

## 发酵类抗生素原料药 残留核酸、蛋白、糖类检测

### 背景介绍

微生物发酵被广泛用于多种抗生素（antibiotics）的生产，一般需经提取、纯化和结晶等多个过程，工艺复杂且生产周期较长。其中，来自发酵生产用菌的细胞核酸（HCDs）、蛋白（HCPs）的混合物、多糖等残留物，存在感染性、致癌性、免疫原性、诱变性等潜在风险。因此，发酵类抗生素药物中宿主细胞残留蛋白、核酸、糖类的检测十分必要。

目前，各国药典各论及通则项下均未收载或规定针对抗生素品种中特殊残留物（残留DNA和残留蛋白）的检测方法及限度要求，但各国监管机构（欧盟、FDA）均要求该类产品申报注册时需提供相关残留物的检测数据，以证明生产工艺的可靠性、稳定性及产品的安全性。近年来，随着我国“药品一致性评价”工作不断开展，CDE也越来越关注和强调对抗生素产品特别是 $\beta$ -内酰胺类抗生素中相关特殊残留物的控制。



湖州申科已成功帮助多家原料药出口生产企业提供菌种来源的宿主DNA、蛋白残留以及葡萄糖残留检测方法开发、方法验证和样品检测服务，成功帮助企业完成产品出口注册申报，包括欧盟、FDA等。

**咨询热线：0572-2115083**

**邮箱：info@shenkebio.com**

## 抗生素药物中残留DNA检测

不同品种的生物制剂中残留宿主DNA的限量要求为10pg-10ng/剂（《中国药典》2020版），而rHCD的限量和风险还与给药方式密切相关，静脉注射剂的限量标准最高。具体见表1。

表1 宿主细胞rHCD残留及风险等级 (Ref: 瑞士Solvias公司 “Prospects” 2013.2)

参数	类型	限值	风险因子
细胞株	原代细胞	-	1
	二倍体细胞株	-	1
	连续传代非肿瘤细胞株	≤10ng	2
	连续传代肿瘤细胞株	≤100pg	3
给药方式	口服	≤100ug	1
	皮下注射	≤10ng	2
	肌内注射	≤10ng	3
	静脉注射	≤100pg	4
	输液	≤100pg	5

抗生素微生物发酵主要菌种为放线菌科多个属。湖州申科主要采用qPCR方法，已完成对多种抗生素药物中残留DNA的检测，方法建立流程详见下图。

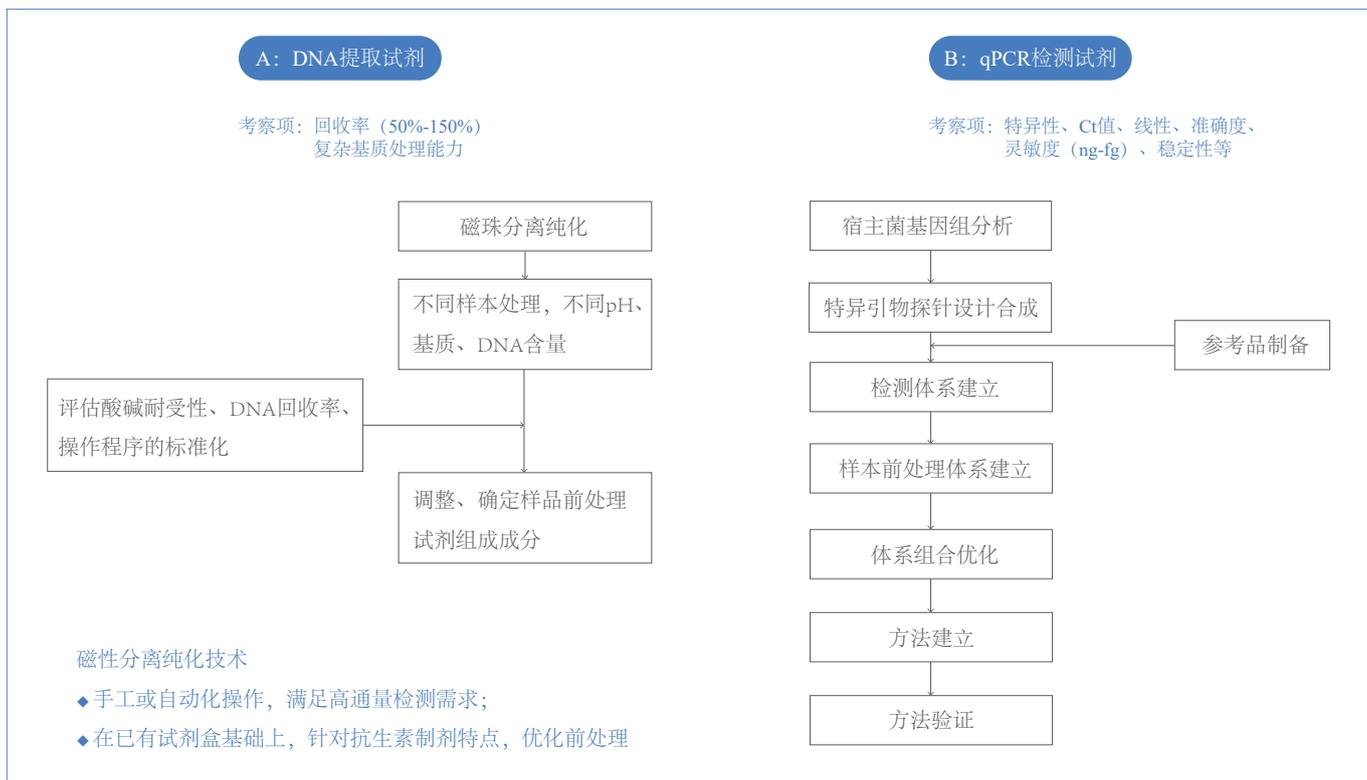


图1 qPCR方法建立图

◆ 方法开发及验证

表2 中间精密度

浓度 (mg/mL)	实验次数	样品检测值 (pg/μL)	6pg加标样品检测值 (pg/μL)	30pg加标样品检测值 (pg/μL)	300pg加标样品检测值 (pg/μL)
11.36	1	9.64×10 <sup>-5</sup>	7.27×10 <sup>-2</sup>	3.23×10 <sup>-1</sup>	2.43
		未检出	5.23×10 <sup>-2</sup>	3.12×10 <sup>-1</sup>	2.56
		1.03×10 <sup>-3</sup>	6.43×10 <sup>-2</sup>	2.78×10 <sup>-1</sup>	2.24
	2	1.17×10 <sup>-3</sup>	3.45×10 <sup>-2</sup>	2.34×10 <sup>-1</sup>	2.40
		2.32×10 <sup>-3</sup>	4.38×10 <sup>-2</sup>	2.58×10 <sup>-1</sup>	2.09
		未检出	4.38×10 <sup>-2</sup>	2.98×10 <sup>-1</sup>	2.19
	3	9.76×10 <sup>-5</sup>	6.13×10 <sup>-2</sup>	2.81×10 <sup>-1</sup>	2.75
		未检出	5.78×10 <sup>-2</sup>	2.74×10 <sup>-1</sup>	2.44
		2.40×10 <sup>-4</sup>	4.67×10 <sup>-2</sup>	2.62×10 <sup>-1</sup>	2.61
平均值 (pg/μL)		1.69×10 <sup>-4</sup>	5.25×10 <sup>-2</sup>	2.78×10 <sup>-1</sup>	2.50
CV%		/	23.0	9.8	8.4

表3 范围

理论浓度 (pg/μL)	平均值 (pg/μL)	CV (%)	偏差 (%)
3×10 <sup>3</sup>	2.79×10 <sup>3</sup>	13.2	7.3
3×10 <sup>2</sup>	3.02×10 <sup>2</sup>	6.7	0.7
3×10 <sup>1</sup>	3.21×10 <sup>1</sup>	5.8	7.3
3×10 <sup>0</sup>	3.06	9.2	2.0
3×10 <sup>-1</sup>	3.01×10 <sup>-1</sup>	5.0	0.7
3×10 <sup>-2</sup>	2.85×10 <sup>-2</sup>	15.3	5.0
3×10 <sup>-3</sup>	2.56×10 <sup>-3</sup>	52.9	15.0
3×10 <sup>-4</sup>	1.14×10 <sup>-3</sup>	/	/

表5 定量限

理论浓度 (pg/μL)	6.00×10 <sup>-3</sup>	3.00×10 <sup>-3</sup>
检测值 (pg/μL)	6.33×10 <sup>-3</sup>	4.25×10 <sup>-3</sup>
	8.54×10 <sup>-3</sup>	3.55×10 <sup>-3</sup>
	8.28×10 <sup>-3</sup>	3.74×10 <sup>-3</sup>
	5.28×10 <sup>-3</sup>	6.17×10 <sup>-3</sup>
	5.07×10 <sup>-3</sup>	3.44×10 <sup>-3</sup>
	5.19×10 <sup>-3</sup>	3.07×10 <sup>-3</sup>
	7.00×10 <sup>-3</sup>	4.85×10 <sup>-3</sup>
	5.17×10 <sup>-3</sup>	2.84×10 <sup>-3</sup>
	6.22×10 <sup>-3</sup>	2.22×10 <sup>-3</sup>
	6.35×10 <sup>-3</sup>	4.99×10 <sup>-3</sup>
平均值	6.33×10 <sup>-3</sup>	3.90×10 <sup>-3</sup>
CV (%)	19.7	29.6
偏差 (%)	5.7	30.5

表4 重复性

项目	样品	30pg加标样品
检测值 (pg/μL)	2.54×10 <sup>-4</sup>	1.79×10 <sup>-1</sup>
	未检出	1.95×10 <sup>-1</sup>
	未检出	2.00×10 <sup>-1</sup>
	未检出	2.01×10 <sup>-1</sup>
	未检出	2.03×10 <sup>-1</sup>
	未检出	1.85×10 <sup>-1</sup>
平均值	2.54×10 <sup>-4</sup>	1.92×10 <sup>-1</sup>
CV (%)	/	5.4

表6 准确性

检测值(pg/μL)	加标量 (pg)	加标检测值(pg/μL)	CV (%)	回收率 (%)
1.60×10 <sup>-4</sup>	300	2.60	5.8	86.7
	30	2.73×10 <sup>-1</sup>	3.3	90.9
	6	5.53×10 <sup>-2</sup>	13.8	91.9

表7 专属性

细胞基因组DNA	Ct均值	细胞基因组DNA	Ct均值
毕赤酵母	36.53	MDCK	未检出
CHO	未检出	Sf9	未检出
E.coli	36.07	Vero	37.21
Human	未检出	AcNPV	未检出
NTC	38.15		

表8 样品结果分析

样品	检测均值(pg/μL)	回收率(%)	残留量(pg/mg)
1	5.78×10 <sup>-5</sup>	91.6	< 2.5×10 <sup>-1</sup>
2	2.68×10 <sup>-4</sup>	97.7	< 2.5×10 <sup>-1</sup>
3	1.15×10 <sup>-2</sup>	94.8	9.8×10 <sup>-1</sup>

注：USP<509> & ChP<3407>要求：标曲R<sup>2</sup>>0.980，斜率-3.8~-3.1；样本回收率50%~150%；阴性质控样本Ct值大于标曲最低浓度Ct值。

**检测方法优点**

易标准化、回收率高、专用机器自动化操作、通量高（1~32通道）、避免操作污染、降低工作强度。

湖州申科已为多家企业生产的多种抗生素原料药中来自宿主菌的DNA残留量进行检测，相关数据详见表9。

表9 抗生素中宿主菌DNA残留数据汇总

抗生素名称	宿主菌	宿主菌DNA残留量 (pg/mg)
粘菌素甲烷磺酸钠	多粘类芽孢杆菌	1.69 / 1.68 / 0.14
盐酸万古霉素	东方拟无枝酸菌	<6
米尔贝肟	冰城链霉菌	1.67 / 0.74 / 0.26
达托霉素	玫瑰孢链霉菌	<3
硫酸庆大霉素	小单孢菌	0.22 / 2.21 / 0.98
替考拉宁	游动放线菌	7.6 / 27.9 / 2.3
盐酸林可霉素	盐酸林可霉菌	0.013 / 0.021 / 0.015
洛伐他汀	桔青霉菌	<6
霉酚酸	短密青霉菌	<6

## 抗生素药物中残留总蛋白检测

表10 各国药典对生物制品外源性残留蛋白相关检测技术方法收载情况汇总表

具体检测项目	Chp 2020	USP 43	EP 10.0	JP 17
HCP残留	ELISA法 <3411>牛血清白蛋白残留量测定法 <3412>大肠杆菌菌体蛋白质残留量测定法 <3414>酵母工程菌菌体蛋白质残留量测定法	ELISA法 <1132>	ELISA法 <2.6.34>	ELISA法 <第一增补>
蛋白含量	<0731> 凯氏定氮法 福林酚法（Lowery法） 双缩脲法（Biuret测定法） BCA法 考马斯亮蓝法（Bradford法） 紫外-可见分光光度法	<1057> UV测定法（280 nm） Lowry测定法 Bradford测定法 BCA测定法 Biuret 测定法 荧光测定法 定氮法	<2.5.33> 同USP 43	同USP 43
多肽/蛋白	—	—	—	MS及MS/MS分析

湖州申科主要采用蛋白沉淀法，对抗生素药物样品中存在的微量蛋白进行富集，结合考马斯亮蓝法进行总蛋白检测。该方法灵敏度高，可同时适用于水溶性样品和醇溶性样品。

### ◆ 方法开发及验证

表11 Bradford法定量限验证结果

浓度 (µg/mL)	5	2.5	1.25
检测浓度 (µg/mL)	4.47	2.50	1.63
	4.81	2.60	1.66
	4.55	2.30	1.16
	6.02	2.45	1.80
	4.21	1.98	1.62
	4.26	2.90	1.70
	4.73	2.46	1.55
	4.58	2.25	1.06
	4.83	2.94	1.56
3.70	2.15	1.51	
检测浓度均值 (µg/mL)	4.61	2.46	1.53
SD	$5.95 \times 10^{-1}$	$3.27 \times 10^{-1}$	$2.40 \times 10^{-1}$
CV (%)	12.8	13.2	15.5
偏差 (%)	7.5	1.7	23.0

表12 重复性验证结果

样品名称	批号	加标量 (μg)	OD值	检测浓度 (μg/mL)	浓度均值 (μg/mL)	CV (%)
利福霉素原料	S201101	0	0.370	$7.39 \times 10^{-1}$	$5.92 \times 10^{-1}$	/
			0.362	$3.83 \times 10^{-1}$		
			0.368	$6.62 \times 10^{-1}$		
			0.341	未检出		
			0.350	未检出		
			0.343	未检出		
		1.5	0.625	13.20	11.40	13.4
			0.608	12.20		
			0.586	10.72		
			0.588	10.72		
			0.559	9.18		
			0.612	12.48		

表13 准确性

加标量 (μg)	OD值	检测浓度 (μg/mL)	浓度均值 (μg/mL)	回收率(%)	CV (%)
0	0.340	未检出	/	/	/
	0.351	未检出			
	0.342	未检出			
1.5	0.588	10.70	10.77	107.5	15.8
	0.556	9.06			
	0.611	12.48			

表14 Bradford法检测限验证结果

OD值 (10复孔)	0.383	0.355	0.386	0.354	0.370
	0.388	0.364	0.362	0.370	0.366
OD均值	0.370				
SD	$1.26 \times 10^{-2}$				
OD均值+2SD	$3.95 \times 10^{-1}$				
检测限浓度 (μg/mL)	$5.41 \times 10^{-1}$				

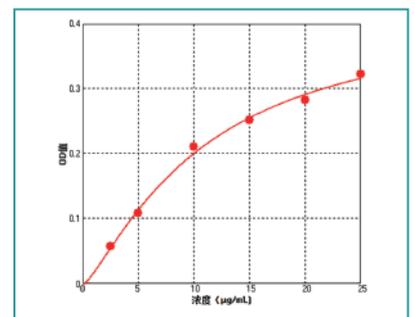


图3 线性范围

## 抗生素药物中残留多糖检测

根据《中国药典》2020年版第四部“分析方法验证指导原则”中检测项目和验证指标，完成抗生素药物中残留多糖检测方法开发及验证。

表15 生物制品杂质测定检测项目和验证指标

项目 指标	鉴别	杂质测定		含量测定特性参数
		定量	限度	含量或效价测定
专属性	+	+	+	+
准确度	-	+	-	+
精密度				
重复性	-	+	-	+
中间精密度	-	+	-	+
检测限	-	-	+	-
定量限	-	+	-	-
线性	-	+	-	+
范围	-	+	-	+
耐用性	+	+	+	+

湖州申科采用离子色谱柱法（HPLC/MS），通过葡萄糖的检测来实现对抗生素药物样品中存在的多糖残留进行检测。所建立的方法进行方法学验证以确保结果可信，该方法灵敏度高。

### ◆ 方法开发及验证

表16 准确性

样品量 (mL)	样品含量 ( $\mu\text{g}$ )	上机溶液测得量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	折算至样品中测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收量 ( $\mu\text{g}$ )	对照品加入量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	RSD (%)
0.2	0	0.149	0.298	0.298	0.299	99.6	3.58
		0.144	0.288	0.288		96.3	
		0.159	0.318	0.318		106.3	
		0.245	0.490	0.490	0.499	98.2	
		0.240	0.480	0.480		96.0	
		0.248	0.496	0.496		99.4	
		0.523	1.046	1.046	0.998	104.8	
		0.505	1.010	1.010		101.2	
		0.484	0.968	0.968		96.8	
		0.789	1.578	1.578	1.497	105.4	
		0.730	1.460	1.460		97.5	
		0.743	1.486	1.486		99.2	

表17 适用性

序号	浓度 (µg/mL)	葡萄糖峰面积/内标峰面积	RSD (%)
对照品1-1	0.499	0.2191	2.71
对照品1-2		0.2111	
对照品1-3		0.2246	
对照品1-4		0.2265	
对照品1-5		0.2267	
对照品1-6		0.2230	

表18 专属性

名称	峰面积	保留时间 (min)	选择离子对
葡萄糖	247.46	4.7	178.98→59

表19 重复性

编号	上机溶液测得量 (µg/mL)	相当于药品中含量 (µg/mL)	平均值 (µg/mL)	RSD (%)
重复性-1	0.47	4.7	4.9	4.1
重复性-2	0.48	4.8		
重复性-3	0.53	5.3		
重复性-4	0.49	4.9		
重复性-5	0.49	4.9		
重复性-6	0.51	5.1		

表20 中间精密度

序号	含量 (µg/mL)						平均	RSD (%n=12)
	1	2	3	4	5	6		
实验员A	4.720	4.880	5.290	4.990	4.900	5.150	5.05	3.27
实验员B	5.000	5.010	5.230	5.130	5.150	5.170		

表21 检测限与定量限

项目	溶液浓度 (µg/mL)	相当于药品中含量 (µg/mL)	编号	葡萄糖峰面积/内标峰面积	RSD (%)	信噪比
检测限	0.100	1.000	1	0.039	/	96.8
			2	0.044		48.5
			3	0.040		101.0
定量限	0.150	1.500	1	0.066	3.04	136.7
			2	0.067		160.2
			3	0.065		199.8
			4	0.062		103.7
			5	0.067		116.8
			6	0.066		194.4

表22 标准曲线

编号	溶液浓度 (µg/mL)	相当于药品中的浓度 (µg/mL)	线性方程	相关系数 (r)	100%浓度峰面积的25%
线性-1	0.15	1.5	y=44.5686X-0.3308	0.9999	154.5
线性-2	0.25	2.5			
线性-3	0.49	4.9			
线性-4	0.74	7.4			
线性-5	0.99	9.9			

表23 耐用性

序号	时间 (h)	葡萄糖峰面积/内标峰面积	平均值	RSD (%)
1	0	0.2348	0.2263	2.61
2	1.5	0.2207		
3	5.5	0.2192		
4	7	0.2292		
5	10.5	0.2256		
6	18.5	0.2303		