

中图分类号: R917; R927.11 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0092-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.021



基因重组鲎试剂检测促肝细胞生长素注射液中细菌内毒素含量适用性研究

刘书显, 陈彤, 阮健[△]

(山东省烟台市食品药品监督管理局, 山东 烟台 264570)

摘要:目的 探讨基因重组鲎试剂用于测定促肝细胞生长素注射液中细菌内毒素含量的适用性。方法 分别使用基因重组鲎试剂和天然美洲鲎试剂建立细菌内毒素标准曲线,采用供试品干扰试验测定供试品溶液中外加内毒素的回收比,采用动态显色法测定供试品中细菌内毒素含量,并比较2种鲎试剂检测结果的差异。结果 2种鲎试剂细菌内毒素浓度在0.008~5 EU/mL范围内与反应时间线性关系较好($|r| \geq 0.998$)。供试品在稀释2倍或20倍时对反应无干扰,细菌内毒素回收比均在50%~200%之间,26批供试品的细菌内毒素含量均小于限值(37.5 EU/mL)。2种鲎试剂细菌内毒素含量检测结果无显著差异($P > 0.05$)。结论 该研究中建立了该制剂细胞内毒素的定量检测方法,准确性和灵敏度好,可用于该产品生产、流通环节细菌内毒素的质量控制。

关键词:基因重组鲎试剂;动态显色法;细菌内毒素;促肝细胞生长素注射液

Suitability Study of Recombinant Limulus Amebocyte Lysate for the Determination of Bacterial Endotoxins in Hepatocyte Growth - Promoting Factors Injection

LIU Shuxian, CHEN Tong, RUAN Jian

(Yantai Center for Food and Drug Control and Test, Yantai, Shandong, China 264570)

Abstract: Objective To investigate the suitability of recombinant limulus amebocyte lysate (LAL) for the determination of bacterial endotoxins in Hepatocyte Growth - Promoting Factors Injection. **Methods** The bacterial endotoxin standard curves were established by the recombinant LAL and LAL, respectively. The recovery rate of endotoxins added to the test solution was determined by the interference test of the test sample, the content of bacterial endotoxins in test sample was determined by the kinetic chromogenic assay, and the content differences determined by recombinant LAL and LAL were compared. **Results** The concentration of bacterial endotoxins determined by recombinant LAL and LAL in the range of 0.008 - 5 EU/mL showed a good linear relationship with reaction time ($|r| \geq 0.998$). There was no interference when the test sample was diluted by two or twenty multiples, and the recovery rate of bacterial endotoxins was in the range of 50% to 200%. The content of bacterial endotoxins in 26 batches of test samples was lower than the limit (37.5 EU/mL). There was no significant difference in the content of bacterial endotoxins determined by recombinant LAL and LAL ($P > 0.05$). **Conclusion** The established quantitative determination method for bacterial endotoxin in Hepatocyte Growth - Promoting Factors Injection is accurate and sensitive, which can be used for the quality control of bacterial endotoxin in the production and circulation of this product.

Key words: recombinant limulus amebocyte lysate; kinetic chromogenic assay; bacterial endotoxin; Hepatocyte Growth - Promoting Factors Injection

鲎试剂(LAL)是鲎血细胞提取物制备的裂解试剂,广泛用于非肠道用药和医疗器械的内毒素检测。天然鲎试剂使用存在以下3个问题:1)持续使用会导致鲎减少降^[1-2];2)地域和季节不同会导致批间差异,影响检测结果^[3-4];3)通过旁路途径G因子通路与1,3- β -D-葡聚糖反应,可能导致假阳性结果^[5-6]。基因重组鲎试剂作为一种新的重组显色试剂逐渐用于国外制药领域细菌内毒素的定量检测^[7]。其由C因子、B因子和凝固酶原这3种重组蛋白酶酶原组成,可用于复制级联反应,提供一种动力学显色法。有研究显示,基因重组鲎试剂能满足相关规定中细菌内毒素的检测标准^[8]。鉴于

此,本研究中使用基因重组鲎试剂和天然美洲鲎试剂定量检测促肝细胞生长素注射液中细菌内毒素含量,并比较检测结果,为基因重组鲎试剂的使用提供实验依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

PKF96-OE-2774型细菌内毒素定量检测系统(美国Cape Cod公司,配套专用软件)。

1.2 试剂

促肝细胞生长素注射液(威海赛洛金药业有限公司,批号分别为2101005,2007013,2006005,2107032,

第一作者:刘书显,男,硕士,主管药师,研究方向为药品检验与药理学,(电子信箱)958251475@qq.com。

[△]通信作者:阮健,女,硕士,主任药师,研究方向为药品检验与药理学,(电话)0535-6243276。

2106027, 2106026, 2106025, 2106024, 2106023, 2106022, 2106021, 2106020, 2106019, 1912049, 2101006, 2101001, 2104011, 2104013, 2104016, 2101004, 2104014, 2104010, 2104018, 2012025, 2104015, 2104017; 规格均为每支 2 mL: 30 μg ; 基因重组鲎试剂(批号为 2630001, 可检测内毒素浓度范围 50 ~ 0.005 EU / mL, 规格为每支 2.8 mL), 配套复溶缓冲液(批号为 2631001), 天然美洲鲎试剂(批号为 2042102, 可检测内毒素浓度范围 0.001 ~ 10 EU / mL, 规格为每支 3.2 mL), 配套葡聚糖抑制缓冲液(批号为 1207078), 细菌内毒素工作标准品(批号为 249034), 细菌内毒素检查用水(BET水, 批号为 AF29482230), 均购自美国 Cape Cod 公司。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值及最大有效稀释倍数的确定

按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌内毒素检查法规定^[9], 细菌内毒素限值公式为 $L = K / M$, 其中, L 为供试品细菌内毒素限值, 注射剂 K 值为 5 EU / (kg·h), M 为人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量 [mL / (kg·h)]。按供试品说明书规定, 促肝细胞生长素注射液 $M = 8 \div (60 \times 1)$ mL / (kg·h), 得 L 为 37.5 EU / mL。最大有效稀释倍数公式为 $MVD = cL / \lambda$, 其中 c (供试品溶液浓度) 为 1.0 mL / mL, L 为 37.5 EU / mL, λ 为标准曲线上最低的内毒素浓度 (0.008 EU / mL), 得 MVD 为 4 687.5。

2.2 标准曲线可靠性试验

取细菌内毒素工作标准品适量, 用 BET 水配制浓度分别为 5, 1, 0.2, 0.04, 0.008 EU / mL 的系列标准溶液, 每一浓度平行 3 管; 以 BET 水为阴性对照, 平行 2 管, 每管 200 μL , 分别加入装有 50 μL 复溶缓冲液鲎试剂的反应管中, 混匀, 置仪器中, 设置反应温度为 (37 \pm 0.2) $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 405 nm, 检测。反应结束后将获得的反应时间与标准品溶液浓度进行线性回归, 得回归方程, 以 $|r| \geq 0.980$ 为试验有效^[10-11]。

以细菌内毒素浓度的对数 ($\lg C$) 为横坐标、反应时间的对数 ($\lg T$) 为纵坐标进行线性回归(见表 1), 结果表明, 细菌内毒素浓度与反应时间线性关系良好, 且阴性对照管反应时间均大于标准曲线最低浓度的反应时间, 标准曲线成立。

2.3 供试品干扰试验

取 2 批内毒素含量偏高的供试品适量, 分别用 2 种鲎试剂稀释 20 倍, 其他批次样品稀释 2 倍, 作为供试品溶液; 同时配制相同倍数含内毒素标准品浓度为 0.2 EU / mL 的溶液, 作为阳性对照, 每一浓度重复 2 管, 按 2.2 项下方法测定。

按回归方程得出供试品溶液和含标准细菌内毒素

表 1 线性回归结果

Tab. 1 Results of the linear regression analysis

试剂类型	回归方程	r	试剂类型	回归方程	r
基因重组鲎试剂	$\lg T_1 = 2.78 - 0.268 \lg C_1$	-0.998	天然美洲鲎试剂	$\lg T_5 = 2.82 - 0.255 \lg C_5$	-0.999
	$\lg T_2 = 2.78 - 0.268 \lg C_2$	-0.998		$\lg T_6 = 2.82 - 0.259 \lg C_6$	-1.000
	$\lg T_3 = 2.79 - 0.263 \lg C_3$	-0.998		$\lg T_7 = 2.83 - 0.254 \lg C_7$	-0.999
	$\lg T_4 = 2.79 - 0.261 \lg C_4$	-1.000			
	$\lg T_8 = 2.81 - 0.271 \lg C_8$	-0.998			

供试品溶液的内毒素含量分别为 c_1 和 c_s , 按公式 $R = (c_s - c_1) / \lambda_m \times 100\%$ 。计算回收比, 其中 λ_m 为 0.2 EU / mL, 回收比应在 50% ~ 200% 之间。

结果见表 2 和表 3。不同稀释倍数下, 细菌内毒素的回收比均符合规定 (50% ~ 200%), 则在此条件下供试品溶液未产生干扰作用。

2.4 细菌内毒素含量测定

使用基因重组鲎试剂, 按 2.2 项下方法测定。结果 26 批样品均检测出内毒素, 含量在 0.018 1 ~ 3.72 EU / mL 之间; 使用天然美洲鲎试剂, 其中 1 批样品未检测出内毒素 (含量 < 0.016 EU / mL), 另 25 批内毒素, 含量在 0.0352 ~ 5.24 EU / mL 之间, 但均小于限值 (37.5 EU / mL)。两种鲎试剂测定的细菌内毒素含量无显著差异 ($P > 0.05$), 表明两者细菌内毒素检测结果一致性较好。

3 讨论

相较于家兔热原检查法, 光度法具有检测速度快、结果可定量等优点^[10-12]。本研究结果显示, 26 批样品中内毒素含量均小于限值 (37.5 EU / mL), 但批间内毒素含量差异较大, 其中 2 批样品 (批号分别为 2007013, 1912049) 内毒素含量偏高, 且后者以基因重组鲎试剂检出值达 5.24 EU / mL。细菌内毒素含量偏高, 可能与原料来源和生产工艺有关。生产厂家应加强对原料中细菌内毒素的控制, 改进生产工艺, 进而控制药品的细菌内毒素含量至更低水平, 以提高其安全性。

本研究中的 2 种鲎试剂对 26 批样品内毒素含量检测结果无显著差异, 表明 2 种鲎试剂的动态显色法试验结果一致性较好, 且均满足 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌内毒素检查法中光度测定法的要求, 可考虑用基因重组鲎试剂代替天然鲎试剂进行药品内毒素含量检测。

有研究显示, 与天然鲎试剂比较, 基因重组鲎试剂产品批间差异较小^[13], 可有效避免天然鲎试剂导致测试结果差异大的问题, 且避免了与 1,3- β -D-葡聚糖交叉反应造成假阳性结果的干扰^[8], 是一种有效可行的细菌内毒素定量检测鲎试剂。试剂成分采用基因工程技术获得, 不必由鲎活体来提供, 从保护鲎资源的角度出发^[14], 重组鲎试剂技术可能比依赖自然资源的天然

表2 基因重组鲎试剂定量检测样品中细菌内毒素含量(n=2)

Tab. 2 Results of content determination of bacterial endotoxins in samples by recombinant LAL (n=2)

批号	稀释倍数	外加内毒素浓度(EU/mL)	C _i (EU/mL)	C _s (EU/mL)	原液含量(EU/mL)	回收比(%)
2106026	2	0.2	0.366 0	0.563	0.732	98.50
2106025	2	0.2	0.401 0	0.616	0.802	107.50
2106024	2	0.2	0.038 6	0.224	0.077 2	92.70
2106023	2	0.2	0.137	0.312	0.274	87.50
2106022	2	0.2	0.103	0.297	0.206	97.00
2106021	2	0.2	0.049 8	0.276	0.099 6	113.10
2106020	2	0.2	0.050 9	0.255	0.102	102.05
2106019	2	0.2	0.050 9	0.241	0.102	95.05
2101006	2	0.2	0.054 7	0.261	0.109	103.15
2101001	2	0.2	0.039 4	0.191	0.078 8	75.80
2104011	2	0.2	0.023 5	0.236	0.047 1	106.25
2104013	2	0.2	0.135	0.309	0.270	87.00
2104016	2	0.2	0.385	0.509	0.770	62.00
2101004	2	0.2	0.009 07	0.161	0.018 1	75.97
2104014	2	0.2	0.125	0.288	0.250	81.50
2104010	2	0.2	0.045	0.227	0.090 0	91.00
2104018	2	0.2	0.449	0.578	0.898	64.50
2012025	2	0.2	0.028 8	0.218	0.057 6	94.60
2104017	2	0.2	0.342	0.516	0.684	87.00
2106027	2	0.2	0.482	0.7	0.964	109.00
2101005	2	0.2	0.037 1	0.227	0.074 2	94.95
2006005	2	0.2	0.135	0.354	0.270	109.50
2107032	2	0.2	0.026 1	0.207	0.052 2	90.45
2104015	2	0.2	0.162	0.351	0.324	94.50
2007013	20	0.2	0.132	0.35	2.64	109.00
1912049	20	0.2	0.186	0.39	3.72	102.00

表3 天然美洲鲎试剂定量检测样品中细菌内毒素含量(n=2)

Tab. 3 Results of content determination of bacterial endotoxins in samples by LAL (n=2)

批号	稀释倍数	外加内毒素浓度(EU/mL)	C _i (EU/mL)	C _s (EU/mL)	原液含量(EU/mL)	回收比(%)
2101006	2	0.2	0.041 8	0.388	0.083 6	173.10
2101001	2	0.2	0.027 8	0.332	0.055 6	152.10
2104011	2	0.2	0.017 6	0.344	0.035 2	163.20
2104013	2	0.2	0.112	0.447	0.224	167.50
2104016	2	0.2	0.233	0.596	0.466	181.50
2101004	2	0.2	<0.008	0.317	<0.016	159.00
2104014	2	0.2	0.140	0.416	0.280	138.00
2104010	2	0.2	0.041 5	0.346	0.083	152.25
2104018	2	0.2	0.328	0.724	0.656	198.00
2104015	2	0.2	0.173	0.476	0.346	151.50
2104017	2	0.2	0.309	0.684	0.618	187.50
2101005	2	0.2	0.042 9	0.357	0.085 8	157.05
2006005	2	0.2	0.097 2	0.441	0.194	171.90
2107032	2	0.2	0.026 4	0.358	0.052 8	165.80
2106027	2	0.2	0.349	0.704	0.698	177.50
2106026	2	0.2	0.369	0.736	0.738	183.50
2106025	2	0.2	0.405	0.786	0.810	190.50
2012025	2	0.2	0.027 6	0.381	0.055 2	176.70
2007013	20	0.2	0.080 0	0.379	1.60	149.50
2106024	2	0.2	0.035 7	0.371	0.071 4	167.65
2106023	2	0.2	0.111	0.458	0.222	173.50
2106022	2	0.2	0.095 9	0.475	0.192	189.55
2106021	2	0.2	0.042 9	0.412	0.085 8	184.55
2106020	2	0.2	0.043 6	0.414	0.087 2	185.20
2106019	2	0.2	0.045 4	0.418	0.090 8	186.30
1912049	20	0.2	0.262	0.653	5.24	195.50

鲎试剂技术优势更大。

综上所述,使用基因重组鲎试剂、天然美洲鲎试剂采用动态显色法测定的促肝细胞生长素注射液内毒素含量结果相当。本研究中建立了该制剂内毒素的定量检测方法,准确性和灵敏度好,能快速定量检测促肝细胞生长素注射液中的细菌内毒素含量,可用于该产品生产、流通环节细菌内毒素的质量控制。

参考文献

[1] CARMICHAEL RH, BOTTON ML, SHIN PKS. Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab Biology, Conservation and Management[M]. Berlin:Springer International Publishing, 2015:369-381.
[2] LEE CN, MORTON B. Changes in the distributions of juvenile horseshoe crabs (Arthropoda: Chelicerata) (2002 - 2014) related to environmental perturbations at Pak Nai and Ha Pak Nai, Deep Bay, Hong Kong SAR, China[J]. Mar Pollut Bull, 2016,108(1-2):134-146.

[3] MILTON DK, JOHNSON DK, PARK JH. Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the Limulus assay of house dust[J]. Am Ind Hyg Assoc J, 1997, 58(12):861-867.
[4] MCKENZIE JH, ALWIS KU, SORDILLO JE, et al. Evaluation of lot - to - lot repeatability and effect of assay media choice in the recombinant Factor C assay[J]. J Environ Monit, 2011, 13(6): 1739-1745.
[5] TANAKA S, IWANAGA S. Limulus test for detecting bacterial endotoxins[J]. Methods Enzymol, 1993, 223:358-364.
[6] KAWABATA S, MUTA T. Sadaaki Iwanaga; discovery of the lipopolysaccharide - and β - 1, 3 - D - glucan - mediated proteolytic cascade and unique proteins in invertebrate immunity[J]. J Biochem, 2010, 147(5):611-618.
[7] MIZUMURA H, OGURA N, AKETAGAWA J, et al. Genetic engineering approach to develop next - generation reagents for