < 1% (中国标准 5%),确保试剂在三年有效期内非常稳定;日本 Wako 公司的细菌内毒素检测仪控制生产工艺和辅助标定试剂,确保每一批产品质量的均一性及标定的准确性;美国 Lovning 公司的超纯水制备系统,使生产的无热原超纯水的水质纯度(电阻率) > 10M Ω - cm,内毒素含量 < 0.001Eu/ml;美国 Cozzoli 公司安瓿自动分装、充氮拉丝封口系统,取代落后的安瓿熔封工艺,确保分装的精确度(< \pm 1%)及封口的严密性。
- 现代化的生物车间及良好的生产环境:500M² 洁净度 10 万 ~ 100 级的生物车间,确保试剂的无菌性。

多年以来,湛江安度斯公司为促进中国鲎试剂的应用与发展作出了巨大的努力和贡献:

- 中国药典细菌内毒素检查法所增添的内容,如干扰试验的应用,旋涡混合器的使用、定量检测技术的应用等,均是本公司积极倡议的结果;
- 中国第一批鲎试剂的国家参考品是由我公司于 94 年制备生产;现用的第二批参考品在中检所组织的公开招标之下,我公司又是一举夺标,于 98 年成功地制备出产;
- 现用的内毒素国家标准品 Lot98 - 1(9000Eu 效价)也是在本公司分装生产;
- 1995 年世界卫生组织(WHO)邀请全球 13 个国家 26 名专家参与第二批内毒素国际标准品的协作标定研究,本公司的冯聚锦高级工程师荣幸受邀,并受到 WHO 的表彰,中国同时被邀请参与研究的还有中检所周海钧所长、夏振民研究员;
- 应美国药典公约组织(USPC)、美国食品药品监督管理局(FDA)以及 C R Endosafe 公司的邀请,国家药典会、中检所有关人员一行四人由本公司冯聚锦总经理陪同于 98 年 1 月 16 ~ 27 日,对美国进行了为期 10 天的访问考察。此行对我国的细毒素检查法与国际接轨有很大的促进作用。

湛江安度斯公司严格实施 GMP 及 ISO9002 标准管理,采用 Endosafe 公司的先进工艺技术生产高品质的中国鲎试剂(TAL),产品面向中国及全球市场。本公司将一如既往地全力为用户提供全方位的技术支持和尽善尽美的售后服务。

湛江安度斯生物有限公司鲎试剂系列产品目录

凝胶法鲎试剂			内毒素检测用辅剂		
B-109	0.1ml/支	10支/盒	F-101	稀释剂I(阳离子调节剂)	4.0ml/支
B-115	0.5ml/支	10支/盒	F-102	稀释剂II(PH调节剂)	4.0ml/支
B-116	1.2ml/支	8支/盒	F-103	抗增液(G因子抑制剂)	0.6ml/支
B-117A	2.2ml/支	8支/盒	内毒素指示剂(干热验证)		
B-117B	2.2ml/瓶	10瓶/盒	F-104A	2,000Eu/支	10支/盒
B-104	5.2ml/瓶	10瓶/盒	F-104B	10,000Eu/支	10支/盒
特异性鲎试剂			临床内毒素检测系列		
B-309	0.1ml/支	10支/盒		人血液内毒素检测盒	10人份/盒
B-315	0.5ml/支	10支/盒		人体液内毒素检测盒	10人份/盒
动态浊度法鲎试剂			实验操作器械		
KT-116	1.2ml/支	8支/盒	S-101	精密可调移液器	200-1000 μ l
KT-117	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-103	精密可调移液器	50-250 μ l
动态显色法鲎试剂			S-111	无热原吸头	1000 μ l
KC-117	2.2ml/瓶	10瓶/盒	S-113	无热原吸头	250 μ l
KC-118	3.2ml/瓶	10瓶/盒	S-301	无热原空安瓿	5ml
内毒素工作标准品			S-302	无热原空安瓿	2ml
E-103	1.0Eu/支(0.5Eu/支)	10支/盒	S-303	无热原空瓶	10ml
E-102A	10Eu/支	10支/盒	S-501	无热原玻璃毛细管	0.1ml
E-102B	50Eu/瓶	10瓶/盒	S-502	无热原玻璃毛细管	0.2ml
内毒素检查用水			S-202	旋涡混合器	XW-80A型
W-106	2.0ml/支	10支/盒	S-401	试管浮板	10孔
W-105	5.0ml/支	10支/盒	S-601	TAL-40 试管恒温仪	40孔
W-102	25ml/瓶	10瓶/盒	动力学定量检测系统		
W-104	50ml/瓶	6瓶/盒	K-002	ATI/LKL 动态试管分析仪	
W-103	100ml/瓶	6瓶/盒			

销售直线:0759-3380671、3380617、3391072

销售分机:0759-3391071、3380672 转 8989、8899

开户行:中国银行湛江分行霞海支行

帐号:12374408091001

TAL-40 型试管恒温仪简介

《中国药典》2000年版的细菌内毒素检查法要求：反应试管应“垂直放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 适宜恒温器中，保温 60 ± 2 分钟”。根据这一要求，湛江安度斯生物有限公司研制开发了一种专用于凝胶法细菌内毒素检查的实验设备——TAL-40型试管恒温仪。与传统使用的恒温水浴槽比较，TAL-40型试管恒温仪有如下特点：

1. 仪器的加热块采用高密度铝合金挤压成型，具有热容量大，热阻小，加热均匀的特点，是精密温控的理想材料。

2. 仪器采用最先进的薄膜加热技术及脉冲控温技术，使温度极稳定均匀，温控精度达到 $37 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ，试管孔间温差 $\leq 0.1^\circ\text{C}$ 。传统使用的恒温水浴槽的温控精度只有 $\pm 1^\circ\text{C}$ ，且槽内温度场的分布不均匀，靠近发热管位置的水温高，偏离发热管位置的水温低，容易造成鲎试剂反应的差异。

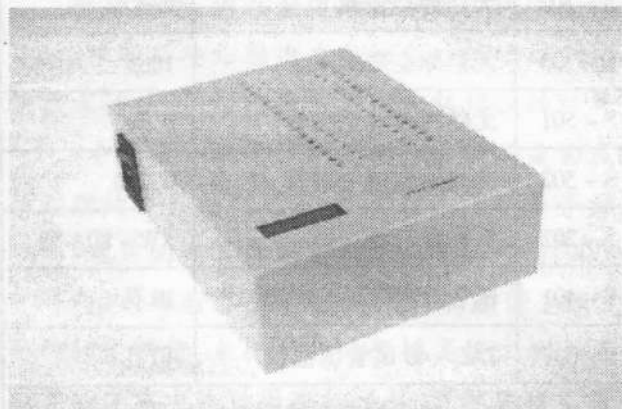
3. 仪器设有五档独立的 60 分钟定时装置，

计时精度达到 60 分钟 + 0 ~ 30 秒，每档定时装置均有独立的蜂鸣提示音。仪器 40 只试管孔可同时使用一档定时装置，也可以分成最多五组先后不同时间使用各自的定时装置。

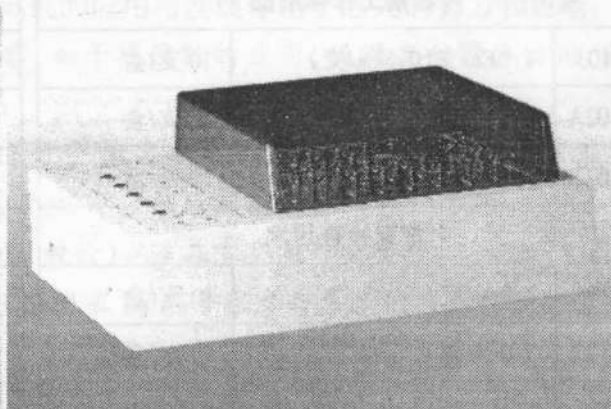
4. 仪器装有独特的遮光防尘盖，使用时试管免封口，使实验操作更方便快捷。如果使用传统的恒温水浴槽，试管必须封口，否则水蒸气或小水珠会进入试管内造成污染。给每支试管一一封口，既麻烦费时，又影响实验精度。

5. 仪器在出厂前已调校好恒定的温度，用户无需调校仪器温度。每次使用前只需提前 15 ~ 20 分钟开启仪器预热。本仪器属节能产品，最大功率 190W，工作状态能耗小于 15W。

6. 每台仪器有 40 只试管孔。A 型仪器适合使用 2ml 安瓶作反应试管；B 型仪器适合使用 $10 \times 75\text{mm}$ 标准试管。仪器外型美观，体积小，适合放置于实验室任何位置。



ATi/LKL 动态试管分析仪



TAL-40 型试管恒温仪

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 3391071 转

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