

微量动态显色法用于细菌内毒素检测的可行性研究

陈素珍, 陈琪*, 曾秋敏, 吴燕虹

(广东省药品检验所, 广州 510180)

摘要 目的: 建立微量动态显色法, 并验证其用于细菌内毒素检查的可行性。方法: 建立鲎试剂、样品分别为 25、25 μL 的加样体系, 通过考察准确度和精密度、线性和范围、最低检测限、试剂耐用度进行方法学验证, 并采用动态显色法和微量动态显色法两种方法比较对 39 个不同品种进行方法适用性研究。结果: 0.03、0.3、3.0 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度 6 次重复实验的回收率分别为 $(96.19 \pm 16.68)\%$ 、 $(92.53 \pm 10.17)\%$ 、 $(89.54 \pm 25.84)\%$; 6 条标准曲线的相关系数(r)的绝对值为 (0.9977 ± 0.0023) ; 鲎试剂最低灵敏度浓度 0.01 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 反应时间为 $(3896.0 \pm 279.6)\text{s}$, 均小于阴性对照的反应时间; 2 个不同厂家鲎试剂的耐用度检查结果符合规定; 品种适应性研究结果显示, 39 个品种的回收率在 50% ~ 200% 之间, 两种方法的有效性相同。结论: 微量动态显色法的准确度和精密度、线性和范围、最低检测限、试剂耐用度均符合方法验证要求, 品种适用性与传统的动态显色法相等, 该方法可用于常规样品的细菌内毒素检测。

关键词: 微量动态显色法; 细菌内毒素; 方法学验证; 品种适应性研究; 动态显色法

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)06-0607-05

doi: 10.19778/j.chp.2024.06.013

Feasibility study of micro kinetic-chromogenic method for bacterial endotoxin detection

CHEN Suzhen, CHEN Qi*, ZENG Qiumin, WU Yanhong

(Institute of Drug Control in Guangdong Province, Guangzhou 510180, China)

Abstract Objective: To establish a micro kinetic-chromogenic method and verify its feasibility for bacterial endotoxin testing. **Methods:** Establish an addition system for micro kinetic-chromogenic lysate reagent with 25 μL and 25 μL sample, respectively. Methodological validation was conducted by examining accuracy and precision, linearity and range, minimum detection limit, and reagent durability. Two methods, kinetic-chromogenic method and micro kinetic-chromogenic method, were used to compare the applicability of the method to 39 different varieties. **Results:** The recovery rates of three doses of 0.03, 0.3, and 3.0 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ in six repeated experiments were $(96.19 \pm 16.68)\%$, $(92.53 \pm 10.17)\%$, and $(89.54 \pm 25.84)\%$, respectively. The absolute value of the correlation coefficient (r) for the six standard curves is (0.9977 ± 0.0023) . When the minimum sensitivity concentration of lysate reagent is 0.01 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, the reaction time is $(3896.0 \pm 279.6)\text{s}$, which is lower than the reaction time of the negative control. The durability test results meet the requirements by two micro kinetic-chromogenic lysate reagents from different manufacturers. The research results on variety adaptability show that the recovery rates of 39 varieties are between 50% and 200%, the effectiveness of the two methods is the same. **Conclusion:** The accuracy and precision, linearity and range, minimum detection limit, and reagent durability of micro kinetic-chromogenic method all meet the requirements of method validation. The variety applicability is

第一作者简介: 陈素珍, 主管药师; 研究方向: 药品、化妆品的安全性评价研究

* 通讯作者简介: 陈琪, 副主任药师; 研究方向: 药品、化妆品的安全性评价研究。Tel: 020-32447971; E-mail: 40586313@qq.com

equivalent to that of the traditional kinetic-chromogenic method, so this method can be used for bacterial endotoxin detection of routine samples.

Key words: micro kinetic-chromogenic method; bacterial endotoxins; methodological validation; variety adaptability research; kinetic-chromogenic method

细菌内毒素检查法是中国药典中收录的控制注射剂热原污染的经典方法^[1-2]。由于细菌内毒素检查法简便、快速、灵敏、特异性强、重现性好等优点,它用于热原物质检测的重要性越来越突出^[3-5]。鲎试剂作为细菌内毒素检查法必备的试剂,对其需求量和用量逐年增大,然而与之相对应的,由于过度捕食、环境恶化等原因,我国的鲎资源迅速减少,甚至到了急需拯救该物种的地步。2019年3月世界自然保护联盟(IUCN)正式宣布中华鲎“濒危”,鲎保护课题成为国际社会关注热点^[6]。国家林业和草原局、农业农村部于2021年2月5日发布公告,将中国鲎和圆尾鲎列为国家二级野生保护动物^[7]。如何有效利用有限的鲎试剂资源,研究现有方法的补充替代法已经成为亟待解决的问题^[8-9]。

目前,国内外发展了一些细菌内毒素的替代方法,如重组C因子法、重组鲎试剂法。这两种方法已不同程度地被欧洲药典通则、美国药典、日本药典、中国药典指导原则收录,可以作为细菌内毒素检查的替代方法,但必须经过充分的验证,并由相应的监管机构批准。并且,试剂盒价格高、需特定的仪器等原因造成的检验成本居高不下,该方法在国内推广用于日常检验仍需时日。因此,国内研发了微量鲎试剂法,用于应对迫在眉睫的鲎资源减少的难题,目前已有微量凝胶法^[9]和微量动态浊度法^[8]的相关报道,暂未见微量动态显色法系统性方法学验证的报道。

本课题旨在鲎试剂资源濒危的前提背景下,建立减少鲎试剂用量的微量动态显色法,验证其可行性。在不改变现有鲎试剂检验法实验原理的基础上,建立现有方法的补充替代法,尽快地运用到日常检验中,更有效地利用有限的鲎试剂资源,达到可持续发展的目的,为药品安全性质控保驾护航。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

细菌内毒素测定仪(酶标仪)(安度斯 Multi-skan ET)。

1.2 试剂与试药

细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研

究院,批号:150601-202089;规格:90 EU/支);动态显色法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:2304060;规格:50 ~ 0.005 EU · mL⁻¹, 1.25 mL/支);微量动态显色法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:2305240;规格:10 ~ 0.01 EU · mL⁻¹, 0.35 mL/支);微量动态显色法鲎试剂(厦门鲎试剂生物科技有限公司,批号:24010116;规格:10 ~ 0.005 EU · mL⁻¹, 0.5 mL/支)。细菌内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司,批号:2307250;规格:50 mL/瓶)。

2 方法与结果

2.1 方法的建立

根据《中国药典》2020年版细菌内毒素检查法^[1],设置4个反应项目:供试品溶液A、供试品阳性对照溶液B、标准内毒素溶液C(建立标准曲线)以及阴性对照溶液D。实验前开启细菌内毒素测定仪预热至37℃。精密移取25 μL的上述各溶液加到微孔反应板,然后各孔加入25 μL的微量动态显色法鲎试剂。从阴性对照孔开始,按照从低浓度内毒素到高浓度内毒素的顺序加样。加样完毕后把反应板放入细菌内毒素测定仪中。分别考察仪器波长、预设OD值、反应时间对实验结果的影响。

2.1.1 反应时间的设置 用内毒素工作标准品制备浓度为0.01、0.1、1.0、10 EU · mL⁻¹的标准曲线,设置试验条件为仪器波长405 nm,预设OD值为1.0,分别考察反应时间60 min和90 min时的检测结果,试验重复3次。结果显示,试验设置为60 min时,鲎试剂最低灵敏度浓度0.01 EU · mL⁻¹的反应时间分别为>3 600 s、>3 600 s、3 486.3 s;试验设置为90 min时,0.01 EU · mL⁻¹的反应时间分别为3 725.3、3 573.0、3 988.7 s。因此仪器反应时间为60 min时,鲎试剂最低灵敏度浓度0.01 EU · mL⁻¹可能还未到达限时间,将试验反应时间设置为90 min。

2.1.2 预设OD值的设置 用内毒素工作标准品制备浓度为0.01、0.1、1.0、10 EU · mL⁻¹的标准曲线,设置试验条件为仪器波长405 nm,反应时间90 min,分别考察预设OD值为0.02、0.5、1.0时的检测结果。结果显示,预设OD值为0.02、0.5、1.0

时,标准曲线的相关系数 r 的绝对值均 ≥ 0.980 ,符合规定;内毒素标准品系列浓度 0.01、0.1、1.0、10 EU · mL⁻¹ 的达限时间见表 1。综合考虑鲎试剂最低灵敏度浓度 0.01 EU · mL⁻¹ 的达限时间以及高中低浓度达限时间的分布情况,选取预设 OD 值 1.0 作为微量动态显色法的反应条件。

表 1 微量动态显色法不同实验条件对达限时间的影响

Tab. 1 The influence of different experimental conditions on the reaction time in micro kinetic-chromogenic method

Reaction time/s	Concentration/(EU · mL ⁻¹)				r	
	0.01	0.1	1.0	10		
Preset OD	0.02	2 255.7	1 103.3	568	321.3	0.998 7
	0.5	3 120.7	1 590.7	711.3	384.3	0.998 8
	1.0	3 736.3	1 706.0	856.7	457.0	0.999 1
λ	405 nm	3 880.0	1 817.0	971.0	625.7	0.993 2
	450 nm	>5 400	>5 400	2 641.7	1 248.3	-

2.1.3 仪器波长的设置 用内毒素工作标准品制备浓度为 0.01、0.1、1.0、10 EU · mL⁻¹ 的标准曲线,设置试验条件为预设 OD 为 1.0,反应时间 90 min,分别考察动态显色法常用波长 405、450 nm 时的检测结果,结果见表 1。仪器波长为 450 nm 时,0.1、0.01 EU · mL⁻¹ 的达限时间均 $> 5 400$ s,因此选取波长 405 nm 作为微量动态显色法的反应条件。

最后将方法的试验条件确定:仪器波长为 405 nm,预设 OD 为 0.1,反应时间 90 min,根据微孔反应板加样设置输入相关信息,混匀样品并开始自动进行数据采集。

2.2 方法的验证

2.2.1 准确度和精密度 制备 3 个已知确定浓度的内毒素标准品溶液 0.03、0.3、3.0 EU · mL⁻¹,采用微量动态显色法检测其内毒素浓度,不同日期重复检测 6 次,计算回收率和标准差(s)来分别考察准确度和精密度,回收率应在 50% ~ 200%,标准差应 $\leq 30\%$ 。由结果可见,3 个浓度点重复 6 次检测,回收率均在 50% ~ 200% 范围内,准确度符合要求;标准差均 $\leq 30\%$,精密度符合要求(见表 2)。

2.2.2 线性和范围 用细菌内毒素工作标准品配制一组浓度为 0.01、0.1、1.0、10 EU · mL⁻¹ 的标准内毒素溶液,使用微量鲎试剂法检测各浓度点的吸光度,分析拟合内毒素浓度与吸光度之间的线性关系($r \geq 0.980$)并确定检测范围,不同日期重复检测 6 次。结果显示,阴性对照的反应时间均大于标准

曲线最低点的反应时间,6 条标准曲线的相关系数(r)的绝对值均 > 0.980 。标准曲线的线性在 0.01 ~ 10 EU · mL⁻¹ 范围内,符合要求(见表 2)。

表 2 微量动态浊度法的准确度、精密度和线性($n=6$)

Tab. 2 Accuracy, precision, and linearity of micro kinetic-chromogenic method($n=6$)

Concentration/EU · mL ⁻¹	0.03	0.3	3.0
Recovery/%	96.19 ± 16.68	92.53 ± 10.17	89.54 ± 25.84
r	0.997 7 ± 0.002 3		

2.2.3 最低检测限 用细菌内毒素工作标准品配制浓度为 0.01 EU · mL⁻¹ 的内毒素溶液,每次实验设 10 个复孔,不同日期重复检测 3 次,计算反应时间的平均值和标准差。结果显示,该厂家微量动态显色法鲎试剂最低灵敏度浓度 0.01 EU · mL⁻¹ 时,反应时间为 $(3 896.0 \pm 279.6)$ s,均小于阴性对照的反应时间,结果符合要求。

2.2.4 耐用性 采用 2 个不同厂家(A、B)的微量动态显色法鲎试剂进行准确度和精密度试验,评价该方法对不同厂家鲎试剂的耐用性。每个厂家的鲎试剂重复检测 3 次。结果显示,厂家 A 和厂家 B 的微量鲎试剂在 3 个浓度点的回收率均在 50% ~ 200% 范围内,两个厂家 3 次重复实验的标准差 $\leq 30\%$,结果符合要求。见表 3。

表 3 不同厂家的鲎试剂进行微量动态浊度法的耐用性($n=3$)

Tab. 3 Durability of different manufacturers' lysate reagent for micro kinetic-chromogenic method($n=3$)

Concentration/EU · mL ⁻¹	0.03	0.3	3.0
Recovery (A)%	84.35 ± 12.71	84.16 ± 5.53	73.31 ± 3.99
Recovery (B)%	70.46 ± 17.88	64.91 ± 11.50	74.64 ± 6.44

2.2.5 专属性 与传统的动态显色法相比,微量动态显色法不改变其原理和反应条件,最主要的不同点在于鲎试剂的用量减少,加样量仅需 25 μ L,因此专属性不受影响。

2.3 方法的品种适用性

本研究收集了 39 个不同品种样品,包括化学药品(硝酸异山梨酯注射液、丙泊酚乳状注射液、黄体酮注射液、葡萄糖酸钙注射液等)、抗生素(注射用头孢噻肟钠、注射用头孢曲松钠、注射用美罗培南等)、生物制品(人血白蛋白、注射用重组

人 TNK 组织型纤溶酶原激活剂等),同时采用动态显色法和微量动态显色法进行比较研究,进行微量动态显色法的品种适用性研究。

根据以下公式将每个样品稀释至最大有效稀释倍数(MVD): $MVD = cL/\lambda$ (其中 L 为样品的细菌内毒素限值;c 为样品原液的浓度; λ 为标准曲线上最低的内毒素浓度)。例:已知盐酸罗哌卡因注射液的 $L = 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, $c = 7.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 标曲 $\lambda_{\min} = 0.01 \text{ EU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 则求得该样品 $MVD = 7.5 \times 0.05 / 0.01 = 37.5$ 倍。将样品稀释至 MVD 作为待测样品溶液。

结果显示,39 个品种采用微量动态显色法的回收率在 50% ~ 200%,其中注射用双氯芬酸钠利多卡因、注射用阿莫西林钠、注射用盐酸万古霉素、注射用艾普拉唑钠可采用 Tris 缓冲液调整样品溶液 pH 约 7.0 来消除干扰。

3 讨论

2020 年版《中国药典》四部通则 1143 收录的细菌内毒素检查法有凝胶法和光度法(包括浊度法和显色法)^[1],本课题在现有的动态显色法基础上,进行微量法的研究。与传统的动态显色法相比,鲎试剂的加样量仅需 25 μL ,仅为传统鲎试剂加样量的 1/4,极大程度的节省鲎试剂。与重组 C 因子法等新的替代方法相比,微量动态显色法不改变现有方法的原理,不需要复杂的验证和论证过程,可以迅速地应用到日常检验工作中,是快速且有效缓解目前鲎资源短缺难题的方法。

一般的方法学验证均参照《中国药典》“9101 分析方法验证指导原则”^[10]进行,该指导原则普遍适用于理化检验。细菌内毒素检查法属于生物检定,中国药典 2020 年版中尚未有针对生物检定法或生物测定法的验证指导原则。因此,本研究的方法学验证工作以《中国药典》9101 指导原则为主要参考,参照其项下“杂质测定”中“定量”的具体要求,对建立的微量动态显色法的准确度和精密度、线性和范围、最低检测限、试剂耐用度等指标进行方法验证^[11]。但验证指标的可接受范围,则参照细菌内毒素检查法^[1]的具体规定,如可接受的回收率范围为 50% ~ 200%、标准曲线相关系数($|r|$)的绝对值均 ≥ 0.980 等。

品种适用性检查结果显示,39 个品种的内毒素回收率均在 50% ~ 200%,包括注射用泮托拉唑钠、盐酸罗哌卡因注射液、丙泊酚乳状注射液、盐

酸莫西沙星氯化钠注射液、碘克沙醇注射液、吠塞米注射液、己酮可可碱注射液、注射用亚胺培南西司他丁钠、注射用头孢噻肟钠、注射用盐酸头孢吡肟、注射用头孢米诺钠、注射用伏立康唑、注射用美罗培南、注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠、注射用头孢曲松钠、注射用硝普钠、注射用尤瑞克林、注射用阿昔洛韦、葡萄糖酸钙注射液、注射用赖氨匹林、注射用重组人绒毛促性素、苦参碱注射液、盐酸奥普力农注射液、克林霉素磷酸酯注射液、黄体酮注射液、氨甲环酸注射液、注射用水溶性维生素、硝酸异山梨酯注射液、注射用重组人 TNK 组织型纤溶酶原激活剂、注射用曲克芦丁、复合磷酸氢钾注射液、二羌丙茶碱注射液、氯化钾注射液、人血白蛋白、注射用双氯芬酸钠利多卡因、注射用阿莫西林钠、盐酸利多可因注射液、注射用盐酸万古霉素、注射用艾普拉唑钠。其中部分品种由于样品本身偏酸或偏碱性,必要时可采用 Tris 缓冲液调节 pH 约 7.0 来消除干扰。微量显色法和传统动态显色法在 39 个品种检验有效性方面未表现出差异。

微量法加样量少,甚至各厂家制作工艺中的微小差别都会在微量法中被放大,因此对实验操作环境和人员操作均提出了更高的要求。实验器具应严格按照要求清洗灭菌,移液枪需确定其准确性,实验人员应戴好口罩与手套,加样前保证鲎试剂混合均匀,加样时尽量将液体加到微孔的底部,加样后将鲎试剂和待测溶液混合均匀,但应避免出现气泡;每次试验应适当地控制加样孔数,避免因为前后孔加样时差过长造成的实验结果出现人为误差;微量法对样品溶液的 pH 较为敏感,必要时可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节 pH 以消除干扰;同时,显色法的反应终点产生黄色的呈色团,若样品本身为黄色溶液,会对终点吸收产生干扰,因此显色法不适用于黄色样品的检验,可选用凝胶法或浊度法进行黄色样品的细菌内毒素检查。

本研究建立的微量动态显色法,经验证其准确度和精密度、线性和范围、最低检测限、试剂耐用度均符合方法验证要求,品种适用性与传统的动态显色法相等,该方法可用于实际检验工作中,为减少鲎试剂使用量,缓解鲎试剂资源紧张的现状提供一种有效的解决方法。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:178.

- ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:178.
- [2] 张媛. 细菌内毒素检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(3):368.
- ZHANG Y. Research progress of bacterial endotoxin detection methods[J]. Chin J Biol, 2023, 36(3):368.
- [3] 张昇昉, 卢海霞, 王钧, 等. 注射用伏立康唑细菌内毒素检查研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1):57.
- ZHANG HF, LU HX, WANG J, *et al.* Investigation on bacterial endotoxins test of voriconazole for injection[J]. Drug Stand China, 2023, 24(1):57.
- [4] 周丹, 任天一, 赵龙山, 等. 阿奇霉素原料药细菌内毒素检查方法学验证[J]. 中国药品标准, 2023, 24(4):398.
- ZHOU D, REN TY, ZHAO LS, *et al.* Investigation of bacterial endotoxin test for azithromycin [J]. Drug Stand China, 2023, 24(4):398.
- [5] 方选, 于德志, 武刚毅, 等. 乙酰半胱氨酸细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药品标准, 2022, 23(2):220.
- FAND X, YU DZ, WU GY, *et al.* Establishment of bacterial endotoxin test method for acetylcysteine [J]. Drug Stand China, 2022, 23(2):220.
- [6] 颀晓勇, 钟金香, 关杰耀, 等. 基于鲎试剂需求的中国鲎资源保护的迫切性研究[J]. 中国渔业经济, 2021, 39(2):109.
- XIE XY, ZHONG JX, GUAN JY, *et al.* The urgency of horseshoe crab protection in China from the perspective of Tachypleus Amebocyte Lysate industry[J]. Chin Fish Econ, 2021, 39(2):109.
- [7] 国家林业和草原局, 农业农村部. 《国家重点保护野生动物名录》(2021年2月1日修订)[J]. 野生动物学报, 2021, 42(2):605.
- National Forestry and Grassland Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs. List of National Key Protected Wildlife (Revised on February 1, 2021) [J]. J Wild Sci, 2021, 42(2):605.
- [8] 裴宇盛, 陈晨, 蔡彤, 等. 微量动态浊度法检测细菌内毒素方法的建立与验证[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(7):918.
- PEI YS, CHEN C, CAI T, *et al.* Establishment and verification of the method for detecting bacterial endotoxins by the micro-kinetic turbidimetric method[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(7):918.
- [9] 裴宇盛, 蔡彤, 陈晨, 等. 微量凝胶法检查细菌内毒素方法学验证研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(12):1340.
- PEI YS, CAI T, CHEN C, *et al.* Study on micro-gel method verification of bacterial endotoxin test [J]. Chin J New Drugs, 2018, 27(12):1340.
- [10] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:481.
- ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:481.
- [11] 许明哲, 黄宝斌, 杨青云, 等. 分析方法验证、转移和确认概念解析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1):169.
- XU MZ, HUANG BB, YANG QY, *et al.* Elaboration on the concepts of analytical method validation, transfer and verification [J]. J Pharm Anal, 2015, 35(1):169.

(收稿日期:2024-08-12)