

静注人免疫球蛋白细菌内毒素检查方法的建立

郭采平 张剑平 黄晓华  
(深圳卫武光明生物制品有限公司 深圳 518107)

**摘要** 目的:建立用于静脉注射用人免疫球蛋白(IVIG)的细菌内毒素检查方法。方法:通过干扰评价实验证明 IVIG 对细菌内毒素检查法有强烈的抑制作用,单纯用简单稀释和调整 pH 值法无法消除干扰,如果用稀释剂(I)对 IVIG 作 1:4 以上的稀释,即可消除样品对该检查法的干扰,利用灵敏度为 0.125EU/ml 的鲎试剂,将样品用稀释剂(I)稀释 4 倍,按中国药典(2000 版)进行细菌内毒素的检查,结果与家兔热原质试验进行比较。结论:IVIG 用稀释剂(I)进行适当稀释后,可以用细菌内毒素检查法替代家兔热原试验,应用于生产过程及半成品的质量控制。  
**关键词** 低 pH 静脉注射人免疫球蛋白(IVIG) 细菌内毒素检查 干扰试验 稀释剂(I)

低温乙醇法提取、低 pH 值病毒灭活的 IVIG, 现行规程规定进行家兔热原质检查<sup>[1]</sup>。本文通过实验,探讨了对该品种进行细菌内毒素检查的方法,并与家兔法热原质试验进行比较,结果显示,对 IVIG 进行细菌内毒素检查是可行的。

1 试验材料

低 pH 静脉注射人免疫球蛋白:深圳卫武光明生物制品有限公司。鲎试剂(TAL):Lot: 990820, λ= 0.125EU/ml(已通过灵敏度复核),湛江安度斯生物有限公司。细菌内毒素工作标准品:Lot: 990528, 效价:10EU/ml, 湛江安度斯生物有限公司。稀释剂(I):Lot: 990115, 湛江安度斯生物有限公司。细菌内毒素检查用水:厦门鲎试剂厂。细菌内毒素检查用具一套,经 250℃干烤 1h 去热原质<sup>[2]</sup>。

2 实验方法与结果

2.1 IVIG 对细菌内毒素检查的干扰评价试验<sup>[3]</sup>

本品家兔注射剂量 M 为 10ml/kg(5%)<sup>[1]</sup>。细菌内毒素阈值为 5.0EU/kg,细菌内毒素限值 L= K/M= 5/10= 0.5EU/ml(湛江安度斯生物有限公司:细菌内毒素检查的有关概念及理论,细菌内毒素检查法应用培训班讲义,1996 年 10 月,7 页)。以鲎试剂灵敏度 0.5EU/ml 为基准,求出相应的最大有效稀释倍数 MVD 为 1,取热原检查合格的 IVIG,以此为基准用细菌内毒素检查用水(以下简称水)作 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 系列稀释,标为 S<sub>w</sub> 系列。

另作一组 1:1~ 1:16 的样品稀释液,但在稀释过程加入细菌内毒素工作标准品,使最终浓度为 0.25EU/ml,记为 S<sub>E</sub> 系列。

选灵敏度为 0.125EU/ml 的鲎试剂,分别与 S<sub>w</sub> 与 S<sub>E</sub> 2 个系列反应,记为 NPC 和 PPC,结果见表 1。表明样品对细菌内毒素检查法有强烈的抑制作用,且无法用简单的稀释去除干扰。

表 1 IVIG 干扰评价试验结果  
Table 1 Results of IVIG Interference Evaluation Experiment

稀释倍数 Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
NPC	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
PPC	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

2.2 消除干扰作用的试验

2.2.1 将 IVIG 样品作消除干扰的处理 我们对样品分别采取两种方法进行处理:一是用无热原的 NaOH 溶液,将样品液 pH 值调至 7.0;一是用稀释剂(I)代替水稀释样品(参照湛江安度斯生物有限公司,稀释剂(I)使用说明书,细菌内毒素检查法应用培训班讲义,1996 年 10 月,附录 I,35 页),然后按上法作干扰评价试验,结果发现,用 NaOH 调节 IVIG 的 pH 至 7.0 后仍无法消除其抑制,而用稀释剂(I)将样品稀释至 1:4 倍以上时,PPC 管出现了阳性,见表 2、表 3。

表 2 IVIG 调 pH7.0 后干扰评价试验结果

Table 2 Results from Interference Evaluation  
Experiment of the IVIG Neutralized

稀释倍数 Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
NPC	-	-	-	-	-
PPC	-	-	-	-	-

表 3 IVIG 用稀释剂(I)稀释的干扰评价试验结果

Table 3 Results from Interference Evaluation  
Experiment of the IVIG Diluted with Dilution SolutionI

稀释倍数 Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
NPC	-	-	-	-	-
PPC	-	-	+	+	+

2.2.2 干扰试验 MVD= 4 所对应的 TAL 的灵敏度  $\lambda=0.125\text{EU/ml}$ , 干扰试验按中国药典 2000 版修订后的有关要求<sup>[2]</sup>进行。

用水将内毒素工作标准品稀释成 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03EU/ml 浓度系列。取 3 批无热原 IVIG, 用稀释剂(I)作 1:4 稀释, 用这些样品稀释液分别复溶 TAL, 然后与系列内毒素溶液反应, 另以水复溶 TAL, 然后与同样的内毒素系列反应作对照, 试验重复 4 管, 结果见表 4。

2.3 与家兔热原试验的比较

将 40 批已进行过家兔热原试验的 IVIG 样品, 用稀释剂(I)作 1:4 倍稀释, 以  $\lambda=0.125\text{EU/ml}$  的 TAL 按照《中国药典》2000 版修订后的细菌内毒素检查法进行检查<sup>[2]</sup>, 结果见表 5、表 6。

表 4 IVIG 干扰试验结果

Table 4 Results of the Interfering Factor Test

TAL 复溶液 Resolvent	内毒素浓度 Concentration	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	NC	$E_d/E_t$
IVIG××××10		++++	++++	++++	++++	----	----	0.06
IVIG××××06		++++	++++	++++	++++	----	----	0.09
IVIG××××01		++++	++++	++++	++++	----	----	0.09
水(BET Water)		++++	++++	++++	----	----	----	0.125

$\lambda=0.125\text{EU/ml}$ ;  $E_s=0.125\text{EU/ml}$  在 0.5λ~ 2.0λ 范围  $E_t$  分别为 0.06、0.09、0.09EU/ml, 均在 0.5  $E_s$ ~ 2.0  $E_s$  范围内, 可认为 IVIG 用稀释剂(I)作 4 倍稀释后, 对细菌内毒素检查无干扰

表 5 IVIG 的热原检查和细菌内毒素检查结果

Table 5 Results of Pyrogen Test versus that of BET

IVIG 批号 Lot	热原试验结果 Pyrogen Test	鲎试验结果 BET	IVIG 批号 Lot	热原试验结果 Pyrogen Test	鲎试验结果 BET
98 试 01	合格	-	20001134- 4	合格	-
98 试 06	合格	-	200020	不合格	+
98 试 10	合格	-	20001135- 1	合格	-
990517- 3	合格	-	20001135- 2	合格	-
990306- 1	合格	-	20001135- 3	合格	-
20000402	合格	-	20001135- 4	合格	-
0008	不合格	+	20001136- 1	合格	-
20000513- 2	合格	-	20001136- 2	合格	-
20000513- 3	合格	-	20001137- 4	合格	+
20000616- 1	合格	+	20001138- 1	合格	-
20000616- 2	合格	+	20001138- 1	合格	-
20001031- 2	合格	-	20001138- 3	合格	-
20001032- 3	合格	-	20001138- 5	合格	-
20001032- 4	合格	-	20001138- 6	合格	-
20001133- 1	合格	-	20001239- 1	合格	-
20001133- 2	合格	-	20001239- 2	合格	-
20001133- 3	合格	-	20001240- 2	合格	-
20001134- 1	合格	-	20001240- 3	合格	-
20001134- 2	合格	-	20001240- 4	合格	-
20001134- 3	合格	-	20001239- 4	合格	-

表 6 IVIG 的热原检查和细菌内毒素检查结果一致性比较

Table 6 Conformity Comparison between the Results from Pyrogen Test and the BET

		家兔热原试验结果		小计	一致批数	吻合率
		Results of Pyrogen Test				
		合格 (Pass)	不合格 (Fail)			
内毒素检查结果	阳性 Positive	3	2	2	2	33%
Results of BET	阴性 Negative	35	0	35	35	100%
合计 (Aggregate)		38	2	40	37	92.5%

3 讨 论

从表 1 可以看出, IVIG 在 1~ 16 倍稀释范围, 对内毒素凝集反应存在较强的抑制作用。现在市售的鲎试剂最高灵敏度为 0.03EU/ml, 对应的 MVD = 16 倍, 可见用简单的稀释法无法消除 IVIG 对细菌内毒素检查的干扰。

IVIG 的 pH 值为 4.1±0.3, TAL 凝集反应的最佳 pH 值为 6.5~ 7.5(参照湛江安度斯生物有限公司,再论细菌内毒素检查的抑制/增强作用, 鲎试剂应用技术研讨资料, 1997 年 10 月, 附录 II, 15 页), 但我们调节样品 pH 值至 7.0 后仍不能消除抑制, (见表 2), 说明尚有其他抑制因素存在。

用稀释剂(I)对 IVIG 作 4 倍以上稀释, 可以消除其对 TAL 凝集反应的干扰, 可能是 IVIG 中的球蛋白分子与 TAL 的二价阳离子结合, 而稀释剂(I)含有一定浓度的二价阳离子, 可维持 TAL 正常灵敏度所需的二价阳离子, 并且稀释剂(I)有较强的 pH 缓冲能力, 能使反应介质保持反应所需的最佳 pH 值。

3 批样品的干扰试验结果,  $E_t$  均在  $0.5E_s \sim 2.0E_s$  范围, 按规定可以判为无干扰作用。但其中一批处于临界值  $0.5 E_s$ , 另两批也小于  $1 E_s$ , 说明经过处理后的样品转而对 TAL 的凝集反应略有增强。40 批样品同时进行内毒素检查和家兔热原试验, 结果表明, 5 批内毒素检查为阳性的样品当中, 有 3 批家兔热原试验为阴性, 也说明该法会导致一些假阳性结果。

综上所述, 我们认为 IVIG 用稀释剂(I)作适当稀释后, 可进行细菌内毒素检查, 稀释倍数应大于 4 倍, 所需 TAL 灵敏度要高于 0.125EU/ml, 该法可取代家兔热原试验用于生产过程中热原监控及半成品检定, 出现阳性结果时, 再以家兔法仲裁。

参考文献

[ 1 ] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程一部( 试行规程). 1995, 20

[ 2 ] 黄清泉. 中国药典 2000 年版细菌内毒素检查法修订情况简介. 鲎试剂应用与进展, 1999, ( 3 ): 3

[ 3 ] 韦群. 红花注射液细菌内毒素检查方法的研究. 鲎试剂应用与进展, 1997, ( 1 ): 13

The Setting up of a Method to Conduct Bacterial Endotoxins Test in Intravenous Immunoglobulin( IVIG)

GUO Cair ping    ZHANG Jiarr ping    HUANG Xiao hua  
( Shenzhen Weiwu Guangming Biological Products Co., Ltd. Shenzhen 518107, China)

**Abstract** Objective: Developing a method to conduct Bacterial Endotoxins Test in Intravenous Immunoglobulin (IVIG). Methods: The interference evaluation experiment proves that IVIG exerts strong inhibitions in Bacterial Endotoxin Test (BET). While the interfering factors can't be eliminated by treatments such as dilution and neutralisation, they are liable to be inhibited provided that the IVIG samples are to be diluted by 1: 4 with the Dilution Solution I. The BET way for IVIG preparation diluted by 1: 4 with the Dilution Solution I is carried out comply with the Chinese Pharmacopoeia (2000 Edition) The lysate with sensitivity of 0.125Eu/ml is used in the test, and the results of the BET are comparable to that of Pyrogen Test carried out in rabbits. Conclusion: Bacterial Endotoxins Test (BET) can take the place of Pyrogen Test only after the IVIG is diluted properly, then the method can be employed in quality inspection during the manufacturing process.

**Key words** Human IVIG(PH4) BET Interfering Factor Test Dilution Solution I