

評估「」之 內毒素含量試驗

試驗計畫書

Study Protocol

泓佑生物科技有限公司
桃園市大園區青昇二街 68 號 6 樓
電話：+886-3-2870051
傳真：+886-3-2871151
email：service@acebiolab.com

評估「」之內毒素含量試驗

1. 試驗目的

本檢測依照美國藥典 (USP) 第 85 章及 FDA guideline 以 LAL (*Limulus Amebocyte*

Lysate) 試劑檢測由革蘭陰性菌產生的細菌內毒素，以判斷試驗品中細菌內毒素的限量是否

符合規定內毒素含量。

2. 一般資訊

2.1 試驗委託單位

委託單位名稱：

委託單位地址：

聯絡電話：

傳真：

委託單位代表：

2.2 試驗執行單位

試驗機構名稱：泓佑生物科技有限公司

試驗機構地址：桃園市大園區青昇二街 68 號 6 樓

聯絡電話：+886-3-2870051 傳真：+886-3-2871151

試驗主持人：

3. 試驗系統

- 3.1 檢測方法：凝膠法 (Gel-Clot Technique)
- 3.2 檢測試劑：Pyrotell-T *Limulus* Amebocyte Lysate
- 3.3 測試條件：於 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培養箱中進行反應 60 ± 2 分鐘

4. 試驗方法

4.1 試驗溶液製備與組別：

4.1.1 將試驗物質進行複溶、稀釋或在水性溶液中制成試驗溶液。必要時，調節試驗溶液（或其稀釋液）的 pH 值，一般試驗溶液和 LAL 試劑混合後溶液的 pH 值在 6.0~8.0 的範圍內為宜，可使用適宜的酸、鹼溶液或緩衝溶液調節 pH 值。酸或鹼溶液須用細菌內毒素檢查用水在已去除內毒素的容器中配製。緩衝液必須經過驗證不含內毒素和干擾因數。

4.1.2 實驗分成靈敏度對照組系列、陰性對照組、干擾試驗組及試驗組。每組至少進行三重複試驗。

4.2 試驗步驟：

4.2.1 將 LAL 以細菌內毒素檢查用緩衝液進行複溶。

4.2.2 預備試驗

4.2.2.1 LAL 試劑靈敏度測試：根據 LAL 試劑靈敏度的標示值 (λ)，將內毒素標準品以細菌內毒素檢查用水溶解，在旋渦混合器上混勻 15 分鐘，然後製成

2λ、λ、0.5λ 和 0.25λ 四個濃度的內毒素標準溶液，每稀釋一步均在旋渦混合器上混勻 30 秒。取 18 管分裝有 0.1 ml LAL 試劑溶液的 10 mm × 75 mm 試管。其中 16 管分別加入 0.1 ml 不同濃度的內毒素標準溶液，每一個內毒素濃度平行做 4 管；另外 2 管加入 0.1 ml 細菌內毒素檢查用水作為陰性對照。將試管中溶液輕輕混勻後，封閉管口，垂直放入 37°C±1°C 的培養箱中，保溫 60 分鐘 ± 2 分鐘。將試管從培養箱中輕輕取出，緩緩倒轉 180°，若管內物質形成凝膠，並且凝膠不變形、不從管壁滑脫者為陽性；未形成凝膠或形成的凝膠不堅實、變形並從管壁滑脫者為陰性。保溫和拿取試管過程中應避免收到振動，造成假陰性結果。當最大濃度 2λ 管均為陽性，最低濃度 0.25λ 管均為陰性，陰性對照管為陰性，試驗方為有效。

4.2.2.2 干擾試驗：按表 1 製備溶液 A、B、C 和 D，使用的試驗溶液應為未檢出內毒素且不超過最大有效稀釋倍數 (MVD) 的溶液，按 LAL 試劑靈敏度複核子試驗項下操作。

表 1：凝膠法干擾試驗溶液的製備

項目	內毒素濃度/被加入內毒素的溶液	稀釋用液	稀釋倍數	所含內毒素的濃度	平行管數
A	無/試驗溶液	-	-	-	4
B	2λ/試驗溶液	試驗溶液	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/檢查用水	檢查用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2



D	無/檢查用水	-	-	-	2
---	--------	---	---	---	---

注：A 為試驗溶液；B 為干擾試驗系列；C 為 LAL 試劑靈敏度標準溶液系列；D 為陰性對照

4.2.4 凝膠限度試驗：按表 2 製備溶液 A、B、C 和 D。使用稀釋倍數不超過 MVD 並且已經排除干擾的試驗溶液來製備溶液 A 和 B。按 LAL 試劑靈敏度複核子試驗項下操作。

表 2 凝膠限度試驗溶液的製備

項目	內毒素濃度/配置內毒素的溶液	平行管數
A	無/試驗溶液	2
B	2λ/試驗溶液	2
C	2λ/檢查用水	2
D	無/檢查用水	2

注：A 為試驗溶液；B 為陽性對照試驗溶液；C 為陽性對照；D 為陰性對照

4.2.5 結果判斷：保溫 60 分鐘±2 分鐘後觀察結果。若陰性對照溶液 D 的平行管均為陰性，陽性對照試驗溶液 B 的平行管均為陽性，陽性對照溶液 C 的平行管均為陽性，試驗有效。若溶液 A 的兩個平行管均為陰性，判定試驗溶液符合規定。若溶液 A 的兩個平行管均為陽性，判定試驗溶液不符合規定。若溶液 A 的兩個平行管中的一管為陽性，另一管為陰性，需進行複試。複試時溶液 A 需做 4 支平行管，若所有平行管均為陰性，判定試驗溶液符合規定，否則判定試驗溶液不符合規定。若試驗溶液的稀釋倍數小於 MVD 而溶液 A 出現不符合規定時，需將供試品稀釋至 MVD 重新實驗，再對結果進行判斷。

4.2.6 凝膠半定量試驗：本方法透過反應終點濃度來量化試驗溶液中內毒素的含量。按表 3 製備溶液 A、B、C 和 D。按 LAL 試劑靈敏度複核子試驗項下操作

表 3 凝膠半定量試驗溶液的製備

項目	內毒素濃度/被加入 內毒素的溶液	稀釋用液	稀釋倍數	所含內毒 素的濃度	平行管數
A	無/試驗溶液	檢查用水	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
B	2λ/試驗溶液		1	2λ	2
C	2λ/檢查用水	檢查用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	無/檢查用水	-	-	-	2

4.2.7 結果判斷：若陰性對照溶液 D 的平行管均為陰性，陽性對照試驗溶液 B 的平行管均為陽性，系列溶液 C 的反應終點濃度的幾何平均值在 0.5 ~ 2λ，試驗有效。系列溶液 A 中每一系列的終點稀釋倍數乘以λ，為每個系列的反應終點濃度。如果檢驗的是經稀釋的試驗溶液，則將終點濃度乘以試驗溶液進行半定量試驗的初始稀釋倍數，即得到每一系列內毒素濃度 c。若每一系列內毒素濃度均小於規定的限值，判定試驗溶液符合規定。每一系列內毒素濃度的幾何平均值即為試驗溶液的內毒素濃度[按公式 $cE = \text{antilg}(\sum c/2)$]。若試驗中試驗溶液的所有平行管均為陰性，應記為內毒素濃度小於λ (如果檢驗的是稀釋過的供試品，則記為小於λ乘以供試品進行半定量試驗的初始稀釋倍數)。若任何系列內毒素濃度不小於規定的限值時，則判定試驗溶液不符合規定。當試驗溶液的所有平行管均為陽性，可記為內毒素的濃度大於或等於最大的稀釋 倍數乘以λ。

5. 參考文獻

- 5.1 Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
- 5.2 Bacterial Endotoxins Test, USP 85, 2012, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD. .

6. 試驗預計時程

試驗前準備：1 週

試驗分析、數據整理：3 週

正式報告：2 週

7. 計畫核准

委託單位名稱：

委託單位地址：

聯絡電話： 傳真：

日期：_____

試驗機構名稱：泓佑生物科技有限公司

試驗機構地址：桃園市大園區青昇二街 68 號 6 樓

聯絡電話：+886-3-2870051 傳真：+886-3-2871151

試驗主持人：

日期：_____