

注射劑細菌內毒素試驗凝膠法評估

陳昱憲*、林秋華、陳玉林、詹勳隆、林文華、葉修如

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 本研究目的在於建立實驗室執行細菌內毒素試驗能力，並對國內市售動物用藥品注射劑產品進行調查，評估目前動物用藥品注射劑產品是否能符合細菌內毒素試驗之規範。試驗結果可做為主管機關修訂檢驗標準及推動之參考。期盼修訂「動物用藥品檢驗標準」後，能符合藥典規範及國際趨勢並縮小與人用藥品差距，藉此提升國內動物用注射劑品質。根據中華藥典通則 8003 細菌內毒素試驗各項規範：依序進行內毒素標準品連續稀釋、內毒素檢測試劑靈敏度核驗。未來若搭配適當製造藥廠教育訓練，修訂「動物用藥品檢驗標準」與中華藥典規範要求一致，可望與國際趨勢接軌。

關鍵字：注射劑，動物用藥品檢驗標準，中華藥典，細菌內毒素試驗

緒言

我國「動物用藥品檢驗標準」，早期因扶植國內動物用藥製造產業成長等時空背景因素下，對於注射劑檢驗項目要求並未完全依照藥典規範，省略部分試驗 [2]。在現今產業逐漸國際化下，業者客戶對象拓展至世界各國而不再侷限於國內市場時，現行「動物用藥品檢驗標準」對注射劑之要求與藥典比較下寬鬆許多。因此，「動物用藥品檢驗標準」勢必面臨修訂與現行藥典要求一致，使我國產品能符合國際普遍要求。

未來對於「動物用藥品檢驗標準」一般藥品注射劑部分檢驗項目，可能因順應國際動物保護概念，勢必移除現行藥典已無須執行之動物安全試驗 (safety test)，以降低實驗動物使用；但考量注射劑品質及動物使用上安全性，應回歸執行藥典注射劑要求之熱原試驗 (pyrogen test) 等項目 [1]。傳統熱原試驗以紐西蘭白兔作為實驗動物，量測試驗前後體溫變化作為判定通過試驗與否方法，對於現今動物保護意識已有所衝突。儘管免熱原試驗仍為藥典規範各式熱原檢測方法有所爭議之指定最終判定方法 [1, 7, 9, 11, 12]。但現今製藥業多以藥典規範之細菌內毒素試驗 (bacterial endotoxin test, BET) 作為傳統免熱原

試驗之替代方式。隨科技進步，藥典亦收錄利用組織培養方式之單核球活化試驗 (monocyte activation test, MAT) 作為替代傳統免熱原試驗之新方法 [9]，惟細菌內毒素試驗在人用藥製造業已運行多年，不考慮檢驗技術、成本及試劑取得等因素下，需於短時間內進行方法轉換亦非易事。動物用藥品若要與國際規範及方法接軌，推動應以普及度較廣的細菌內毒素試驗為初期目標。

內毒素是指革蘭氏陰性細菌細胞壁上的脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)，其結構會引起生物體免疫反應，如產生細胞激素 (cytokines) (如 IL1、IL6、IL8、TNF 等)、凝集反應活化、補體系統活化進而造成生物體發熱、低血糖、低血壓甚至瀰漫性血管內凝集血栓症、敗血性休克等嚴重症狀 [3, 4, 5]。細菌內毒素只有在細菌成長、分裂、死亡等細胞壁溶解狀況下才會被釋出，一旦無菌製劑製造設備或產品滋生細菌，破壞原先無菌狀態，則內毒素可能伴隨出現。細菌內毒素對熱穩定性極高，普通高溫高壓環境下仍能保持活性，須至 250 °C 以上乾熱處理方能使之不活化，一旦產生於製藥設備中，將造成系統性汙染需耗費大量人力物力方可清除。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

細菌內毒素試驗最早收錄於1980年之美國藥典20版 (USP20NF15)，迄今已逾40年，期間試驗方法及標準亦逐漸與其他各國際公定藥典如歐洲藥典、英國藥典或日本藥典等調合化 (harmonization)，對於本試驗檢測技術以及使用商用試劑確認已有公定方法及條件，已為趨於成熟及穩定技術。本試驗技術由最早運用以人工判讀的凝膠法 (gel-clot technique) 之定性/半定量試驗發展至由儀器判讀的光度定量法 (photometric quantitative techniques) 之定量試驗 (含濁度法 (turbidimetric technique) 及呈色法 (chromogenic technique))，可供不同目的及階段的檢驗需求。人用藥品製造業已執行本試驗多年，其檢測方式多以可定量之光度法為主；而動物用藥品製造產業未來若執行本試驗，考量建置成本及產業發展狀況，應自凝膠法開始起步為佳。本研究以建置動物用藥品國家檢驗單位執行細菌內毒素試驗凝膠法為目的，並同時在法規修訂前對現行市售動物用藥品注射劑進行細菌內毒素狀況進行調查，結果可做為未來修訂法規參考。

材料與方法

原理

利用鱗 (*Limulus polyphemus*) 之循環阿米巴變形細胞 (circulating amebocyte) 水性抽提液製成之 LAL (limulus amebocyte lysate) 試劑，與細菌內毒素結合可形成凝膠之特性，以已知濃度之內毒素標準品 (經適當連續稀釋) 及檢品原液或經適當稀釋之檢液，與已知靈敏度之 LAL 試劑同時作用相比對，以測定檢品內所含細菌內毒素含量是否超標。

實驗材料

內毒素標準品 (certified standard endotoxin, CSE)：商用內毒素2個廠牌 (C牌、E牌)、細菌內毒素檢驗法用水 (BET用水, LAL reagent water, LRW)、細菌內毒素檢驗試劑 (BET試劑, limulus amebocyte lysate, LAL)：商用試劑2個廠牌 (C牌、E牌)、無菌去熱原注射針筒 (5 mL)、硼矽玻璃材質反應管：10×75 mm、去熱原級 PS 塑膠材質稀釋管：13×100 mm, 15 mL、去熱原級微量吸管尖：200

μL、1000 μL。

儀器設備

移液管 (pipette)：200 μL、1000 μL，振盪器 (vortex)，37 °C 非循環式恆溫水浴槽或加熱設備。

內毒素標準品復溶及儲備溶液製備

取商用包裝細菌內毒素標準品並依原廠使用說明加入所需BET用水後，進行劇烈震盪均勻，並儲存於2-8 °C，於此保存條件下原廠建議可使用一個月，本實驗室自訂使用期限3週。

內毒素標準品連續稀釋

根據搭配之細菌內毒素檢驗試劑靈敏度 (λ) 對標準品進行連續稀釋，配製至2 λ、λ、0.5 λ、0.25 λ，兩種商用包裝廠牌連續稀釋如表1、二。

內毒素檢測試劑復溶

取商用包裝內毒素檢測試劑，依原廠使用說明加入所需毫升數之BET用水後，確認內容物溶解後待用。復溶之試劑於2-8 °C可保存24小時，超過開啟時間24小時者應丟棄。

內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗

每批內毒素檢測試劑使用前或當試驗條件改變而可能影響結果時，依照藥典規範皆需核驗其標誌靈敏度。取內毒素標準品依試劑靈敏度 (C牌：0.03 EU/mL；E牌：0.015 EU/mL) 連續稀釋配製至2 λ、λ、0.5 λ及0.25 λ之稀釋液並連同陰性對照組 (BET用水) 取100 μL加入無熱原玻璃試管中，再加入100 μL之內毒素檢測試劑，輕輕混合均勻，各濃度均進行四重複試驗。於37 ± 1 °C反應60 ± 2分鐘後，小心移出觀察。若最低濃度 (0.25 λ) 內毒素標準品溶液及陰性對照之四重複結果均呈陰性，則本試驗有效。幾何平均終點濃度必須介於LAL試劑標誌靈敏度0.5 λ至2 λ之間，則該批試劑之標誌靈敏度通過核驗。內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗配製及判定如表3。

干擾因子試驗 (抑制/增強性試驗)

本試驗針對個別產品執行，用以確認該產品選定

之試驗稀釋倍數是否適合產品特性而不至於產生偽陰性或偽陽性結果。依藥典規範，當注射劑產品不論原料、製程或試驗條件改變而可能影響試驗結果時，皆應重新進行干擾因子試驗。試驗方法同內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗：除檢品溶液執行4重複外，尚須進行檢品添加標準品連續稀釋組4重複、去熱原水添加標準品連續稀釋組4重複以及去熱原水組2重複（陰性對照組）。根據藥典規範，樣品稀釋倍數不得超過藥典規範所計算出最大有效稀釋度（maximum valid dilution, MVD）。若檢品溶液組及陰性對照組皆為陰性，且去熱原水添加標準品連續稀釋組符合檢測試劑標誌靈敏度，則試驗有效；檢品添加標準品連續稀釋組之內毒素幾何平均終點濃度必須介於LAL試劑標誌靈敏度 0.5λ 至 2λ 之間，代表該稀釋條件無干擾因子存在。干擾因子試驗配製及判定如表4。

限量試驗（定性試驗）

當產品稀釋倍數已決定且通過干擾因子試驗後，則可依規範做為產品例行性之成品檢驗規格，判斷各生產批次產品中內毒素是否超標。試驗方法同內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗，依檢品最適當但不超過最大有效稀釋度之稀釋倍數進行。限量試驗配製及判定如表5。

內毒素含量之計算

幾何平均終點濃度：用於計算陽性對照組、陽性檢品對照組等之幾何平均終點濃度，該值須介於 $0.5 \lambda \sim 2 \lambda$ 之間。

幾何平均終點濃度 (E) = $\text{antilog}(\Sigma e/f)$

E：各重複試管之陽性對照組或陽性檢品對照組之終點濃度，即最後凝集之濃度

e：終點濃度 (E) 之對數值

Σe ：各終點濃度對數值之總和

f：重複試驗數

判定標準

各反應管於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 反應 60 ± 2 分鐘後小心移出試管，緩緩倒轉 180° 後目視觀察凝膠狀態，試管內容物為穩固之凝膠體者為陽性 (+)，而形成凝膠體或凝膠體無法保持其凝固性者為陰性 (-)。取試管時

需減少不必要振動，否則易造成不當之陰性判定。當最低濃度 (0.25λ) 內毒素標準品溶液及陰性對照組之重複結果均呈現陰性，則試驗有效，反之無效需重新進行試驗。

結果

本研究自106年度行政院農業委員會動植物防疫檢疫局主管科技計畫，建置實驗室依據中華藥典規則8003細菌內毒素試驗之執行能力，培訓實驗室操作人員能力符合藥典內各項要求規範：

內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗

依據藥典規範，各批次試劑於初次使用時須進行本項核驗工作，主要目的為確認試劑是否符合標示靈敏度；另一方面可用以確認操作人員手法是否純熟，本計畫中，以本項目作為人員反覆練習手法項目：根據藥典，本項目完整操作需於時間內完成配製20反應管（如表3），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘。操作結果如標準品序列稀釋、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求，方可進行至下一步干擾因子試驗及限量試驗之演練。

干擾因子試驗

產品稀釋倍數應由製造廠自行評估，目前法規尚未要求執行情況下，除輸入產品已有國外原廠規範內毒素限量值外，國內製造產品無相關資訊可參考。

本計畫中，以隨機樣品進行干擾因子試驗練習，以藥典規範最寬鬆條件即最大稀釋倍數 (MVD) 作為練習條件。根據藥典，030反應管（如表4），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘，對操作人員操作手法考驗較大。操作結果如標準品序列稀釋、樣品添加、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求。

限量試驗結果

相較於試劑靈敏度核驗及干擾因子試驗等先期評估工作，限量試驗作為產品未來例行性檢驗方法，相對簡單。根據藥典，本項目完整操作需於時間內完成配製8反應管（如表5），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘，對於已可熟稔操作前兩項試

驗之操作者來說，較無太大難度。操作結果如標準品、樣品添加、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求。

不同商用廠牌之內毒素檢測試劑差異性

本研究使用兩種不同廠牌商用包裝內毒素標準品及檢測試劑（C牌及E牌）進行相關試驗，不同廠牌之凝膠法商用檢測試劑，皆為同樣原理檢測細菌內毒素，配製處理上可能有部分差異。測試結果，兩廠牌試劑進行干擾因子試驗與限量試驗，結果相同，無顯著差異。

討論

執行細菌內毒素凝膠法試驗時，所需注意細節眾多，若忽略掉某些部分易造成偽陰性或偽陽性而使試驗結果不可信：（1）試驗場所儘量避免氣流之擾動，減少空氣中異物或其他足以影響試驗結果之物質逸入；（2）試驗反應之溫度要求 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下加熱 60 ± 2 分鐘，使用的加熱器（水浴槽或乾浴器）溫度調控精確度需被要求；（3）人員熟練度需藉由不斷練習操作，判讀時僅能以第一時間顛倒反應管所見結果進行判定，且需由相同人員觀察判定，所有判定需於1-2分鐘內完成。避免各試驗管反應加熱時間不一造成誤判；（4）所有耗材如微量分注器吸管、稀釋用試管、稀釋用水或玻璃反應管皆為去熱原等級，避免因背景值汙染而誤判；（5）若考量試驗成本，反應用玻璃管可清洗滅菌再重複使用，但因內毒素需以 250°C 高溫情況下方能破壞，需使用經過溫度確效之高溫烘箱，方能避免玻璃反應管在重複使用下，有殘留內毒素之情形。

對於國外或國內人用藥品來說，細菌內毒素試驗為已經發展純熟的試驗項目。對人用藥品而言，因前端開發階段技術性資料較為完備，對於人體對藥品耐受度等皆有明確的科學推算結果，即便藥典內無特定成分之內毒素限量值，也能依前述資料以公式推算出產品之內毒素限量值。細菌內毒素試驗在藥廠執行範圍涵蓋原料及成品：（1）原料部份：無菌原料及注射用水（含例行性水質監控）須依藥典規格執行；（2）成品部分，製劑處方已收錄至藥典者，可依藥典規範限量值制定；藥典未收錄之處方，可由廠商依藥典規

範之產品單位時間最大總投給劑量自行計算評估或委託具相關經驗單位協助，惟該類評估多為計算之理想值，是否能將產品內毒素控制於理想值內，仍依各製造廠環境及製藥設備條件等因素不同而異。

複方注射劑之主成分雖各自有不同藥典內毒素限量值規範。但產品之內毒素限量值應於藥廠研發階段評估制定，雖主成分有各自內毒素限量值，但因各成分於配方中比例不同，無法以單一成分內毒素限量值代表整體，因此可依藥典計算產品於試驗中最大稀釋倍數計算之公式，以單位時間最大總投給劑量計算該產品內毒素限量值，故最終僅有一個產品限值。

不同於人用藥品，動物用藥品之使用對象涵蓋多種別動物，依FDA Guidance [10]：若藥物主成分於藥典無規範限量值而需自行推估情況下，考量不同動物種別之劑量使用量及耐受度差異，推估產品限量值應以最嚴苛條件評估，即體型最小、單位體重耐受度最低或年幼動物之情況。我國目前無公告類似指引，相關資訊可做為業者評估產品限量值或主管機關查驗登記審查時參考。

在動物保護及實驗動物減量趨勢下，具爭議性之熱原試驗未來將逐漸被其他方法替代。所幸，動物用一般藥品過往並未要求執行熱原試驗，未來也不建議推廣。近年收錄至藥典之單核球活化試驗為替代熱原試驗新技術，雖檢測熱原範圍可涵蓋內毒素性汙染物及非內毒素汙染物，但檢驗成本相對高昂許多（如方法轉換、設備需求及操作技術），一般化學藥品製造廠較難以負擔作為例行性檢驗用途。本試驗多應用於特殊情況如產品具內源性致熱物質導致細菌內毒素試驗嚴重干擾且無法排除而需進行熱原試驗之產品，可見於人用藥品高單價之細胞治療或蛋白質製劑。目前所見輸入動物用注射劑規格，仍以細菌內毒素試驗為主，尚未見國外運用本檢驗技術應用於動物用藥品之情形。

一般來說，無菌製劑若能嚴格管控原料、製程中細菌汙染問題，則能有效降低細菌滋生或細菌內毒素超標所造成之不良發熱反應風險。因此，細菌內毒素試驗長期以來作為熱原試驗之替代方法，但本試驗原始意義在於檢測無菌產品自原料、包材及製程中設備

等是否曾經因細菌汙染而存在細菌內毒素，並非作為替代熱原試驗而存在。目前動物用藥品注射劑大多為利用注射用水製備之水性注射劑，且主成分多屬小分子藥物，如常用化學藥品或抗生素，以細菌內毒素試驗大多可有效檢測產品中細菌內毒素是否超標。單核球活化試驗雖可涵蓋細菌內毒素檢測範圍，但檢驗成本相對高昂許多，於動物用一般藥品推動執行細菌內毒素試驗初期，恐較難為業者優先採用。

未來動物用藥品檢驗標準擬加入細菌內毒素試驗項目，目的為要求業者能確認產線至產品之無菌性。作為國家動物用藥品檢驗單位在法規推動階段，除評估細菌內毒素更精確之定量檢驗技術外，亦可配合其他計畫輔導或訓練業者品管人員操作能力。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助(106農科-9.11.1-檢-B3)，特此致謝。

表 1、C 牌 CSE1000 EU/mL 包裝，連續稀釋配製。

CSE 濃度 (EU/mL)	1000	50	25	2.5	0.12	0.06 (2λ)	0.03 (λ)	0.015 (0.5λ)	0.0075 (0.25λ)
前一階吸取量	-	0.1 mL	1 mL	0.2mL	0.24 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
BET 用水	-	1.9 mL	1mL	1.8mL	4.76 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

表 2、E 牌 CSE20 EU/mL 包裝，連續稀釋配製。

CSE 濃度 (EU/mL)	20	2	0.6	0.06	0.03 (2λ)	0.015 (λ)	0.0075 (0.5λ)	0.00365 (0.25λ)
前一階吸取量	-	0.2 mL	0.6 mL	0.2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
BET 用水	-	1.8 mL	1.4 mL	1.8 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

表 3、C、E 廠牌內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗配製及判定。

溶液	CSE 終濃度	稀釋液	重複試驗數	判定通過標準
陽性對照組	2λ	BET 用水	4	全陽性
(檢測試劑添	λ	BET 用水	4	陽性 or 陰性
加內毒素標	0.5λ	BET 用水	4	陽性 or 陰性
準品)	0.25λ	BET 用水	4	全陰性
陰性對照組	—	BET 用水	4	全陰性

表 4、C、E 廠牌干擾因子試驗（抑制增強性試驗）配製及判定。

試液編號	內毒素濃度/添加 內毒素之溶液	稀釋液	稀釋倍數	最終內毒素 濃度	重複試驗數	判定通過標準
A	無/檢品溶液	—	—	—	4	全陰性
			1	2λ	4	全陽性
B	2λ/檢品溶液	檢品 溶液	2	1λ	4	陽性 or 陰性
			4	0.5λ	4	陽性 or 陰性
			8	0.25λ	4	全陰性
C	2λ/BET 用水	BET 用水	1	2λ	2	全陽性
			2	1λ	2	陽性 or 陰性
			4	0.5λ	2	陽性 or 陰性
			8	0.25λ	2	全陰性
D	無/BET 用水	—	—	—	2	全陰性

表 5、C、E 廠牌限量試驗配製及判定

試液編號	內毒素濃度/ 添加內毒之溶液	重複試驗數	判定通過標準
A	無/稀釋之檢品溶液	2	全陰性
B	2λ/稀釋之檢品溶液	2	全陽性
C	2λ/BET 用水	2	全陽性
D	無/BET 用水	2	全陰性

參考文獻

- 中華藥典編修委員會。中華藥典（第8版）。衛生福利部，臺北市。2016。
- 行政院農業委員會。動物用藥品檢驗標準。行政院農業委員會農防字第1081470943號令修正發布。2019。
- 邱清裕。內毒素特性與檢測方法之簡介。腎臟與透析，民國97年20卷3期。2008。
- 連淑華等。小型注射劑產品之發熱性物質檢驗。藥物食品檢驗局調查研究年報，24: 79-96。2006。
- 連淑華等。2006。大型輸注液之熱原試驗。藥物食品檢驗局調查研究年報，24: 97-109。2006。
- Associates of Cape Cod. (www.acciusa.com)
- British Pharmacopoeia Commissio. British Pharmacopoeia (BP2019). Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), London, U.K. 2019.
- Charles River Laboratories.(www.endosafe.com)
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. European Pharmacopoeia (EP10.0). European Directorate for the Quality of Medicines&HealthCare (EDQM) Council of Europe. France. 2019.
- Food and Drug Administration.Guidance for Industry. Pyrogen and Endotoxin Testing: Question and Answers. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. U.S.A. 2012.

注射劑細菌內毒素試驗凝膠法評估

11. The Minister of Health, Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia (JP17). The Minister of Health, Labour and Welfare. Japan. 2016. Pharmacopeia (USP42-NF37). The United States Pharmacopeia Convention Inc. Rockville, U.S.A. 2019.
12. The United States Pharmacopeia Convention. The United States

Injection Bacterial Endotoxin Test Evaluation (Gel-Clot Method)

YH Chen^{*}, CH Lin, YL Chen, HL Chan, WH Lin, SR Yen

Animal Drugs Inspection Branch, National Institute for Animal Health, Council of Agriculture,
Executive Yuan

Abstract The purpose of this study was to establish national testing laboratory capacity to perform bacterial endotoxin test and to investigate commercially animal injection products. To make sure these products meet the specifications of the bacterial endotoxin test on pharmacopeia. The results can be used as a reference for the revision of the Test standards of veterinary drugs by the authority. It hoped that the revised test standard will meet the pharmacopoeia and international trends. And promote the quality of veterinary drugs and decrease the gaps from human. According to the General chapter 8003 (Bacterial Endotoxin Test) in Chinese Pharmacopeia requirement. In the future, with appropriate training for the manufactures, it is feasible to revise the Test standards of veterinary drugs with the same requirement as the Chinese Pharmacopoeia and follow international tend.

Keywords: *injection, test standards of veterinary drugs, Chinese Pharmacopoeia, bacteria endotoxin test.*