

依克多因中细菌内毒素的定量检测 微量动态显色法

Determination of bacterial endotoxin in ecdyl Micro kinetic chromogenic assay

(报批稿)

2024 - 12 - 24 发布

2024- 12 - 24 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分：试验方法标准》的规则起草。

本文件由江苏省分析测试协会提出并归口。

本文件主要起草单位：宁波伯通伟达生物医药有限公司、南京古田化工有限公司、南京自一界科技研发有限公司、常州常检一诺食品检测中心有限公司、江苏省理化测试中心（江苏省理化测试技术研究所）、南京都市农业技术开发有限公司、江苏大敬生物科技股份有限公司、连云港市食品药品检验检测中心、国家轻工业食品质量监督检测南京、谱尼测试集团江苏有限公司。

本文件主要起草人：杜和亮、李坤、薛仪芬、涂俊宏、王明明、钟俊兰、周旭恺、李瑞盈、袁艳丽、王李群、朱赛磊、辛林林、杨恪鉴、陈斌、聂韡、高宏、李姮、李文皓、张燕、张晓红、陈茜、彭雪琦。

依克多因中细菌内毒素的定量检测 微量动态显色法

1 范围

本文件规定了依克多因中细菌内毒素的微量动态显色检测方法。
本文件适用于依克多因原料中细菌内毒素的定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修订单）适用于本文件。

中华人民共和国药典（2020年版）四部通则1143 细菌内毒素检查法

3 原理

细菌内毒素与鲎试剂反应产生的凝固酶使特定底物释放出呈色团，通过酶标仪检测反应混合物的光密度值（OD）达到预先设定值所需要的反应时间（T），计算样品中的细菌内毒素的含量。

4 试剂与材料

- 4.1 微量动态显色法鲎试剂（0.01EU/mL~10EU/mL）。
- 4.2 细菌内毒素标准品。
- 4.3 细菌内毒素检查用水（BET水，内毒素含量小于0.005EU/mL）。
- 4.4 无细菌内毒素枪头。
- 4.5 耐高温玻璃试管（外径10×75mm，250°C处理至少30min以上）。
- 4.6 无内毒素的聚苯乙烯微孔板：96孔透明板。

5 仪器和设备

- 5.1 可控温的全自动定量绘图酶标仪。
- 5.2 天平：感量 0.001g。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 移液器：量程为 5μL~50μL 和 100μL~1000μL。
- 5.5 高温干燥箱。

6 分析步骤

6.1 鲎试剂的配制

将微量动态显色法鲎试剂冻干粉按照所附证书的操作说明，用BET水复溶制成鲎试剂溶液。

6.2 标准溶液的配制

将细菌内毒素标准品（4.2）按照所附标准物质证书的操作说明，用BET水溶解制成浓度为10 EU/mL的标准溶液，用BET水逐级稀释得到1.0、0.5、0.1、0.05、0.01EU/mL的标准系列溶液（每个浓度配制3个平行管），每稀释一步均应在涡旋混合器上混匀30 s或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作，现配现用。

6.3 标准曲线的绘制

分别取6.2中的细菌内毒素的标准系列溶液（每个浓度配制3个平行管）以及两个阴性对照溶液（BET水）进行细菌内毒素检测，当阴性对照的达限反应时间大于标准曲线最低点的反应时间，将全部数据进行线性回归分析，标准曲线以细菌内毒素浓度的对数值（Lgc）为横坐标，以平均反应达限时间对数值（LgT）为纵坐标绘制而成。

6.4 样品溶液的制备

将样品混合均匀后，准确称量0.50 g（精确至0.01g）至耐高温玻璃试管中，准确加入5mLBET水，涡旋混匀3min，使其充分溶解。根据样品中细菌内毒素的限量要求，计算出相应的最大稀释倍数（MVD）。

6.5 样品溶液的测试

当6.3标准曲线通过可靠性试验，6.4的样品溶液通过干扰试验后，再进行样品溶液的检测。取稀释后的25 μL样品溶液至微孔板中（4.6），再加入25 μL鲎试剂（6.1），轻轻晃动微孔板3~5下，然后将其放入酶标仪中，酶标仪内部温度保持在（37±1）℃，检测波长为405 nm，按酶标仪使用说明书预设达限光密度值（OD值），记录反应产物的光密度值达到预设限值时的反应时间（T）。根据所得线性回归方程计算出样品溶液中细菌内毒素的浓度。

注：标准曲线可靠性试验及样品干扰试验按照附录A进行。

7 结果计算与表示

7.1 结果计算

样品中细菌内毒素的含量按下式进行计算：

$$X = \frac{c \times f \times V}{m \times 1000}$$

式中：X——样品中细菌内毒素的含量，单位为EU/mg；

c——样品稀释溶液中细菌内毒素的浓度，单位为EU/mL；

f——稀释倍数；

V——样品溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样称样量，单位克（g）。

7.2 结果表示

取两次平行测定结果的算术平均值作为最终结果，当小于0.01EU/mg时，结果保留两位有效数字，当大于0.01EU/mg时，结果保留三位有效数字。

8 重复性

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的10%。

9 方法定量限

方法定量限为0.002EU/mg。

附录 A
(资料性)

标准曲线可靠性试验及供试品干扰试验方法

A.1 标准曲线可靠性试验

为了保证微量动态显色法的有效性,应预先进行标准曲线的可靠性试验。绘制的标准曲线获得的相关系数(r)的绝对值应 ≥ 0.980 ,试验方为有效,否则须重新试验。

A.2 干扰试验

在进行样品中细菌内毒素含量检测之前,需要进行干扰试验。参照中华人民共和国药典(2020年版)四部通则中细菌内毒素检查法中干扰试验检方法。

选取标准曲线中间点的内毒素浓度(设为 λ_m),作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度。制备如下的溶液。

①稀释倍数不超过最大稀释倍数(MVD)的供试品溶液,2管($MVD=c \cdot L/\lambda$,其中 c 为依克多因的样品浓度, L 为细菌内毒素限量值, λ 为标准曲线上最低的内毒素浓度。);

②与溶液①有相同稀释倍数的供试品溶液,其中加入了浓度为 λ_m 的内毒素,2管;

③用于制备标准曲线的标准内毒素溶液,每个浓度2管;

④阴性对照(BET水),2管。

将上述溶液进行内毒素含量测定后,按所得线性回归方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量,计算回收率,当内毒素的回收率在80%~120%,则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。

当内毒素的回收率不在指定的范围内,须排除干扰因素,重新进行干扰试验。

当鲎试剂、供试品的处方、生产工艺改变或试验环境等发生了任何有可能影响试验结果的变化时,须重新进行干扰试验。