

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95118546.2

[45] 授权公告日 2002 年 3 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1081333C

[22] 申请日 1995.10.30 [24] 颁证日 2002.3.20
[21] 申请号 95118546.2
[30] 优先权
[32] 1994.10.31 [33] JP [31] 290596/94
[73] 专利权人 和光纯药工业株式会社
地址 日本大阪
[72] 发明人 高冈文 土谷正和
川边惠子 共尻晴久
审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 段承恩

权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 测量含于样品中的内毒素或(1→3)-β-D 葡聚糖的方法及其试剂

[57] 摘要

一种测量含于样品中的内毒素或(1→3)-β-D-葡聚糖(以后称作 β-葡聚糖)的方法,包括将样品在至少一种选自聚乙二醇,聚乙烯醇,甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物存在下与马蹄蟹的变形细胞溶胞产物混合,用光照射得到的混合物,测量直到样品与变形细胞溶胞产物混合后,或样品与变形细胞溶胞产物混合经过预定时间之后,产生的混合物的光学变化程度达到一个预定值所需的时间,以该时间与内毒素或 β-葡聚糖的量之间的关系为基础测定含于样品中的内毒素或 β-葡聚糖的含量。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 测量含于样品中的内毒素或 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖的方法，包括：

将样品在至少一种选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物存在下与马蹄蟹的变形细胞溶胞产物混合，其中不共用离子型表面活性剂，

当使用聚乙二醇时，在胶凝反应中聚乙二醇的浓度分别为，当聚乙二醇的重均分子量为 3000 时，其浓度为 $0.5 - 4w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 7500 时，其浓度为 $0.3 - 4w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 20000 - 70000 时，其浓度为 $0.3 - 1.5w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 500000 - 4000000 时，其浓度为 $0.2 - 0.5w/w\%$ ，

当使用聚乙烯醇时，在胶凝反应中聚乙烯醇的浓度分别为，当聚乙烯醇的聚合度为 500 时，其浓度为 $1 - 3w/w\%$ ，当聚乙烯醇的聚合度为 2000 时，其浓度为 $0.2 - 1w/w\%$ ，

当使用甲基纤维素时，在胶凝反应中甲基纤维素的浓度分别为，当甲基纤维素的粘度为 15cps 时，其浓度为 $0.2 - 1w/w\%$ ，当甲基纤维素的粘度为 100cps 时，其浓度为 $0.1 - 1w/w\%$ ，

当使用羟丙基纤维素时，在胶凝反应中羟丙基纤维素的浓度为 $0.1 - 1w/w\%$ ，

用光照射得到的液体混合物，

测量在样品与变形细胞产物混合后，或样品与变形细胞溶胞

产物混合后经过预定的时间之后，直到产生的液体混合物的光学变化程度达到一个预定值所需的时间，和

以该时间与内毒素或 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖的量之间的关系为基础测定含于样品中的内毒素或 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖的含量。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中光学变化由透光度变化，吸收变化，比值 $R_t = I_t/I_0$ 的变化程度，或比值 R_t 的对数值的变化程度引起，其中 I_0 是初始阶段的透光度而 I_t 是样品与变形细胞溶胞产物混合经过时间 t 之后，或样品与变形细胞产物混合经过预定时间之后的透光度。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中水溶性聚合物是聚乙二醇。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中聚乙二醇具有重均分子量 3000 至 4000000。

5. 一种用于测量含于样品中内毒素或 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖的试剂，包含马蹄蟹的变形细胞溶胞产物和至少一种选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物，其中不共用离子型表面活性剂，

当使用聚乙二醇时，在胶凝反应中聚乙二醇的浓度分别为，当聚乙二醇的重均分子量为 3000 时，其浓度为 $0.5 - 4w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 7500 时，其浓度为 $0.3 - 4w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 20000 - 70000 时，其浓度为 $0.3 - 1.5w/w\%$ ，当聚乙二醇的重均分子量为 500000 - 4000000 时，其浓度为 $0.2 - 0.5w/w\%$ ，

当使用聚乙烯醇时，在胶凝反应中聚乙烯醇的浓度分别为，

当聚乙烯醇的聚合度为 500 时，其浓度为 $1 - 3w/w\%$ ，当聚乙烯醇的聚合度为 2000 时，其浓度为 $0.2 - 1w/w\%$ ，

当使用甲基纤维素时，在胶凝反应中甲基纤维素的浓度分别为，当甲基纤维素的粘度为 15cps 时，其浓度为 $0.2 - 1w/w\%$ ，当甲基纤维素的粘度为 100cps 时，其浓度为 $0.1 - 1w/w\%$ ，

当使用羟丙基纤维素时，在胶凝反应中羟丙基纤维素的浓度为 $0.1 - 1w/w\%$ 。

说明书

测量含于样品中的内毒素或

(1→3)- β -D-葡聚糖的方法及其试剂

本发明涉及测定包含于样品中的内毒素或(1→3)- β -D-葡聚糖(以下称作 β -葡聚糖)的量的方法,包括将内毒素或 β -葡聚糖与马蹄蟹的变形细胞溶胞产物反应,并用动学比浊法分析反应混合物。

内毒素是存在于革兰氏阴性菌细胞壁内的物质,并具有诸如发热等多种生物活性。因而,当直接与药品或血液接触的医疗器械被内毒素污染时,尽管在内毒素的量很低的情况下也会带来严重后果。因此,内毒素污染应严格控制。同样地,对于归因于革兰氏阴性菌的败血症的早期诊断,也要检测内毒素在血液中的含量。

而且, β -葡聚糖是已知存在为酵母和毒菌细胞壁的骨骼组成,为许多担子菌纲子实体(磨菇)的重要聚糖成份,为从用于血液透析等的膜的洗出成份。 β -葡聚糖的生物活性不象内毒素情况下那样清楚;然而,真菌病的早期诊断和医疗器械被真菌污染的检测通过测量 β -葡聚糖而成为可能。这已经被考虑到。

每种内毒素和葡聚糖已知与含有马蹄蟹的变形细胞溶胞产物的溶液(以下称作AL溶液)反应以激活一种酶并引起凝胶反应。利用这类性质,测量含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖的多种方法被发展和应用。

利用在 AL 溶液和内毒素 (或 β -葡聚糖) 之间发生的凝胶化反应的测量方法的代表性例子包括所谓的胶凝法, 其中目测确定是否发生胶凝化, 和所谓的动力学比浊法, 如用于测定含于样品中的内毒素 (或 β -葡聚糖) 的量的方法, 以内毒素 (或 β -葡聚糖) 浓度和凝胶化时间之间的关系为基础, 该时间通过测量透光度比 (R_t) [起始阶段的透光度 (I_0) 和样品与 AL 溶液混合后经过时间 t 后或样品与 AL 溶液混合后经过预定时间后的透光度 (I_t) 之间的比。 $R_t = I_t/I_0$], (这一比值被凝胶化反应降低) 的变化程度或比值 R_t 的对数值的改变程度达到预期值所需的时间而确定。由内毒素 (β -葡聚糖) 浓度和开始时间之间的关系测定样品中内毒素 (或 β -葡聚糖) 的含量的方法, 开始时间通过测量直到归因于凝胶化反应的透光或吸光的变化的改变程度达到预定值的需要时间而确定, 等等。

在这些方法中, 动力学比浊法与胶凝法相比更简单且具有更高的灵敏度因而被广泛使用。

然而, 最近的动力学比浊法的内毒素检测极限通常为约 0.001EU/ml, 因而, 需要一种能使更低得多的内毒素被检测到的高灵敏度的测定方法。

另一方面, US—4221865 公开了测定内毒素的方法, 它改进了测量灵敏度, 并通过在 AL 溶液和内毒素 (或 β -葡聚糖) 反应期间存在离子型表面活性剂和悬浮剂或同时存在具有两者性质的聚合物而加强浊度测定法的重现性。根据这一美国专利, 加入离子型表面活性剂以停止 Limulus 蛋白的凝聚, 而加入悬浮剂以稳定药物或食物乳胶和胶态溶液。

然而, 这一方法必须使用表面活性剂和悬浮剂两种试剂, 这就

有这样的问題，即操作变复杂且 AL 溶液被存在于试剂中的内毒素或 β -葡聚糖污染的可能性增加。因此，即使现在也需要进一步改进。

本发明的目的在于提供一种通过动力学比浊法测量含于样品中的内毒素和 β -葡聚糖的方法，这一方法具有非常高的灵敏度，与常规方法相比，更低含量的内毒素或 β -葡聚糖可被检测到。

以下详述本发明的其它目的和优点。

根据本发明，提供了一种测量含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖的方法，包括：

将含内毒素或 β -葡聚糖的样品在至少一种选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物的存在下与马蹄蟹的变形细胞溶胞产物混合。

用光照射得到的液体混合物，测量直到液体混合物的光学变化程度达到一个预定值所需的时间，这是在样品与变形细胞溶胞产物混合之后，或从样品与变形细胞溶胞产物混合开始经过预定的时间后进行的，和基于所说的时间与内毒素或 β -葡聚糖之间的关系测定含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖的量。

本发明还提供用于测定样品中的内毒素或 β -葡聚糖含量的试剂，包括马蹄蟹的变形细胞溶胞产物和至少一种选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素。

在所谓动力学比浊法中，例如基于内毒素（或 β -葡聚糖）浓度和凝胶化时间之间的关系来测定含于样品中的内毒素（或 β -葡聚糖）的含量的方法，凝胶化时间通过测量直到透光量比 R_t [初始阶段的透光度 (I_0) 与经过预定时间 (t) 之后的透光度 (I_t) 之间的比，

$R_t = I_t/I_0$] 的变化程度或比值 R_t 的对数值的变化程度, (该比值被作为 AL 溶液和内毒素 (或 β -葡聚糖) 之间反应结果的凝胶化反应所降低) 达到一个预定值所需的时间而确定; 由内毒素 (β -葡聚糖) 浓度和开始时间之间关系测定含于样品中的内毒素 (或 β -葡聚糖) 含量的方法, 开始时间通过测量直到归因于凝胶化反应的透光度或吸光度的变化达到一个预定值所需的时间而确定; 等等, 凝胶化反应可通过在 AL 溶液与内毒素 (或 β -葡聚糖) 反应期间在反应体系中特定的水溶性聚合物存在而不共用离子型表面活性剂而有效地加速。换句话说, 缩短动力学比浊法中的反应时间和加强动力学比浊法的测量灵敏度两者均通过只使用特定的水溶性聚合物而不用离子型表面活性剂而实现。

如前面提到的, 离子型表面活性剂根本不被用于本发明中。因为离子型表面活性剂具有, 例如, 停止马蹄蟹变形细胞溶胞产物和内毒素 (β -葡聚糖) 之间反应的功能, 在 AL 溶液中沉淀一个成分 (不是由与内毒素或 β -葡聚糖反应产生的凝胶) 的功能, 等等, 当离子型表面活性剂以常用量 (例如在 US-4221865 中指出的, 在溶液中浓度为 0.5 至 20% 重量) 使用时, 根据本发明在动力学比浊法中灵敏度的改进 (换句话说, 由于反应时间缩短而使测量灵敏度的改进) 则不能获得。

在用于本发明的特定水溶性聚合物中, 聚乙二醇优选地具有重量平均分子量 3000 至 4000000, 更优选地 7500 至 70000。当重量平均分子量太小时, 凝胶化加速作用很弱, 而当其太大时, 含有聚乙二醇的溶液的粘度变得太高故其处理变得困难。如上相同的原因, 聚乙烯醇优选地具有聚合度 500 至 2000。

用于作为内毒素（或 β -葡聚糖）与AL溶液反应结果的凝胶化反应中的特定水溶性聚合物的浓度（以下称作用于凝胶化反应中的浓度）在某种程度上根据所用的水溶性聚合物的类别，分子量，聚合度等，和所用AL溶液的类别和份量而变化；然而，当例如具有重量平均分子量约3000的聚乙二醇被使用时，适当地选自0.5至4W/W%的范围；当用具有重量平均分子量约7500的聚乙二醇时，范围为0.3至4W/W%；当用具有重量平均分子量20000至70000的聚乙二醇时，范围为0.3至1.5W/W%；当用具有重量平均分子量500000至4000000的聚乙二醇时，范围为0.2至0.5W/W%。而且，当使用聚合度约500的聚乙烯醇时，凝胶化反应中所用的浓度适当地选自1至3W/W%的范围；当用具有聚合度约2000的聚乙烯醇时，范围为0.2至1W/W%；当用具有粘度约15CPS的甲基纤维素时，范围为0.2至1W/W%；当用具有粘度约100CPS的甲基纤维素时，范围为0.1至1W/W%；或当用羟丙基纤维素时，范围为0.1至1W/W%。

这些水溶性聚合物即使各自单独使用也具有足够的效果；然而，它们将以两种或更多的适当组合被应用。

用于本发明的水溶性聚物理所当然地必须不含有足以影响测量含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖含量的内毒素或 β -葡聚糖。为此目的，选用具有微量内毒素或 β -葡聚糖含量的水溶性聚合物，或者，当所用的水溶性聚合物含有明显量的内毒素和 β -葡聚糖时，水溶性聚合物需要用高压釜或内毒素吸收剂等预先除去内毒素和 β -葡聚糖。

当内毒素和 β -葡聚糖的除去用高压灭菌器进行时，它足以，例

如，使上述水溶性聚合物形成具有合适聚合物浓度的溶液，然后使其在高压灭菌器内在，例如，在常用湿度（约 121°C）下处理约 15 至 120 分钟。

当用内毒素吸收剂除去内毒素时，可以用，例如，其上已固定多粘菌素 B 的载体，其上已通过间隔物固定组氨酸的载体，等等。尤其是可以用 Detoxi—Gel (PIERCE 的商品名)，Affi—Prep Polymyxin (Bio—Rad Laboratories 的商品名)，Pyro Sep (TANABE SEIYAKU CO., LTD. 的商品名) 等；然而，内毒素吸收剂当然不限于这些例子。

在本发明的方法中，可以用光学变化，它被用作测量样品中内毒素（或 β —葡聚糖）浓度的指数并由作为 AL 溶液与内毒素（或 β —葡聚糖）之间的反应结果的凝胶化反应而产生。例如，由透光度变化吸收变化引起的光学变化，透光量比 R_1 的变化程度，透光度比 R 的对数值的变化程度等在所谓动力学比浊法中被用作测量指数是优选的。

用于本发明的马蹄蟹变形细胞溶胞产物不是关键；可以属于，例如，Limulus 属，Tachypleus 属等的马蹄蟹变形细胞的溶胞产物，该溶胞产物增加与内毒素或 β —葡聚糖反应的浊度。理所当然的，可以用，例如，从 ACC (Associates of Cape Cod)，Whittaker Bioproducts, Inc.，Endosafe. /nc.，Seikagaku Corp.，Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 等购买的 AL 溶液冻干产品来制备。

在实施本发明的方法时，上述水溶性聚合物被加入并溶入 AL 溶液与内毒素（或 β —葡聚糖）的反应混合物中，以使用于凝胶化反应的浓度成为预定的浓度，这样得到的溶液被用于以常规方式通过

动力学比浊法测量内毒素（或 β -葡聚糖）。

利用本发明的方法通过动力学比浊法测量含于样品中的内毒素（或 β -葡聚糖）的方法在下面解释。

本方法的优选过程是，例如，根据FDA准则[作为对人和动物非肠道药物，生物制品，医疗器械的最终产物内毒素试验的Limulus变形细胞溶胞产物试验的批准准则，Food and Drug Adm. (1987)]中所述的动力学比浊法。

更特定地，通过动力学比浊法用AL溶液，利用独特的器械如Toainometer ET—201 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的商品名)，Toxinometer ET—251 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 的商品名)，Toinometer ET—301 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd 的商品名)，LAI—5000 [Acc (Associates of Caps Code 公司的商品名)]，Microplate reader Tmax (Molecular Device Company 的商品名) 等进行测量是足够的。

这就是说，例如，下面的操作用上面的器械进行：

首先，马蹄蟹的变形细胞溶胞产物与含有内毒素或 β -葡聚糖的样品在至少一种选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物存在下混合，用光照射得到的液体混合物，并且随后，将液体混合物用于测量在样品与变形细胞溶胞产物混合之后，或在样品与变形细胞溶胞产物混合之后经过预定时间，直到光学变化如透光度变化，吸光度的变化程度，透光度比 R_i 的变化程度，透光度比 R_i 的对数值的变化程度等达到一个预定值所需的时间。以这样得到的时间和内毒素或 β -葡聚糖的量之间的关系（例如，利用原先得到的所说时间与内毒素或 β -葡聚糖量之间的校准曲线），可

确定含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖的含量。

在上面的说明中，直到光学变化程度达到一个预定值所需时间的开始点是样品与变形细胞溶胞产物混合的时刻，或样品与变形细胞溶胞产物混合后预定时间过去后的时刻。尽管预定的时间不是关键且随变形细胞溶胞产物对内毒素或 β -葡聚糖的活性（或测量灵敏度）等而变化，但根据测量目的，一般在2或3秒至3至5小时的范围。

预定时间可考虑下列点来确定：

- a) 不影响内毒素或 β -葡聚糖测量的时间，
- b) 与在样品与变形细胞溶胞产物混合后得到的混合物实际开始光学变化所需的时间相比足够短的时间，和
- c) 如果发生测量误差，使测量误差在 $\pm 25\%$ 之内的时间，因为根据FDA对通过动力学比浊法测量内毒素的准则，内毒素测量中的允许误差在 $\pm 25\%$ 之内。

例如，当用具有这样的测量灵敏度（对于含有高于许可量内毒素的样品测量可在30分钟内完成）的AL溶液测量注射用水中的内毒素量以判断内毒素量是否超过最大允许极限（即约0.25EU/ml）时，预定时间一般在2或3秒至2或3分钟的范围内。

当测定用动力学比浊法的器械进行时，开始点可以是样品与变形细胞溶胞产物混合的时刻，或者是含有这些混合物的测量试管被置于器械中的时刻。在这种情况下，当样品与变形细胞溶胞产物混合后多只测量试管立即被置于器械中时，对每只试管的测量起始点将是不同的，以使起始点的差别在几秒钟之内，因为这样一个时间差一般不会对测量引起明显的误差。

为了在根据本发明测量内毒素（或 β -葡聚糖）时获得时间，光学变化程度的预定值被预先设定在足以实现目标测量的范围。当光学变化由透光度比 R_t 的变化程度引起时，例如，预定值合适地在一3至-25%，优选-5至-20%的范围。而且，当光学变化由透光度变化，吸收变化，透光度比 R_t 的对数值的变化程度等引起时，预定值将根据透光度比 R_t 选定。

将用于本发明的水溶性聚合物加到马蹄蟹的变形细胞溶胞产物与内毒素（或 β -葡聚糖）的反应混合物中以使聚合物浓度成为预定值的方法将是这样一种方法—通过该法，水溶性聚合物可被加到马蹄蟹变形细胞溶胞产物与内毒素（或 β -葡聚糖）的反应混合物中使聚合物的最终浓度变为预定浓度；然而，这一方法不是关键的，并可被优选地使用，例如，其中以预定浓度含有水溶性聚合物的AL溶液被冻干然后重新溶解并使用的方法；其中合适量的水溶性聚合物被加入并溶于AL溶液中的方法；其中AL溶液的冻干产物被溶于含水溶性聚合物的水溶液中的方法；其中被测的样品（含内毒素或 β -葡聚糖）适当地用含水溶性聚合物的水溶液稀释的方法；等等。

顺便提一句，勿需说明，含水溶性聚合物的水溶液将含有，例如，缓冲剂如磷酸缓冲液，Good's缓冲液等，其量为内毒素或 β -葡聚糖的测量既不被抑制，也不被加速。

本发明的测试剂被用于实施上述测量含于样品中的内毒素或 β -葡聚糖的方法，且含有马蹄蟹的变形细胞溶胞产物和选自聚乙二醇，聚乙烯醇，甲基纤维素和羟丙基纤维素的水溶性聚合物。各个构成要素的优选方式，方案如前所述。而且，本发明的测试剂除上述成份外，可额外地含有如磷酸缓冲液，Good's缓冲液等之类的缓

冲液，其量为使内毒素或 β -葡聚糖的测量既不被抑制也不被加速。

下面给出的实施例更具体地说明本发明；然而，本发明不受这些实施例的限制。

实施例 1

(试剂)

内毒素溶液

使用用注射用水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产) 适当稀释的 *Escherichia Coli* 关联的内毒素 (日本药典中定义的标准内毒素，由 *E. Coli* VKT—B 菌株产生的脂多糖，在一小瓶内含相当于 16000 内毒素单位 (EU) 的内毒素)。

AL 溶液

由 *Limulus* 属的马蹄蟹衍生的 AL 溶液的冻干产物 (冻干产品以后称作 LAL，从 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 购买，对 5ml 的凝胶化灵敏度：0.06EU/ml) 溶于 2.5ml LAL—溶解缓冲溶液 (由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产) 的溶液被使用。

聚乙二醇溶液

通过将 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产的聚乙二醇溶于注射用水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 中使浓度成为预定值而制备，然后将溶液进行高压灭菌处理 (121°C 15 分钟)。确认聚乙二醇溶液不含内毒素。

顺便提一下，所用的几种聚乙二醇具有如下平均分子量：

聚乙二醇 4000：重量平均分子量 3000

聚乙二醇 6000：重量平均分子量 7500

聚乙二醇 20000：重量平均分子量 20000

聚乙二醇 50000: 重量平均分子量 50000

聚乙二醇 70000: 重量平均分子量 70000

聚乙二醇 500000: 重量平均分子量 500000

聚乙二醇 2000000: 重量平均分子量 2000000

聚乙二醇 4000000: 重量平均分子量 4000000。

(过程)

在测试管中加入 0.05ml AL 溶液, 0.1ml 所需的聚乙二醇溶液和 0.05ml 内毒素溶液 (0.2EU/ml), 将产生的混合物搅拌, 然后用 Toxinometer ET—201 测量在保持温度 37°C 时直到液体混合物 (反就混合物) 的透光度比 (R_t) 降低 5% 所需的时间 (以后称所说的时间为 T_g)。作为阴性对照, 与上面相同的过程被重复, 只是用 0.05ml 注射用水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产) 代替内毒素溶液, 确证 T_g 值大于测量时间 (90 分钟) (凝胶化未被判定)。

而且, 显示 T_g 值与内毒素浓度之间关系的校准曲线预先通过在测试管中放置 0.05ml AL 溶液, 0.1ml 注射用水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产) 和具有预定浓度的 0.05ml 内毒素溶液, 搅拌得到的混合物, 然后以如上相同的方式进行测量而制得。用上面得到的几种聚乙二醇溶液得到的 T_g 值被用于校准曲线以确定表观内毒素浓度。这样得到的表观内毒素浓度被用于下面的公式以确定相对活性 (%) :

$$\text{相对活性 (\%)} = (\text{表观内毒素浓度}) / 0.2 \times 100$$

(结果)

当具有几种分子量的聚乙二醇被允许以几种浓度存在时得到的相对活性示于表 1 至 3 中。顺便提一下, 在表中, 聚乙二醇 (PEG)

浓度表示在反应期间（测量 Tg 值期间）在溶液中的浓度。

表 1

PEG · 浓度 (w/w %)	相对活性 (%)		
	PEG 4,000	PEG 6,000	PEG 20,000
0.156	116	117	120
0.313	124	126	136
0.625	134	160	180
1.25	154	229	308
2.5	222	430	-
5	-	-	-

注：PEG：聚乙二醇

—：由于产生不是因为内毒素的非特殊浊度，没有测出相对活性。

表 2

PEG 浓度 (w/w%)	相对活性 (%)	
	PEG 50,000	PEG 70,000
0.078	109	105
0.156	119	114
0.313	143	135
0.625	196	204
1.25	322	315
2.5	-	-

注：PEG：聚乙二醇

—：由于产生不是因为内毒素的非特殊浊度，没有测出相对活性。

表 3

PEG 浓度 (w/w%)	相对活性 (%)		
	PEG 500,000	PEG 2,000,000	PEG 4,000,000
0.063	97.8	98.0	96.5
0.125	110	113	115
0.25	129	123	121
0.5	203	214	171

注：PEG：聚乙二醇

从表 1 至 3 的结果可以看出表观内毒素浓度是增加的，也就是

说,当AL溶液与内毒素反应时,允许合适量的具有重量平均分子量3000至4000000的聚乙二醇存在,使内毒素的测量灵敏度增加。

顺便地说,尽管没有示于表中,当具重量平均分子量500000至4000000的高分子量聚乙二醇的浓度超过1.0%时,聚乙二醇溶液的粘度变得较高,其操作变得困难,因而所说的聚乙二醇溶液不实用。

而且,尽管没有示于表中,但已发现当使用具有重量平均分子量2000的聚乙二醇时,没有发现对AL溶液与内毒素反应有加速作用,而且在一些情况下,所说的反应被抑制。而且,当具有大重量平均分子量的聚乙二醇被使用时出现这样的问题,反应混合物的粘度变得太高,当AL溶液被倾倒时,反应混合物含有气泡因而产生误差,而且AL溶液附于反应试管壁妨碍反应。因此,已发现用于本发明这一目的的聚乙二醇需要具有重量平均分子量3000至4000000。

实施例2

(试剂)

β -葡聚糖溶液

将(1-3)- β -D-葡聚糖羧甲基化衍生物的羧甲基化的Curd-lan (由Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产)溶于注射用水(由Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产)以制备1mg/ml溶液,并将其适当稀释然后使用。

AL溶液

将LAL溶液的冻干产品(从Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 购买的,对5ml的凝胶化灵敏度:0.06EU/ml)溶于5ml LAL-溶解缓冲溶液(由Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产)中,使用得到的溶液。

聚乙二醇溶液

使用由实施例 1 中的聚乙二醇 6000 制备的具有各种浓度的聚乙二醇。

测量用的样品

等当量的 β -葡聚糖溶液 (40 ng/ml) 和具有预定浓度的聚乙二醇溶液的混合物被用作测量的样品。

(过程)

在测量用的试管中放入 0.1 ml AL 溶液和 0.1 ml 测量用样品, 搅拌得到的混合物, 在此之后, 液体混合物 (反应混合物) 的 Tg 用 Toxinometer ET-201 在温度保持 37°C 时测量。作为阴性对照, 与上相同的过程被重复, 只是测量样品用 0.1 ml 注射用水 (由 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产) 代替以确证 Tg 大于测量时间 (60) 分钟 (凝胶化未被判定)。

(结果)

测量结果示于表 4 中。

表 4

聚乙二醇 浓度 (%) [*]	Tg 值 (分)
0	22.9
0.5	20.2
1.0	18.3
1.5	17.1
1.8	16.4
2.0	16.0

注：*：显示测量样品的浓度

从表 4 的结果可以看出，凝胶化时间被缩短，也就是说，通过使聚乙二醇在反应期间存在使 β -葡聚糖的测量灵敏度增加。

实施例 3

(试剂)

内毒素溶液

与实施例 1 中相同

AL 溶液

与实施例 1 中相同

聚乙烯醇溶液

具有聚合度 500 的聚乙烯醇或者具有聚合度 2000 的聚乙烯醇（两者都由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产）被溶于注射用水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产）以制备 2% 溶液，将此溶液在 121°C 进行高压灭菌处理 15 分钟。使用这样得到的聚乙烯醇溶液。

甲基纤维素溶液

将具有粘度 15CPS 的甲基纤维素或具有粘度 100CPS 的甲基纤维素（两者都由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产）溶于注射用水（由 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产）以制备 2% 溶液，将此溶液在 121°C 进行高压灭菌处理 15 分钟。该溶液然后被冷却并再

次搅拌以确证甲基纤维素完全溶解。使用这样得到的甲基纤维素溶液。

羟丙基纤维溶液

将具有粘度 150 至 400CPS 的羟丙基纤维素（由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产）溶于注射用水（由 Otsuka Pharmaceutical CO., Ltd. 生产）以制备 1% 溶液，将此溶液在 121°C 进行高压灭菌处理 15 分钟，使用这样得到的羟丙基纤维素溶液。

GANTRETZ (GAF 公司的甲基乙烯基醚/马来酐共聚物的商品名) 溶液

将 GANTRETZ AN—119, AN—139 或 AN—169（都由 GAF 公司生产）及 GANTRETZ 的三倍量的氢氧化钠溶于注射用蒸馏水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.）以制备 1% 溶液，此溶液在 121°C 进行高压灭菌处理 15 分钟。使用这样得到的 GANTRETZ 溶液。

聚丙烯酸钠溶液

具有聚合度 22000 至 70000 的聚丙烯酸钠（由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产）被溶于注射用水（由 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产）以制备 0.5% 溶液，将此溶液在 121°C 进行高压灭菌处理 15 分钟。使用这样得到的聚丙烯酸钠溶液。

(过程)

在测量用试管中加入 0.05ml AL 溶液，0.1ml 预定的水溶性聚合物和 0.05ml 内毒素溶液（0.2EU/ml），将得到的混合物搅拌，在此之后，用 Toxinometer ET—201 在温度保持在 37°C 时测量液体混合物（反应混合物）的 Tg。作为阴性对照，重复与上述相同的过程，只是用 0.05ml 注射用水（由 Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 生产）代

替内毒素溶液以确证 Tg 值大于测量时间 (90 分钟) (凝胶化未被判定)

而且, 通过将 0.05ml AL 溶液, 0.1ml 注射用水和 0.5ml 具有预定浓度的内毒素溶液放入测试管中并以与上述相同的方式进行测量而预先制备表示 Tg 值和内毒素浓度之间关系的校准曲线, 应用此校准曲线, 用前面得到的各种水溶性聚合物溶液得到的 Tg 值测定表观内毒素浓度。这样得到的表观内毒素浓度被用于下面的公式以确定相对活性值 (%) :

$$\text{相对活性 (\%)} = (\text{表观内毒素浓度}) / 0.2 \times 100$$

(结果)

用各种水溶性聚合物在各种浓度得到的相对活性 (%) 被示于表 5 和表 6 中。顺便提一句, 在表中的水溶性聚合物浓度是反应期间 (Tg 值测量期间) 溶液中的浓度。

表 5

聚合物	浓度 (%)	相对活性 (%)
聚乙烯醇	0.625	117
聚合度 a.500	1.25	159
	2.5	235
	5.0	-
聚乙烯醇	0.025	113
聚合度 a.2,000	0.25	125
	0.5	157
	1.0	242
	1.5	-
甲基纤维素	0.125	123
粘度	0.25	145
	0.5	213
甲基纤维素	1.0	377
粘度 100 cps	0.1	96.5
	0.125	141
	0.25	159
	0.5	238
羟丙基纤维素	1.0	307
粘度 150-400 cps	0.063	121
	0.125	130
	0.25	143
	0.5	187

表 6

聚合物	浓度 (%)	相对活性 (%)
GANTRETZ AN-119	0.0005	107
	0.005	99.3
	0.05	82.8
	0.5	60.4
GANTRETZ AN-139	0.0005	99.3
	0.005	92.7
	0.05	79.3
	0.5	107
GANTRETZ AN-169	0.0005	109
	0.005	97.0
	0.05	92.7
	0.5	109
聚丙烯酸钠	0.00025	108
	0.0025	105
	0.025	95.5
	0.25	-

注：-：由于产生不是因为内毒素的非特定浊度，相对活性值不能测定。

从表 5 的结果可以看出，当具有聚合度约 500 的聚乙烯醇被允许以 1.25% 或更高的浓度存在，具有聚合度约 2000 的聚乙烯醇被允许以 0.25% 或更高的浓度存在时，具有粘度 15CPS 的甲基纤维素允许以 0.25% 或更高的浓度存在时，具有粘度 100CPS 的甲基纤维素以 0.125% 或更高的浓度存在时，或羟丙基纤维素被允许以 0.125% 或更高的浓度存在时，内毒素的测量灵敏度增加。

另一方面，从表 6 的结果可以看出：甲基乙烯基醚/马来酐共聚物，聚丙烯酸钠等的 GANTRETZ 之类的水溶性聚合物没有诸如增加内毒素测量灵敏度之类的作用。

从上面的叙述已很清楚，本发明提供了用动力学比浊法测量内

毒素（或 β -葡聚糖）的高灵敏度方法，当本发明的方法被使用时，以大大低于常规情况的量存在的内毒素或 β -葡聚糖可以高灵敏度被检测到。因此，本发明对工业贡献很大。