

应用 ELISA 测定睫状神经营养因子中卡那霉素残留量^{*}

王兰 毕华 饶春明^{**}

(中国药品生物制品检定所重组技术产品室 北京 100050)

摘要 目的:建立 ELISA 检测卡那霉素残留量的方法并进行方法学验证,用于重组技术产品的质量控制在。方法:采用间接竞争 ELISA 方法,样本中残留的卡那霉素将与微孔板上预包被的偶联抗原竞争抗卡那霉素抗体,加入酶标二抗后,用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色,样本吸光值与残留卡那霉素的含量成负相关,用酶标仪进行检测并用 SOFT MAX 分析软件进行分析。结果:ELISA 方法测定卡那霉素残留量在 0.5~40.5 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好,且符合四参数方程式: $y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$, $r^2 \geq 0.99$; 板内变异小于 15%, 板间变异小于 20%, 实验重复性好,加标回收率在 80%~120% 之间;该方法检测与庆大霉素、盐酸四环素、链霉素和氨苄西林药物未显示交叉反应。应用该法对 1 批睫状神经营养因子(CNTF)原液的卡那霉素残留量进行测定,结果表明,每人用剂量 CNTF(100 μg)卡那霉素残留量小于 0.5 ng。结论:该方法具有灵敏度高、操作简便、检测迅速等特点,可用于重组技术产品中卡那霉素残留量的检定。

关键词: ELISA; 卡那霉素; 残留量; 重组生物制品; 质量控制

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1064-03

Determination of residual kanamycin in ciliary neurotrophic factor (CNTF) by ELISA^{*}

WANG Lan, BI Hua, RAO Chun-ming^{**}

(Division of Biopharmaceuticals, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish ELISA method for determination of residual kanamycin for the quality control of recombinant products. **Method:** Using indirect competitive ELISA, residual kanamycin in the test sample can compete with pre-coated antigen in the microplate for antibody specific for kanamycin. An enzyme-linked antibody specific for kanamycin was added to the wells, then a substrate solution was added to the wells and color developed in negative proportion to the amount of residual kanamycin. The results were read using microplate reader and analyzed using SOFT MAX software. **Results:** The ELISA method for residual kanamycin had good linearity ($r^2 \geq 0.99$) in the concentration range of 0.5-40.5 ng·mL⁻¹ and complied with the 4-parameter equation: $y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$. The relative standard deviation for intraprecision studies was less than 15%, and for interprecision studies less than 20%. Mean recoveries ranged between 80% and 120%. This method did not have the cross-reactivity with gentamicin, tetracycline hydrochloride, streptomycin and ampicillin. The method was used for determination of residual kanamycin in one batch of CNTF bulk. The results indicated that the kanamycin content was less than 0.5 ng per dose (100 μg). **Conclusion:** The method is sensitive, convenient and quick, and can be used for determination of residual kanamycin in recombinant products.

Key words: ELISA; residual kanamycin; recombinant; biological product; quality control

2010 年版中国药典三部凡例中规定生物制品生产过程中应尽可能避免使用抗生素,必须使用时,应选择安全性风险相对较低的抗生素,使用抗生素的种类不得超过 1 种,且产品的后续工艺应保证可

有效去除制品中的抗生素^[1]。研究发现,残留的抗生素对敏感的人能产生过敏反应;有些导致人的再生障碍性贫血等^[2,3]。因此应严格控制生物制品中原液和成品的抗生素残留。

* 国家科技重大专项课题(课题编号:2009ZX09307-001)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095380; E-mail: raoem@nicpbp.org.cn

卡那霉素属氨基糖苷类抗生素,是生物技术药物筛选和生产中常用的一种抗生素。药典收录的抗生素残留量测定采用传统的微生物检测法^[4],该法特异性较差,容易受非抗生素抑菌剂的影响。本文以重组睫状神经营养因子制品为例,采用间接竞争ELISA建立了灵敏、快速的卡那霉素含量测定方法。

1 药品与试剂

供试品重组睫状神经营养因子原液为本室留样;卡那霉素(批号3199209)、氨苄西林(批号200004)、链霉素(批号200012)、盐酸四环素(批号200001)、庆大霉素(批号200314)为中国药品生物制品检定所保存;卡那霉素ELISA检测试剂盒为北京望尔生物技术有限公司产品,其中包括6个浓度的卡那霉素标准品溶液及高浓度标准品溶液($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2 仪器设备

SpectraMax Plus384 多功能酶标仪及SOFT MAX 分析软件为美国Molecular Devices公司产品。

3 方法与结果

3.1 卡那霉素含量标准曲线建立 试剂盒中提供的卡那霉素标准品溶液浓度分别为0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,每个稀释度做3个平行孔;加入上述标准品溶液20 μL 到对应的微孔中,每孔加入酶标二抗50 μL ,再加入抗体工作液80 μL ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应40 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,每孔用洗涤工作液250 μL 充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;加入底物液A液50 μL ,再加底物液B 50 μL ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中避光反应15 min;加入终止液50 μL ,轻轻振荡混匀,用酶标仪于450/630 nm双波长进行检测。利用SOFT MAX软件分析数据,以卡那霉素标准品浓度为横坐标, A_{450} 与 A_{630} 光吸收差值的平均数为纵坐标,选用的回归模型为四参数方程,绘制标准曲线并求得回归方程为: $y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$,即在半对数坐标纸上呈典型的反S型曲线,其曲线相关系数在0.99以上(见图1)。应用本方法对0.125 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和0.25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素溶液进行测定,两者测定值RSD波动较大,均在30%以上;而在0.5~40.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内测定RSD均在20%以内。因此本方法的定量限依据试剂盒中的规定,定为0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,低于此浓度的样本卡那霉素含量判为阴性。

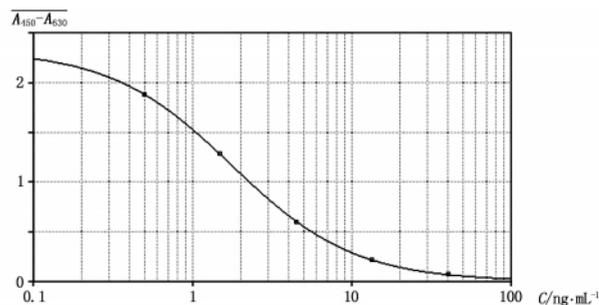


图1 卡那霉素含量标准曲线

Fig 1 Standard curve of kanamycin content

3.2 专属性分析 根据国际ICH药品注册的国际技术要求对分析方法论证的指导原则^[5],为了解分析方法的合理性应首先考虑专属性研究。用该方法对10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的卡那霉素标准品溶液进行3次测定,阳性率为100%;对100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氨苄西林、链霉素、盐酸四环素、庆大霉素标准品溶液进行3次测定,检测结果均为阴性。结果表明本方法和试剂盒具有较好的专属性。

3.3 睫状神经营养因子中卡那霉素残留量、精密度及回收率测定 将试剂盒中提供的2×样本稀释液用水稀释为1×样本稀释液,将睫状神经营养因子原液用1×样本稀释液稀释至0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 待测;同时做精密度和回收率实验,即将稀释的0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试品分别等体积加入80, 60, 40, 20, 1.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素标准品溶液,上述样品用酶标仪于450/630 nm双波长进行测定,所得数据用SOFT MAX软件进行分析,以样品 A_{450} 与 A_{630} 光吸收差值的平均数($n=3$)在标准曲线回归方程中自动求得结果。回收率用以下公式计算:回收率=(加标样品测定值-样品测定值)×2/加标理论值,如果样品测定值低于检测限则忽略不计。应用上述方法对1批睫状神经营养因子样品进行了3次测定(结果见表1),蛋白浓度为0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品中卡那霉素残留量的检测结果均小于0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,即每人份剂量(100 μg)睫状神经营养因子中卡那霉素残留量小于0.5 ng ,判为阴性。以40, 30, 20, 10, 0.75 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个卡那霉素加标浓度进行试验精密度分析,可见本方法测定的板内RSD在2.2%~14.0% ($n=3$)之间,均低于15%;3次测定的板间RSD在8.8%~16.4%之间,均低于20%。表明本方法具有较理想的精密度。5个不同浓度的加标样本进行3次重复测定,计算得到本实验的回收率在100.3%~107.0%之间,表明本方法均有较好的准确性。

表 1 睫状神经营养因子中卡那霉素残留量、精密度及回收率测定
Tab 1 Kanamycin content precision and recovery in CNTF

样品 (sample)	试验次数 (times)	卡那霉素浓度(content of kanamycin) /ng · mL ⁻¹				回收率 (recovery) /%
		$\bar{x} \pm SD$ (RSD, %)	mean	SD	RSD/%	
CNTF	1	0.185 ± 0.093(50.3)	0.116	0.064	55.3	/
	2	0.059 ± 0.007(11.9)				
	3	0.103 ± 0.043(41.7)				
加标(added 40 ng · mL ⁻¹)	1	35.788 ± 0.870(2.4)	40.672	6.673	16.4	101.7
	2	48.275 ± 6.049(12.5)				
	3	37.953 ± 4.182(11.0)				
加标(added 30 ng · mL ⁻¹)	1	28.159 ± 0.971(3.5)	31.568	2.959	9.4	105.2
	2	33.472 ± 3.347(10.0)				
	3	33.073 ± 3.441(10.4)				
加标(added 20 ng · mL ⁻¹)	1	18.687 ± 1.479(7.9)	21.244	2.226	10.5	106.2
	2	22.289 ± 1.435(6.4)				
	3	22.755 ± 1.318(5.8)				
加标(added 10 ng · mL ⁻¹)	1	10.218 ± 1.151(11.3)	10.699	1.743	16.3	107.0
	2	12.632 ± 1.768(14.0)				
	3	9.248 ± 0.207(2.2)				
加标(added 0.75 ng · mL ⁻¹)	1	0.811 ± 0.037(4.5)	0.752	0.066	8.8	100.3
	2	0.766 ± 0.059(7.7)				
	3	0.681 ± 0.080(11.7)				

4 讨论

ELISA 方法自 1971 年 Engvall 和 Permman 首次建立以来,经过 20 余年的发展,现已成为药物残留分析中最重要的分析技术之一^[6]。目前药物残留分析越来越倾向于简便、快速、灵敏和微量化。与其他方法相比较 ELISA 具有以下优点:较高特异性和灵敏性;检测范围在 ng 甚至 pg 水平,属于超微量分析技术;结果准确、重现性好、方法操作简单且样品处理量大。本文所采用的间接竞争 ELISA 方法检测卡那霉素残留量,在 0.5 ~ 40.5 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好, r^2 在 0.99 以上。应用该法对 1 批睫状神经营养因子中原液进行测定,结果表明每人份剂量(100 μg)睫状神经营养因子中卡那霉素残留量小于 0.5 ng,样品加标回收率为 100.3% ~ 107.0%。该方法未发现与氨苄西林、链霉素、盐酸四环素及庆大霉素的交叉反应。

2010 年版中国药典三部中增加了成品抗生素残留量的检测项目,目前药典中收录的抗生物残留量检查法为管碟法,该方法容易受到成品中辅料,如甘露醇、SDS 或盐等干扰,而且需要 3 d 才能观察到结果。ELISA 方法灵敏度高,可以根据临床剂量对样本进行适当稀释,同时引入回收率对反应体系及干扰因素进行评价;该方法简单快速,在 2 h 之内能

够获取结果,可以有效节省检测时间,并进行样品批量操作。下一步我们将进一步扩大样本量,对不同厂家不同制品中体系影响因素进行评价,对制品中抗生素残留水平进行评估,同时规范操作,完善简便快速的抗生物残留量测定方法,以满足对生物技术产品质量控制的需要。

参考文献

- 1 ChP(中国药典) 2010. Vol III(三部): General Notices(凡例) XI
- 2 HAN Qing-gong(韩庆功), CUI Yan-hong(崔艳红). Application of ELISA in detecting antibiotic residue of livestock products (ELISA 检测技术在畜产品抗生素类药物残留检测中的应用). *Biotechnol Bull*(生物技术通报) 2008 4: 89
- 3 HE Jia-liang(贺家亮), LI Kai-xiong(李开雄), YU Jian-liang(于见亮) et al. The status of the residues of animal medicine in animal food and suggestion for it(动物性食品兽药残留现状及对策). *Chin J Animal Quarant*(中国动物检疫), 2006, 23(7): 22
- 4 ChP(中国药典) 2010. Vol III(三部): Appendix(附录) 59
- 5 ZHOU Hai-jun(周海钧). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH 药品注册的国际技术要求). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2007. 90
- 6 Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005 51(12): 2415

(本文于 2010 年 9 月 9 日收到)