

## 概述

美国药典<85>、欧洲药典<2.6.14>和中国药典<1143>章节提供了使用鲎试剂检测细菌内毒素的基本要求。本技术说明提供了有关Endosafe™鲎试剂卡片如何满足并在某些情况下超过这些章节要求的技术细节。



微生物解决方案

## Endosafe™LAL鲎试剂卡片和法规要求

美国药典USP <85>章节, 欧洲药典EP <2.6.14>章节, 中国药典ChP <1143>章节

Endosafe™内毒素检测系统, 以及获得FDA许可的LAL (鲎试剂) 卡片, 是Charles River为客户对于更高灵敏度和更快定量结果的需求而开发的动态显色法解决方案。我们的LAL卡片满足美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)、中国药典 (ChP) 等对于细菌内毒素检测的要求, 可以用于原料、过程中样本和终产品的检测。

**Endosafe™nexgen-PTS™:** 这是一款15分钟内快速定量、采样即检的可便携式内毒素检测系统, 它利用Endosafe™内毒素检测卡片进行精确、便捷、实时的内毒素检测和葡聚糖测定。

**Endosafe™nexgen-MCS™:** 这是多通道台式内毒素检测系统, 同样采用FDA许可的LAL卡片进行检测, 满足更高样品通量的需求, 能够在15分钟内同时测试五个样品, 提供快速、准确的定量检测结果。

**Endosafe™Nexus 100/200:** 这是内置nexgen-MCS™的全自动内毒素检测系统, 每次运行最多可检测60-120个样品, 条码读取功能赋能数据管理, 减少输入错误及后续调查, 能够进行复杂和连续的稀释, 极大程度上消除了测试中的不稳定因素, 并充分发挥了Endosafe™卡片技术的潜力。

美国药典（USP）、欧洲药典（EP）以及中国药典（ChP）细菌内毒素检查法章节内容：

- 方法
  - 试剂
- 标准曲线接受标准
  - 干扰试验

2007年2月，EDQM已确认Endosafe™LAL鲎试剂卡片采用的是目前药典内毒素检查法章节中的检测技术与方法（光度检测技术-动态显色法），无需单独进行阐述，因为卡片已包含在现有药典技术与方法中。

美国药典（USP）、欧洲药典（EP）以及中国药典（ChP）中所列明的检查方法包括：

- 凝胶限度法
  - 凝胶定量法
- 动态浊度法
  - 动态显色法
- 终点浊度法
  - 终点显色法

Endosafe™ LAL卡片内置有FDA许可的、上述检查法中的动态显色法鲎试剂。

Endosafe™LAL鲎试剂卡片是如何满足美国药典（USP）、欧洲药典（EP）以及中国药典（ChP）细菌内毒素检测章节要求的：

|           | 中国药典要求                                                                                                                                                                                                                                 | 美国药典/欧洲药典要求                                                                                                                           | Endosafe® LAL卡片技术                                                                                                   |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 方法        |                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                       |                                                                                                                     |
| 光度测定法     | <ul style="list-style-type: none"><li>“光度测定法分为浊度法和显色基质法。显色基质法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶使特定底物释放出呈色团的多少而测定内毒素含量的方法。”</li><li>“动态显色法是检测反应混合物的吸光度或透光率达到某一预先设定的检测值所需要的反应时间，或检测值增加速度的方法。”</li><li>“光度测定试验需在特定的仪器中进行，温度一般为37°C ± 1°C。”</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>“显色法测定内毒素和鲎试剂反应后从适当的显色肽释放出来的显色团。”</li><li>“动态显色法是测定反应混合物达到预设吸光度所需时间(达限时间)或颜色变化速率的方法。”</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>卡片使用的是动态显色试剂。</li><li>卡片使用分光光度计测定达到预设吸光度的时间(达限时间)，并在37 ± 1°C 下进行检测。</li></ul> |
| 光度测定法的预实验 | <ul style="list-style-type: none"><li>“为保证浊度和显色试验的有效性，应预先进行标准曲线的可靠性试验以及供试品的干扰试验。”</li></ul>                                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"><li>“为了保证...显色法的准确性和有效性，预试验能够确认标准曲线的可靠性，以及样品溶液不会抑制或增强反应。”</li></ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"><li>标准曲线的可靠性试验在批放行前完成。</li><li>样品验证/干扰试验由终端用户执行。</li></ul>                        |

|            |  | 中国药典要求                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 美国药典/欧洲药典要求                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Endosafe® LAL卡片技术                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 方法         |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 检查法        |  | <ul style="list-style-type: none"><li>使用系列溶液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。</li><li>试验必须符合以下三个条件方为有效:<ol style="list-style-type: none"><li>系列溶液C的结果要符合“标准曲线的可靠性试验”中的要求;</li><li>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;</li><li>阴性对照吸光度小于或透光率大于标准曲线最低点的检测值或反应时间大于标准曲线最低点的反应时间。</li></ol></li><li>注:<p>A为稀释倍数不超过MVD的供试品溶液。</p><p>B为加入了标准曲线中点或靠近中点的一个已知内毒素浓度的, 且与溶液A有相同稀释倍数的供试品溶液。</p><p>C为如“标准曲线的可靠性试验”项下描述的, 用于制备标准曲线的标准内毒素溶液。</p><p>D为阴性对照。</p></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>1) “用阳性对照组C生成的标准曲线计算溶液A每支平行管的内毒素浓度。</li><li>2) 对照组C的结果符合分光光度法项下的标准曲线的可靠性试验中的有效要求;</li><li>3) 用溶液B的内毒素浓度减去溶液A中的内毒素浓度, 计算出的内毒素回收率为50%~200%之间;</li><li>4) 阴性对照系列D的结果不超过所用的鲎试剂说明书中规定的空白限值。”</li><li>注:<p>A溶液: 样品平行管</p><p>B溶液: 添加标准曲线中点浓度的样品平行管</p><p>C溶液: 标准曲线 (平行管)</p><p>D溶液: 阴性水对照组 (平行管)</p></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>系列溶液C即存档标准曲线。</li><li>药典方法并未说明不允许使用存档标准曲线、或只允许使用实验室自制的标准曲线。药典仅规定曲线的生成实验必须有规定数量的平行管, 且符合线性要求。事实上, 存档曲线符合更严格的线性要求, 其放行标准为存档标准曲线的相关系数绝对值必须&gt;0.990。</li><li>阳性对照的回收率百分比的计算用其内毒素减去了样品中的内毒素。我们的说明书规定, 有效回收率必须在50%~200%之间。</li><li>阴性水对照是在用水制备标准曲线的批放行实验时设置。这符合检测完成前无反应的标准 (阴性对照的反应时间大于标准曲线最低点的反应时间)。</li></ul> |
| 标准曲线的可靠性试验 |  | <ul style="list-style-type: none"><li>“用标准内毒素制成溶液, 制成至少3个浓度的稀释液...每一浓度至少做3支平行管...做2支阴性对照...阴性对照的反应时间大于标准曲线最低点的反应时间... 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。”</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <ul style="list-style-type: none"><li>“使用标准内毒素溶液制备至少3个内毒素浓度点的稀释液以建立标准曲线。每个标准内毒素浓度点至少平行三管...相关系数的绝对值 r 必须大于或等于0.980。”</li></ul>                                                                                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"><li>为了确定存档标准曲线, 设置3个RSE浓度, 每个浓度都平行10管进行试验。</li><li>在每批的效价标定测试期间会进行30次重复测试的阴性对照 (水) 测试。</li><li>相关系数绝对值只有大于0.990才能满足放行标准。</li></ul>                                                                                                                                                                             |

|      | 中国药典要求                                                                                                                                                                                      | 美国药典/欧洲药典要求                                                                                                                                                                                                                                   | Endosafe® LAL卡片技术                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 方法   |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 干扰试验 | <ul style="list-style-type: none"> <li>“选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度, 作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度。”供试品溶液、产品阳性对照、内毒素标准品和阴性水对照组都应至少平行2管进行试验。</li> <li>“当内毒素的回收率在50%~200%, 则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。”</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>“选择标准曲线中点或靠近中点的内毒素浓度。”根据表格所列, 这一浓度是在样品溶液中制备样品阳性对照的浓度。表格中也说明所有的样品、阳性产品对照、内毒素标准品和阴性水对照组都应至少平行两管进行试验。</li> <li>“为了确认检测条件下无干扰因素, 加入样品溶液中的实测内毒素浓度减去未添加内毒素的溶液中检测到的内毒素浓度后应在已知添加的内毒素浓度的50%至200%之间。”</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>样品阳性对照通道预置的标准品目标为存档标准曲线中点或中点附近的浓度。</li> <li>样品通道和样品阳性对照通道都按照要求平行两管。</li> <li>存档标准曲线用每浓度10支平行管创建。</li> <li>每一批阴性水对照依据用于批放行的30支平行管检测。</li> <li>我们的产品说明书经过FDA审核, 其中表明: 初次确认: 每一批新的卡片签收时需进行质量检验。首次确认试验要求用1张卡片及内毒素检查用水作为样品。评估试验必须证明无内毒素检出, 内毒素回收率应在可接受范围内 (50%~200%)。</li> <li>卡片配套仪器及软件计算内毒素回收率前先减去未添加内毒素的样品溶液中存在的内毒素浓度。</li> <li>Charles River还提供干扰筛查卡片, 可用于干扰初筛试验中快速筛选适宜的稀释梯度用于正式干扰试验。</li> </ul> |
| 日常测试 |                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 标准曲线 | <ul style="list-style-type: none"> <li>至少3个浓度的稀释液, 每一浓度至少做2支平行管。</li> <li>相关系数 (r) 的绝对值应大于或等于0.980。</li> </ul>                                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>最低要求: 3个浓度点, 平行2管。</li> <li><math> R  \geq 0.980</math>。</li> </ul>                                                                                                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>卡片标曲设置3个浓度点, 平行10管。</li> <li>卡片标曲的<math> R </math>值大于0.990。</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 阴性对照 | <ul style="list-style-type: none"> <li>至少2管阴性对照。</li> </ul>                                                                                                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>最低要求设置2个平行管。</li> <li>设置阴性对照组的目的是为了验证用于细菌内毒素检测的水中无可检出含量的内毒素。</li> </ul>                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>在每批的效价标定测试期间会进行30次重复测试的阴性对照 (水) 测试。符合测试完成前无反应的标准 (阴性对照的达限时间&gt;标准曲线最低点的达限时间)。</li> <li>我们的产品说明书是FDA 批准的文档, 其中声明了: 初始确认 (Initial Qualification): 每批新卡片必须在收到时进行确认。初始确认测试需要一张用内毒素检查用水作为样品的卡片。评估必须证明没有可检测到的内毒素并获得可接受的加标回收率 (50~200%)。</li> </ul>                                                                                                                                                    |

|                |  | 中国药典要求                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 美国药典/欧洲药典要求                                                                                               | Endosafe® LAL卡片技术                                                                                      |
|----------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 其他             |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                           |                                                                                                        |
| 内毒素标准品和标准溶液的制备 |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>“细菌内毒素国家标准品系自大肠埃希菌提取精制，并以细菌内毒素国际标准品标定其效价。”</li> <li>细菌内毒素国家标准品和工作标准品溶液根据中国药典或说明书中的描述进行制备。</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>“内毒素标准品溶液要使用经WHO国际标准品校准的内毒素参考品制备...按照说明书和标签上的参数进行制备...”</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>卡片使用USP内毒素标准品 (RSE，等同于细菌内毒素国际标准品) 确定存档标准曲线各数据点的达限时间。</li> </ul> |
| 卡片技术在国际上被认可的历史 |  | <p>2006年7月，美国FDA批准将使用卡片技术的鲎试剂纳入 Charles River 的BLA (biologics license application)。</p> <p>2007年6月，Charles River向欧洲药典委员会提交了一份申请，要求将预校准一次性使用的、与存档标准曲线协同操作的LAL卡片收载到细菌内毒素检查法文本中。</p> <p>2007年9月，英国药典 (BP) 委员会代表确认卡片技术“充分包括在目前的 (药典) 协调内容中”，因而对于此“经证实适宜的技术方法”无需在细菌内毒素检查法文本中进行额外详述。</p> <p>2008年2月，欧洲药品监督管理局 (EDQM) 回信再次确认“...该 (卡片) 技术使用传统的显色鲎试剂，并已包含在现有章节中”，并且“第1章 ‘仪器’ 指出，‘试管’ 一词可包括任何种类的容器：因此，该词也包括预校准的一次性使用卡片。”</p> <p>2011年11月，在PMF细菌内毒素峰会上，FDA再次确认了卡片技术符合细菌内毒素检查法要求。</p> |                                                                                                           |                                                                                                        |



查士利华微生物应用技术（上海）有限公司  
sales-msshanghai@criver.cn | www.criver-microbial.cn  
客服热线：021 39739888

