

鲎试剂应用与进展

司洛韵

湛江安度斯生物有限公司主编 2001年第3期(总第9期) 2001年10月28日

目 录

根据新 BET 法修订 SOP	1
β -葡聚糖与内毒素共同作用对 BET 的影响	4
甲硝唑注射液细菌内毒素检查方法的探讨	7
复方氧化钠注射液细菌内毒素的检测	10
硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查干扰试验	12

根据新 BET 法修订 SOP

James F. Cooper

概述:统一的细菌内毒素检测法(BET)于2001年1月在欧洲药典和美国药典同时生效,开始了内毒素检测的新纪元,该新篇章在今年早些时候已经回顾过(LAL Times,2000年3月),现在是更新任何与鲎试剂有关的标准操作规程(SOP)的适当时机,因为 BET 是现在的主要参考文件。随着 USP 将分光光度法纳入 BET 法中,FDA 和其它管理机构将依赖新的 BET 法来制定鲎试验的最低标准。

那么 FDA 的鲎试验指南在将来的作用是什么呢?该指南从多方面深入论述了鲎试验以及现行 GMP 的重要论点,它远胜过最低标准;以指南作为鲎试验的基础,拓展的鲎试验满足了 CGMP 的需要,例如:用于无菌过程的各种成分

的除热原验证步骤,本文的讨论是建议如何更新标准操作规程(SOPs),并使其与新的 BET 及审核组织和管理官员的 CGMP 期待目标相一致;下表是一份指导回顾和修订 SOPs 的清单。

修订的 SOP 项目清单

无内毒素的配套产品
标示值复核,凝胶法
抑制或增强试验
CSE 的认可
凝胶限值试验
分光光度检测法
鲎试剂反应葡聚糖
CGMP 要求
原材料检测

标准内毒素对照:新的 BET 中没有涉及 CSE 引

起了相当深入的广泛争论,毕竟使用经参考标准品(RSE)标定的CSE已经有20余年的实践,新的BET法却将它排斥在外;鲎试剂和CSE的供应商将继续提供分析证明(CoA)来证明CSE等同于USP内毒素参考标准品,这一方法与去年在统一的BET法中发布的绪言一致;一份完整的SOP中要求1)接受来自CSE供应商的CoA以及,2)收到新批号的试剂即完成标示值的验证。如果有必要以USP参考所使用的CSE,应援引USP 24的P.1829中凝胶法的RSE/CSE相对效价的确定,这份描述是距今最近的文件;在SOP中注明1个USP-EU等于1个EP-IU内毒素也是很有用的。

除热原:玻璃器皿和耐热材料要求进行有效除热原,明智的作法是在SOP中只注明材料经干热除热原而不必叙述如何除热原,这样将来除热原过程如果有任何变化,SOP却不必修订,硼硅酸玻璃试管是配套耗材的最佳选择。

无内毒素塑料制品:要求使用经证明无干扰的塑料制品几乎是不可能的,它将刺激标示为无内毒素材料的销售,但这并不足以满足要求;合适的塑料制品的最好证明是在实验室中进行BET实验趋势分析,注意标示值复核实验或其他控制,以确保塑料制品无抑制、增强;无内毒素是依赖于鲎试剂的灵敏度和在特定实验室中使用的方法,应确定在你的设置下的无内毒素的含义。

标示值复核:USP的统一BET法的文中最大的改进是减少了日常凝胶法的对照数,前一版USP要求做一个内毒素稀释系列来复核每个实验的标示值;使用 2λ , λ , $1/2\lambda$ 和 $1/4\lambda$ 标准浓度,重复4管。与过去过多的对照比较,在新的BET法中,没有要求复核实验的最少次数。FDA指

南要求在每天的实验开始时做一个复核实验,这是一个谨慎的做法,许多人仍会继续做下去,我们记得复核实验的目的是证实 2λ 阳性对照的效价正确以及试验条件是在控制之下的,减少复核实验的频率应以历史数据为依据,小心执行。

减少对照管有一个重要的例外,凝胶法分析仍然要求同时做一个复核实验,作为稀释到凝胶终点来确定内毒素量的分析的一部分。

抑制或增强实验:SOP中的验证方案应与新BET法中相应的表格对比并根据有关方法进行修订,注意阳性水对照只需平行两组检测,BET不要求两种鲎试验方法之间做比较试验,只需一个验证试验来证明每种鲎试剂都是相容的。

新的BET法中推荐的一个干扰试验的方法是不现实的,用样品修饰,如:中和或稀释直到有效的验证成功;对于大多数产品来说,进行干扰筛选或相容性试验来确定日常鲎试验的适当范围更加经济,而且能提供更多数据信息,相容的范围是在限定的稀释(MVD)或浓度(MVC)范围内阳性对照能完全回收,一种经济的有效验证方法在2000年的通讯已经讨论过。

凝胶法限值试验:新的BET法中的第2个表格简明叙述了凝胶法限值试验,在SOP中重新制作这样一个表格是比较合适的;然而,用现行的词汇来定义溶液A-D可能会更好,例如,溶液B是PPC(阳性产品对照),当然,限值试验并没有真正改变。

动态鲎试验方法:现在统一的BET法中的分光光度法与FDA的鲎试验指南和鲎试剂供应商提供的产品使用说明书相似,明显地,BET与供应商提供的使用说明书的最低要求一致,以FDA的文件为基础的SOPs可能不需要做太多的修订,

但是,应复查 PPCs 的回收率和 PPC 浓度的选择要求;不幸的是,对精确度没有具体的最低要求,如 C.V(变异系数)。

有效的标准曲线要求相关系数 $[r]$ 是 BET 中的最低要求的另一个例子,也很不现实,太过随意的线性标准, $[r]$ 为 0.980(绝对值)令人迷惑,因为如果 $[r]$ 小于 0.990,回收率将不符合要求,当试验参数处于控制之下并且是被优化的,如:好的配套耗材和合适的标准范围,可以轻易的获得更好的线性;不应使用多元回归,除非线性回归大于 0.990,因为这一回归掩盖了鲎试剂的拙劣性能,而且在 λ 点处丧失效价。

鲎试剂反应葡聚糖(LRG):新的 BET 提供了一种方法以避免与葡聚糖有关的干扰产生的增强,越来越多的产品含有鲎试剂反应葡聚糖(LRG),例如:羧甲基纤维素(CMC)和透明质酸盐(HA)等会产生假阳性结果,对于已知含有 LRG 的产品,应使用能阻断鲎试剂的非特异活性的试剂,有关使用 LRG 阻断物的 SOP 应要求做一个验证试验确保复溶 LAL 的阻断试剂不会改变 LAL 的标示值,如果阻断试剂只加入样品而没有加入对照品,则会有更多的争议。

原材料检测:统一的 BET 法没有区分终产品和原材料检测,虽然 BET 只讲述了用 MVC 计算样品的制备,它并没有排除其它方法,例如 MVC(最小有效浓度),随着人们对原材料和重要赋形剂的内毒素检测越来越感兴趣,有必要检测固体粉末,例如: MVC 不适用于检测无菌固体,象 EP 中的甘露醇或 USP 中的注射用氨苄青霉素,检测固体的最好的办法是将粉末制备在 MVC 范围内的浓度,因为可以直接用试剂或方

法的灵敏度与内毒素限值计算 MVC,以浓度为基础的样品制备更有效,可避免为了稀释度而设计一个原始浓度。

CGMP 争议:FDA 的鲎试验指南和无菌操作过程是 20 世纪 80 年代中期制定的,鲎试验指南认识到 CGMP 的争议,如取样、重现性和分析员资格,争议之一是在每批药品生产的开始、中间和最后的取样应在将来 SOPs 中保留下来,即使 BET 中没有提到,一个新的问题是外理超出规定(OOS)的 BET 结果,现在,对 OOS 的调查将胜过过去的复测要求,现在人们可以查找可能的原因并采取纠正措施。

包装说明:BET 和产品管理官员要求内毒素检测应按照 FDA 规范的随附包装中的使用说明书使用鲎试剂,CBER 必须通过它的生物认证机构查证标签和说明书中的任何改变;Charles River Endosafe 正在高效率工作以期获得标签改变的认可,FDA 已经表示有意与鲎试剂供应商一起工作使随附包装的说明书明显一致,使用说明书的一致是为了使 BET 一致,为了加速 SOP 的修订,FDA 认可的使用说明书的修订完成后立即供使用,BET 对动态鲎试验法的指导很少,因此,鲎试剂使用说明书中的指导对 SOP 的修订有举足轻重的作用。

总结:鲎试验的一套最低标准已被建议用于更新 SOPs,使其与统一的 BET 法一致;当然,制订的规程可以比最低要求更加全面和先进,目标是制定出有效的,易于理解的 SOPs,使 BET 的规定、CGMP 的期望和实践之间达成合理的关系。

β-葡聚糖与内毒素共同作用对 BET 的影响

张永坚 冯聚锦(湛江 524022 湛江安度斯生物有限公司)

摘要 目的:研究 β-葡聚糖与细菌内毒素共同作用对细菌内毒素检查结果的影响及消除的方法。方法:比较普通鲎试剂和特异性鲎试剂分别与细菌内毒素、β-葡聚糖、内毒素葡聚糖混合溶液的反应。结果:普通鲎试剂可以与 β-葡聚糖反应而特异性鲎试剂不与 β-葡聚糖产生凝胶反应;微量的 β-葡聚糖和内毒素混合液可以使普通鲎试剂产生凝胶反应。结论:β-葡聚糖可以使细菌内毒素检查呈现假阳性结果,应对产品质量标准和药典细菌内毒素检查法进行修订以免出现误判。

关键词:细菌内毒素检查,β-葡聚糖,鲎试剂,特异性鲎试剂。

细菌内毒素检查作为取代兔法热原检查近年来越来越多地受到人们的重视,随着药检技术水平的不断提高,药典所收载的细菌内毒素检查的品种也越来越多。研究发现^[1,2],普通鲎试剂与内毒素的反应并非特异性的,因为鲎试剂的凝集系统中存在着 G 因子反应旁路,可以被 β-葡聚糖所激活产生细菌内毒素检查的假阳性。我们对 β-葡聚糖对内毒素检查结果的影响进行了研究。

1. 实验材料 1.1 仪器

EDS-99 型细菌内毒素检测系统(湛江正杰科学仪器有限公司)。XW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 试剂

普通鲎试剂,批号:000414,0.5ml/支,灵敏度:0.25EU/ml。特异性鲎试剂,批号:0106171,0.5ml/支,灵敏度:0.25EU/ml。细菌内毒素检

查用水,批号:0106260,100ml/瓶,内毒素含量 < 0.003EU/ml。以上产品均为湛江安度斯生物有限公司生产。内毒素工作标准品,批号:2000-9,50EU/支,中国药品生物制品检定所提供。(1-3)β-D-葡聚糖标准品,批号:L84562,1.0mg/ml,美国 CR.Endosafe 公司生产。

1.3 实验器具一套,按药典规定除热原处理。

2. 方法与结果

2.1 鲎试剂与内毒素的反应

按细菌内毒素检查法的要求,把内毒素工作标准品分别稀释成 0.5,0.25,0.125,0.06EU/ml 共 4 种浓度,分别与普通鲎试剂、特异性鲎试剂作凝胶反应,每浓度重复 2 管。反应在 EDS99 细菌内毒素检测仪上进行,该仪器可在作凝胶法检查的同时观察动态浊度的反应曲线。结果见图 1、图 2。

图 1 普通鲎试剂与标准内毒素的反应

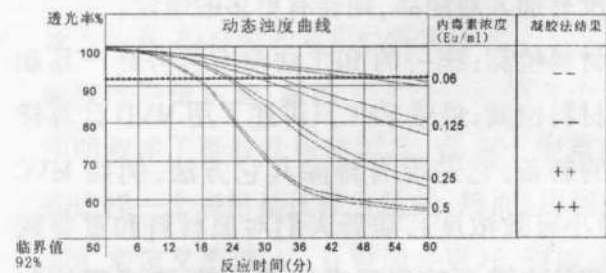
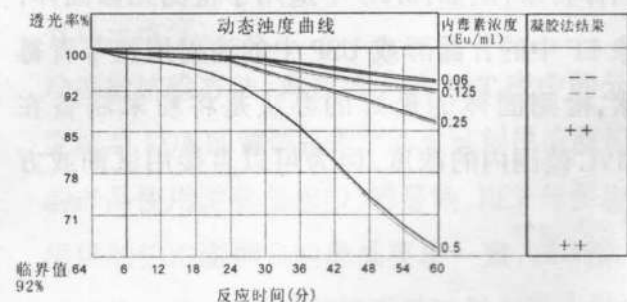


图 2 特异性鲎试剂与标准内毒素的反应



2.2 鲎试剂与葡聚糖的反应

把葡聚糖标准品分别稀释成 0.02, 0.004, 0.0008, 0.00016mg/ml 共 4 个浓度, 分别与普通鲎试剂、特异性鲎试剂反应。结果见图 3、图 4。

图 3 普通鲎试剂与葡聚糖的反应

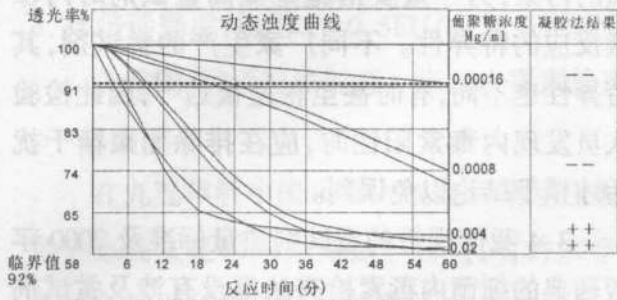
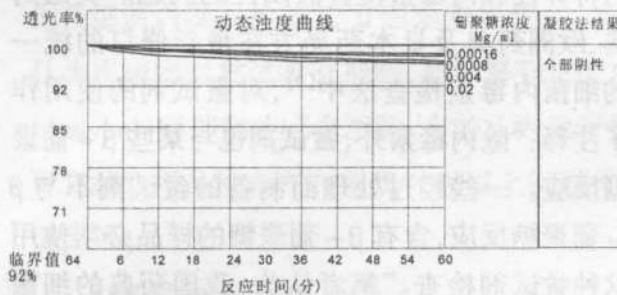


图 4 特异性鲎试剂与葡聚糖的反应



2.3 鲎试剂与内毒素葡聚糖(E/G)混合溶液的反应

配制表 1 中的内毒素葡聚糖混合溶液 A、B、C、D、E、F 共 6 种浓度, 分别与普通鲎试剂和特异性鲎试剂反应。

表 1 内毒素葡聚糖混合溶液

内毒素浓度 (EU/ml) \ 葡聚糖浓度 (mg/ml)	葡聚糖浓度 (mg/ml)		
	0.004	0.002	0.0001
0.125	A	B	C
0.06	D	E	F

图 5 普通鲎试剂与 0.125/G 混合液反应

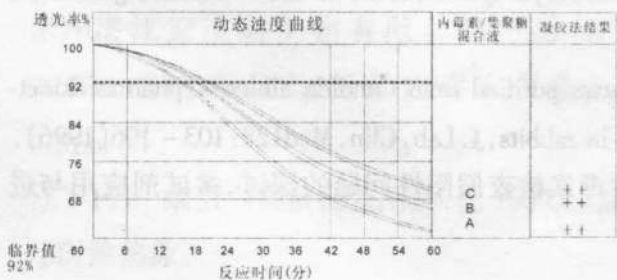


图 6 普通鲎试剂与 0.06/G 混合液反应

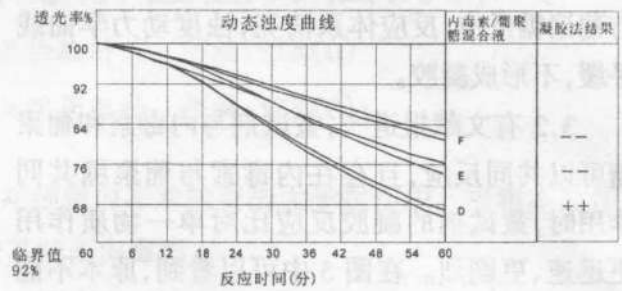


图 7 特异性鲎试剂与 0.125/G 混合液反应

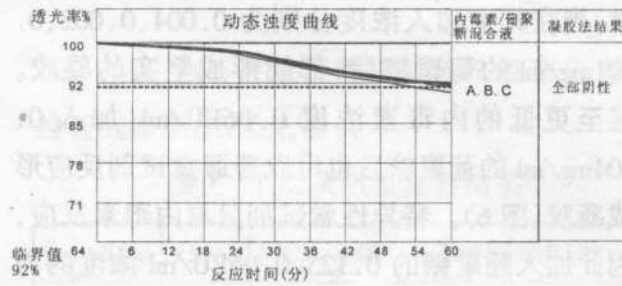
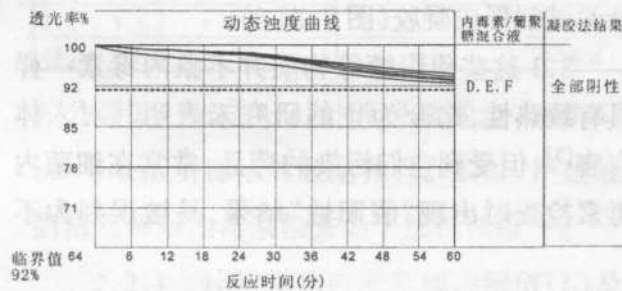


图 8 特异性鲎试剂与 0.06/G 混合液反应



3. 讨论

3.1 研究已证实普通鲎试剂与内毒素的反应是非特异性的, 普通鲎试剂的凝集系统中存在着 G 因子反应旁路, 一些非内毒素物质激活 G 因子也能使鲎试剂发生凝集反应。这些物质包括(1-3)、(1-4)、(1-6)-β-葡聚糖等真菌多糖以及某些血液制品、血液透析器里的物质(LAL-RM)^[3], 经过特殊工艺处理生产的特异性鲎试剂可以不与此类物质反应而只与内毒素反应^[4,5]。由图 1、图 2 可以看出, 普通鲎试剂和特异性鲎试剂与内毒素的反应性是一致的, 标示灵敏度为 0.25EU/ml 的 2 种鲎试剂都能与浓度 ≥ 0.25EU/ml 的内毒素溶液反应, 浊度变化明显并生成坚实的凝胶, 而不与浓度 < 0.25EU/ml 的内毒素溶液生成凝胶。从图 3、图 4 可以看到, 普通鲎试剂可以与 0.02mg/ml、0.004mg/ml

的葡聚糖产生凝胶反应,而特异性鲎试剂则不与葡聚糖反应,反应体系清亮,浊度动力学曲线平缓,不形成凝胶。

3.2 有文献报道^[6],鲎试剂与内毒素和葡聚糖可以共同反应,且存在内毒素与葡聚糖共同作用时,鲎试剂的凝胶反应比对单一物质作用更迅速、更剧烈。在图5中可以看到,原本不能与普通鲎试剂反应的0.125EU/ml浓度的内毒素,当在其中加入浓度分别为0.004、0.002、0.001mg/ml的葡聚糖后,都能形成坚实的凝胶。甚至更低的内毒素浓度0.06EU/ml,加入0.004mg/ml的葡聚糖后也可以普通鲎试剂反应形成凝胶(图6)。特异性鲎试剂只与内毒素反应,因此加入葡聚糖的0.125、0.06EU/ml浓度的内毒素并不能使标示灵敏度为0.25EU/ml的特异性鲎试剂形成凝胶(图7、图8)。

3.3 这些葡聚糖等物质并不象内毒素一样具有致热性,迄今为止的研究未表明其对人体有害^[7],但受到它们污染的药品,常常在细菌内毒素检查时出现“假阳性”结果,易被误判为不

合格。因为有内毒素与葡聚糖的共同作用,这就使得一些药品虽然内毒素含量并不超过规定限值,但一旦受到葡聚糖的轻微污染,就会使内毒素检查呈现假阳性。要避免葡聚糖对内毒素检查的影响,一是要尽量防止药品受到这类物质的污染,另一重要措施是提高鲎试剂对内毒素反应的特异性。不同厂家生产的鲎试剂,其特异性也不同,有时甚至相差很远^[8],因此检验人员发现内毒素阳性时,应在排除葡聚糖干扰后才慎下结论以免误判。

3.4 我国现行的鲎试剂质量标准及2000年版药典的细菌内毒素检查法都没有涉及鲎试剂的特异性和内毒素检查假阳性的问题。美国药典、欧洲药典及日本药局方在最新修订的统一的细菌内毒素检查法中^[9],对鲎试剂的使用作了注释:“除内毒素外,鲎试剂也与某些 β -葡聚糖反应。一些经过处理而制备的鲎试剂不与 β -葡聚糖反应,含有 β -葡聚糖的样品必须使用这种鲎试剂检查。”笔者认为,我国药典的细菌内毒素检查法也应作类似的修订。

参考文献

- 1 Morita T, Tanaka S, et al. A new (1,3) - β - Glucan - mediated coagulation pathway found in Limulus amoebocytes, FEBS Lett 129:318 - 321, 1981.
- 2 Kakinuma A, et al. Gelation of limulus amoebocyte lysate by an antitumor (1 - 3) - β - D - Glucan. Biochen Biophys Res Commun, 1981, 101:434.
- 3 Ikemura K, et al. Interference in endotoxin and fungal polysaccharide assay from blood products and antimicrobial agents. Jpn J Clin Pathol, 1990, 38:872.
- 4 夏振民,等. 特异鲎试剂研究进展. 药物分析杂志, 1997, 17:353 - 355.
- 5 湛江安度斯生物有限公司. 细菌内毒素检查法应用培训班讲义, 1998:5 - 6.
- 6 Roslansky PF, Novisky T. Sensitivity of Limulus amoebocyte lysate (LAL) to LAL - reactive giucans, J Clin. Micro, 29:2477 - 2481, 1991.
- 7 Minoru Y, Roth R, et al. Soluble (1,3) - β - Glucan purified from Candida albicans: pharmacokinetics, biological effects and distribution in blood and organs in rabbits, J. Lab. Clin. Med 128:103 - 106(1996).
- 8 湛江安度斯生物有限公司. 常用大输液细菌内毒素检查假阳性问题的探讨. 鲎试剂应用与进展, 2001, 7:20 - 26.
- 9 USP XX IV, Secondary Supplement NF - 19, 2001.

甲硝唑注射液细菌内毒素检查方法的探讨

梁华养(海南省三亚市药品检验所 邮编:572000)

邢治雄(海南省第三人民医院药剂科 邮编:572000)

摘要:本文通过干扰试验证明甲硝唑注射液对细菌内毒素检查法无干扰作用。可将本品作 1:3.34 倍稀释后,使用 $\lambda=0.5\text{EU/ml}$ 鲎试剂来检查其细菌内毒素。

关键词:甲硝唑注射液 细菌内毒素检查 干扰试验

在九五年版中国药典上规定甲硝唑注射液的热原检查是采用家兔法。目前,有许多学者都证实采用鲎试验代替其热原检查的可行性。但在细菌内毒素检查法方面观点不统一,有的认为甲硝唑对鲎试验有抑制,要稀释到 $\leq 0.1\%$ (1mg/ml) 时抑制才完全消除,有的认为无干扰,可直接取样品检查^[1]。现我针对以上问题作验证如下。

1、实验材料

1.1 甲硝唑注射液:三亚市人民医院制剂室产品、海南省第三人民医院制剂室产品,含甲硝唑均为 0.5% (5mg/ml),批号见表。

1.2 鲎试剂(TAL):湛江安度斯生物有限公司产品,0.1ml/支,批号 981209B,标示灵敏度 0.5Eu/ml。

1.3 细菌内毒素工作标准品(RSE):中国药品生物制品检定所制备,批号 98—8,效价 40Eu/支。

1.4 细菌内毒素检查用水(以下简称水):湛江安度斯生物有限公司产品,批号 980730,规格 2ml/支,标示内毒素含量 $< 0.015\text{Eu/ml}$ 。

1.5 细菌内毒素检查用具,在 180℃干热 2 小时除热原。

2、实验方法与结果

2.1 TAL 灵敏度复核试验按细菌内毒素检查法操作,结果见表 1。

表 1 TAL 灵敏度复核结果

管号	1.0EU/ml	0.5EU/ml	0.25EU/ml	0.125EU/ml	阴性对照	反应终点浓度(X)
1#	+	+	-	-	-	0.5EU/ml
2#	+	+	-	-	-	0.5EU/ml
3#	+	+	-	-	-	0.5EU/ml
4#	+	+	-	-	-	0.5EU/ml

按公式 $\lambda = 1g(\sum X/4)$ 计算灵敏度为 $\lambda = 0.5\text{Eu/ml}$ 与 TAL 材标示灵敏度相符。2.2 甲硝唑注射液对细菌内毒素检查的干扰预试验^[2]。

2.2.1 计算样品内毒素理论限值(L)及最大有效稀释(D)甲硝唑注射液热原检查的免注射剂量(M)为 3ml/kg,细菌内毒素阈值(k)为 5.0Eu/kg, $\lambda = 0.5\text{Eu/ml}$ 。

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5.0\text{Eu/kg}}{3\text{ml/kg}} \approx 1.67\text{Eu/ml}$$

$$D = \frac{L}{\lambda} = \frac{1.67\text{Eu/ml}}{0.5\text{Eu/ml}} = 3.34 \text{ 倍}$$

2.2.2 制备系列浓度样品(S_w)和阳性样品(S_e)

先制备 2.0Eu/ml 和 1.43Eu/ml 的内毒素溶液,取未稀释样品 1.5ml 加入水 3.5ml 混合均匀,即得 1:3.34 浓度样品;取未稀释样品 0.3ml 加入 1.43Eu/ml 内毒素溶液 0.7ml 混均,即得含 1.0Eu/ml 内毒素的 1:3.34 的阳性样品;从 1:3.34 浓度样品管中取 1.5ml 加入水 1.

5ml 混均,得 1:6.68 浓度样品,再从 1:3.34 浓度样品管中取 0.5ml 加入含 2.0Eu/ml 内毒素溶液 0.5ml 混均,得 1:6.68 的阳性样品,依此类推稀释至所需的系列浓度样品(S_w)和含 1.0Eu/ml 内毒素的系列样品浓度阳性样品(S_E)。

2.2.3 选用灵敏度为 0.5Eu/ml 的鲎试剂,分别与 S_w 和 S_E 反应,每个浓度平行做 2 管。结果见表 2。

表 2 甲硝唑注射液预试验结果

样品厂家 和批号	项目	样品浓度				阴性对照
		1:3.34	1:6.68	1:13.36	1:26.72	
三亚市人民 民医院	S _w	- -	- -	- -	- -	- -
99033-2	1.0Eu/ml	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
	S _E					

2.3 干扰试验

表 2 的结果表明,甲硝唑注射对鲎试剂反应无抑制,但还需要进一步做干扰试验。按细菌内毒素检查法的供试品干扰试验项进行。

2.3.1 制备 1.0Eu/ml、0.5Eu/ml、0.25Eu/ml、0.125Eu/ml 系列内毒素浓度溶液。

2.3.2 取三批经热原检查合格的甲硝唑注射液,分别作 1:3.34 稀释。用这些样品稀释液分别复溶 TAL,然后与系列内毒素浓度溶液反应;另作以水复溶 TAL 与系列内毒素溶液反应作比较,各批号的每一个浓度平行作 4 管,每个批号各作 2 管阴性对照(NC)。结果见表 3。

表 3 甲硝唑 1:3.34 稀释液液的干扰试验结果

(批号)	内毒素深液(Eu/ml)				NC	反应终点浓度 (0Eu/ml)
	1.0	0.5	0.25	0.125		
990303-2	++++	++++	----	----	--	0.5
990309	++++	++++	----	----	--	0.5
990413	++++	++++	----	----	--	0.5
水+980625	++++	++++	----	----	--	0.5

2.4 样品细菌内毒素检查与热原检查的比较试验

2.4.1 将甲硝唑注射液作 1:3.34 稀释后,按细菌内毒素检查法进行检查^[3],作 6 管,其中 2 管为供试品管(S);2 管为 2.0λ 和 0.25λ 浓度内毒素溶液管(Pc);1 管为供试品阳性管(PPC 含 2λ 浓度内毒素的供试品管);1 管为阴性管(NC)

2.4.2 上述样品同样均按家兔法作热原检查

两种方法检查结果汇总如下表 4

表 4 6 个批次甲硝唑注射液的细菌内毒素检查与热原检查结果

生产单位	批号	细菌内毒素检查						热原检查	
		S ₁	S ₂	PC _{0.25λ}	PC _{2.0λ}	PPC	NC	结果	结果
三亚市人民医院	990507	-	-	-	+	+	-	合格	合格
三亚市人民医院	990610	-	-	-	+	+	-	合格	合格
三亚市人民医院	990704	-	-	-	+	+	-	合格	合格
三亚市人民医院	990914	-	-	-	+	+	-	合格	合格
海南省第三人民医院	990526	-	-	-	+	+	-	合格	合格
海南省第三人民医院	981208-2	-	-	-	+	+	-	合格	合格

3、讨论

3.1 计算内毒素限值 L 的方法除本文使用的方法外还有另一种,即

$$L = \frac{K}{M} = \frac{5.0\text{Eu/kg}}{15\text{mg/kg}} \approx 0.33\text{Eu/mg}, M \text{ 为甲硝唑注射液的最大人体剂量。本产品浓度 } C = 5\text{mg/ml}, \text{ 鲎试剂 } \lambda = 0.5\text{Eu/ml}, \text{ 那么:最低有效浓度 } MVC = \frac{\lambda}{L} = \frac{0.5\text{Eu/ml}}{0.33\text{Eu/mg}} \approx 1.5\text{mg/ml}, \text{ 最大有效稀释 } MVD = \frac{C}{MVC} = \frac{5\text{mg/ml}}{1.5\text{mg/ml}} \approx 3.33 \text{ 倍}$$

这与本文采用的方法计算得出的 D 值是一致的。

3.2 本实验在制备内毒素溶液时,每稀释一步均应在旋涡混合器上混合适当的时间。

3.3 从表 3 可以看到,按照干扰试验的判断方法判断结果认为甲硝唑注射液不会有干扰。

3.4 2.4 细菌内毒素检查法预先采用了

2000年版药典草案细菌内毒素检查法进行,与95年版药典的比较增加了2支反应管,一支为含 0.25λ 内毒素溶液的阴性对照管(PC_{0.25 λ}),另一支为含 2.0λ 内毒素的样品阳性对照管(PPC),只有在PC_{2.0 λ} 、PPC管为阳性,NC、PC_{0.25 λ} 管为阴性时,实验方有效,即所增设的对照管主

要起到验证本实验有无效的作用。

3.5 从表4看到,6批检品有两批是不同厂家,配方相同,其内毒素检查结果全部与热原检查结果相同,这说明可以采用细菌内毒素检查方法取代家兔法来检查甲硝唑注射液的热原。

参 考 文 献:

- [1]王秀萍、余文光. 中国医院药学杂志. 1995:15(7):322
 [2]鲎试剂应用技术,湛江安度斯生物有限公司,1997.4.
 [3]中国药典2000版第二部,附录XIE(草案)

小知识

鲨的资源状况及保护

中国是鲨资源种类和数量最丰富的国家,其中中国鲨(东方鲨)这一品种在我国广东、广西和海南沿海的资源分布几乎占总蕴藏量的95%以上,以南海北部湾的生息密度最高。但随着人们对海洋的过度开发利用(围海养殖及开发沙滩旅游区),破坏了鲨的生殖场所,直接威胁着鲨的生存。另外由于食用鲨肉的风气日盛(既有活鲜出售也有被制成罐头出售)以及作为工业原料甲壳素的掠夺性收购,已对这种古老生物的生存造成毁灭性的打击。

日本由于工业化的迅速发展,大面积填海造地已严重破坏了鲨的生活栖息地,使鲨种在日本沿海已经基本绝迹。目前日本对待鲨,就象中国对待“大熊猫”一样,投入巨资建立鲨博物馆,并成立了国际性的“鲨保护协会”,还拨出专款对鲨的繁殖和增殖进行研究,通过人工繁殖育苗,人工放流来达到增加鲨资源的目的。而美国东部沿海是美洲鲨栖息密度最高的区域,也是鲨资源保护最完美,最好的区域。各相关州已经有完善的法律体系对专业性鲨的捕捉进行严格的监管,通过限制捕捉数量、时间,设立禁捕区,禁止捕杀食用,专业处理后运返深海投放等手段和方法使整个美洲鲨资源得到很好的保护。

前车之鉴,我们强烈呼吁各界人士对我国鲨资源的保护给予重视,加强开发与宣传,保护好这一珍贵物种,使其能为人类作出更大的贡献。

复方氯化钠注射液细菌内毒素的检测

刘炜 彭晓青 (广州市第一人民医院 广州 510180)

摘要 通过干扰初筛试验和干扰试验证明复方氯化钠注射原液对 λ 为 0.5Eu/ml 的鲎试剂无干扰,可用细菌内毒素检查代替热原检查。

关键词 复方氯化钠注射液,鲎试剂,细菌内毒素检查,干扰初筛试验,干扰试验

复方氯化钠注射液是我院制剂室生产的一种大输液,临床用量较大。中国药典(95版)规定其热原检查项,而美国药典(23版)则规定其细菌内毒素检查项($L = 0.5\text{Eu/ml}$)。为了日常检测中更简单、快速,同时又提高其检测的灵敏度,我们按中国药典(1998年增补本)中细菌内毒素检查法的有关规定和查找的有关资料,对该品种细菌内毒素检查(BET)进行了研究,方法如下:

1. 实验材料

1.1 供试品(S):复方氯化钠注射液,批号 990617①,本院制剂

1.2 鲎试剂(TAL):灵敏度 0.25Eu/ml,批号 990413B;灵敏度 0.5Eu/ml,批号 990129B,均为湛江安度斯产品(购回后经灵敏度复核合格)。使用同厂细菌内毒素检查用水(BET水)。

1.3 细菌内毒素工作标准品(CSE):批号 9605,效价 20Eu/支,中国药品生物制品检定所

1.4 刻度吸管 规格 2、1、0.5、0.25ml;玻璃试管,均按规定除热原。

1.5 旋涡混合器 XW-80A,上海医科大学仪器厂

2. 实验方法与结果

2.1 供试品的干扰初筛试验

2.1.1 供试品细菌内毒素理论限值(L)的

确定

据中国药典(95版)可知,本品热原检查的总注射剂量(M)为 10ml/kg,细菌内毒素阈值(K)为 5.0Eu/kg,则 $L = K/M = 5.0\text{Eu/kg}/10\text{ml/kg} = 0.5\text{Eu/ml}$

再结合美国药典(23版),我们确定 L 为 0.5Eu/ml。

2.1.2 初筛试验鲎试剂灵敏度(λ)的确定

λ 可以在 0.5 ~ 0.03Eu/ml 范围内根据方便任意选择,我们选用 λ 为 0.25Eu/ml。

2.1.3 供试品的稀释

由最大有效稀释 $MVD = L/\lambda$ 可得: $MVD_{0.5} = L/\lambda_{0.5} = 0.5/0.5 = 1$ 倍

由此类推可得:

MVD	$MVD_{0.5}$	$MVD_{0.25}$	$MVD_{0.125}$	$MVD_{0.06}$	$MVD_{0.03}$
S 稀释倍数	1	2	4	8	16

用 BET 水把 S 稀释或上述系列浓度备用,记为 S_w 。

2.1.4 CSE 的稀释

另制备一系列同样浓度的 S 稀释液,但在制备过程中加入内毒素,使每一浓度的稀释液都含有 2λ 浓度的内毒素,即为 0.5、0.25、0.125、0.06Eu/ml,记此系列溶液为 S_E 。

2.1.5 加样及反应

取批号 990413B 的 TAL($\lambda = 0.25\text{Eu/ml}$),分

别与 S_w 与 S_E 两个系列稀释液反应,依次记为 NPC 和 PPC 系列,试验重复两管,结果见表 1。

表 1 S 干扰初筛试验结果

MVD	MVD _{0.5}	MVD _{0.25}	MVD _{0.125}	MVD _{0.06}	MVD _{0.03}
NPC 系列	--	--	--	--	--
PPC 系列	++	++	++	++	++

2.1.6 结果判断

表 1 结果表明,S 对 BET 的相容性好,使用 0.5~0.03Eu/ml 灵敏度的 TAL 在对应的 S 浓度下做 BET,没有干扰。

2.2 供试品的干扰试验

2.2.1 干扰试验鲎试剂灵敏度(λ)的选择

为了方便日常检测,我们选择 λ 为 0.5Eu/ml 的 TAL,用 S 原液做干扰试验,按中国药典(1998 年增补本)干扰试验项,用 BET 水和 S 原液分别制成含 $CSE2\lambda$, λ , 0.5λ 和 0.25λ 种浓度的内毒素溶液,即为 1.0、0.5、0.25、0.125Eu/ml。每一浓度平行做 4 管,另取 BET 水和 S 原液各做 2 管阴性对照(NC)。实验共进行 3 次,反应结果见表 2。表中 $ES = \lg^{-1}(\sum X_s/4)$, $Et = \lg^{-1}(\sum X_t/4)$,单位为 Eu/ml, X_s , X_t 分别为 BET 水和 S 原液制成细菌内毒素溶液的反应终点浓度的对数值(lg)。

表 2 S 原液的干扰试验结果

次数	内毒素倍液	1	0.5	0.25	0.125	NC	Es	Es/ λ	Et	Es/Et
1	BET 水	++++	-----	-----	-----	-----	1	2		
	S 原液	++++	-----	-----	-----	-----			1	1
2	BET 水	++++	-----	-----	-----	-----	1	2		
	S 原液	++++	++++	-----	-----	-----			0.6	1.67
3	BET 水	++++	++++	-----	-----	-----	0.5	1		
	S 原液	++++	++++	++++	-----	-----			0.35	1.43

2.2.2 结果判断

由表 2 可知, $Es/\lambda \in [0.5, 2]$ 且 $Es/Et \in [0.5, 2]$,则可判断 S 原液对 $\lambda = 0.5Eu/ml$ 的 TAL 无干扰。

3. 讨论

3.1 干扰初筛试验的目的是评价供试品浓度对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度及干扰性质(增强或抑制),以便初步筛选出其干扰试验的起始浓度。这样既可避免干扰试验的盲目性,同时又节省了大量的时间和鲎试剂。

3.2 细菌内毒素检查是比热原检查更灵敏的方法。通过复方氯化钠注射液的干扰试验表明,原液对 λ 为 0.5Eu/ml 的鲎试剂无干扰。日常检测中可用原液直接做细菌内毒素检查来代替热原检查,适用于医院作为内部检测标准。

3.3 当然,为了进一步避免其干扰作用,可选择更高灵敏度的鲎试剂,用其稀释至相应的浓度做细菌内毒素检查。

参 考 文 献

- 1、中国药典(1998 年增补本).1998:附录 142
- 2、F·C·Pearsos·三 Pyrogens·Marcel Dekker Imc.1985
- 3、黄清泉,夏振民.药品细菌内毒素检查的实验设计.中国药学杂志.1997,32(2):72

硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查干扰试验

浙江省金华市药品检验所

何忠平 (金华 321000)

浙江奥托康制药有限公司

叶根余 (金华 321053)

摘要 目的:研究硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查干扰试验。方法:通过干扰试验证明硫酸西索米星注射液对细菌内毒素检查有增强作用。结果:使用 $\lambda = 0.5$ 或 $\lambda = 0.25$ EU/ml的鲎试剂对样品有增强作用,使用 $\lambda = 0.125$ 、 0.06 EU/ml的鲎试剂可消除干扰作用。结论:硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查时应使用 $\lambda = 0.125$ EU/ml或更灵敏的鲎试剂。

关键词:硫酸西索米星注射液;细菌内毒素检查;鲎试剂;干扰试验。

卫生部原标准 WS-283(X-241)-93 规定,硫酸西索米星注射液热原检查用家兔法,国家药品监督管理局标准 WS-(X-045)-99z 将其改为细菌内毒检查,中国药典 2000 年版二部收入了该品种,其细菌内毒素的检查沿用了标准 WS-(X-045)-99z,其方法是每 1000 西索米星单位中含内毒素的量应小于 0.5EU。自从 WS-(X-045)-99z 实施以来,我们一直用灵敏度为 0.25EU/ml 的鲎试剂进行细菌内毒素检查,结果都符合规定,但在 2000 年七月份,我们在对某几个批号进行细菌内毒素检查时结果都呈阳性。为了搞清楚是产品不符合规定还是样品对鲎试剂有干扰作用,我们进行了以下试验。

1. 实验材料

硫酸西索米星注射液,浙江奥托康制药股份有限公司生产,批号,000711,000712,000801,000802;鲎试剂:0.1ml/支, $\lambda = 0.5$ EU/ml,批号 0006161, $\lambda = 0.25$ EU/ml,批号 0006092, $\lambda = 0.125$ EU/ml,批号 981211B, $\lambda = 0.06$ EU/ml,批号 981121(湛江安度斯生物有限公司); $\lambda = 0.25$ EU/ml,批号 000514, $\lambda = 0.125$ EU/ml,批号 000904(厦门鲎试剂厂);细菌内毒素工作标准品

(中国药品生物制品检定所,60EU,批号 9801);细菌内毒素检查用水(中国药品生物制品检定所,960125,10ml)。

2. 实验方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏(λ_b)复核

按中国药典 2000 年版二部方法进行操[1],结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

鲎试剂批号	标示灵敏度/ λ_b	复核灵敏/ λ_c
0006161(湛江)	0.5	0.42
0006092(湛江)	0.25	0.21
981211B(湛江)	0.125	0.125
981121(湛江)	0.06	0.07
000514(厦门)	0.25	0.25
000904(厦门)	0.125	0.15

2.2 样品的细菌内毒素检查

按中国药典 2000 年版二部,将上述四批硫酸西索米星注射液用细菌内毒素检查用水稀释成 1000U/ml,再根据鲎试剂的灵敏度,将样品稀释一定倍数,进行细菌内毒素检查,结果见表 2、表 3。

表 2 硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查结果

硫酸西索米星注射液	鲎试剂 批号 λ_b	细菌内毒素检查				
		S	S	PC	NC	PPC
000711	000616 0.5	+	+	+	-	+
	0006092 0.25	+	+	+	-	+
	981211B 0.125	-	-	+	-	+
	981121 0.06	-	-	+	-	+
	000514 0.25	+	+	+	-	+
000712	000904 0.125	-	-	+	-	+
	000616 0.5	+	+	+	-	+
	0006092 0.25	+	+	+	-	+
	981211B 0.125	-	-	+	-	+
	981121 0.06	-	-	+	-	+
000711	000514 0.25	+	+	+	-	+
	000904 0.125	-	-	+	-	+

注:S为样品管,PC为阳性对照管,NC为阴性对

照管,PPC 为样品阳性管

表 3 硫酸西索米星注射液细菌内毒素检查结果

硫酸西索米星注射液	鲎试剂 批号 λ_b	细菌内毒素检查				
		S	S	PC	NC	PPC
000801	000616 0.5	+	+	+	-	+
	0006092 0.25	+	+	+	-	+
	981211B 0.125	-	-	+	-	+
	981121 0.06	-	-	+	-	+
	000514 0.25	+	+	+	-	+
000802	000904 0.125	-	-	+	-	+
	000616 0.5	+	+	+	-	+
	0006092 0.25	+	+	+	-	+
	981211B 0.125	-	-	+	-	+
	981121 0.06	-	-	+	-	+
000801	000514 0.25	+	+	+	-	+
	000904 0.125	-	-	+	-	+

2.3 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供试品稀释液(MVD),分别将同一支细菌内毒素工作标准品制成含内毒素工作标准品 2λ 、 1λ 、 0.5λ 、 0.25λ 四种浓度的内毒素溶液,每一浓度平行做 4 支,另取细菌内毒素检查用水和稀释液(MVD)各做 2 支阴性对照管,结果见表 4、表 5。

表 4 硫酸西索米星注射液的干扰试验

鲎试剂	样品批号	细菌内毒素浓度				阴性对照	E_t	E_s
		0.5	0.25	0.125	0.06			
$\lambda_b = 0.25$	超纯水	++++	++++	-----	-----	--	0.21	
	(湛江) 000711	++++	++++	++++	++++	--	0.09	
	000712	++++	++++	++++	++++	--	0.07	
	000801	++++	++++	++++	++++	--	0.09	
	000802	++++	++++	++++	++++	--	0.09	
$\lambda_b = 0.25$	超纯水	++++	++++	-----	-----	--	0.25	
	(厦门) 000711	++++	++++	++++	++++	--	0.10	
	000712	++++	++++	++++	++++	--	0.09	
	000801	++++	++++	++++	++++	--	0.10	
	000802	++++	++++	++++	++++	--	0.09	

注: E_t 为样品稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值(I_g)

E_s 为超纯水制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值(I_g)

表 5 硫酸西索米星注射液的干扰试验

鲎试剂	样品批号	细菌内毒素浓度				阴性对照	E_t	E_s
		0.25	0.125	0.06	0.03			
$\lambda_b = 0.125$	超纯水	++++	++++	-----	-----	--	0.125	
	(湛江) 000711	++++	++++	-----	-----	--	0.125	
	000712	++++	++++	-----	-----	--	0.125	
	000801	++++	++++	-----	-----	--	0.10	
	000802	++++	++++	-----	-----	--	0.09	
$\lambda_b = 0.125$	超纯水	++++	++++	-----	-----	--	0.15	
	(厦门) 000711	++++	++++	-----	-----	--	0.125	
	000712	++++	++++	-----	-----	--	0.15	
	000801	++++	++++	-----	-----	--	0.125	
	000802	++++	++++	-----	-----	--	0.15	

3. 讨论

硫酸西索米星在正常情况下,我们用灵敏度为 0.25EU/ml 的鲎试剂进行检测,都是可行的,并无增强作用。在生产这几批样品前车间曾停产过一段时间,重新生产前对某些工艺进行了改进,产品出来后对鲎试剂(0.25EU/ml)却有增强作用。因此对一些条件改变以后进行细菌内毒素检查产生阳性反应的不应过早下结论。本例几批样品我们用 $\lambda = 0.125$ 、 0.06 EU/ml 的鲎试剂进行检测,结果为阴性,而用 $\lambda = 0.5$ 、 0.25 EU/ml 的鲎试剂进行检测,结果为阳性,通过干扰试验,证明对 $\lambda = 0.5$ 、 0.25 EU/ml 的鲎试剂进行有增强作用。为确保用药安全,我们用原标准即兔法进行热原检查,结果也符合规定。因此我们将本产品判为符合规定,结果投放临床后也未发生热原反应。

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·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。此行对我国的细菌内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	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
E-101	液体内毒素	1.0ml/支	S-202	旋涡混合器	XW-80A型
内毒素检查用水			S-401	试管浮板	10孔
W-106	2.0ml/支	10支/盒	S-601	干式恒温反应仪	32孔
W-105	5.0ml/支	10支/盒	动力学定量检测系统		
W-104	50ml/瓶		K-002	EDS99内毒素检测仪	32孔
W-103	100ml/瓶				

销售电话:0759-3380671(直线)

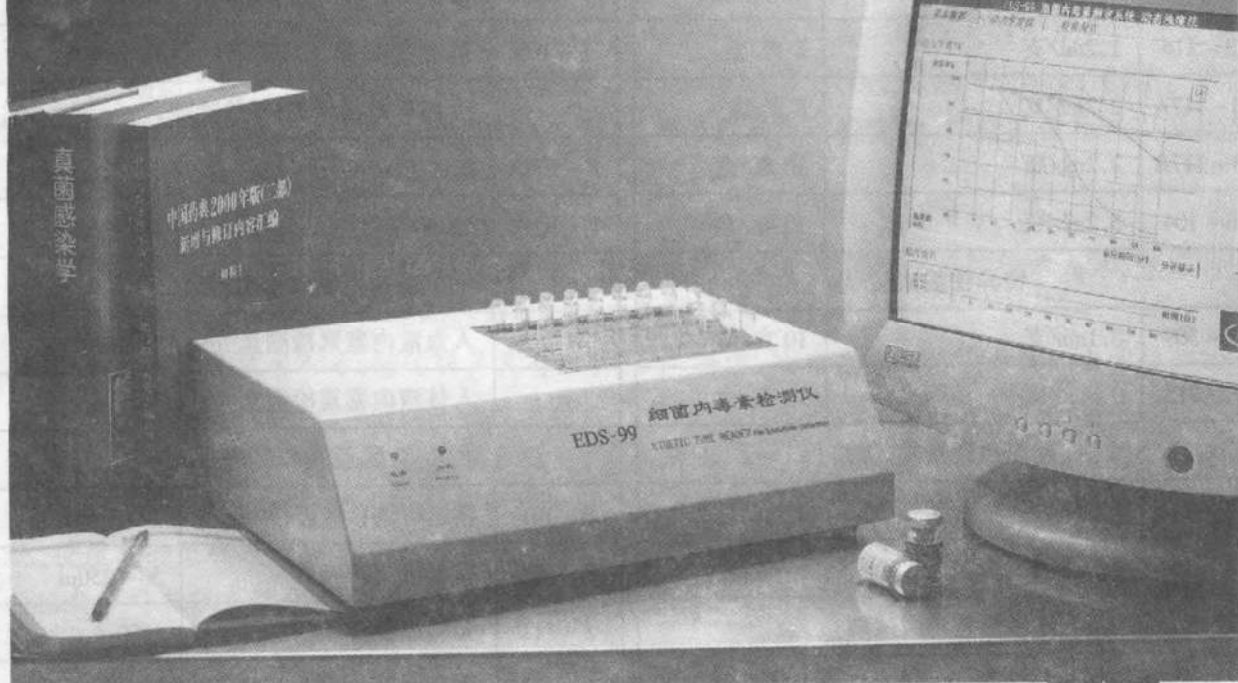
0759-3391071、3391072、3380672 转 8989、8899

开户行:中国银行湛江分行霞海支行

帐号:825201410800

EDS-99 细菌内毒素测定系统

KINETIC TUBE READER for Endotoxin Detection



特点

- 世界上第一台“三法集一”的细菌内毒素测定仪，适用于动态浊度定量法、动态显色定量法以及凝胶限量法细菌内毒素检查。
- 作动态浊度定量法测定的同时可获得凝胶限量法结果；作凝胶法检查时可观察动态反应曲线。
- 更灵敏、更准确、更快速，30-40分钟可完成反应，检查范围达0.001-100Eu/ml。
- 强大的软件功能，全自动智能式数据处理，“傻瓜”型操作设计，安装简便，易学易会。



用途

- 人用及兽用注射药品、生物制品及医疗器械的细菌内毒素(热原)检查。
- 医药生产过程细菌内毒素水平的监测与控制，杜绝终产品内毒素检查不合格造成的经济损失。
- 临床人体液(血液、尿液、腹水、脑脊液)细菌内毒素检测，对临床诊断及治疗具有指导意义。

你只要把试管插入，其它的由我来做！

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) 3391071、3391072 转

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