

试剂应用与进展

司洛勃

湛江安度斯生物有限公司主编 2001年第1期(总第7期)

2001年3月28日

导 读

进入 21 世纪的第一年, 我们发现在细菌内毒素检查 (BET) 的领域内最有影响的一件事是美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP) 和日本药局方 (JP) 达成的一个“BET 的国际调和案”, 或者也可以叫做“统一的 BET”。这一方案是医药经济高速发展、医药贸易全球一体化大背景下的产物。“统一的 BET” 已于 2001 年的 USP24 - NF19 第二增补本上生效, EP 和 JP 都即将采纳, 相信今后对各国药典所刊载的 BET 也必将产生深刻的影响, 因此在本期《进展》中我们用主要的篇幅对此进行介绍, 希望能给国内的同行提供一个有益的参考。首先为读者送上 USP24 - NF19 第二增补本所刊载的统一 BET 的中文译本——生物试验 <85> 细菌内毒素检测 (第 3 页), 接下来是 CR. Endosafe (安度斯) 公司的环球科学顾问 Cooper 博士对“统一的 BET” 的评价之作——统一的细菌内毒素检查法将在 2001 年的 USP 生效 (第 11 页), 之后我们将比较一下美欧日中的药典方法的异同点——走向统一的细菌内毒素检查法 (第 14 页), 读者据此可体会到“统一”是大势所趋。由于版面所限, 关于“USP24 新的 BET 对 SOP 的影响”我们将在下一期奉献给读者。

最近我们也特别注意到了有关细菌内毒素检查假阳性的问题。BET 方法在不断地发展的同时, 鲎试剂的生产工艺、质量水平也是在不断提高的。新版的 USP 就特别提到“除内毒素外, 鲎试剂也与某些 β -葡聚糖反应。某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”。湛江安度斯公司研究与发展部对 BET 的假阳性开展了专题研究, 《进展》本期刊登的“常用大输液细菌内毒素检查假阳性问题的探讨” (第 20 页) 是该部的研究报告之一, 随后我们还将陆续刊登其它的研究结果。您是否也碰到过 BET 假阳性的结果? 您是否考虑过鲎试剂的特异性呢? 希望我们一起来探讨这些问题!

《进展》编辑组

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 Lorning 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) > 10MΩ - 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 (< ± 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，漩涡混合器的使用、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。

生物试验

< 85 > 细菌内毒素检测

修订内容:

本章提供了检测或定量测定可能出现在样品内或样品上的细菌内毒素的试验方法;它使用由鲎(美洲鲎或中国鲎)的循环阿米巴细胞提取液制备的鲎试剂(LAL)^[1]。

该检测有两种方法:基于形成凝胶的凝胶法和光度法。后一种方法包括浊度法——基于内源性底物断裂后的浊度变化,和显色法——基于一个带显色团的合成肽断裂后颜色的变化;除非在品种项有特别指定,否则可用上述方法中的任何一种;除非在品种项有特别指定,若存在争议,最后结论以凝胶法为准。

在凝胶法技术中,反应的终点是将样品稀释后与平行稀释的参考内毒素进行直接比较得到的,内毒素含量用 USP 内毒素单位表示(USP-EU)。[注:1 USP-EU 等于 1 IU 的内毒素]

既然鲎试剂已为浊度法或显色法用途配制,因此试验须符合一定的要求:这些试验要求先建立一条标准回归曲线,并用该曲线计算样品的内毒素含量;该试验应预先规定内毒素和对照液与鲎试剂反应的孵育时间,以及在适当波长使用光度计读取吸光度;在终点浊度试验中,孵育期结束时应立即读数;在终点显色法检测中,在到达预先规定的反应时间时,添加终止酶终止反应后再读数;而在浊度和显色动力学检测中,光密度的测定是贯穿于整个反应期间,而“率”值是通过这些读数来确定的。

所有的器械和玻璃用具

所有的玻璃用具和耐热材料应置于热空气烤箱中经有效的程序除热原^[2]:通常使用的最少时间和最低温度为 30 分钟、250℃。如果使用如微孔平板和自动加样器的吸头之类的塑料制品,应确认其在试验中没有可被检测的内毒素并且不会干扰试验。[注:在这一章中,“试管”这个词泛指其它任何容器,如微量滴定孔]

内毒素标准贮备液和标准内毒素溶液的制备

美国药典(USP)的参考内毒素的效价为每瓶 10,000 个 USP 内毒素单位(EU)。用 5ml LAL 溶解用水^[3]复溶 1 瓶参考内毒素的全部内容物,用旋涡混合器间歇混合 30 分钟制成原液,用这一原液制作合适的系列稀释液;将原液置于冰箱中保存,用于以后制备的稀释液,但保存时间不

得超过 14 天，使用前用旋涡混合器强力混合至少 3 分钟，每一步稀释至少混合 30 秒，然后才能用它稀释下一步，经稀释的参考内毒素不能贮存留待以后使用，因为吸附作用会使其失去活性。

预试验

使用复核过的标示灵敏度的鲎试剂。

细菌内毒素试验结果的有效需要足够的证据，试验使用的用具、溶液、浸洗液或抽提液样品本身对反应没有抑制、增强或其它干扰作用，可按以下陈述的三种方法的任何一种进行抑制或增强试验来完成验证。试验中，应设置适当的阴性对照，如果鲎试剂的原材料、生产方法或配方发生改变时，都要重新进行验证试验。

样品溶液的制备

用 LAL 溶解用水溶解或稀释药品或浸提医疗器械来制备样品溶液，某些物质或制品可能更适于在其它水性溶剂中溶解、稀释或抽提，如果有必要，调整待检溶液（或稀释液）的 pH 值以使鲎试剂和样品混合物的 pH 值在鲎试剂生产商指定的 pH 值范围内，通常应用的产品 pH 值在 6.0-8.0 范围。可用酸、碱或鲎试剂生产商推荐的合适的缓冲液调整 pH 值，酸和碱可用原液或固体加 LAL 溶解水在无可测内毒素的容器中制备；缓冲液须经验证没有可检测到的内毒素和干扰因子。

最大有效稀释倍数的计算 (MVD)

最大有效稀释倍数是样品的最大允许稀释倍数，在 MVD 下，内毒素限值可以被判断，它适用于注射液或非经肠道的以溶解或稀释形式给药的药品溶液，如果给药量的体积量不确定则以重量为给药量，MVD 的计算公式如下：

$$\text{MVD} = \frac{\text{内毒素限值} \times \text{样品溶液浓度}}{\lambda}$$

样品溶液的浓度和 λ 定义如下，当内毒素限值浓度以体积表示 (EU/ml) 时，用限值除以 λ ，来计算 MVD 倍数， λ 是鲎试剂的标示灵敏度 (EU/ml)；当内毒素限值浓度以重量或活性单位 (EU/mg 或 EU/U) 表示时，用限值乘以待检药品溶液浓度或依据标示说明复溶的药品浓度，视乎哪个更合适，然后将乘积除以 λ 来得出 MVD 倍数，由此获得的 MVD 倍数即是有效试验样品的限定稀释倍数。

内毒素限值的建立

依据剂量来确定,非经肠道药品的内毒素限值等于 K/M , K 是人每公斤体重的内毒素阈值, M 是人每公斤体重在一个小时内的最大注射剂量^[4]。

在独立的品种项中,非经肠道药品的内毒素限值以单位表示,如 EU/ml、EU/mg 或 EU/生物活性单位。

凝胶法

凝胶法是根据鲎试剂在内毒素存在时会产生凝胶的原理来定性检测内毒素的方法;能使鲎试剂在标准条件下形成凝胶的内毒素浓度为鲎试剂的标示灵敏度,为确保该检测法的精确性和有效性,标示灵敏度的复核试验和干扰试验在“凝胶法预试验”中有叙述。

凝胶法预试验

鲎试剂灵敏度复核试验——每批鲎试剂至少取 1 支来复核标示灵敏度;用 LAL 溶解用水将 USP 参考内毒素作 2 倍稀释系列,即 2λ , λ , 0.5λ 和 0.25λ , 其中 λ 为鲎试剂的标示灵敏度,试验在 4 个浓度标准内毒素溶液下进行,平行 4 组,试验包括阴性对照。当使用新批号的鲎试剂或当对试验结果有影响的试验条件发生变化时须对鲎试剂标示灵敏度进行复核。

将鲎试剂和等量(如 0.1ml)的内毒素标准溶液加入一试管中混合,如果使用装有冻干鲎试剂的单个试管或安瓿,可将溶液直接加入试管或安瓿中,根据鲎试剂生产商的指导将反应混合物恒温孵育一段时间(通常是 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 ± 2 分钟),避免振动,将每支试管按顺序从恒温器中直接取出并轻轻翻转 180° 观察结果,如果内容物形成坚实凝胶并在试管翻转后保留在原处,则记为阳性;如果未形成完整的凝胶,则结果为阴性,最低浓度的内毒素标准溶液的所有平行管都为阴性结果试验才为有效试验。

终点浓度是系列递减浓度的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度,按下式计算反应终点浓度的对数平均值然后求此平均值的反对数:

终点浓度的几何平均值 = $\text{antilog}(\sum e/f)$

$\sum e$ = 所使用的稀释系列反应终点浓度对数值的和, f = 重复试管数, 终点浓度几何平均值为鲎试剂灵敏度的测定值 (EU/ml), 如果该值在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 之间, 则该批鲎试剂的标示灵敏度符合规定, 可以用于试验。

凝胶法干扰试验——按表 1 制备溶液 A, B, C 和 D, 使用小于 MVD 稀释并且不含有可检测到的内毒素的样品溶液进行抑制/增强试验, 操作方法、溶液 B 和 C 的终点浓度几何平均值的计算公式与鲎试剂标示灵敏度的复核试验程序相同。

表 1. 凝胶法抑制/增强试验的溶液制备

溶液	内毒素浓度/溶液	稀释剂	稀释倍数	初始内毒素浓度	重复管数
A	无/样品溶液	——	——	——	4
B	2λ/样品溶液	样品溶液	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/LAL 溶解用水	LAL 溶解用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/LAL 溶解用水	——	——	——	2

溶液 A: 无可检测到内毒素的样品溶液

溶液 B: 用于干扰试验

溶液 C: 用作鲎试剂灵敏度复核的对照

当任何有可能影响检测结果的条件改变时应重新进行试验, 有效的试验中溶液 A 和 D 不出现阳性结果, 而且溶液 C 的结果与标示灵敏度相符合, 除此以外, 试验均无效。

如果在样品溶液测得的灵敏度在 0.5λ ~ 2.0λ 之间, 则样品溶液在所使用的试验条件下没有干扰, 否则样品溶液对试验有干扰。

如果样品以小于 MVD 的倍数来稀释而仍然有干扰, 用更大的稀释倍数但不超过 MVD 的倍数来稀释样品重新进行试验, 使用更高灵敏度的鲎试剂可对样品进行更大的稀释, 这有助于消除干扰。

干扰可用适当的处理来克服, 例如中和、透析或加热, 为了证明所选择的处理方法有效消除了干扰而没有丧失内毒素, 应在制备的样品溶液中加入 USP 参考内毒素, 经选定的处理方法处理后再进行检测。

凝胶法限量试验

品种项下有内毒素限值要求时使用这种检测方法。

方法——按表 2 制备溶液 A, B, C 和 D, 按照凝胶法预试验中的鲎试剂标示灵敏度的复核试验步骤进行试验操作。

表2 凝胶法限量试验的溶液制备

溶液*	内毒素浓度/添加内毒素溶液	重复管数
A	无/稀释的样品溶液	2
B	2λ/稀释的样品溶液	2
C	2λ/LAL 溶解用水	2
D	无/LAL 溶解用水	2

* 用不超过 MVD 的样品溶液按凝胶法预试验下的干扰试验中所述的方法来制备溶液 A 和阳性产品对照溶液 B, 阳性对照溶液 B 和 C 中所含的内毒素为鲎试剂灵敏度标示值的 2 倍, 阴性对照溶液 D 为 LAL 溶解用水。

结果判断——当阳性对照溶液 B 和 C 中所有重复管均为阳性结果以及阴性对照溶液 D 所有重复管均为阴性结果时, 此次试验才有效, 如果溶液 A 中的两管均为阴性结果, 则该样品符合规定; 如果溶液 A 的两管均为阳性结果, 则该样品不符合规定。

如果溶液 A 中一管为阳性结果另一管为阴性结果, 则需重复此试验, 重复试验中, 如果溶液 A 中的两管均为阴性结果, 则该样品符合规定, 如果样品的稀释倍数小于 MVD, 其检测结果为阳性, 则该试验可重复进行, 但稀释倍数不得大于 MVD。

凝胶法定量试验

这种检测方法用确定反应终点的方法来定量检测样品溶液中的细菌内毒素。

方法——按表 3 制备溶液 A、B、C 和 D, 按照凝胶法预试验的鲎试剂标示灵敏度复核试验步骤进行试验操作。

表3 凝胶法定量试验的样品溶液的制备

溶液	内毒素浓度/溶液	稀释剂	稀释倍数	内毒素初始浓度	重复管数
A	无/样品溶液	LAL 溶解用水	2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ/样品溶液	—	1	2λ	2
C	2λ/LAL 溶解用水	LAL 溶解用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/LAL 溶解用水	—	—	—	2

溶液 A: 样品溶液的稀释不超过 MVD 稀释, 且已作过凝胶法干扰试验, 所有后续的产品稀释倍数均不能超过最大有效稀释倍数, 用 LAL 溶解用水制备浓度为 1, 1/2, 1/4 和 1/8 的 4 个样

品稀释系列，并对相应的稀释进行凝胶法干扰试验；其它稀释系列也可适当使用。

溶液 B：含浓度为 2λ 的标准内毒素的溶液 A（阳性产品对照）

溶液 C：2 个平行组各 4 管，分别含浓度为 2λ ， λ ， 0.5λ 和 0.25λ 的标准内毒素的 LAL 溶解用水

溶液 D：LAL 溶解用水（阴性对照）

计算与说明——有效试验应符合以下条件：（1）阴性对照溶液 D 的两支重复管均为阴性结果（2）阳性产品对照溶液 B 的两支重复管均为阳性结果（3）溶液 C 的终点浓度的几何平均值在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 范围内。

要计算溶液 A 的内毒素浓度，可将每一终点对应的稀释倍数乘以 λ 计算出样品稀释系列的每支重复管的终点浓度，样品溶液的内毒素浓度即是各重复管的终点浓度的几何平均值（公式用“凝胶法预试验”中鲎试剂灵敏度复核试验中的公式）；如果试验中用的是稀释过的样品溶液，计算原始样品的内毒素浓度时，可以将各自的稀释倍数相乘；如果样品溶液在有效试验中没有一个是阳性的，内毒素浓度应记为小于 λ （如果稀释过的样品检测结果小于 λ ，则以 λ 乘以样品的最小稀释倍数）；如果所有稀释倍数都为阳性，内毒素浓度应记为等于或大于最大稀释倍数乘以 λ （例如表 3 中初始稀释倍数乘以 8 再乘以 λ ）。

如果内毒素浓度小于各品种项中规定限值时，样品符合规定。

光度法

浊度法测定浊度的增加，根据所使用的原理，该方法分为终点浊度法和动态浊度法；终点浊度法是一种测定恒温孵育期结束时反应混合物的内毒素浓度与浊度（吸光度或透光率）之间关系的方法；动态浊度法是一种测定反应混合物达到预定吸光度水平所需的时间或孵育期内浊度变化速率的方法。

显色法是测定由内毒素与鲎试剂反应导致的特定显色肽释放显色团方法；基于所采用的测定原理，这种方法分为终点显色法和动态显色法，终点显色法是测定恒温孵育期结束时，内毒素浓度与释放的显色团之间的定量关系的一种方法，动态显色法是测定反应物达到预定吸光度变化时所需时间或测定孵育期间颜色变化速率的一种方法。

所有的光度法都是在鲎试剂生产商推荐的恒温温度下进行，通常是 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

光度法的预试验

为了确保浊度法和显色法的正确性和有效性，需要进行预试验来证实标准曲线的可靠性和样品溶液对反应没有抑制或增强作用，当任何有可能影响试验结果的条件改变时，对试验方法要求

重新验证。

标准曲线的可靠性试验——用标准内毒素溶液制备至少三个内毒素浓度来建立标准曲线，根据所用鲎试剂的说明书进行试验（体积比例、培育时间、温度、pH值等），每个标准内毒素浓度至少做三个重复管，如果动态法中要求的范围大于两个对数范围，则应在每个对数区间添加一个标准内毒素浓度；在鲎试剂生产商指定的内毒素范围内，相关系数 $|\gamma|$ 的绝对值必须大于或等于0.980。

干扰试验——选定一个标准曲线的中点或接近中点的内毒素浓度，按表4制备溶液A、B、C和D，按照所使用的鲎试剂的说明书进行溶液A、B、C和D的试验（例如：样品和鲎试剂的体积、样品和鲎试剂的体积比例、恒温孵育时间等），至少平行2组。

用已添加内毒素的溶液的平均内毒素浓度减去没有添加内毒素的溶液的平均内毒素浓度来计算内毒素浓度的回收率的平均值，为了确认在检测条件下没有干扰，在减去未添加内毒素的溶液中任何可检测到的内毒素浓度后，添加到样品溶液中的内毒素浓度测定值必须在实际添加值的50%~200%之间，当内毒素回收率超出指定范围时，应按照凝胶法干扰试验中所述消除干扰因素，重复凝胶法干扰试验验证处理方法。

表4 光度法抑制/增强试验的溶液制备

溶 液	内毒素浓度	溶 液	重复管数
A	无	样品溶液	不少于2
B	标准曲线的中点浓度	样品溶液	不少于2
C	至少3个浓度（ λ 为最低浓度）	LAL溶解用水	
D	无	LAL溶解用水	不少于2

溶液A：样品溶液的稀释不得超过MVD

溶液B：与溶液A有相同稀释倍数的样品溶液，添加的内毒素浓度等于或接近标准曲线的中点浓度。

溶液C：标准内毒素（阳性对照系列）使用光度法预试验项下“标准曲线的可靠性试验”中的浓度系列。

溶液D：LAL溶解用水（阴性对照）

光度法操作程序

按照光度法预试验项下的干扰试验中所述的程序进行操作。

光度法中的计算

用阳性对照组C回归的标准曲线计算溶液A每组试验中的内毒素，有效的试验应符合下述

三项要求：(1) 对照组 C 的结果符合光度法项下的标准曲线的可靠性试验中所述有效要求；(2) 用溶液 B 的内毒素浓度减去溶液 A 中的内毒素浓度计算的内毒素回收率应在 50% ~ 200% 范围内；(3) 阴性对照 D 的结果不超过所用的鲎试剂的说明书中规定的空白限值。

光度法结果说明

如果溶液 A 平行组的平均内毒素浓度在经过稀释倍数和浓度换算后，其结果小于产品的内毒素限值，则样品合格。

[1] 除了内毒素，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。

[2] 对于灭活内毒素程序的验证试验见“干热灭菌和灭菌验证纲要”(1211)；使用灵敏度不低于 0.15EU/ml 的 LAL。

[3] 与所使用的鲎试剂的极限灵敏度没有反应的灭菌注射用水，或者其它水。

[4] 对于非鞘内的非经肠道给药途径，K 值等于 5USP - EU/kg 体重，(鞘内给药途径的 K 值等于 0.2USP - EU/kg 体重)；非鞘内给药的放射性药品，内毒素限值为 175EU/V，V 是最大的 ml 剂量，鞘内给药的放射性药品，其限值计算公式为 14EU/V；以体表面积为给药依据的药品（通常为抗癌药物），按如下公式计算内毒素限值， $K / (M \times 1.8m^2)$ ， $K = 5EU/kg$ ，M 是每 kg 每小时的最高给药剂量。

小知识

鲎的种属及地理分布

1、鲎的种属：

鲎(hòu)是栖生于海洋中的一种无脊椎动物，在动物学分类学上，鲎属节肢动物门(Arthropoda)、肢口纲(Nerostomata)、剑尾目(Xiphosura)、鲎科(Limulidae)。目前，世界上现存的鲎有三属四种，北美洲东岸海域产的美洲鲎，属美洲鲎亚科(Subfamily Limulinae)，东南亚海域分布的东方鲎、圆尾鲎、南方鲎均属鲎亚科(Subfamily Tachypleinae)。目前能够用于生产鲎试剂的只有美洲鲎和东方鲎(中国鲎)二种。

2、鲎的主要地理分布：

- ①美洲鲎 *Limulus polyphemus* (Linnaeus 1758) 北美洲东岸海域。
- ②东方鲎 *Tachypleus tridentatus* (Leach 1819) 中国东南沿海和南海西部海域。
- ③南方鲎 *Tachypleus gigas* (Muller 1785) 泰国和马来群岛海域。
- ④圆尾鲎 *Carcinoscorpins rotundicauda* (Latreille 1802) 东南亚西部海域。

统一的细菌内毒素检查法将在 2001 年的《美国药典》生效

J.F.Cooper.

在 2000 年 1 至 2 月号的《药典论坛》杂志中发表了 BET 的国际调和案，它是国际调和委员会为使 EP、JP 和 USP 的 BET 达成一致的一个产物，采用统一的 BET 后，USP 将有较大的变化，它将条文简化使其易于理解和执行，在 USP23 版中仅包含一个标准凝胶法试验，而新的 BET 提供两个标准方法，凝胶法和光电测定的 LAL 方法，任何方法经验证有效后都可以使用，但发生争议时仍以凝胶法作为参考试验法。

统一的 BET 将收载于 USP24 版 NF19 的第二增补本中并将于 2001 年 1 月 1 日生效，本文将回顾统一的 BET 中的每个章节，确认其不足之处，考虑新 BET 法对 SOPs 修改版的含义。新 BET 带来的最大益处是它包含全部 LAL 试验方法的标准操作程序，最大的不足是它不再使用内毒素工作标准品（CSE）来代替 USP 参考内毒素，以前称 RSE。

引言

文中说鲎试剂可以从东方鲎或美洲鲎的阿米巴细胞中制备，它指出 LAL 可与某些葡聚糖反应，“一些 LAL 经处理后不再与葡聚糖反应，可用于含葡聚糖的样品检查”，这意味着可以使用经特定方法处理的 LAL 来检测葡聚糖材料，使其不与葡聚糖反应，这一改进提供了避免与葡聚糖有关的干扰的方法。

试验用具和玻璃器皿

在谈到耐热材料的除热原时，文中说通常使用的最低时间/温度设置为 30 分钟、250℃，文中还提到塑料用具必须证实无可测的内毒素，而且不能干扰鲎试验。

内毒素标准

文中描述了如何制备标准内毒素溶液和 USP 中的 RSE 标准溶液，它反对储存稀释液超过 14 天，除非有数据证实其稳定性，最显著的改变是取消内毒素工作标准品（CSE）的使用。

准备性试验

与以前一样，每收到一个新批次的鲎试剂必须复核其标示值（灵敏度、线性），验证标准在每种鲎试验方法的相关标题下有描述，“如果鲎试剂的来源或鲎试剂的生产方法、配方改变时，必须重新验证。

供试品溶液的制备

供试品与鲎试剂混合物的 PH 值必须在鲎试剂供应商规定的范围内, 使用缓冲液时须经验证。

计算

最大有效稀释 (MVD) 和内毒素限值的计算没有明显的改变, 但不幸的是没有提到最大有效浓度 (MVC)。

凝胶法

在新的 BET 法文中将凝胶法分为两种方法并分别命名为凝胶法限值试验和凝胶法分析, 凝胶法的预试验没有明显的改变, 使用新的一批试剂或实验条件有明显改变时要求复核标示值。表 1 中清楚解释了干扰试验, 然而本节字面上的意思却建议在验证研究中必须使用 USP 的 RSE。

凝胶法限值试验有一个非常明显的变化, 限值试验不要求每次试验都进行标示值的复核: 仅使用 2 λ 阳性水对照即可, 这一改变减少了多余的对照; 描述如何应用该检测法的文字和表 2 大大地简化了。

经扩展和改名的凝胶法分析程序运用几何稀释方法定量检测样品中的内毒素水平, 凝胶法分析对于该文是新的, 但对于工业界来说却是标准方法, 它简单阐述了用两倍稀释技术来找出终点的方法, 表 3 清楚概括了如何设立这一检测方法。

光电检测技术

新的 BET 的最重要的不同点是收录了定量方法, 有两个基本方法: 动态、终点比浊法; 动态、终点比色法, 预试验用来验证标准曲线标准的有效性分析和供试品的干扰试验, 这基本上与鲎试剂厂商提供的方法及 FDA 鲎试验指南 (1987 年、1991 年) 相一致, 试验项目 (标准内毒素、对照) 至少平行两组试验, 回收率的有效范围为 50 - 200%, 相关系数仍为 -0.980 没有更严格。

不足之处

最奇怪的不足之处是在 BET 的全文中未见 CSE 的使用, 这一缺失引起争论, 例如何时可用 CSE 代替 RSE, 要何种证据可证实两者的同一性。在《药典论坛》的有关 BET 的基本事项中说明可以使用 RSE 的替代品 CSE, 但使用者必须证明两者间效价的一致性, 上一版 BET 提供了 CSE 的标准化原则, 使用 RSE 为标准标定, 作为验证参考内毒素和非参考内毒素的一致性的方法。

鲎试验参考一份文件的梦想仍然是一个幻想，鲎试剂用户可以依旧按 FDA 鲎试验指南（1987 年）来建立 SOPs，接受厂商提供的 CSE 效价分析报告（CoA）直至 CSE 的争论被澄清，CSE 的 CoA 已经使用了 20 余年，CSE 作为优良特征的内毒素应该仍作为工作标准品使用，由于成本差异和 USP 的 RSE 溶解后仅两个星期的有效期，使用 RSE 替代 CSE 将每年令用户增加 300 - 4000 美金的开支。

另一个不足之处是 MVC 的计算仍未被收入，原料药和药用辅料的内毒素检测越来越令人感兴趣，粉末，无菌固体物质没有 MVD，如注射用氨苄西林，检测固体物的适当的方法是制备粉末的溶液浓度不超过 MVC，正如计算鲎试剂或鲎试验方法的 λ 以及药品的内毒素限值，因此 MVC 是下版 BET 应增加的候选者。

总结：统一的 BET 是一个重大的进步，它相当简明，而且内毒素检测的标准程序更易于理解，它是第一个经协调统一的生物试验法，当新的 BET 再次修订时，若接受 CSE 作为内毒素参考标准品的替代品，而且包括 MVC 以简化无菌固体的试验，那么新的 BET 将会是一份更加完善的文件。

技术服务承诺

湛江安度斯生物有限公司对亚洲市场和中国市场持有远期的目标和具体的实施计划。我们对中国细菌内毒素检查项目的贡献不仅体现在大量资金的投入，还体现在以先进的技术以及良好的商业信誉为基础，为用户提供品质卓越的鲎试剂产品及良好的技术支持。为此，我们成立了跨部门机构“技术支持部”，向我们的用户提供完善的、始终如一的服务。

1、提供最新的学术资料和相关信息 我们掌握专业知识的翻译人员不断地追踪着国内外细菌内毒素检查法的发展和动态，定期编辑《鲎试剂的应用与进展》免费发送给用户；根据用户的不同需要提供分类的检查方法资料和资料索引（文献题录）；提供国内外最新的细菌内毒素检查学术动态（协作、会议、学习班）及会议材料。

2、提供全面技术培训 我们将与各地药品监督检验机构合作举办有关细菌内毒素检查法的培训及应用技术高级研讨班；常年接受用户到本公司培训，派出技术人员上门向用户提供现场的技术服务。

3、提供具体品种的检查方法 提供具体品种的检查方法；接受用户寄送样品帮助建立检查方法；协助用户建立药品生产过程的细菌内毒素监控方法。

4、提供详尽的咨询服务 仔细聆听和解答用户的咨询；解决用户在使用过程中遇到的具体问题及质量投诉。

5、提供检测服务 接受用户的寄样检查委托。

作为一个提供生物技术产品的企业，我们理解用户的需要总是独特的。我们经验丰富的技术人员将竭尽全力为鲎试剂用户提供最有效的技术支持和尽善尽美的售后服务。

走向统一的细菌内毒素检查法

湛江安度斯生物有限公司 研究与发展部

美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)、日本药典 (JP) 是三个收载细菌内毒素检查法 (BET) 较早的药典, 使用这三个药典的国家、区域的医药经济在国际上同样有着强大的影响力; USP、JP、EP 分别建立了各自的内毒素标准物和 BET, 虽然内毒素标准不同, 检查方法各异, 但内毒素的致热阈剂量 $K = 5\text{EU/Kg}$ 或 5IU/Kg 却被普遍接受; WHO 设在英国的 NIBSC 于 1985 年建立了一个内毒素的国际标准品 IS84/650, 效价单位为 IU, 而 FDA、USP、JP 的内毒素标准以 EU 为效价单位, WHO 为了保持 IU 与 EU 效价的一致性, 标示 IS 为 14, 000IU/瓶, 在 1996 年的第二批内毒素 IS 国际协作研究中, IS84/650 与 FDA 的 EC-5 通过凝胶、定量综合研究显示 IS94/580 的效价为 18, 500IU/瓶更合适; 内毒素的 IS 在欧洲普遍被接受, 欧洲药典的 BRP 以 IS 为基准建立, 但在 USP、JP、FDA 的鲎试验指南 (1987 年) 和动态鲎试验暂行条例 (1991 年) 中均未涉及所谓的 IS 标准, IS84/650 也没有给以 EU 为效价的体系带来任何影响, IS84/650 似乎只是欧洲的标准; 第二批内毒素的国际标准改变了各标准相对独立的现象, 在协作研究中, 由 NIBSC 提供了三个亚批的候选品, 其中两个亚批成为新的内毒素国际标准 IS94/580, 而余下的一个亚批是 FDA 的 EC-6, USP 接受 EC-6 作为美国的内毒素参考品——LotG, LotG/EC-6 与 EC-5 经美国 6 个专业实验室的协作研究, 确定其效价为 10, 000EU/瓶, 实际上 EC-5 与 EC-6 由同一原料制备, IS94/580 以 EC-5 为基础建立的效价为 10, 000IU/瓶, $1\text{IU} = 1\text{EU}$, EP (1998 年) 将一部分 IS94/580 作为新的药典内毒素标准——BRP-3; 自此, 内毒素的标准在 IU 与 EU 之间实现了统一, 在标准内毒素的来源上, WHO、USP、FDA、EP 实际上使用的是同一个内毒素标准物。

统一的内毒素国际标准为 BET 的进一步统一奠定了基础, USP20 版第一个收载 BET, 但历经 5 版 20 年, 其方法仍然是孤单、严谨的凝胶法, 但这并不意味着鲎试验在美国落后, FDA 在 1987 年颁布了鲎试验有效性指南, 1991 年对动态鲎试验又增补一份条例, 至今, FDA1987 年的指南仍是对鲎试验方法论述最为详细指导文件, 其中的内毒素工作标准品标定方法、供试品取样及合并检查、初始质量控制等在现版的各药典中均未涉及; 内毒素的国际标准是一个国际协作的产物, 而 BET 的国际方法则是一个协调的产物, USP24、FDA 的鲎试验指南 1987、EP1998、JP13 的 BET 虽然其目的一致——检查内毒素, 而具体实现方法上各具特色, 以最基本的凝胶法为例, USP24: 样品中加入适量的 LAL 试验包括标准内毒素系列从 2λ 到 0.5λ 、阴性对照、样品检查和 PPC, 平行两组, 37 保温 1 小时; EP1998: 将样品加入到鲎试剂中, 鲎试剂与样品的体积可灵活使用, 37 保温, 时间通常在 20~60 分钟, 样品稀释不超过 MVD, 包括阴性对照, 平行两组, 限

度试验还包括 2λ 阳性对照和 2λPPC, 半定量分析包括一个内毒素稀释系列和有效的样品稀释系列及其 2λPPC; JP13: 在 0.1ml 鲎试剂中加入 0.1ml 样品或内毒素, 37 保温 60 + 2min, 在 MVD 下检查样品, 试验还包括阴性对照、2λ 阳性对照、2λPPC; 仅一个凝胶法试验各药典方法有如下不同: 1、保温时间, EP 未作明确规定, 2、鲎试剂与样品的量仅 JP 明确要求 0.1 鲎试剂加 0.1 样品或内毒素, 3、样品稀释, USP、EP 不大于 MVD, JP 要求 MVD, 4、标准对照, USP 的限度检查要求一个内毒素稀释系列, EP、JP 的限度检查为 2λPC, EP 的半定量分析要求一个内毒素稀释系列, 虽然内毒素标准初步统一, 但在不同的药典方法下测定的内毒素值仍缺乏可比性, 内毒素检查法的协调案因此应蕴而生, 细菌内毒素的国际协调案是国际协调委员会 (ICH) 综合 USP、EP、JP 的方法求同存异的产物, USP 和 JP 已接受该协调案作为其 BET 的修订案, USP 与 JP 虽然采用同一协调案, 其具体内容、试验方法保留各自的特色, 如: USP 与 JP 使用各自的内毒素标准物; 以下表格 (16~19 页) 比较了几个药典和法规的 BET 方法, USP24 和 JP13 的 BET 即将成为历史, FDA 法规与药典方法相比其特色是更加着重于鲎试验方法验证的细节, 而药典是提供一个判断产品内毒素合格与否的基本方法; 中国药典 2000 的细菌内毒素检查法与 JP13 的方法更加类似, BET 的国际协调案也为其提供了一个有益的参考。

缩写说明:

FDA: 美国食品及药物管理局; WHO: 世界卫生组织; FDA 鲎试验指南: 鲎试验作为人用、兽用非经肠道药品、生物制品及医疗器械终产品细菌内毒素检查的有效性指南, 1987, FDA; NIBSC: 生物标准物及控制物国家研究所; BRP: 生物参考品。

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鲎试剂应用的文章都可以投稿 (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。

来稿请寄: 湛江安度斯生物有限公司《进展》编辑组

广东湛江市人民大道中 38 号 邮编: 524022

电话: (0759) 3391071、3391072 转 8022

传真: (0759) 3391071、3391072 转 8668

法规 项目	USP 24 <85>生物试验方法 (2000年)	USP 24-NF 19 第二增补本 (2001年)	JP13 改正版 (1996年)	JP14 (2001年)
方法	凝胶法,使用其他方法应符合方法转换的要求	凝胶法、光电测定法包括比色法和比浊法	凝胶法,比浊法和比色法统称为光电测定法	凝胶法、光电测定法包括比色法和比浊法
试剂	标示灵敏度的 LAL	LAL 或 TAL	LAL 或 TAL 等	LAL 或 TAL 等
标准内毒素	USP 的内毒素参考标准 (RSE) 或者已知效价的内毒素工作标准 (CSE)	内毒素参考标准 RSE	内毒素参考标准 (JP 标准品) 内毒素单位为 EU, (JP 的 CSE 标准以 USP 的 CSE 标准化)	内毒素参考标准 (JP 标准品) 10000EU 或 100EU
PH	反应物(样品 + 鲎试剂)的 PH 值:6.0~8.0 如果需要可以使用 NaOH、HCl 或者缓冲液调节 PH 值	反应物(样品 + 鲎试剂)的 PH 值:6.0~8.0 如果需要可以使用 NaOH、HCl 或者使用鲎试剂厂商提供的缓冲液调节 PH 值	反应混合物(样品 + 鲎试剂)的 PH 值 6.0~8.0 如果要可以使用 NaOH、HCl 或者缓冲液调节 PH 值	样品的 PH 值:6.0~8.0, 用于调节 PH 的溶液须用 BET 用水制配, 容器无可测内毒素
预试验凝胶法灵敏度复核	至少一支鲎试剂,检测 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 的内毒素平行 4 组,结果应在标示值的 2 倍范围内	至少一支鲎试剂,检测 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 的内毒素平行 4 组,结果应在标示值的 2 倍范围内	检测 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 的内毒素平行 4 组,结果应在标示值的 2 倍范围内	检测 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 的内毒素平行 4 组,结果应在标示值的 2 倍范围内
预试验终点法鲎试验的验证	未涉及	至少 3 个标准内毒素浓度,至少平行 3 组,线性相关系数 $ r \geq 0.980$,如果动态法中要求的范围大于两个对数范围,则应在每个对数区间添加一个标准内毒素浓度;	至少 3 个标准内毒素浓度,平行 3 组,线性相关系数 $r \geq 0.980$	至少 3 个标准内毒素浓度,至少平行 3 组,线性相关系数 $ r \geq 0.980$,如果动态法中要求的范围大于两个对数范围,则应在每个对数区间添加一个标准内毒素浓度;
预试验动态法鲎试验的验证	未涉及	同上	至少 3 个标准内毒素浓度,平行 3 组,如果超过一个 log 范围,标准应在每个对数区间添加一个标准内毒素浓度,计算线性相关系数 $r \geq 0.980$	同上
干扰试验凝胶法	复核鲎试剂在样品存在条件下的灵敏度,平行 4 组,样品稀释不超过 MVD;试验还包括水中的标准对照系列,至少平行 2 组测试	复核鲎试剂在样品存在条件下的灵敏度,平行 4 组,样品稀释不超过 MVD;试验还包括水中的标准对照系列,至少平行 2 组测试	复核鲎试剂在样品存在条件下的灵敏度,平行 4 组,样品稀释不超过 MVD;试验还包括水中的标准对照系列,至少平行 2 组测试	复核鲎试剂在样品存在条件下的灵敏度,平行 4 组,样品稀释不超过 MVD;试验还包括水中的标准对照系列,至少平行 2 组测试
干扰试验终点法	未涉及	至少 3 个标准内毒素浓度,至少平行 2 组,计算线性相关系数 $ r \geq 0.980$,样品稀释 \leq MVD,样品中添加中点浓度内毒素,回收率在 50~200% 范围	稀释倍数 = 内毒素限值 (L)/标准曲线中点浓度 (λ_m),检查样品和添加内毒素的样品,回收率应在 75~125% 范围	至少 3 个标准内毒素浓度,至少平行 2 组,计算线性相关系数 $ r \geq 0.980$,样品稀释 \leq MVD,样品中添加中点浓度内毒素,回收率在 50~200% 范围
干扰试验动态法	未涉及	同上	稀释倍数 = 内毒素限值/标准曲线中点浓度,检查样品和添加内毒素的样品,回收率应在 50~200% 范围	同上

FDA 鲎试验指南 1987 年 FDA 动态鲎试验条例 1991 年	EP 增补本 1998 年 2.6.14	EP 增补本 1998 年 鲎试验指南 2.6.14	中国药典 2000 版 附录 XIE 附录 XIXF
凝胶、终点比色、终点比浊、 动态比色和动态比浊法	凝胶法限值试验和分析、动态比 浊和比色及终点比色法	凝胶法、动态比浊和比色及 终点比色法	凝胶法为基本方法,比浊比色 法也可以使用
经 CEBR 批准的 LAL	LAL 须经权威机构以 IU/ml 标示 灵敏度	LAL 或者其它鲎种(如中国 鲎)制备的鲎试剂	有 TAL 的批准文号, TAL 的管 理方法未知
RSE 或 CSE	内毒素 BRP, 以 WHO 的 IS 为基准 标准化建立 IU 效价	内毒素 BRP, 以 WHO 的 IS 为基准标准化建立 IU 效 价, CSE 效价应以 BRP 或 IS 标准化	内毒素国家标准品 981, 其效 价以 IS94/580 建立, 9000EU/ 瓶, 内毒素工作品由中检所制 备、标定 EU 效价和分发
无要求	样品 PH: 6.0 ~ 8.0 如果需要可以 使用 NaOH、HCl 或者缓冲液调节 PH 值	反应物的(样品 + 鲎试剂) PH: 6.0 ~ 7.5, 样品 PH 应不 小于 6.5	无要求
参考 UPS 的凝胶法, 比色法 和比浊法须建立标准曲线	检测 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的内毒素 平行 4 组, 结果应在标示值的 ± 2 倍范围内	除参照 EP 方法, 按鲎试剂 厂商提供的说明书指导同 样重要	检测 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的内 毒素平行 4 组, 结果应在标示值 的 ± 2 倍范围内
标准内毒素, 平行 4 组, 计 算线性相关系数 r 应 \geq 0.980	测试 4 个 BRP 稀释, 覆盖鲎试剂 厂商提供的有效范围, 包括 λ , 在 95% 的显著性下, 检验线性回归 曲线的线性与斜率	未涉及	3 个等比(2 ~ 10 倍)的标准内 毒素浓度, 平行 3 组, 包括 NC, NC 的内毒素小于最低的标准 浓度, 线性相关系数 $ r \geq$ 0.980
至少 3 个标准内毒素浓度, 至少平行 3 组, 计算线性相 关系数 $ r \geq 0.980$	至少 4 个 BRP 浓度平行 2 组测 试, 每个 \log 范围至少有一个浓度, 在 95% 的显著性下, 检验线性回 归曲线的线性与斜率	未涉及	同上
参考 USP 凝胶法, 至少试验 3 批供试品	鲎试剂在样品和水中的灵敏度都 在标示值的 2 倍范围, 平行 4 组, 样品稀释不大于 MVD, 可以使用 中和、透稀、超滤或者化学添加剂 来消除干扰	强调预试验的重要性, 没有 明确区分预试验和干扰试 验, 可以用超滤法消除干 扰因素, 干扰试验至少验证 3 批产品	比较鲎试剂在水中和样品中 的灵敏度, 各平行 4 组, 结果 都应在标示值的 ± 2 倍范围 内, 样品的稀释不大于 MVD
样品平行 2 组测试, 添加 4λ 内毒素, 回收率应在 75 ~ 125%, 至少测试 3 批供试品	试验包括样品、添加中点内毒素 的样品、内毒素标准系列, 样品稀 释不大于 MVD(ELC/λ_m), 回收率 应在 50 ~ 200% 之间	未涉及	样品稀释 $D = L \times C / \text{中点}$, 添 加内毒素的回收率在 50 ~ 200% 范围, 但未说明内毒素 的添加量
样品平行 2 组试验, 如果 $PFC < 1EU/ml$, 添加 0.1 ~ 0.5EU/ml, 如果 $PFC \geq 1EU/ml$, 添加 5EU/ml, 或者添加 4λ , 回收率应在 50 ~ 150%, 至少测试 3 批供试品	试验包括样品、添加中点浓度(λ_m 或 λ_m')内毒素的样品、内毒素标 准系列, 样品稀释不大于 MVD (ELC/λ_m 或 ELC/λ_m'), 回收率应 大于等于 50%	未涉及	同上

法规 项目	USP 24 <85> 生物试验方法 (2000年)	USP 24-NF 19 第二增补本 (2001年)	JP13 改正版 (1996年)	JP14 (2001年)
检测程序 凝胶法	样品中加入适量的 LAL, 试验包括标准内毒素系列从 2λ 到 0.5λ、阴性对照、样品检查和 PPC, 平行两组, 37℃ 保温 1 小时	LAL 与样品或内毒素等体积混合, 或将样品或内毒素直接加入试管或安瓿中, 保温适当时间 (通常 37℃、1h), 凝胶法限度检查包括 NC、PC、PPC 和样品检查, 平行 2 组, 凝胶法分析包括一个内毒素稀释系列和有效的样品稀释系列及其 2λPPC;	在 0.1ml 鲎试剂中加入 0.1ml 样品或内毒素, 37℃ 保温 60 + 2min, 在 MVD 下检查样品, 试验还包括阴性对照、2λ 阳性对照、2λPPC,	LAL 与样品或内毒素等体积混合, 或将样品或内毒素直接加入试管或安瓿中, 保温适当时间 (通常 37℃、1h), 凝胶法限度检查包括 NC、PC、PPC 和样品检查, 平行 2 组, 凝胶法分析包括一个内毒素稀释系列和有效的样品稀释系列及其 2λPPC;
检测程序 终点法 动态法	未涉未	3 个标准内毒素浓度, 至少平行 2 组, 根据所用鲎试剂的说明书进行试验 (体积比例、孵育时间、温度、pH 值等), 样品稀释 ≤ MVD, 添加内毒素的回收率范围为 50 ~ 200%	包括 NC, 标准对照系列, 在经验证的稀释下检测样品, 样品添加的内毒素浓度 = L × C/D	3 个标准内毒素浓度, 至少平行 2 组, 根据所用鲎试剂的说明书进行试验 (体积比例、孵育时间、温度、pH 值等), 样品稀释 ≤ MVD, 添加内毒素的回收率范围为 50 ~ 200%
结果判断 凝胶法	有效的试验: NC 必须阴性, 标准内毒素系列确认鲎试剂灵敏度, PPC 阳性; 样品阴性, 稀释不大于 MVD, 样品合格	1) NC 阴性, PPC 阳性, PC 阳性, 样品全部阴性合格; 2) 标准内毒素系列的反应终点在标示值 2 倍范围, NC 阴性, PPC 阳性, 计算样品内毒素应小于限值合格	有效的试验: NC 必须阴性, 标准内毒素系列确认鲎试剂灵敏度或 PC 阳性, PPC 阳性; 样品内毒素小于限值	1) NC 阴性, PPC 阳性, PC 阳性, 样品全部阴性合格; 2) 标准内毒素系列的反应终点在标示值 2 倍范围, NC 阴性, PPC 阳性, 计算样品内毒素应小于限值合格
结果判断 终点法 动态法	未涉及	标准曲线的 r ≥ 0.980, 添加内毒素的回收率在 50 ~ 200% 范围, NC 小于说明书中规定的限度, 样品内毒素经换算小于内毒素限值	NC 不含有显著的内毒素, 标准曲线的 r ≥ 0.980, 添加内毒素的回收率在 50 ~ 200% 范围, 样品内毒素含量小于添加的内毒素, 样品合格	标准曲线的 r ≥ 0.980, 添加内毒素的回收率在 50 ~ 200% 范围, NC 小于说明书中规定的限度, 样品内毒素经换算小于内毒素限值
复测	稀释小于 MVD 的阳性结果, 在 MVD 下复测	样品检测 1 支阴性、1 支阳性或稀释小于 MVD 的阳性结果, 在 MVD 下复测	仅当样品检查有一组阳性, 其它都阴性时, 可以复测一次	样品检测 1 支阴性、1 支阳性或稀释小于 MVD 的阳性结果, 在 MVD 下复测
医疗器械	USP-NF <161> $L = \frac{K \times N}{V}$ K 是每件医疗器械的内毒素限值, K = 20EU/件 N 是合并浸洗的医疗器械件数 V 是浸取液总体积	同左	未涉及	未涉及
放射性药品	L = 175EU/人	L = 175EU/人	未涉及	未涉及
除热原程序	温度 250℃ 或以上, 充足的时间	耐热用具可以干热除热原, 通常 250℃, 至少 30 分钟	通常 250℃, 至少 1 小时	耐热用具可以干热除热原, 通常 250℃, 至少 30 分钟
其他		LAL 除与内毒素反应还与 β-葡聚糖反应, 对于含 β-葡聚糖的样品可以使用无 β-葡聚糖反应的 LAL	塑料用具须检测干扰的影响	

FDA 鲎试验指南 1987 年 FDA 动态鲎试验条例 1991 年	EP 2.6.14 1998 年	EP 指南 2.6.14 1998 年	中国药典 2000 版 附录 76 附录 102
没有细节,参考 USP,试验包括 NC、标准对照或 PC,标准内毒素对照至少每天的第一次检查中使用	将样品加入到鲎试剂中,鲎试剂与样品的体积可灵活使用,37℃保温,时间通常在 20~60 分钟,样品稀释不超过 MVD,包括阴性对照,平行两组,限度试验还包括 2λ 阳性对照和 2λPPC,半定量分析包括一个内毒素稀释系列和有效的样品稀释系列及其 2λPPC;	无细节,但描述了内毒素限值及 MVD 的计算方法	样品稀释到 MVD,0.1mlTAL + 0.1ml 样品或内毒素,37 ± 1℃、60 ± 2 分钟,1 支 NC、1 支 PC、1 支 PPC、2 支样品
样品在有效的稀释下检查,样品及添加内毒素的样品用于干扰试验,可以使用 PC、存档曲线分析数据,PC 的回收率应在 75~125% 之间	在有效的稀释下检查样品和添加内毒素(λ _m 或 λ _{m'})的样品,动态法包括 3 个 log 范围,终点比色法包括最高和最低浓度	无细节,但描述了内毒素限值及 MVD 的计算方法	至少 3 个等比的内毒素浓度,样品稀释不大于 MVD,平行 2 组,样品体积、试剂样品比例、保温时间等参考鲎试剂和仪器的说明书
有效的试验:NC 必须阴性,标准内毒素系列确认鲎试剂灵敏度,PPC 阳性;样品阴性,稀释不大于 MVD,样品合格	有效的试验:NC 必须阴性,PPC 阳性;A)限值试验:PC 阳性,样品阴性,样品合格 B)分析:标准内毒素系列确认鲎试剂灵敏度,样品内毒素含量的几何平均值小于 L,样品合格	无细节,只阐述了 PC、PPC、NC 的目的;若稀释小于 MVD,样品阳性则在 MVD 下复测	NC 的内毒素小于最低的标准浓度,标准曲线的线性相关系数 r ≥ 0.980,回收率在 50~200% 范围
NC 不含有显著的内毒素,标准曲线的 r ≥ 0.980,或者 PC 的加收率在 75~125%,添加内毒素的回收率在 50~150% 范围,样品内毒素含量小于内毒素限值,样品合格	NC 的内毒素不大于初始验证的值,标准曲线的参数与初始验证值无显著差异,添加内毒素的回收率在 50~200% 范围,样品的所有平行试验值均小于 λ _m (或 λ _{m'})	无细节	PC、PPC 全部为阳性,NC 为阴性,样品全部为阴性,样品合格
提供两个复测,一个确定样品是否合格,另一个确定样品在合并过程中有无污染	只有一次复测,在样品检查一个合格而另一个不合格时	1)由于样品制备、稀释、人为污染导致的阳性,2)样品稀释小于 MVD,在 MVD 下复测	样品 1 阴 1 阳,样品平行 4 组复测,全部阴性为合格
37℃、15min 或者室温 1h,40ml 水润洗,润洗液内毒素限值为 0.5EU/ml,可以调整润洗液的体积,但限值也要相应调整,终产品的检查须经干扰试验验证,	未涉及	内毒素限值 ELC 由 K、M 决定;样品的处理见各品种项	未涉及
未涉及	未涉及	K = 2.5EU/kg/h	K = 2.5EU/kg/h
未涉及	未涉及	未涉及	通常 250℃,至少 1 小时
进行法定检测的实验室须经有效的评价验证,但没有说明如何作	试验用具需要经过测试证明对内毒素无干扰或吸附	品种项中的热原试验以鲎试验取代时应进行验证,并且经权威机构的同意,如果产品可提供热原反应的批次应使用这些批次作鲎试验比较;应注意内毒素与容器吸附的问题	细菌内毒素检查用水为内毒素小于 0.03EU/ml 的灭菌注射用水

常用大输液细菌内毒素检查假阳性问题的探讨

湛江安度斯生物有限公司 研究与发展部

1. 前言

某医院制剂室反映,使用了A、B及C三个厂家生产的鲎试剂对该制剂室生产的5%、10%葡萄糖注射液及0.9%氯化钠注射液作细菌内毒素检查(BET),结果相差甚远,见下表1。

表 1:

用不同厂家鲎试剂作 BET 结果比较

品 名	批 号	细菌内毒素检查结果		
		A	B	C
5%葡萄糖注射液	2000919	++	--	--
5%葡萄糖注射液	20001130	++	--	--
5%葡萄糖注射液	20001219	++	--	--
5%葡萄糖注射液	2001228	--	--	--
0.9%氯化钠注射液	2000927	++	--	--
0.9%氯化钠注射液	20001018	++	--	--
0.9%氯化钠注射液	20001220	++	--	--
0.9%氯化钠注射液	20010103	--	--	--
10%葡萄糖注射液	20001115	--	--	--

该制剂室还反映另一现象:同一天生产的大输液,使用的原料相同,生产工艺条件相同,5%葡萄糖注射液的BET结果不合格,10%葡萄糖注射液的BET结果却合格。该制剂室提供了表1所列批号的样品,请求笔者协助分析原因。

笔者根据经验,认为该制剂室反映的情况可归纳为两个问题:1)鲎试剂非内毒素反应物对BET的干扰;2)鲎试剂的特异性差异。笔者使用凝胶法及动态浊度法两种BET方法,用实验论证常用大输液BET假阳性问题的存在及解决方法。

2. 实验材料

2.1 样品:见表1

2.2 鲎试剂 (TAL): 湛江安度斯生物有限公司, 批号 000414, 0.5ml, $\lambda = 0.5 \text{ Eu/ml}$ 。此批试剂是专为研究而制备的非特异性的鲎试剂, 即此试剂既能与内毒素反应, 也能与 β -葡聚糖反应。

2.3 内毒素标准品: 内毒素国家标准品, 批号 981, 9000Eu/支, 中国药品生物制品检定所制备。

2.4 (1-3)- β -D-葡聚糖标准品: 美国 Endosafe 公司提供, 批号 L84562

2.5 β -葡聚糖阻断剂 (BL): 湛江安度斯生物有限公司制备

2.6 细菌内毒素检查用水 (BET 水): 湛江安度斯生物有限公司, 批号 0012220, 5ml

2.7 细菌内毒素定量检测仪: 湛江正杰科学仪器有限公司, 型号 EDS-99

3. 实验方法及结果

3.1 在表 1 各批号样品中, 取 A 厂家试剂检查结果为阳性及阴性的 5% 葡萄糖注射液及 0.9% 氯化钠注射液各一瓶, 用鲎试剂对上述样品作凝胶法 BET, 反应在细菌内毒素定量检测仪上进行, 同时观察动态浊度反应曲线, 结果见表 2 及表 3。(注: EDS-99 型细菌内毒素定量检测仪可在作动态浊度法定量检查的同时得到凝胶法检查结果, 也可在作凝胶法检查时观察动态浊度反应曲线。)

表 2. 0.9%氯化钠注射液 BET 结果

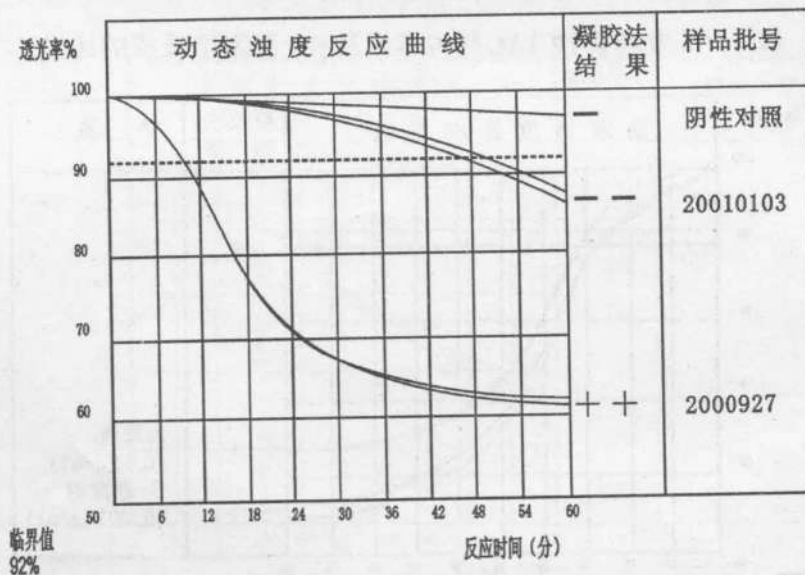
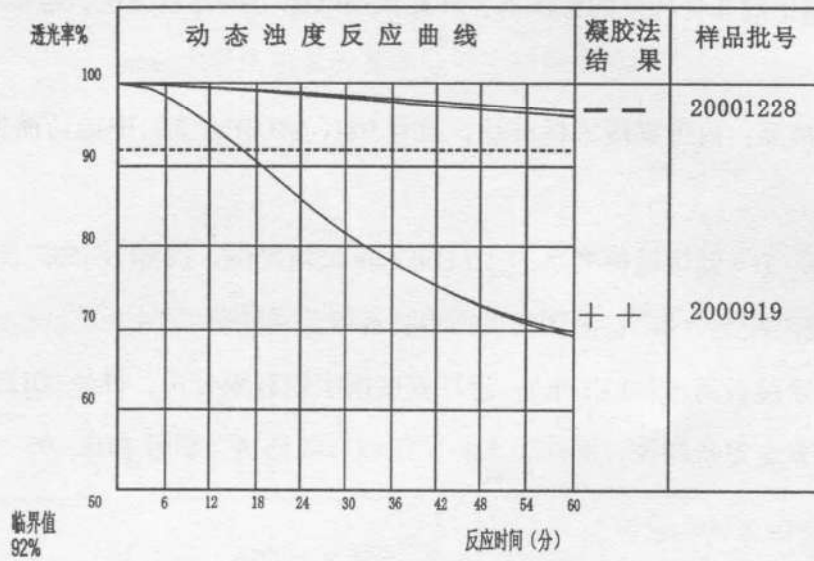


表 3. 5%葡萄糖注射液 BET 结果



从表 2 及表 3 可看出, 使用非特异性的鲎试剂检查大输液, 反应结果与表 1 中 A 厂家试剂的检查结果相同。动态浊度反应曲线直观地显示出反应的趋势与程度。

3.2 取内毒素国家标准品一支, 用 BET 水稀释至 0.5Eu/ml 浓度备用。取 (1-3)- β -D-葡聚糖标准品一瓶, 用 BET 水稀释至 0.001mg/ml 浓度备用。用 BET 水及 β -葡聚糖阻断剂 (BL) 各复溶数支鲎试剂, 然后分别与上述稀释好的内毒素标准液及 β -葡聚糖标准液反应。反应在 EDS-99 型细菌内毒素定量检测仪上进行, 反应结果见表 4 及表 5。

表 4. 非特异性 TAL 与内毒素及 β -葡聚糖反应的比较

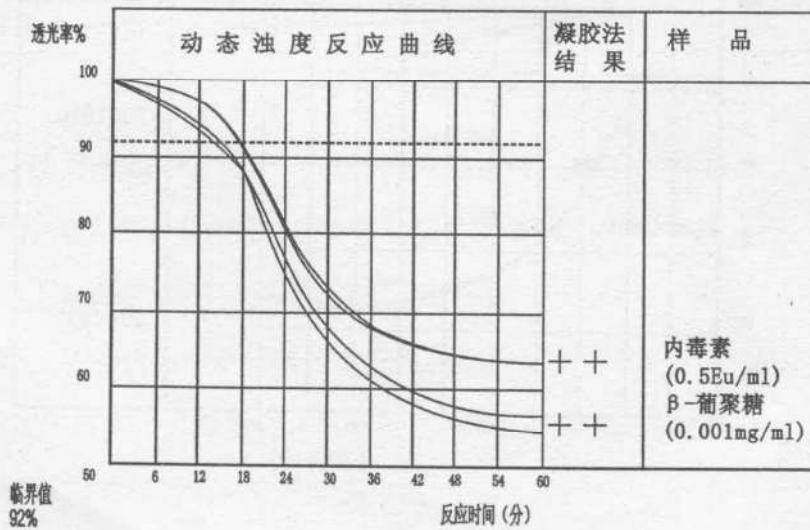
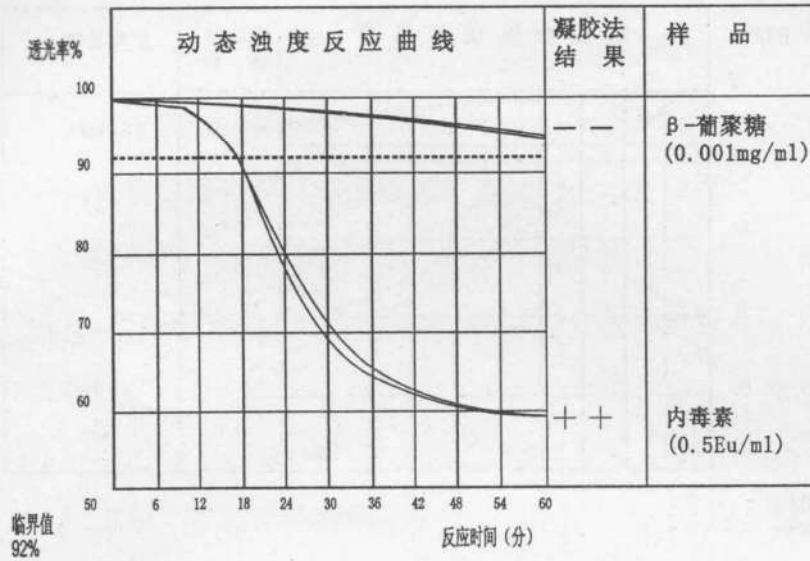


表 5. 含 BL 的 TAL 与内毒素及 β -葡聚糖反应的比较



通常称非内毒素反应物与 TAL 反应的阳性结果为 BET 的假阳性。显然，表 4 中 TAL 与 β -葡聚糖反应的阳性结果属 BET 的假阳性。表 5 结果表明，BL 对 TAL 与内毒素的反应无影响，且能有效地阻断 TAL 与 β -葡聚糖的反应，消除 BET 的假阳性。

3.3 用 BET 水及 β -葡聚糖阻断剂 (BL) 各复溶数支鲎试剂，然后分别与批号 2000927 的 0.9% 氯化钠注射液及批号 2000919 的 5% 葡萄糖注射液反应，结果见表 6 及表 7。

表 6. BL 对 0.9% 氯化钠注射液 BET 的影响

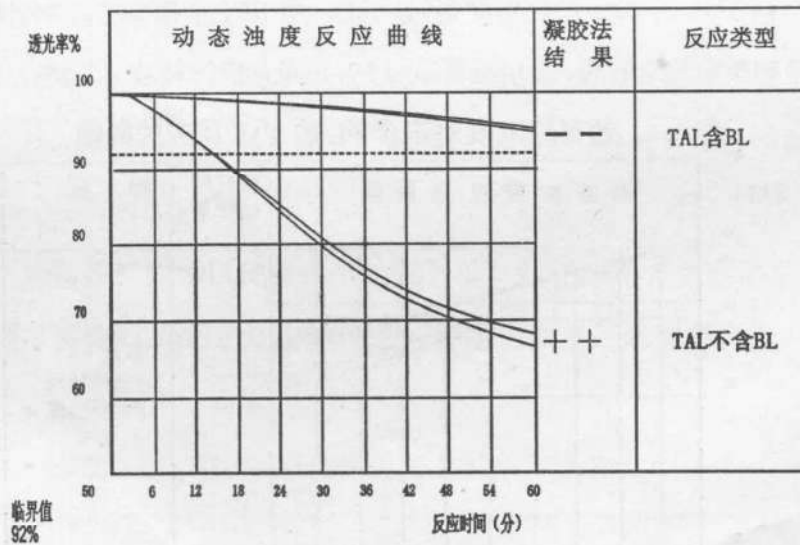
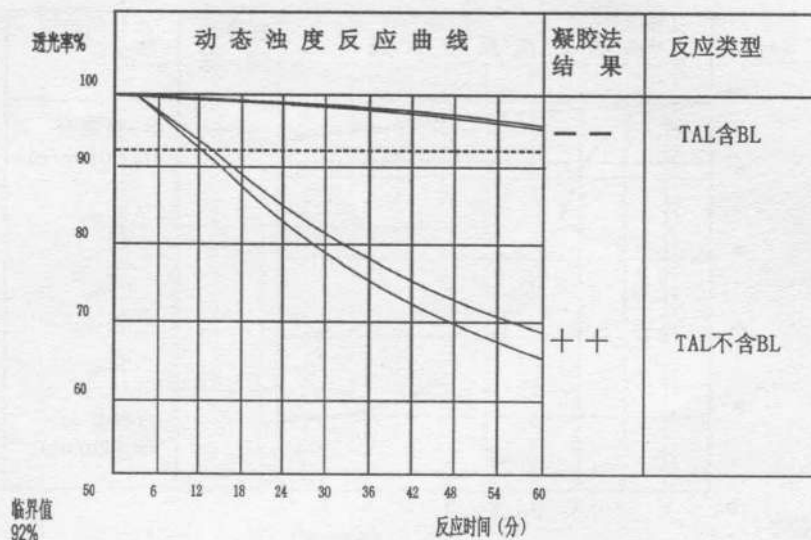


表 7. BL 对 5% 葡萄糖注射液 BET 的影响

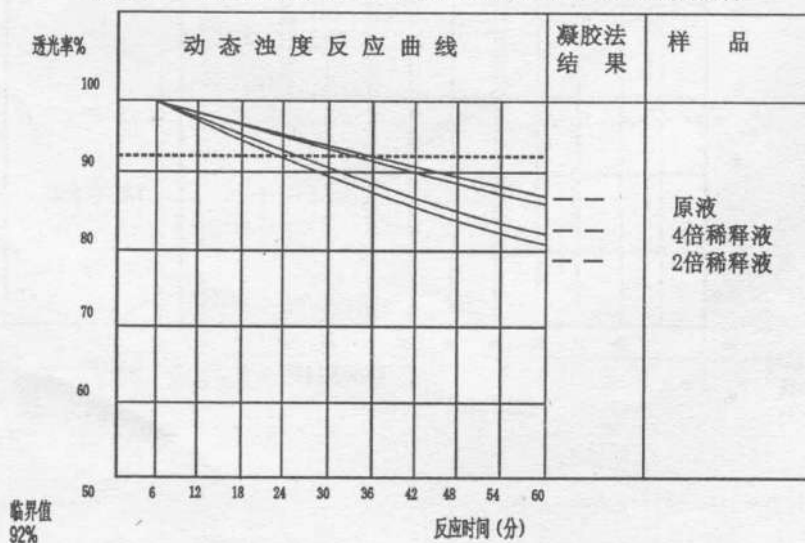


从表 6 及表 7 中看到, 对于同一样品, 用不含 BL 的 TAL 检查, 结果为阳性 (+), 用含 BL 的 TAL 检查, 结果为阴性 (-)。根据表 4 及表 5 的实验结果, 我们可以判断表 6 及表 7 的阳性结果不是由内毒素导致的阳性, 属 BET 假阳性。

3.4 用 β -葡聚糖阻断剂 (BL) 复溶鲎试剂, 然后对表 1 中 A 厂家试剂检查为阳性的其余四批样品 (20001130、20001219、20001018 及 20001220) 作 BET, 结果均为阴性 (-)。这表明表 1 中的阳性结果均为 BET 假阳性。

3.5 取批号为 20001115 的 10% 葡萄糖注射液一瓶, 用 BET 水作 2 倍及 4 倍稀释, 然后用不含 BL 的鲎试剂分别与 10% 葡萄糖原液、2 倍稀释液 (5%) 及 4 倍稀释液 (2.5%) 反应, 结果见表 8。

表 8. 葡萄糖浓度对不含 BL 的 TAL 反应的影响



4. 讨论

4.1 研究已证实^[1], 鲎试剂与内毒素反应并非特异性的, 因为鲎试剂的凝集系统中存在着 G 因子反应旁路, 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。研究已证实^[2] 这些非内毒素物质是 (1-3)- β -D-葡聚糖和(1-4)- β -D-葡聚糖, 它们来自于真菌细胞壁以及某些中空纤维的滤器及滤料。虽然迄今为止的研究未表明这类 β -葡聚糖对人体有害^[3], 但受到它们污染的药品, 常常在细菌内毒素检查 (BET) 时出现假阳性结果, 易被误判为不合格。研究表明^[4], 存在内毒素与 β -葡聚糖共同作用时, 鲎试剂的凝集反应比对单一物质作用更迅速及更剧烈。这往往使得一些药品虽然内毒素含量并不超过规定的限值, 但受到 β -葡聚糖的轻微污染, BET 也呈阳性。

要避免 β -葡聚糖对 BET 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。不同厂家的鲎试剂, 其特异性各不相同, 有时甚至相差甚远, 如表 1 所示。因此, 当检验人员发现 BET 阳性时, 应在排除 β -葡聚糖干扰后才慎下结论, 以免误判。

4.2 用于医学检验的生物试剂, 一般都有特异性要求。鲎试剂作为 BET 使用的重要的生物检测试剂, 其质量标准却未涉及试剂的特异性。也就是说, 厂家生产的鲎试剂, 只要符合质量标准的各项指标, 不管其特异性如何, 就可用于药品的 BET。此外, 现行药典的细菌内毒素检查法, 也未涉及有关假阳性及特异性问题。笔者认为, 这些法规上的缺陷, 已经造成而且还会继续引发 BET 上的一些混乱。例如本文所提制剂室反映的问题, 往往使得检验人员难以判断大输液的 BET 项是否合格, 感到无“法”可依。

此外, 一个地区药检机构使用何种鲎试剂检查药品, 往往对本地区药品的 BET 项合格率也大有影响。以中国药品生物制品检定所发布的 2000 年第四季度药品质量公报为例, 笔者对公布的数字作了如下统计, 见表 9。

表 9. BET 项不合格输液占不合格输液的比例

省份 (代号)	1	2	3	4
比例 (%)	0	2	32.4	50

根据表 9, 我们会提出疑问:

1) 上述各省的 BET 项不合格输液真的有那么大差异吗? 据笔者了解, 上述各省的药检机构作 BET 项检查使用的是不同厂家的鲎试剂, 这些试剂的特异性差异可能是导致输液 BET 检查项不合格率差异大的主要原因。

2) BET 项不合格输液真的会占如此高比例吗? 笔者对部分 BET 项不合格输液生产企业作过调查, 所反映的情况值得思考: (1) 检品抽样是在该批输液的使用过程抽样, 直至整批不合格输液使用完毕, 临床上并未发现有任何不良反应; (2) 用热原检查法检查 BET 不合格输液, 免温升甚微, 甚至不升温; (3) 这些企业所使用的鲎试剂与该省药检机构抽检所使用的鲎试剂是不同厂家试剂, 被抽检样品用企业使用的鲎试剂检查合格, 用药检机构使用的鲎试剂检查不合格。

美国药典在最新修订的细菌内毒素检查法中^[5], 对鲎试剂作了注释: “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。

4.3 样品的浓度对鲎试剂与内毒素的反应有影响, 在较高浓度时通常表现为抑制反应。同样地, 这种干扰对鲎试剂与 β -葡聚糖的反应也存在。表 8 的结果显示, 10% 葡聚糖 (原液) 的动态浊度反应曲线在 2 倍稀释液 (5%) 及 4 倍稀释液 (2.5%) 反应曲线的上方, 表明高糖介质也不利于鲎试剂与 β -葡聚糖的反应, 这解释了在输液生产中有时 5% 葡萄糖注射液 BET 不合格, 10% 葡萄糖注射液反而合格的现象。

[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] Pearson FC, Bohon J, et al, Characterization of *Limulus* Amoebocyte Lysate - reactive material from Hollow - Fiber Dialyzer, Applied Environmental Microbiology 48: 1189 - 1196 1984.

[3] 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).

[4] Roslansky PF, Novisky. T, Sensitivity of *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) to LAL - reactive glucans, J Clin. Micro, 29: 2477 - 2481, 1991.

[5] USP XX IV, Secondary Supplement NF - 19, 2001.

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)

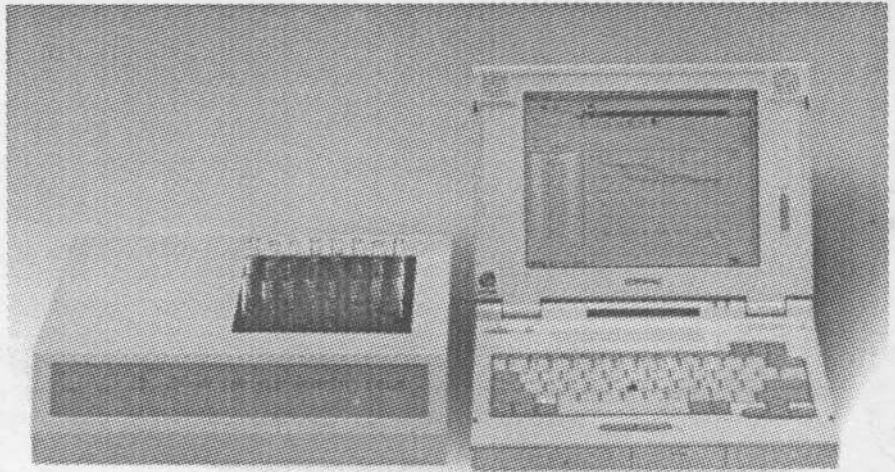
0759-3391071、3391072、3380672 转 8989、8899

开户行: 中国银行湛江分行霞海支行

帐号: 825201410800

EDS99 细菌内毒素测定系统

EDS99 细菌内毒素测定系统是由湛江安度斯生物有限公司与北京金山川科技发展有限公司联合研制开发的新一代内毒素定量测定系统，是融合现代光电技术、计算机技术及生物技术的产物。该系统已于 2000 年通过了广东省科委组织的科技成果鉴定，并获得国家重点新产品证书和湛江市科技成果进步奖。



EDS99 实现了“一机三法”，即同一台仪器可用于内毒素的动态比色、动态比浊和凝胶法测定，而且在做动态比浊测定的同时还可以得到凝胶法测定的结果；可直接测定的内毒范围为 100 ~ 0.001EU/ml，检测极限达 0.001EU/ml，比传统凝胶法至少灵敏十倍，检测时间可缩短 20 ~ 30 分钟。测试比较表明，EDS99 的各项技术性能已达到或超过国内外同类仪器的水平，其比色法测定性能已达到美国 Bio-Tek 的 Elx-808 测定仪的性能，比浊测定的性能已超过日本的 Toxinometer ET-201 测定仪。经广东省医疗器械产品质量监督检验中心检测，全部性能指标均达到设计要求，并符合中国药典 2000 年版对细菌内毒素定量检查的法规要求。

EDS99 细菌内毒素测定系统已由湛江正杰科学仪器有限公司（湛江安度斯公司与北京金山川公司合资建立）正式批量生产并投放市场，经过中国药品生物制品检定所等单位的使用表明：该系统设计合理，操作方便，具有定量、快速、灵敏、准确以及范围广泛等特点。

湛江安度斯公司为 EDS99 内毒素测定系统提供质量稳定、性能优越的试剂支持，同时对细菌内毒素定量检查法的建立提供技术咨询和服务。

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) 3391071、3391072 转
网址：<http://www.zacb.com> 电子信箱：Email: ZACB@pub.zhanjiang.gd.cn
