

细菌内毒素 检查法及其应用

化学工业出版社

细菌内毒素检查法及其应用

王思理 胡冠时 贡立青 主编

气象出版社

内 容 简 介

本书是按照中国药典《细菌内毒素检查法》的要求,作者在近 10 年对《细菌内毒素检查法及其应用》分析、研究的基础上而编著的。主要内容包括:细菌内毒素检查法的进展、最新国际统一的细菌内毒素检查法、我国细菌内毒素检查法指导原则的确立、细菌内毒素检查法系统工程标准化、细菌内毒素标准物质、鲎和鲎试剂、凝胶法的进一步研究、各种样品干扰试验的研究、定量法,重点是动态浊度法的研究建立和发展以及各种类型样品细菌内毒素的测定,并对氨基酸和放射性药品的细菌内毒素检查法进行了专门的论述。

本书可供药检、制药、新药申报、临床、GMP 认证等相关行业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细菌内毒素检查法及其应用/王思理等主编.-北京市:
气象出版社,2002.11
ISBN 7-5029-3488-X

I. 细… II. 王… III. ①细菌毒素:内毒素-医学检验②细菌毒素:内毒素-临床应用 IV. R966.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 087376 号

Xijun Neidusu Jiancha Fa ji Qi Yingyong 细菌内毒素检查法及其应用

王思理 胡冠时 贡立青 主编

责任编辑:王桂梅 终审:汪勤模

封面设计:Logo 创作室 责任技编:陈红 责任校对:陈亮

* * *
气象出版社出版

(北京市海淀区中关村南大街 46 号 邮编:100081)

北京市兴怀印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行 全国各地新华书店经销

* * *

开本:787×1092 1/16 印张:18.5 字数:473 千字

2003 年 1 月第一版 2003 年 1 月第一次印刷

印数:1~3000 定价:68.00 元

ISBN 7-5029-3488-X/R • 0053

序

中国药典 2000 年版已经正式出版,细菌内毒素检查法应用指导原则及附件细菌内毒素定量检测法(动态浊度法和显色基质法),经过国家药典委员会有关专业委员会专家们的多次反复讨论后被列入新版药典。本版药典使用细菌内毒素的品种虽已达 69 种,但应该说细菌内毒素定量法在国内尚属起步阶段。为在我国大力推广普及定量检测法,提高细菌内毒素检测水平(从凝胶法发展到定量法),扩大检测品种,尽快与国际接轨,长期重视此项检测工作的作者,结合个人在国内外试验研究的实践,特编纂了关于《细菌内毒素检查法及其应用》的专门书籍。它的问世,将会有力地推动促进新版药典内毒素定量检测法在中国的普及、应用和发展,能对国内药检相关行业开展细菌内毒素检测工作有所帮助,并希望对我国制药、医学、微生物学、水、食品及临床检验等领域开展此项应用也有所借鉴。

王志清

2002 年 8 月

《细菌内毒素检查法及其应用》编委会

主 编 王思理 胡冠时 贡立青

副主编 赵岚峰 莫水晶 宇佐美洲治 赵海山

编委(按姓氏笔画为序)

王 平	王 信	王 玮	王思理	李 军
贡立青	宇佐美洲治		余方键	周金瑞
钟 山	张庚伦	张筱红	张秀萍	张国来
胡冠时	赵岚峰	赵海山	莫水晶	袁 璐
隋丽亚	蔡 彤	董光宴	魏纪鲁	

前 言

自作者了解中国药典中的《细菌内毒素检查法》起,就对该项法规给予高度的重视。因为它清晰地显示出自己鲜明的特点:其一,有重要的社会效益;其二,有很好的经济效益;其三,有很多研究工作急需去做,最明显的是大量的新品种细菌内毒素检查法急需建立;其四,该检查法可以说是全方位的,包括细菌内毒素检查法的修订、凝胶法的进一步完善、凝胶法标准操作规范的制定、凝胶鲎试剂质量的提高和质量标准的修订、凝胶鲎试剂的批批国家检定、细菌内毒素检查用水的研制和统一、细菌内毒素国家标准品的研制、细菌内毒素工作标准品的研制和统一、定量法的建立和合法化、定量鲎试剂的研制及质量标准 and 标准操作规范的制定、显色基质试剂的研制及质量标准 and 标准操作规范的制定、定量检测仪(动态浊度仪)性能的提高和完善、新品种细菌内毒素检查法的研究和建立、新品种建立中细菌内毒素限值的确定、如何将原来的热原检查法转换成细菌内毒素检查法、两法转换中是否要做对比试验、细菌内毒素检查法如何同国际接轨、如何建立血液中的细菌内毒素检测法以及鲎资源的保护等,内容十分丰富。

在对该项工作有较深刻理解的基础上,作者通过近 10 年来的努力,做了不少工作,并取得了瞩目的进展和成绩,主要归纳为:①明确了细菌内毒素限值的确定,不再沿用热原剂量;②细菌内毒素检查法指导原则列入了 2000 年版中国药典;③细菌内毒素检查法定量法(浊度法和显色基质法)被列入指导原则,成为法定的检测方法,并在全国获得迅速的推广和应用;④定量检测仪(BET 系列检测仪)自 1993 年通过鉴定后,10 年中仪器设计原理、软件和硬件都获得重大进展,使该仪器已达到国际先进水平;⑤热原检查法转换为细菌内毒素检查法时,不必再做两法的对比试验;⑥细菌内毒素标准物质国家标准品 981 经全国近 5 年的使用考核获得了良好的社会效益;⑦细菌内毒素标准物质工作标准品在指导原则中作了统一的规定,“试验中所用细菌内毒素标准物质应使用由中国药品生物制品检定所研制、标定和分发的细菌内毒素国家标准品和工作标准品”。⑧鲎试剂活性定向生产工艺及特异性鲎试剂的研制成功;⑨对血液等体液样品中内毒素测定进行了探讨,并首次出版本检查法著作。

虽然,近 10 年来细菌内毒素检查法在同行共同努力下获得了可喜的进展,但同国际先进水平相比,差距仍十分明显,主要有以下几方面:其一,新品种的建立至今被列入中国药典 2002 年版的只有 69 种,同先进国家美国相比还存在 10 倍的差距;其二,鲎试剂质量标准《中华人民共和国卫生部 WS₁-364(B-123)-91》,1991 年制定,已 10 多年,早已比较落后。这些年中虽然多次讨论反复修订,但修订后的质量标准至今未获得批准。因此,若用修订的质量标准来检定目前正在使用

的鲎试剂就会有相当一部分产品不合格；其三，细菌内毒素工作标准品是最常用的标准物质，虽然在指导原则中已作了明确的统一规定，但至今还远远没有统一；其四，鲎资源的保护，由于在我国鲎资源破坏尤为严重，而且人们吃鲎的不文明行为还在继续蔓延，我国鲎资源何时能得到有效保护尚需今后极大的努力。由于“鲎”对人们还非常陌生，鲎在地球上“活化石”至今远未被人们所认识，而更深层次的目的是为唤起人们对我国鲎资源的自觉保护。因此，作者在对我国的鲎资源作初步考察的基础上，特撰写了“鲎与鲎资源的保护”。我们衷心地希望我国的鲎资源能尽快得到有效地保护！

本书特设了附录，将与本书有关的部分优秀论文和译文选奉献给读者。

应该指出，《细菌内毒素检查法及其应用》一书似乎很简单，但深入研究后就会让我们感到它是一个相当复杂的大课题。就其鲎试剂而言，它已经经历了一代人的努力，同行中著名的专家刘端华主任药师和厦门鲎试剂厂吴伟洪厂长就是典型的代表，他们把大部分的精力都放在鲎试剂事业上，在我国鲎试剂事业中做出了很大的贡献，获得了国家突出贡献奖和其它荣誉等。然而，至今我国的鲎试剂质量不容乐观，价格同国外也有 10 倍之差，定量鲎试剂尚未获得批准文号，鲎试剂更深层次地研究工作也有待去完成。同样，本书涉及诸多课题，但由于我们的水平有限，书中不足之处在所难免，敬请读者批评指正。

作者要向这些年来从事细菌内毒素检查工作的同行们和中国药品生物制品检定所放射性药品室的同事们表示衷心感谢！对周海钧和唐元泰所长、国家药典会朱济广和王志清秘书长等原领导对我们的工作给予的指导、帮助和关心表示衷心地感谢！

作者

2002 年于北京

目 录

序

前言

1	细菌内毒素检查法	(1)
1.1	中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法	(1)
1.2	中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法增修订的主要内容	(2)
1.3	执行中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法的基本要求	(4)
1.4	中国药典 2000 年版与美国药典 24 版第二增补本、日本药典(十四 改正药局方)细菌内毒素检查法的比较	(12)
1.5	国际细菌内毒素检查法发展的新特点(统一的 BET)	(18)
2	细菌内毒素检查法应用指导原则	(22)
2.1	细菌内毒素检查法应用指导原则	(22)
2.2	中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法应用指导原则的指导意义	(24)
2.3	做好细菌内毒素定量测定法(浊度法和显色基质法)的注意事项	(28)
3	细菌内毒素标准物质	(34)
3.1	细菌内毒素的基本概念	(34)
3.2	细菌内毒素标准物质技术规范	(38)
3.3	细菌内毒素国家标准品 981 的研制	(39)
3.4	细菌内毒素国家标准品和工作标准品使用说明	(42)
3.5	第六批细菌内毒素国家标准品 981 稳定性考察	(43)
3.6	细菌内毒素标准试剂盒	(46)
4	鲎试剂	(50)
4.1	概述	(50)
4.2	鲎试剂生产工艺	(56)
4.3	鲎试剂质量标准	(56)
4.4	目前执行的鲎试剂部颁标准	(59)
4.5	鲎试剂活性定向生产工艺及特异性鲎试剂的研制	(63)
5	细菌内毒素检查法之凝胶法	(67)
5.1	凝胶法试验及操作	(67)
5.2	细菌内毒素检查法标准操作规范	(72)
6	细菌内毒素检查法之定量法	(81)

6.1	细菌内毒素定量法分类	(81)
6.2	动态浊度法的应用	(82)
6.3	实验指南	(87)
6.4	供试品干扰试验	(88)
7	细菌内毒素定量测定仪器	(99)
7.1	细菌内毒素定量测定仪的开发情况	(99)
7.2	鲎试验反应动力学及内毒素测定仪器设计原理	(102)
7.3	Easy BET 细菌内毒素检测软件使用指南	(114)
7.4	细菌内毒素定量检测操作指南	(133)
7.5	定量法试验中常见问题	(146)
8	各种类型样品的细菌内毒素测定方法	(150)
8.1	甘露醇等高浓度、高粘度样品的测定及回收率曲线	(150)
8.2	庆大霉素等抗生素的测定	(151)
8.3	人血白蛋白等蛋白高分子样品的测定	(153)
8.4	肝素钠等粘多糖类样品的测定	(154)
8.5	维生素 C 等常与大输液配伍注射样品的测定	(154)
8.6	血液等体液样品中内毒素的测定	(157)
8.7	样品测定实例	(159)
9	氨基酸中细菌内毒素测定法	(169)
9.1	氨基酸的细菌内毒素检查	(169)
9.2	比浊法(光学法)	(170)
9.3	凝胶法	(172)
9.4	参考数据	(176)
9.5	氨基酸细菌内毒素检查验证	(177)
10	放射性药品的细菌内毒素测定法	(179)
10.1	放射性药品及其特殊性	(179)
10.2	放射性药品细菌内毒素限值的确定与表示方式	(179)
10.3	中国药典放射性药品细菌内毒素检查法的品种及与 USP 对比	(181)
10.4	细菌内毒素检查法在放射性药品 GMP 中的应用	(185)
11	细菌内毒素检查法系统工程的标准化	(188)
11.1	国际先进水平和鲎试验在我国发展概况	(188)
11.2	鲎试剂的标准化	(190)
11.3	细菌内毒素检查法	(190)
11.4	细菌内毒素国家标准品	(192)

11.5	细菌内毒素工作标准品	(193)
11.6	细菌内毒素检查用水	(194)
11.7	鲎试剂国家对照品	(194)
11.8	细菌内毒素检查法准则	(195)
11.9	细菌内毒素标准试剂盒	(195)
11.10	小结	(196)
12	细菌内毒素检查法在我国的进展	(197)
12.1	洛阳会议	(197)
12.2	中检所组织研制发放鲎试剂国家对照品	(197)
12.3	举办不同类型的培训班	(199)
12.4	中检所再次被邀参加国际标准品协作标定	(199)
12.5	中检所研制发放细菌内毒素检查用水	(200)
12.6	中检所发文统一发放细菌内毒素工作标准品	(201)
12.7	湛江会议	(204)
12.8	中检所研制发放细菌内毒素检查标准试剂盒	(204)
12.9	将细菌内毒素检查法的修订作为重点工作	(206)
12.10	中检所、天津所、北京所和上海所等开展的八项科研课题	(206)
12.11	宁波会议	(207)
12.12	细菌内毒素定量测定法的研究与发展	(207)
12.13	鲎试验法论文汇编及期刊	(208)
12.14	中检所研制发放第六批细菌内毒素国家标准品——981	(208)
12.15	赴美专题考察	(209)
12.16	对我国鲎资源保护进行首次考察	(211)
12.17	北戴河会议	(211)
12.18	厦门会议	(211)
12.19	中检所举办第一届提高班	(212)
12.20	中检所举办第一届全国《细菌内毒素检查法》定量法培训班 ...	(212)
12.21	细菌内毒素检查法应用指导原则列入中国药典 2000 年版二部	(212)
12.22	中检所组织召开第二届全国细菌内毒素检查法研究与应用学术会议	(212)
12.23	国家药典委员会举办全国细菌内毒素检查法定量培训班三届	(213)
13	鲎与鲎资源的保护	(214)
13.1	鲎	(214)

13.2	鲎的种属主要地理分布	(214)
13.3	鲎(东方鲎)的形态	(214)
13.4	鲎的雌雄区别	(216)
13.5	鲎(东方鲎)的生活习性与生态	(216)
13.6	我国鲎资源与被破坏的严重情况	(216)
13.7	鲎资源的保护	(217)
附录(细菌内毒素检查法论文选)		(219)
关于如何在我国将热原检查法改为细菌内毒素检查法的几点建议 ...		(219)
论药品生物制品细菌内毒素检查限值的确定		(221)
再论细菌内毒素限值的确定		(226)
试论鲎试剂“批批国家”检定		(229)
头孢吡肟原料及头孢吡肟/L——精氨酸细菌内毒素检查方法的研究		(232)
注射用托拉塞米细菌内毒素检测方法的研究		(234)
黄杨宁注射液细菌内毒素检测方法的研究		(237)
左旋卡尼汀氯化钠注射液细菌内毒素检查法的研究		(239)
注射用左亚叶酸钙细菌内毒素检查法的研究		(241)
羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠注射液细菌内毒素检查法的研究		(242)
血液中的细菌内毒素定量分析		(244)
美国药典 24 版细菌内毒素检查法		(245)
美国药典 24 版第二增补本细菌内毒素检查法		(248)
日本药典(十四改正药局方)细菌内毒素检查法		(253)
美国药典 25 版等规定细菌内毒素检查项的药品品种		(259)
参考文献		(283)

1 细菌内毒素检查法

1.1 中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法

本法系利用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应的机理,以判断供试品中细菌内毒素的限量是否符合规定的一种方法。内毒素的量用内毒素单位(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系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系指与灵敏度为 0.03EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂在 37℃±1℃ 条件下 24 小时不产生凝集反应的灭菌注射用水。

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

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

根据鲎试剂灵敏度的标示值(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 2.0 λ , 1.0 λ , 0.5 λ 和 0.25 λ 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,按检查法项下试验,每一浓度平行做 4 支,同时用细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照管,如最大浓度 2.0 λ 管均为阳性,最低浓度 0.25 λ 管均为阴性,阴性对照管均为阴性,按下式计算反应终点浓度的几何平均值,即为鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)。

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

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

当 λ_c 在 0.5 λ ~2.0 λ (包括 0.5 λ 和 2.0 λ)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。每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。

供试品干扰试验 按鲎试剂灵敏度复核试验项下,用细菌内毒素检查用水和未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数(MVD)的稀释液分别将同一支(瓶)细菌内毒素工作标准品制成含细菌内毒素工作标准品 2.0 λ , 1.0 λ , 0.5 λ 和 0.25 λ 四种浓度的内毒素溶液。用细菌内毒素检查用水和用供试品溶液或其稀释液制成的每一浓度平行做 4 支,另取细菌内毒素检查用水和供试品溶液或其稀释液各做 2 支阴性对照管。如最大浓度 2.0 λ 管均为阳

性,最低浓度0.25λ管均为阴性,阴性对照管均为阴性时,按下式计算用细菌内毒素检查用水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值(E_s)和用供试品溶液或其稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值(E_t)。

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

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

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

当 E_s 在 0.5λ~2.0λ(包括 0.5λ 和 2.0λ)时,且当 E_t 在 0.5 E_s 和 2.0 E_s (包括 0.5 E_s 和 2.0 E_s)时,则认为供试品在该浓度下不干扰试验,否则使用更灵敏的鲎试剂对供试品进行更大倍数稀释或采用其它适合排除干扰作用的方法。当鲎试剂、供试品的来源、供试品的配方或生产工艺有变化时,须重新进行干扰试验。

供试品的最大有效稀释倍数(MVD)按下式计算:

$$MVD = CL/\lambda$$

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。

检查法 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 5 支,其中 2 支加入 0.1ml 按最大有效稀释倍数稀释的供试品溶液作为供试品管,1 支加入 0.1ml 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品制成的 2.0λ 浓度的内毒素溶液作为阳性对照管,1 支加入 0.1ml 细菌内毒素检查用水作为阴性对照管,1 支加入 0.1ml 供试品阳性对照溶液[用被测供试品溶液将同一支(瓶)细菌内毒素工作标准品制成 2.0λ 浓度的内毒素溶液]作为供试品阳性对照管。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入 37℃±1℃ 适宜恒温器中,保温 60 分钟±2 分钟。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

结果判断 将试管从恒温器中轻轻取出,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(-)。供试品管 2 支均为(-),应认为符合规定;如 2 支均为(+),应认为不符合规定;如 2 支中 1 支为(+),1 支为(-),按上述方法另取 4 支供试品管复试,4 支中 1 支为(+),即认为不符合规定。阳性对照管为(-)或供试品阳性对照管为(-)或阴性对照管为(+),试验无效。

1.2 中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法增修订的主要内容

中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法较 1995 年版内容更加详实,有以下几个特点:进一步与美、英药典方法接轨;更加科学、完善;注重细节;增修订内容多,在文字、标点符号、公式、编排格式、方法等方面均有较大增修订。增修订的主要内容如下:

1.2.1 前言部分

(1)细菌内毒素国家标准品:删去了原来的“以细菌内毒素国际标准品为基准,经过协作标定,使其与国际标准品单位含义一致”,而其用途增加了“复核鲎试剂灵敏度”。

(2)细菌内毒素工作标准品的用途将原来的“用于鲎试剂灵敏度测定及试验中的阳性对照”改为“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”。

(3)将原来注解 1 项下的“细菌内毒素检查用水系指与使用批号鲎试剂 4 小时不产生凝集反应的注射用水”改为“细菌内毒素检查用水系指与灵敏度 0.03 EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下 24 小时不产生凝集反应的灭菌注射用水”。

1.2.2 试验准备

将除去试验所用器皿可能存在的外源性内毒素的方法由原来的“常用的方法是 250°C 或 180°C 干烤适当的时间,也可用其它适宜的方法”改为“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,并增加试验所用器皿并应确证不干扰细菌内毒素的检查”。

1.2.3 鲎试剂灵敏度复核试验

(1)增加鲎试剂灵敏度定义为“在本检查法规定的条件下能检测出内毒素标准溶液或供试品溶液中的最低内毒素浓度,用 EU/ml 表示”。

(2)将鲎试剂灵敏度的“标示值(λ_0)”改为“ λ ”。

(3)增加 2 支阴性对照管。

(4)将鲎试剂灵敏度的测定值(λ)的计算公式由“ $\lambda = \log^{-1}(\sum X/4)$ ”改为“ $\lambda = \lg^{-1}(\sum X/4)$ ”。

原表达式的对数形式是一般开式,没有底,无法进行计算。实际工作中,用得最多的是常用对数,所以将“log”修订为“lg”。

(5)增加反应终点浓度的定义,即“反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度”。

1.2.4 供试品干扰试验

(1)将“用供试品的最大有效稀释液将细菌内毒素国家标准品或工作标准品制成 $2.0\lambda_0$, $1.0\lambda_0$, $0.5\lambda_0$ 和 $0.25\lambda_0$ 浓度稀释液。”修订为“用细菌内毒素检查用水和未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数(MVD)的稀释液分别将同一支(瓶)细菌内毒素工作标准品制成含细菌内毒素工作标准品 2.0λ , 1.0λ , 0.5λ 和 0.25λ 四种浓度的内毒素溶液”。

(2)增加标准对照,增加“取细菌内毒素检查用水和供试品溶液或其稀释液各做 2 支阴性对照管”。

(3)增加干扰试验结果计算公式,即“用细菌内毒素检查用水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值 $E_s = \lg^{-1}(\sum X_s/4)$ 和用供试品溶液或其稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值 $E_t = \lg^{-1}(\sum X_t/4)$ 。 X_s 和 X_t 分别为细菌内毒素检查用水和供试品溶液或其稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值(lg)”。

(4)修订了判断标准,将“如果有供试品和无供试品测得的鲎试剂灵敏度(λ)在 $0.5 \sim 2.0\lambda_0$ (包括 $0.5\lambda_0$ 和 $2.0\lambda_0$) 时,则认为供试品在该浓度下不干扰试验”修订为“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”。

(5)增加须重新进行干扰试验的条件,即“当鲎试剂、供试品的来源、供试品的配方或生产

工艺有变化时,须重新进行干扰试验”。

(6)将供试品的最大有效稀释倍数(D)由公式“ $D=L/\lambda_0$ ”修订为“ $MVD=CL/\lambda$ ”,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 的单位为 1.0ml/ml,当 L 以 EU/mg 或 EU/u 表示时, C 的单位为 mg/ml 或 u/ml。

1.2.5 检查法

(1)将“(或 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿)”修订为“或复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿”。

(2)将鲎试剂的支数由“4 支”修订为“5 支”。

(3)增加 1 支供试品阳性对照管,并增加供试品阳性对照液的制备方法,即“用被测供试品溶液将同一支(瓶)细菌内毒素工作标准品制成 2.0 λ 浓度的内毒素溶液”。

(4)试验用的孵育装置由原来的“37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 水浴”修订为“37 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 适宜恒温器”。

1.2.6 结果判断

(1)将“将试管从水浴中轻轻取出”修订为“将试管从恒温器中轻轻取出”。

(2)将试验成立的条件由原来的“阳性对照为(—)或阴性对照为(+),试验无效”修订为“阳性对照管为(—)或供试品阳性对照管为(—)或阴性对照管为(+),试验无效。”

1.3 执行中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法的基本要求

1.3.1 对实验人员的基本要求

细菌内毒素检查(BET)工作是一项非常精确的操作,实验中的每一步操作都对实验结果起着关键的作用。检验人员必须具备较高的科学素质。那些没有经过细菌内毒素检查法技术和基础专业知识培训,没有取得资格证明的实验人员,不具备上岗操作的资格。当今细菌内毒素检查技术发展很快,检验人员必须经常阅读新的专业文献资料,不断地进行专业知识和技术的更新,不断地从实践中总结经验,改进工作,提高自己的工作能力。

1.3.2 实验前的准备

1.3.2.1 试验用具的要求及处理

玻璃器具应规范化,即应便于除热原、计量准确、清洗操作方便等。器具的处理是否恰当,直接影响实验结果。因此,洗涤玻璃器具要掌握一定的操作技术。一般的操作程序是:“洗净”、“去污及去细菌内毒素”、“去洗涤剂”、“精洗”四步洗涤法。实验者在配制铬酸洗液或其它适宜的细菌内毒素灭活剂(如三效热原灭活剂)溶液及洗涤玻璃器皿操作过程中要戴手套、工作帽和口罩。

(1)洗净:将被洗涤的玻璃器皿用自来水洗涤干净并控干水分。

(2)去污及去细菌内毒素:置铬酸洗液中浸泡 4h 以上。若使用“三效热原灭活剂”,则按照说明书配制所需浓度的溶液,然后将被洗涤的玻璃器皿在此溶液中浸泡 1h 以上。

(3)去洗涤剂:取出将洗液或“三效热原灭活剂”滤干,用自来水将残留液体洗净。

(4)精洗:用自来水反复冲洗数次,再用蒸馏水或去离子水浸泡 3 次,每次 30min 以上,并用浸泡水反复冲洗,最后取出控干。

将上述处理好的玻璃器皿,除去可能存在的外源性内毒素,常用的方法是 250 $^{\circ}$ C 干烤至少

1h,也可用其它适宜的方法,但应确证不干扰细菌内毒素的检查。

对于金属制试验用具在内毒素标准品的稀释过程中,要避免金属离子对内毒素活性的影响,一般最好使用铝制用具或不锈钢用具,即使是金属用具,也要用蒸馏水或去离子水反复冲洗干净后,再干烤除细菌内毒素。

对于塑料用具,尤其是一次性塑料用具,一定要确认无细菌内毒素和 β -Glucans 的污染时,方可使用。另外,对于细菌内毒素稀释用管,一般不要使用有吸附作用的塑料管,最好使用玻璃试管。

1.3.2.2 实验环境

中国药典 2000 年版规定:试验操作过程应防止微生物的污染。因此,试验应在洁净室或洁净工作台内进行。每次实验前,用 0.1% 苯扎溴胺溶液擦洗实验室地面及操作台面。实验室要有控温设备,因有文献报道,环境温度偏高时,直接会影响实验结果。对实验室的湿度也应有一定要求。

1.3.2.3 实验人员的准备

实验前,实验者须用肥皂或其它适宜洗涤剂洗手,用 75% 乙醇棉球消毒;须戴工作帽和口罩。

1.3.2.4 鲎实验法的特点

鲎实验法,特异性强,灵敏度高,对操作时间要求高,因而试验要有计划,有准备。作为一种生化试验,细菌内毒素检查法的影响因素很多,鲎实验法操作时间的长短,直接影响结果的可靠性。尤其在炎热的夏季,应尽量缩短操作时间,确保鲎实验法的可靠性、准确性。实际操作中要尽量做到准确、快速。做实验的所有器皿经除细菌内毒素后,如盛器比较密闭,且未启封,可在 1 周内使用。

1.3.3 实验部分

1.3.3.1 鲎试剂灵敏度复核试验

(1)鲎试剂灵敏度复核的目的,不仅考察鲎试剂灵敏度和细菌内毒素工作标准品的效价是否准确,也考察试验人员操作方法是否正确和试验条件是否符合规定。中国药典 2000 年版规定每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。

(2)使用凝胶法复核鲎试剂灵敏度时,必须转换成对数值再进行计算。这是因为它们的对数值所反映的频率分布比阳性反应终点值本身反映的频率分布更接近于正态分布(有些明显呈偏态分布的资料经过对数转换后呈对称分布,可以采用几何均数描述其平均水平)。事实上,其对数值所反映的频率分布与正态分析非常接近,可以此为数学模型计算结果,即 $\lambda = \lg^{-1}(\sum X/4)$, X 为反应终点浓度的对数值($\lg$),至于本法的可信限,目前不要求计算,这是由鲎试剂灵敏度复核试验中试验成立的条件决定的,即中国药典 2000 年版:最大浓度 2.0 λ 管均为阳性,最低浓度 0.25 λ 管均为阴性。若满足这些条件,试验成立,可信限即在规定的范围之内。

(3)鲎试剂灵敏度复核应规范化:鲎试剂是一种生物制品,在生产、运输、贮藏过程中受到一定条件的影响,其灵敏度常有变化,所以中国药典 2000 年版规定,每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。目前,市场上的鲎试剂来源杂乱,各生产厂家的制备工艺条件各不相同,其产品质量也参差不齐。许多基层使用单位出于各种目的如贪图节省小部分试剂而不做灵敏度复核试验,这存在着药品重大质量隐患,必须给予重视。实验室的条件、实验器具的规

范化应符合上述要求。实验人员的技能应符合上述要求并且责任心强。达不到规定要求的实验室和实验人员不得做灵敏度复核试验。在灵敏度复核实验结果判断时,应做如下规定,即若第一次复核结果不合格,再进行第二次复核,若2次结果一致,那么再让其他的实验人员进行复核,若复核结果同上述结果一致,这时就判为不合格。因此,作为灵敏度复核,应有高度负责的精神,在复核中达到正确、可靠、规范化。

(4)细菌内毒素国家标准品(NSE):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。日常试验时,常用细菌内毒素工作标准品(WSE),它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。内毒素失活就不能有效激活凝固酶原,因而会使反应管呈假阴性反应。所以内毒素必须严格按照规定要求低温保存,以防止其失活。

一个包装的细菌内毒素量往往超过一次试验所需用量。实验者常常想知道一支开口的细菌内毒素可以存放多长时间而不降低效价,对此中国药典没有明确规定,但美、日、欧药典均有明确规定。已有实验证明,在净化操作台上开口后,用细菌内毒素检查用水溶解,制成细菌内毒素标准原液,用适当的材料封口,并保存在4℃环境下,2周以内效价没有降低(但这只适用于NSE,而WSE开口后一次用完,不再保存)。

将细菌内毒素标准原液经充分混合后,准确吸取一定体积,用细菌内毒素检查用水准确稀释成一系列细菌内毒素标准溶液。由于存在试管壁对内毒素的吸附,从而引起内毒素失活的可能性,因此制备好的标准内毒素溶液要尽可能的快速使用。

内毒素稀释的标准化操作如加样的准确性、混匀过程等对实验结果的准确与否起主要作用。取上述内毒素一支,用砂轮片割断安瓿曲颈上段,并尽可能保留较长的安瓿颈,准确加入细菌内毒素检查用水1.0ml复溶,用封口膜封闭安瓿口,也可用医用胶布在酒精灯上略为烧灼后封口。把封好口的安瓿放在旋涡混合器上混匀15min(国际统一的BET调和案已规定30min,这应值得我们注意),混匀时注意不要使安瓿内溶液上溢沾上封口材料。进一步稀释时,每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀30s。

稀释过程每一步骤所用的移液器具不能交叉混用。

(5)鲎试剂复溶时应注意将细菌内毒素检查用水顺着瓶壁加入,避免产生过多泡沫。复溶后轻轻摇匀,直至内容物全部溶解。

(6)须做2支阴性对照管,若阴性对照管为(+),则复核试验无效。若复核的结果不是内毒素最大浓度(2.0λ)4管均呈阳性,最小浓度(0.25λ)4管均呈阴性,本品鲎试剂不能使用,须查找原因。可能是灵敏度标示不准确,或是内毒素效价标示不准确,或是操作不当的原因所致。

(7)当 $\lambda[\lambda=\lg^{-1}(\sum X/4)]$ 在0.5λ~2.0λ(包括0.5λ和2.0λ)时,方可用于供试品干扰试验及细菌内毒素检查试验,并以λ为该批鲎试剂的灵敏度。

1.3.3.2 供试品的干扰试验

(1)干扰试验的目的是判断某种供试品在某种浓度状态下是否适合作细菌内毒素检查。这样的判断还包括下列条件改变时,须重新进行干扰试验。

- ①鲎试剂的来源改变。
- ②鲎试剂制备工艺的改变。
- ③供试品生产工艺、配方、成分的改变。
- ④供试品关键成分来源的改变。