



Pyrogen and Endotoxin Testing

热原与内毒素检测



【特约经销商】：

北京毕特博生物技术有限责任公司
热线电话：400-833-9299
电话：010-82015225/13366202681
邮箱：info@bitebo.com
网址：<http://www.bitebo.com>





R&D Service

质量研究服务

研究项目

项目	研究内容
原料药的质量控制	合规细菌内毒素检测解决方案制定
辅剂的质量控制	合规细菌内毒素检测解决方案制定
包材的质量控制	合规细菌内毒素检测解决方案制定
烘箱等除热原设备验证	合规生物验证解决方案制定，提供验证需求规格ECV定制

研究流程





Testing Service

检测服务

产品分类	检测项目	检测分类
化学药	细菌内毒素	原料验收、质量监测、备案检验、放行检验
注射剂	细菌内毒素	原料验收、质量监测、备案检验、放行检验
医疗器械	细菌内毒素	质量监测、备案检验、申报检验、放行检验
透析相关领域	细菌内毒素	耗材验收、质量监测、备案检验、放行检验
细胞治疗领域	细菌内毒素	原料验收、质量监测、备案检验、放行检验

服务流程



How do pyrogens act?

热原是如何产生影响的？

Pyrogen 热原

Bacterial Endotoxin 细菌内毒素

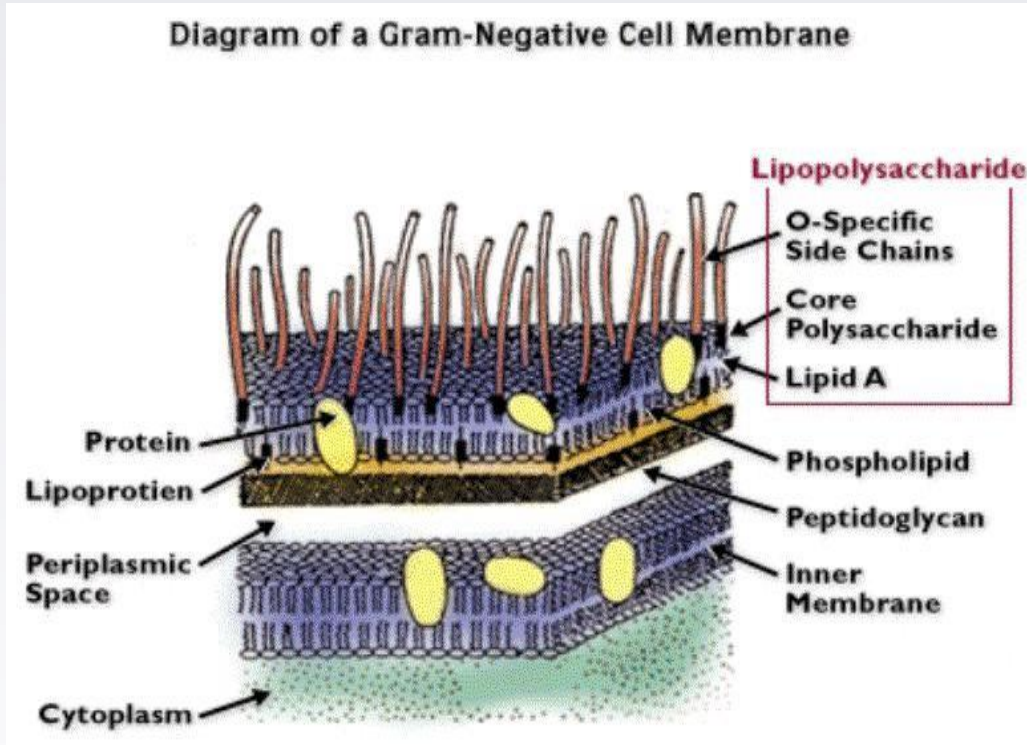
Lypopolysaccharide (LPS) 脂多糖

Ligand 配合基: TLR 4 Toll样受体

4

热原反应

热原经静脉注射进入人体内后，通常在0.5~2小时内发生寒颤、发热、头痛、恶心、呕吐等一系列临床症状，体温可能上升至40℃左右，严重时会出现昏迷、休克，甚至死亡等一系列症状，这种现象称为热原反应。



How do pyrogens act?

热原是如何产生影响的?

Pyrogen $\rightarrow$ TLR $\rightarrow$ Monocyte $\rightarrow$ Activated Monocyte $\rightarrow$ IL-6, IL1- β ,
TNF α -,

INF- γ $\rightarrow$ Hypothalamus $\rightarrow$ Fever

热原 $\rightarrow$ toll样受体 $\rightarrow$ 单核细胞 $\rightarrow$ 被激发的单核细胞 $\rightarrow$ IL-6（白细胞介素-6），
IL1- β （白细胞介素，是一种致炎细胞因子，广泛参与人体组织破坏、水肿形
成等多种病理损失过程，它可促进防御素-4的生成，但总体上，破坏大于防
御），TNF- α （肿瘤坏死因子或TNF家族指一组可以引起细胞死亡或凋亡
的细胞因子。一种多向性的促炎性细胞因子）INF- γ （ γ 干扰素） $\rightarrow$ 丘脑下
部 $\rightarrow$ 发烧

How do pyrogens act?

热原是如何产生影响的?

Parenteral pharmaceutical products must be free of pyrogenic contaminants

所有的注射药均必须是无热原

A pyrogen is linked to an immune defense mechanism and induces fever

热原可触动免疫防御机制以及引起发烧

Pyrogens stimulate monocytes through toll-like receptors (TLR)

热原通过toll样受体刺激单核细胞

Activated monocytes release pro-inflammatory cytokines that initiate the febrile response

被激活的单核细胞释放触发炎性的细胞活素类，从而产生发热反应

设备&软 件 参数





设备参数

1. 智能滤光片架，有四组滤光片位，自动识别

预装荧光波长：Ex 360nm 带宽 35nm；Em 460 nm 带宽 10 nm

预装光吸收波长：405 nm

可选配荧光波长：Ex 230 – 850 nm, Em 280 – 850 nm

可选配光吸收波长：230 – 1000 nm

2. 光源：UV 高能闪烁氙灯

3. 检测器：光吸收 – 紫外硅光电二极管

4. 荧光 – 光电倍增管 (PMT)

5. 板型：6 - 384孔板，比色杯及微量检测板

6. 温控范围：室温 +5 °C 至 42 °C

7. 振板方式：线性及环性

8. 荧光灵敏度

荧光顶部阅读：85 amol / 孔 (0.85 pM, 384孔板)

荧光底部阅读：0.7 fmol / 孔 (3.5 pM, 96孔板)

9. 光吸收

260 / 280 nm 比值精度：± 0.07；260 nm 精确度：< 0.2 %；260 nm 准确度：< 0.5 %

检测范围 0–4 OD

最快读板速度：96 孔板：20 秒；384 孔板：30



软件参数

1. 模板设置

可根据用户习惯预设板布局及实验方案。一键运行实验，方便快捷

2. 报告导出

可以自动计算实验结果并导出实验报告

3. 用户管理

新建用户，指定用户的工作组，限定该用户的软件使用权限

4. 权限管理

用户权限管理可新建组，按不同分级设立工作组，每组分配指定权限

5. 密码安全

每个用户有独立的密码，密码管理系统，可设置密码过期时间及其他密码设置规则

6. 审查跟踪

追踪所有系统、方案、数据的增减记录，定制审查跟踪记录，对软件的关键做审查跟踪记录。追踪所有系统、方案、数据的增减记录，并有审查记录导出功能，符合GMP要求



电脑要求

操作系统：win7 64位系统及以上

CPU：2.0 GHz 或更高速度 RAM：

2GB或更大内存

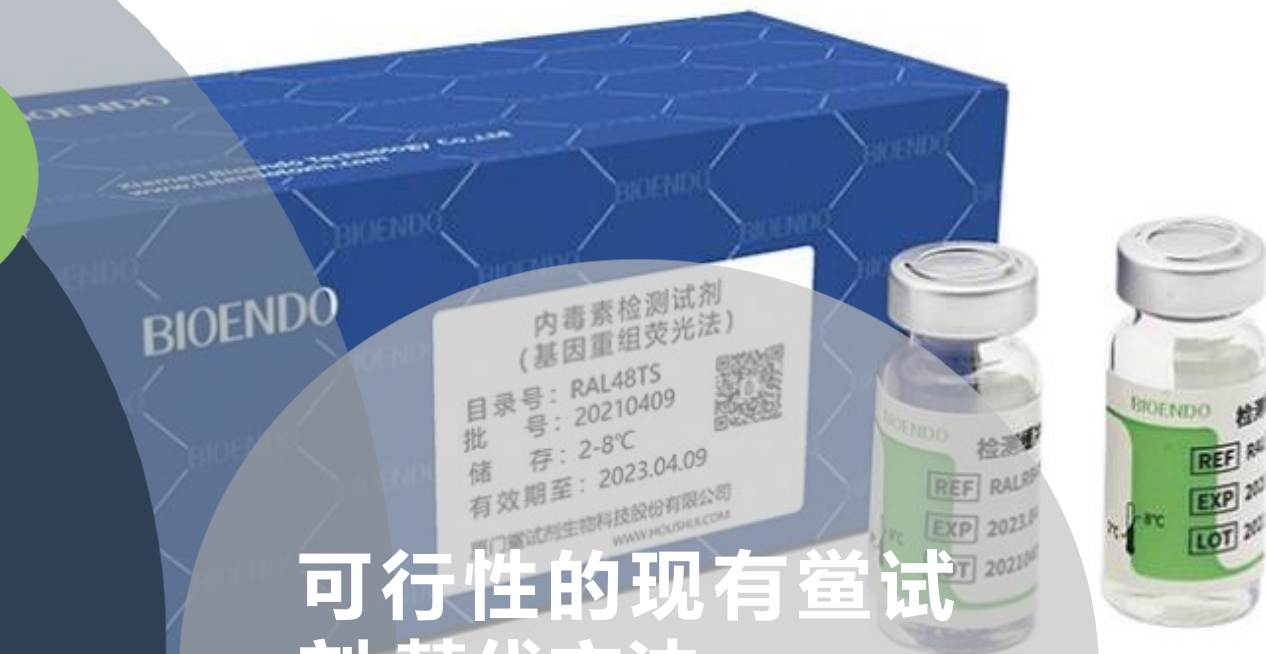
显示器：1280 x 1024 或更高

硬盘空间：10GB可用空间

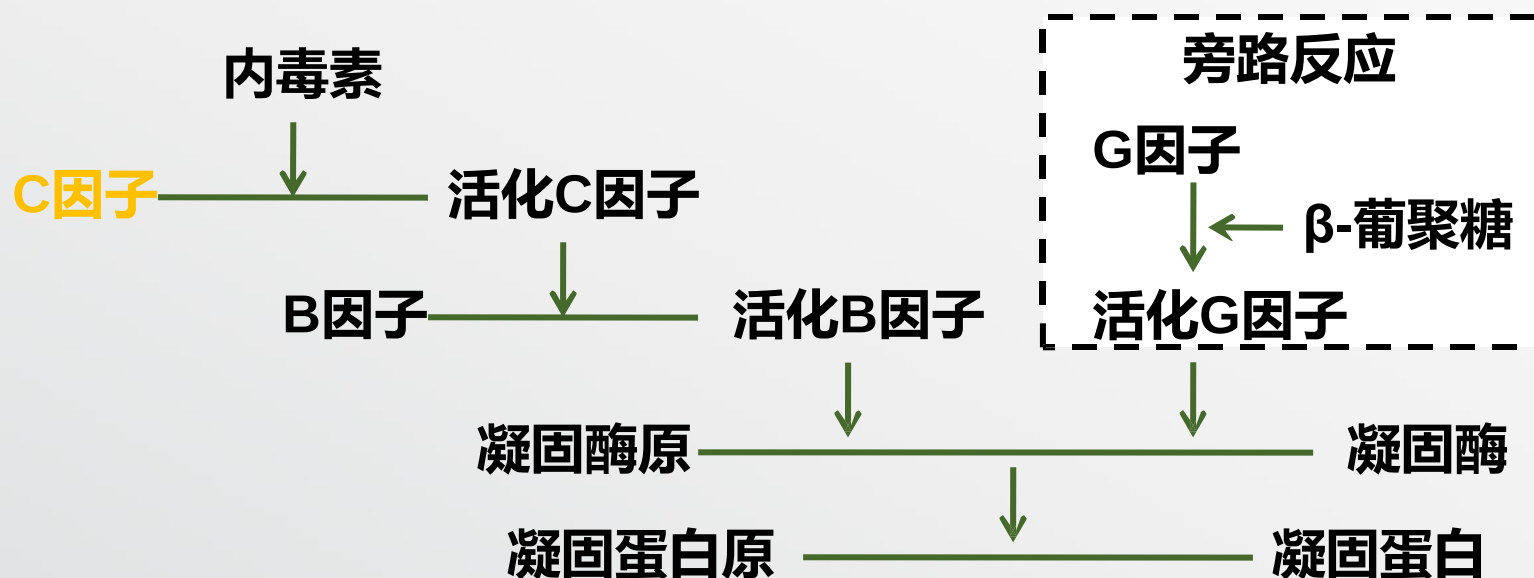


基因重组鲎试 剂 RAL

可行性的现有鲎试
剂 替代方法



9251注射剂安全性检查法应用指导原则：重组C因子法 rFC



C因子是鲎试剂对细菌内毒素敏感的蛋白，能够识别内毒素。重组C因子是利用基因重组技术而获得，它被细菌内毒素活化后，可与特定荧光底物作用产生跟内毒素浓度比例正相关的荧光信号，从而实现定量检测。



不使用天然鲎血细胞的内毒素检测试剂

试剂形态为冻干状

运输便捷成本低

试剂保存期二年



检测限达0.005EU/ml
灵敏度为行业内最高水平

大约30分钟完成检测

其他厂家为60min

只对内毒素起反应，避免G因子旁路干扰

重复性好：重组表达，批间重复性好
操作简单，系统自动检测分析，一步到位

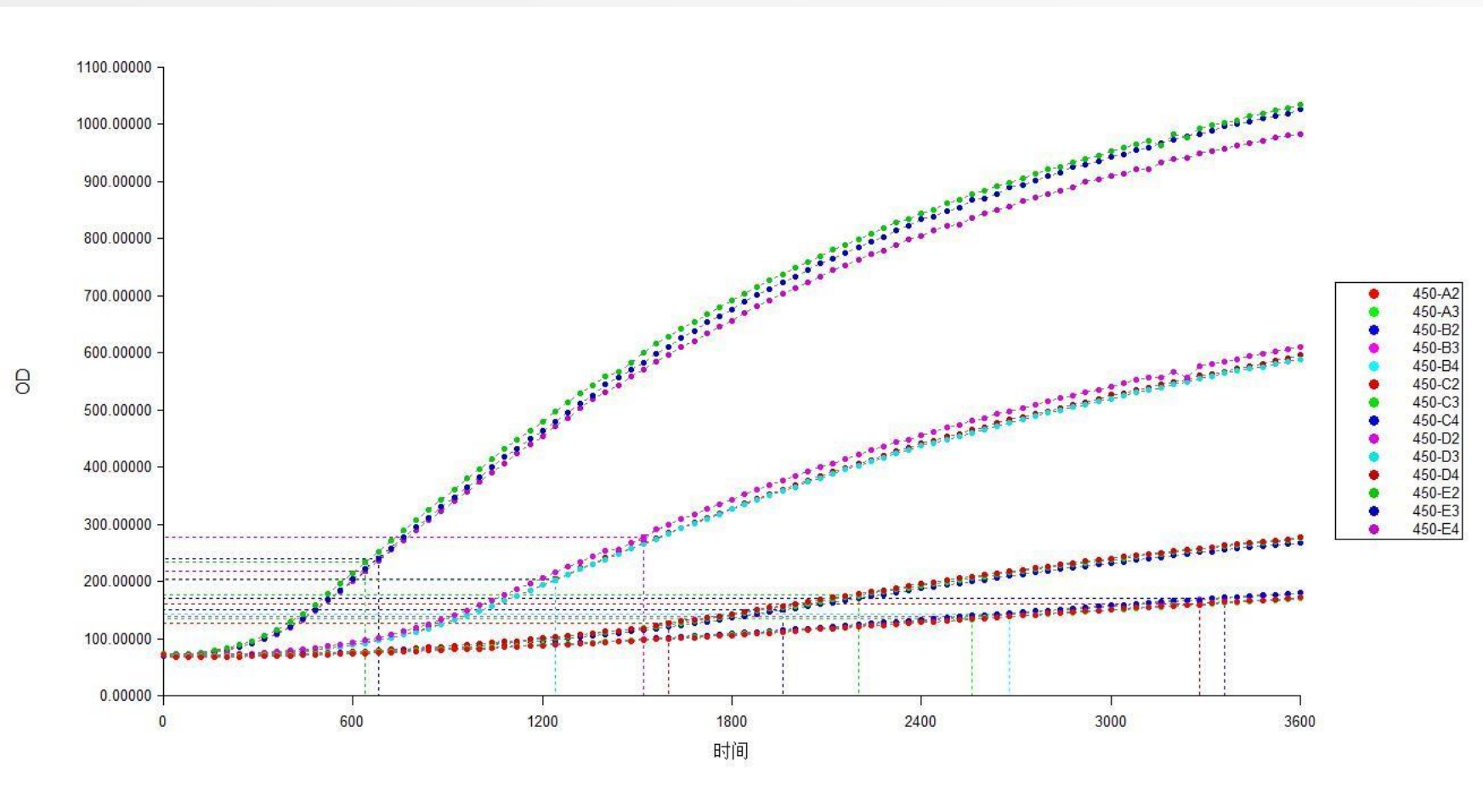
基因重组鲎试剂性能

线性回归 (R 值): 大于**0.980**

平行孔重复性 (CV 值): 小于

10%反应时间: **30min**以内

标准曲线区间: **0.005-5EU ml**





基因重组荧光法细菌内毒素检测方法学建立的程序

标准曲线可靠性试验
干扰试验-样品的验证
日常检查



荧光法细菌内毒素快速检测系统

1.系统组成:

- 检测设备主机;
- 检测软件;
- 计算机;

2.主要试剂耗材:

- 基因重组荧光法鲎试剂;
- 细菌内毒素标准品;
- 细菌内毒素检查微孔反应板

3.检测方法: 基因重组荧光法;

4.实验操作: 按照药典光度法要求

- 打开计算机和仪器荧光法细菌内毒素检测系统
- 反应溶液制备
- 复溶鲎试剂
- 进入软件打开对应实验检测方案
- 移取鲎试剂和样本溶液
- 放置孔板至检测设备主机, 采集数据
- 采集结束, 结果分析, 判断

基因重组法RAL 与 重组C因子法 rFC

C因子是鲎试剂对细菌内毒素敏感的蛋白，能够识别内毒素。重组C因子是利用基因重组技术而获得，它被细菌内毒素活化后，可与特定荧光底物作用产生跟内毒素浓度比例正相关的荧光信号。

基因重组荧光法**RAL**采用基因重组技术，在真核细胞表达鲎血细胞中与内毒素起反应的丝氨酸蛋白酶催化级联蛋白。其中重组C因子与内毒素结合之后，由无活性的蛋白酶原转变成具有生物活性的蛋白酶，识别并催化下游荧光底物产生荧光信号。荧光信号的强度和内毒素浓度成正相关，从而定量检测内毒素。基因重组内毒素检测法**RAL**不采用天然鲎血细胞，保护了鲎资源，是新一代的内毒素检测技术及可行性的替代方法。



改变细菌内毒素检测方法需要大量的评估和验证

- 评估细菌内毒素检测方法的改变是否适用于所有检测样品
- 对新的检测方法制定检测标准
- 重新制定SOP
- 验证检测设备
- 人员培训

新方法的提出和使用时，有很多验证工作，这是一个漫长而严谨的过程