

微量动态浊度法检测细菌内毒素方法的建立与验证

裴宇盛, 陈晨, 蔡彤*, 高华* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 目的 建立使用微量动态浊度法检测细菌内毒素的方法, 并进行验证。方法 采用动态浊度法鲎试剂, 每孔样品和鲎试剂加样量 25 μL , 检测波长 405 nm, 预设 OD 值 0.03, 使用半孔酶标板检测, 并经过 4 个实验室协作验证方法的准确度、重现性、线性和范围、耐用性以及重组新型冠状病毒疫苗、重组新型冠状病毒疫苗(5 型腺病毒载体)、重组乙型肝炎疫苗、麻腮风联合减毒疫苗、双价肾综合征出血热灭活疫苗、四价流感病毒裂解疫苗共计 6 种疫苗的品种适用性。

结果 高、中、低 3 个剂量组在 4 个实验室的共计 24 次试验总平均回收率分别为 100.8%, 150.0%, 125.3%, RSD 值分别为 5.3%, 11.0%, 20.7%; 标准曲线在 0.01~10 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内相关系数平均值为 0.990, 耐用度考察 2 个来源的鲎试剂对检测的影响符合规定; 6 个品种的共计 18 批样品的干扰试验回收率均在 50%~200%, 干扰试验符合规定。**结论** 建立了使用微量动态浊度法检测细菌内毒素的方法, 该方法具有良好的准确度、重现性、线性和范围、耐用性, 并且在 6 种生物制品中具有较好的品种适用性。该方法可用于常规样品的细菌内毒素检测。

关键词: 细菌内毒素检查法; 动态浊度法; 鲎试剂; 替代方法

中图分类号: R927.12

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)07-0918-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.07.009

引用本文: 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): 918-921.

Establishment and Verification of the Method for Detecting Bacterial Endotoxins by the Micro-kinetic Turbidimetric Method

PEI Yusheng, CHEN Chen, CAI Tong*, GAO Hua* (National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and verify a detection method for bacterial endotoxins using the micro-kinetic turbidimetric method. **METHODS** The dynamic turbidimetric limulus reagent was used, the sample volume of each well and the limulus reagent 25 μL was used, the detection wavelength was 405 nm, the onset OD value was 0.03, and the half-well microtiter plate was used. The accuracy, reproducibility, linearity, range, and durability of the method had been verified by 4 laboratories collaboratively. A total of 6 vaccines included recombinant novel coronavirus vaccine, recombinant novel coronavirus vaccine(type 5 adenovirus vector), recombinant hepatitis B vaccine, combined attenuated vaccine for measles and mumps, inactivated bivalent hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine, and influenza vaccines were being studied for method applicability. **RESULTS** The total average recovery rates of 24 trials in 4 laboratories in the high, medium and low dose groups were 100.8%, 150.0% and 125.3%, respectively, the RSD values were 5.3%, 11.0%, and 20.7%. The standard curve had an average correlation coefficient of 0.990 in the range of 0.01~10 $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$. The durability study was investigated. The influence of the two sources of limulus reagent on the detection was in compliance with the regulations. The recovery rates of the interference test for a total of 18 batches of samples of 6 varieties were all within between 50% and 200%, the interference test met the requirements. **CONCLUSION** A method for detecting bacterial endotoxins using micro-kinetic turbidimetry has been established. This method has good accuracy, reproducibility, linearity and range, durability, and has good variety applicability among 6 biological products. This method can be used for bacterial endotoxin detection of conventional samples.

KEYWORDS: bacterial endotoxin test method; dynamic turbidity method; limulus reagent; alternative method

细菌内毒素检查法是控制注射剂质量安全的重要指标, 反映供试品中的热原物质污染程度。中国药典及各国药典中, 化学药品的注射剂及原料药、疫苗、血液制品以及注射用辅料普遍采用

细菌内毒素检查法作为热原质量控制方法^[1]。然而内毒素检查法严重依赖鲎生物资源。近年由于多种因素影响, 鲎资源迅速减少。国际组织对鲎资源做出预警^[2], 中国也将中国鲎和圆尾蝎鲎列为国

基金项目: 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室项目(2019-1-4)

作者简介: 裴宇盛, 男, 副研究员 E-mail: pysh@nifdc.org.cn

*通信作者: 蔡彤, 女, 硕士, 主任药师

E-mail: teddyct@163.com 高

华, 女, 博士, 研究员 E-mail: huag55@163.com

家二级保护动物^[3]。因此内毒素检查法的补充方法的开发和验证很有必要。中国药典 2020 年版中收录了包括凝胶限度试验、凝胶半定量试验、动态浊度法、动态显色法、终点浊度法、终点显色法 6 种法定检查法, 并且中国药典 2020 年版中已将重组 C 因子法收录于 9251 细菌内毒素检查法应用指导原则^[4]。国内常用的方法为凝胶限度法、动态浊度法和动态显色法。本研究针对动态浊度法, 采取减少鲎试剂用量来建立微量动态浊度法, 并对其方法进行验证, 以达到减少鲎资源消耗, 提高鲎试剂使用效率, 保护鲎资源的目的。

在试验设计方面, 细菌内毒素检查法是一种生物测定法, 应参照生物活性检查法方法验证指南, 然而目前药典中尚无专门针对生物活性为机理的测定方法验证指南。国际上, 细菌内毒素的替代方法重组 C 因子法的验证方案依据美国药典 1225 分析方法^[5]。中国药典 2020 年版 9101 分析方法验证指南与美国药典 1225 验证项目和要求总体接近^[6]。因此本验证方案参考中国药典 2020 年版 9101 而设计。

1 仪器与试剂

Multiskan 酶标仪(美国 Thermo 公司); Robot 100 全自动细菌内毒素检测系统(湛江安度斯生物有限公司)。

细菌内毒素国家标准品(中国食品药品检定研究院, 批号: 150800-201601; 规格: 每支 9 000 EU); 动态浊度法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, 批号: 2106090; 规格: 10~0.01 EU·mL⁻¹, 每支 1.25 mL); 动态浊度法鲎试剂(厦门鲎试剂生物科技有限公司, 批号: 19104072; 规格: 0.01~10 EU·mL⁻¹, 每支 2.8 mL)。

2 方法与结果

2.1 方法的建立

检测条件: 采用动态浊度法鲎试剂, 每孔样品和鲎试剂加样量 25 μ L, 检测波长 405 nm, 预设 OD 值 0.03。筛选酶标板: 用内毒素检查用水稀释内毒素国家标准品制备浓度为 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU·mL⁻¹ 的标准曲线, 采用半孔酶标板(Corning)、半孔酶标板(安度斯)、96 孔板分别进行检测, 每组重复 3 次, 以相关系数为评价指标, r 的绝对值应 ≥ 0.980 , 确定使用何种酶标板。

酶标板选择试验中, 采用半孔酶标板(Corning)的 r 绝对值分别为 0.934 8, 0.937 8, 无效; 半孔酶标板(安度斯) r 绝对值分别为 0.999 1, 0.999 1,

0.997 5; 96 孔板的 3 次结果均无效。结果表明半孔酶标板(安度斯)适合用于微量动态浊度法, 方法的试验条件确定为: 采用动态浊度法鲎试剂, 每孔样品和鲎试剂加样量 25 μ L, 检测波长 405 nm, 预设 OD 值 0.03, 使用半孔酶标板(安度斯)进行检测。

2.2 方法的验证

2.2.1 准确度和重现性 用注射用水稀释细菌内毒素国家标准品制备 3.16, 0.316, 0.031 6 EU·mL⁻¹ 溶液。同时采用微量动态浊度法和动态浊度法进行检测, 每个检测重复 6 次, 在 4 家实验室同时进重现性验证。结果见表 1。

以回收率和相对标准偏差(RSD)为指标分别考察准确度和重现性, 回收率应在 50%~200%, RSD 应 $< 32\%$ 。

表 1 微量动态浊度法和动态浊度法的回收率和 RSD 值 ($n=72$)

Tab. 1 Recovery rate and RSD results of micro dynamic turbidimetry and dynamic turbidimetry ($n=72$)

组别	回收率平均值/%		RSD/%	
	微量动态浊度法	动态浊度法	微量动态浊度法	动态浊度法
3.16 EU·mL ⁻¹	100.8	108.4	5.3	5.2
0.316 EU·mL ⁻¹	150.0	138.9	11.0	6.3
0.031 6 EU·mL ⁻¹	125.3	102.3	20.7	8.3

2.2.2 线性和范围 在 4 个实验室分别用内毒素检查用水稀释内毒素国家标准品制备浓度为 10, 1, 0.1, 0.01 EU·mL⁻¹ 的标准曲线, 每个实验室在不同的 6 d 中重复 6 次试验。标准曲线的阴性对照时间均应大于标准曲线最低点的反应时间。采用双对数转化后再用最小二乘法进行线性回归并计算相关系数 r , r 的绝对值应 ≥ 0.980 。

结果显示, 72 条标准曲线的阴性对照时间均大于标准曲线最低点的反应时间, 试验均成立。所有 r 绝对值均 > 0.980 , r 绝对值的平均值为 0.990, RSD 值为 0.48%。标准曲线的线性在 0.01~10 EU·mL⁻¹ 符合规定。

2.2.3 试剂耐用性 评价不同厂家来源的鲎试剂(以 A 厂家和 B 厂家代称)对检测结果的影响, 试验参照精密度和准确度试验, 采用 2 个厂家鲎试剂, 3 个不同浓度, 每个厂家的鲎试剂检测重复 3 次, 在 4 家实验室同时进重现性验证。采用配对 t 检验对替代方法进行评价。采取 F 双边检验对方差齐性。采用单因素方差分析, 对各个实验室之间的差异是否具有显著性。

采用等效性以动态浊度法为参考方法，微量动态法为比对方法对 2 种方法的等效性进行检验。

单因素方差分析结果显示，A 厂家和 B 厂家的参考方法之间无显著性差异，并且 A 厂家的参考方法和替代方法之间无显著性差异，表明在不同实验室之间不存在操作差异。并且不同组之间数据没有显著性差异。但 B 厂家存在显著性差异。结果见表 2。

表 2 单因素方差分析结果(n=36)

Tab. 2 Results of one way ANOVA(n=36)

单因素方差分析	平方和	均方	F 比	概率	显著性差异
A 厂家的参考方法与替代方法	7.41	7.41	0.102 3	0.750 1	无
B 厂家的参考方法与替代方法	4 050.40	4 050.40	6.305 8	0.014 5	有
A 厂家和 B 厂家中的参考方法	106.58	106.58	1.797 9	0.184 4	无

t 检验结果显示，A 厂家和 B 厂家的参考方法之间无显著性差异，并且 A 厂家的参考方法和替代方法之间无显著性差异，表明在准确率回收率方面数据没有显著性差异。但 B 厂家存在显著性差异。结果见表 3。

表 3 t 检验结果(n=36)

Tab. 3 Results of t test(n=36)

配对 t 检验	差值	差值置信限	概率	显著性差异
A 厂家	-0.641 7	-4.645 9~3.362 5	0.750 1	无
B 厂家	15.337 9	3.146 4~27.329 4	0.014 5	有
A 厂家和 B 厂家中的参考方法	2.433 3	-1.188 0~6.054 7	0.184 4	无

F 检验结果显示，3 组均显示出显著性差异。表明在精密度方面，即使是现有的参考方法(法定方法)不同试剂之间也在精密度方面存在差异。结果见表 4。

表 4 F 检验结果(n=36)

Tab. 4 Results of F test(n=36)

F 双边检验	F 比	概率	显著性差异
A 厂家的参考方法与替代方法	6.811 5	0.001	有
B 厂家的参考方法与替代方法	2.117 5	0.031 9	有
A 厂家和 B 厂家中的参考方法	6.217 8	0.184 4	有

在等效性检验方面，在指定的实际差值阈值为 10 的情况下，A 厂家和 B 厂家的参考方法之间以及厂家 A 的替代方法之间等效。但 B 厂家的替代方法与方法 B 的参考方法不等效。结果见表 5。其他结果的分析见讨论部分。

表 5 等效性检验结果(n=36)

Tab. 5 Results of equivalence test(n=36)

等效性检验 (指定的实际差值阈值为 10)	差值	差值标准 误差	P 值	是否 等效
A 厂家	-0.642	2.007	0.001	是
B 厂家	15.338	6.108	0.807	否
A 厂家和 B 厂家中的参考方法	2.433	1.815	0.001	是

2.2.4 专属性 有关方法验证中的专属性研究，由于微量动态浊度法和动态浊度法仅仅是加入试剂和样品量以及反应容器发生了变化，反应机理、反应条件均相同，专属性不受影响。因此本研究并未设立专属性研究。

2.2.5 品种适用性研究 重组新型冠状病毒疫苗、重组新型冠状病毒疫苗(5 型腺病毒载体)、重组乙型肝炎疫苗、麻腮风联合减毒疫苗、双价肾综合征出血热灭活疫苗、四价流感病毒裂解疫苗共计 6 个品种，每个品种 3 批样品，按照本方法进行干扰试验，3 批样品的回收率均应在 50%~200%。结果见表 6。

表 6 6 种疫苗的干扰试验结果

Tab. 6 Interference test results of 6 vaccines

疫苗类型	批号	稀释 倍数	回收率/ %	含量/ EU·mL ⁻¹
重组新型冠状病毒疫苗	NCOV202104001V	10	120.75	0.11
	NCOV202104002V		116.35	<0.10
	NCOV202104004V		109.89	<0.10
重组新型冠状病毒疫苗(5 型腺病毒载体)	B202104033	40	90.93	<0.40
	B202104034		100.42	<0.40
	B202104035		93.16	<0.40
重组乙型肝炎疫苗	AHBVC894AA	100	109.8	<1.00
	AHBVC902AA		101	<1.00
	AHBVC901AA		92.74	<1.00
麻腮风联合减毒疫苗	S20210101	100	168.69	6.75
	S20210102		124.38	9.94
	S20210103		143.81	6.45
双价肾综合征出血热灭活疫苗	20200406	200	164.15	<2.00
	20200407		91.92	<2.00
	20200408		95.05	<2.00
四价流感病毒裂解疫苗	202007013V	100	101.26	47.86
	202007014V		116.26	<1.00
	202007015V		175.27	3.97

3 讨论

3.1 统计方法的限度设定依据

回收率和精密度的限度设定依据，回收率指标见中国药典 2020 年版 1143 内毒素检查法。重现性在各国药典内毒素检查法中均没有规定，因此参照 9101 的限度值设定。测算方法系利用内毒

素国际标准品的质量效价换算 $10 \text{ EU} \cdot \text{ng}^{-1}$ 换算出质量单位为 $1 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ [7], 根据中国药典 2020 年版 9101 分析方法验证指导原则表 3 可设定为 32%。另外医疗器械的热原试验 YY/T 1500-2016 的 A2.2 章对精密度要求为 50%, 可作为参考数据。综合考虑仍然选择 32% 作为本试验的依据。

等效性指定的实际差值阈值设定为 10, 是以 2 个厂家的参考方法等效为前提设定的。2 种现有的参考方法均为法定方法, 因此应为等效, 以此为设定依据考察 2 种替代方法是否与参考方法等效。

3.2 试剂耐用性的结果讨论

单因素方差分析、*t* 检验、一致性检验 4 种统计方法针对试剂耐用性的结果一致。显示 2 个厂家的参考方法一致, 表明 2 个厂家的试剂在按照现有药典方法进行检验时, 具有较好的一致性。在 *F* 检验显示出方差齐性方面的差异, 是由不同厂家的生产工艺决定的。通过单因素方差分析得出 4 家实验室之间不存在显著性差异。因此方差齐性检验将 4 家 24 组数据合并作为一组, 与参考组进行方差齐性检验。由于细菌内毒素检查法本身的误差较大, 应尽量避免操作方面引入误差。

3.3 试验操作注意事项

细菌内毒素检查法操作有很多影响因素。微量动态浊度法在最后一步加样步骤提高了操作难度, 为了获得准确的数据, 可以采用自动化稀释设备来最大程度地减少人工操作引入的误差。如果采用人工稀释方法, 微量移液器的校准和正确使用是最主要的误差来源。另外样品量较多时, 使用电动连续加样器或多道加样器可以明显减少

因加样量引起的误差。在整体的操作环境方面, 避免操作污染也是提高方法准确性的重要因素。

通过对准确度、精密度、线性和范围、试剂耐用度以及方法适用性方面的研究, 微量动态浊度法符合验证的有关要求, 可以用于细菌内毒素的检测。试剂耐用度研究结果表明不同厂家的试剂有较大区别, 其中 A 厂家的试剂与现有法定方法的一致性较好, 更适合日常使用。

中国药典 2020 年版规定, 供试品和鲎试剂的加样量、供试品和鲎试剂的加样比例以及保温时间等, 参照所用的仪器和试剂的有关说明进行。即鲎试剂的加样量并非仅有传统的 0.1 mL 装量。本研究在药典允许的范围内, 减少了鲎试剂使用量, 为缓解鲎资源减少提供了一种解决方式。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2020: 178-181.
- [2] PEI Y S, CAI T, CHEN C, et al. Methodological study on the detection of bacterial endotoxin in fosaprepitant dimeglumine by recombinant factor C[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(1): 1-4.
- [3] 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): 605-640.
- [4] 中国药典. 四部[S]. 2020: 515-516.
- [5] USP43-NF38[S]. 2020: 1225.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2020: 480-483.
- [7] RIETSCHEL E T, KIRIKAE T, SCHADE F U, et al. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function[J]. FASEB J, 1994, 8(2): 217-225.

收稿日期: 2021-02-26

(本文责编: 李艳芳)