

动态显色法检测脐带间充质干细胞悬液中细菌内毒素含量

袁超璐, 张思师, 陈绎如, 李嘉慧, 唐嘉*

(浙江自贸区霍普金斯生物科技有限公司, 舟山 316000)

摘要 目的: 建立用于定量检测脐带间充质干细胞悬液中细菌内毒素的方法, 并验证其可行性。方法: 参考 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 第四部通则 1143 细菌内毒素光度测定法的标准, 从标准曲线建立及可靠性验证、供试品干扰初筛及干扰性检测 2 个方面, 初步建立脐带间充质干细胞悬液中细菌内毒素含量的检测方法, 并用此方法对 3 批脐带间充质干细胞悬液的细菌内毒素进行了定量检测。结果: 在标准曲线建立可靠性验证中, 得到线性回归方程: $\lg T = 2.7780 - 0.2814 \lg C$, $r = -0.9998$, $|r| > 0.980$, 阴性对照的 $T > 3600$ s (标准曲线最低点平均反应的 T 为 2690 s), 反应重复管的 RSD 均 $\leq 10\%$, 表明标准曲线建立成功; 干扰初筛试验结果显示, 干细胞悬液在 20、40、80 稀释倍数下, 对鲎试剂检测均无干扰作用, 且 40 倍稀释时的回收率接近 100%, 表明在无干扰的情况下, 40 倍为最佳干扰稀释倍数; 3 批供试品的试验结果显示, 40 倍稀释下, 3 批供试品的内毒素含量均小于限值 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且 RSD 均 $< 10\%$, 阳性回收率在 86.8%~101.2%, 符合 2020 年版《中国药典》的规定。结论: 本方法能快速定量检测脐带间充质干细胞悬液中内毒素含量, 抗干扰能力强, 能较好地满足细胞悬液中细菌内毒素含量测定。

关键词: 脐带间充质干细胞; 细胞悬液; 细菌内毒素; 动态显色法; 定量检测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2022)12-2110-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2022.12.06

Dynamic chromogenic method for detection of bacterial endotoxin content in umbilical cord mesenchymal stem cell suspension

YUAN Chao-lu, ZHANG Si-shi, CHEN Yi-ru, LI Jia-hui, TANG Jia*

(Zhejiang Free Trade Zone Hopkins Biotechnology Co., Ltd., Zhoushan 316000, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative detection method of bacterial endotoxin in umbilical cord mesenchymal stem cell suspension and verify its feasibility. **Methods:** According to the standards for photometric determination of bacterial endotoxin in General notice 1143 of Chinese Pharmacopoeia part IV (2020 edition). A preliminary detection method of bacterial endotoxin content in umbilical cord mesenchymal stem cell suspension was established from two aspects: standard curve establishment, reliability verification, sample interference screening and interference detection. Bacterial endotoxins in three batches of umbilical cord mesenchymal stem cell suspensions were quantitatively detected by this method. **Results:** In the establishment of standard curve and reliability verification test, the linear regression equation was $\lg T = 2.7780 - 0.2814 \lg C$, $r = -0.9998$, $|r| > 0.980$, negative control time > 3600 s (standard curve low average response of time was 2690 s), repeated

* 通信作者 Tel: (0580)6870203; E-mail: gtang@hopkinsbiotech.com

第一作者 Tel: (0580)6870203; E-mail: lyuan@hopkinsbiotech.com

reaction tube RSD were 10% or less, the standard curve was established successfully. The results of interference screening test showed that the stem cell suspension had no interference on limulus test at the dilution ratio of 20, 40 and 80, and the recovery rate was close to 100% at the dilution ratio of 40, indicating that 40 times was the best interference dilution ratio without interference. The results of the three batches of samples showed that the endotoxin content of the three batches of samples were less than $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ under 40 times dilution, and the RSD was less than 10%. The positive recovery was 86.8%–101.2%, which complied with The Chinese Pharmacopoeia 2020 edition. **Conclusion:** This method can quickly and quantitatively detect the content of endotoxin in umbilical cord mesenchymal stem cell suspension, and has strong anti-interference ability, which can meet the determination of bacterial endotoxin in cell suspension.

Keywords: umbilical cord mesenchymal stem cells; cell suspension; bacterial endotoxin; dynamic colorimetry; quantitative detection

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是具有自我复制和多向分化潜能的多能干细胞,是目前临床应用研究较多的 1 类干细胞^[1-3]。从脐带中分离的间充质干细胞又称人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, Hu-MSCs) 具有来源广泛,提取简单、增殖能力强,无伦理学争议等优势,越来越受到人们的关注。据报道, Hu-MSCs 已被广泛应用于自身免疫性疾病、心脑血管疾病、骨骼与肌肉衰退性疾病、肝病、脑及脊髓神经损伤和老年痴呆等疾病的治疗^[4-7]。

细菌内毒素 (endotoxin), 又称“热原”, 是脂多糖复合物, 单位 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 是革兰氏阴性菌和部分蓝藻中存在的毒性物质的总称, 是多种革兰氏阴性菌的细胞壁成分, 细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素。细菌内毒素广泛存在于自然界中, 属于强免疫刺激因子, 进入机体后能导致严重的炎症级联反应, 引起一系列的病理生理反应。极微量 ($1 \sim 5 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的内毒素进入人体即可引起发热反应; 大剂量的细菌内毒素可引起机体发生内毒素休克、弥散性血管内凝血、多器官衰竭等反应甚至死亡^[8]。

按照 2020 年版《中国药典》三部的规定, 细菌内毒素的检测方法有凝胶法和动态显色法。动态显色法的机制是在检测试剂中添加了显色基质, 在一定的时间内, 内毒素激活鲎试剂发生多级酶促反应, 导致凝固酶生成, 凝固酶水解显色基质, 释放出显色基团在溶液中呈黄色, 用酶标仪测定溶液的吸收度 (A)^[9]。与凝胶法相比, 动态显色法能定量显示检测结果, 结果易保存, 尤其在临界条件下, 更容易进行结果的判定^[10]。

目前细菌内毒素检查已被广泛应用于药品检验、药品生产过程质控、食品卫生、环境保护、医疗器械以及临床应用中的辅助诊断等领域, 但鲜有关于对 MSC 悬液检测的报道, 而 MSC 悬液中细菌内毒素的测定又是《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》中的必检项目, 因此本研究参照 2020 年版《中国药典》三部细菌内毒素动态显色检查法的要求, 建立 1 套 MSC 悬液中细菌内毒素的检测方法, 为 MSC 制品细菌内毒素的检测提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Protect-2FD-S 超净工作台、Vortex 涡旋混匀器 (赛默飞世尔科技有限公司); Proline Plus 移液枪 (赛多利斯公司); BioTek Elx808IU 酶标仪、BioProde 生物探针 5.0、细菌内毒素检查试管、细菌内毒素检查 96 孔反应板 (湛江安度斯生物有限公司)。

1.2 试剂

鲎试剂 (TAL), 批号 2012090, 规格 $1.25 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ (湛江安度斯生物有限公司); 细菌内毒素标准品 (RSE), 批号 150601-202088, 规格 $60 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$ (中国食品药品检定研究院); 细菌内毒素检查用水 (BET 水), 批号 2103110, 规格 $50 \text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$ (湛江安度斯生物有限公司)。

2 方法和结果

2.1 定义

2.1.1 供试品细菌内毒素限值 细菌内毒素限值一般是通过公式 $L = K/M$ 计算得到的 (L : 细菌内毒素限值; K : 人每千克体质量每小时最大可接受的内

毒素剂量; M : 人每千克体质量每小时的最大供试品剂量^[11]。根据 2020 年版《中国药典》四部 9251 细菌内毒素检查法应用指导原则, 100 mL 及以上装量的大输液类制剂, 其细菌内毒素限制一般不得超过 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[12]。故参考药典, 本试验确定 MSC 悬液中细菌内毒素的限定值也为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 最大有效稀释倍数 根据 2020 年版《中国药典》第三部(通则 1143), 最大有效稀释倍数(maximum valid dilution, MVD) 是指在试验中供试品溶液被允许被稀释的最大倍数。用公式 $MVD = cL/\lambda$ 计算^[11]。公式中 L : 细菌内毒素限值; c : 为供试品溶液的浓度; λ : 鲎试剂的标示灵敏度($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 或是在吸收度测定法中所使用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

2.2 标准曲线的制作方法和结果

2.2.1 不同浓度稀释液配制 取 1 支效价为 $60 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$ 的 RSE, 加入 BET 水 1.2 mL 复溶, 涡旋 15 min, 得到中间液浓度为 $50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。取中间液 0.1 mL 和 BET 水 900 μL 加入到细菌内毒素检查试管中, 涡旋 30 s, 得到 $5.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。根据上述稀释方法, 再逐级稀释, 得到终浓度分别为 0.5 、 0.05 、 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时做阴性对照管。取 1 支 TAL, 参照鲎试剂说明书, 加入 BET 水 1.25 mL, 轻摇待澄清后, 得到复溶的显色鲎试剂。

2.2.2 加样及检测 加样如表 1 所示, 用移液枪往 A1 孔内准确加入阴性对照(BET 水) 0.1 mL, 再往 B1-E14 个孔内分别加入 4 个浓度的标准溶液 0.1 mL(标准溶液从低浓度开始加), 然后往 A1-E15 个孔内分别加入 TAL 0.1 mL。重复第 1 列的操作, 在第 2 列与第 3 列设置 3 组平行。

将 96 孔板放置酶标仪中, 确保加样孔内无气泡, 设置反应温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长为 405 nm, 预设 A 为 0.05, 反应时间为 3 600 s, 进行检测。根据鲎试剂使用说明书对光度测定法的规定: 阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度(c) 的反应时间, 反应重复管的 RSD $\leq 10\%$, 且根据 2020 年版《中国药典》三部通则 1143 细菌内毒素检查法光度测定法中, 根据线性回归分析, 标准曲线的相关系数(r) 的绝对值应 ≥ 0.980 , 试验方为有效, 否则须重新试验^[11]。

2.2.3 标准曲线结果 根据检测数据, 将标准曲线进行线性回归, 以反应时间 T 的对数($\lg T$) 为纵坐

表 1 96 孔板加样模板示意图

Tab. 1 Schematic diagram of 96 - well plate loading template

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○									
B	★	★	★									
C	★	★	★									
D	★	★	★									
E	★	★	★									
F												
G												
H												

注(note): ○. 阴性对照(negative control) ★. 标准品(standard substance)

1 ~ 12. 96 孔板竖列序号(vertical serial number of 96 - well plate)

A ~ H. 96 孔板横排序号(horizontal serial number of 96 - well plate)

标, 以细菌内毒素标准品浓度的对数($\lg C$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程:

$$\lg T = 2.778 - 0.2814 \lg C \quad r = -0.9998$$

$|r| > 0.980$, 阴性对照的 $T > 3\ 600 \text{ s}$ (标准曲线最低点平均反应的 T 为 2 690 s), 反应重复管的 RSD 均 $\leq 10\%$ 。可见, 标准曲线试验成立, 表明试验有效, 结果见图 1 和表 2。

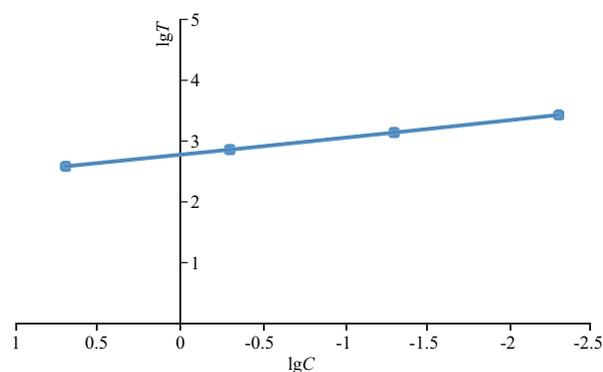


图 1 内毒素标准曲线

Fig. 1 Standard curve of endotoxin

2.3 供试品的干扰初筛试验

2.3.1 内毒素标准溶液的制备 取 1 支 RSE, 按“3.2.1”项下方法稀释, 得到终浓度分别为 0.5 、 0.05 、 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品稀释液, 在细菌内毒素检查试管上分别标记为 $E_{0.005}$ 、 $E_{0.05}$ 、 $E_{0.5}$ 、 E_5 (下标数字为内毒素浓度)。

表 2 标准曲线可靠性的试验结果

Tab. 2 Test results of standard curve reliability

标准内毒素浓度 (standard endotoxin Concentration)/ (EU · mL ⁻¹)	T/ s	实测值 (measured value)/ (EU · mL ⁻¹)	RSD/ %
0(阴性对照) (negative control)	>3 600	<0.001 45	0
0.005	2 680 2 705 2 685	0.004 83	0.49
0.05	1 367 1 391 1 382	0.051 76	0.88
0.5	728 716 722	0.517 31	0.83
5.0	380 389 386	4.831 66	1.2

2.3.2 供试品溶液的稀释 根据公式 $MVD = cL/\lambda$ 计算,本实验中 $L = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $c = 1.0 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\lambda = 0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 计算得到 $MVD = 100$ 倍,故设定本试验的稀释倍数设为 20、40、80 倍。取 MSC 悬液用 BET 水按稀释倍数稀释成浓度为 20、40、80 倍稀释液,分别标记为 S_{20} 、 S_{40} 、 S_{80} (下标数字为供试品的稀释倍数)。

2.3.3 供试品溶液阳性对照的制备 分别吸取 S_{20} 、 S_{40} 、 S_{80} 的稀释液 0.9 mL 于 3 支细菌内毒素检查试管内,用移液枪准确加入 E_5 0.1 mL,涡旋混合 30 s,使供试品阳性对照溶液终浓度为 20、40、80 倍,内毒素终浓度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别标记为 $S_{20}E_{0.5}$ 、 $S_{40}E_{0.5}$ 、 $S_{80}E_{0.5}$ 。

2.3.4 与鲎试剂反应 取 1 支 TAL,加入 BET 水 1.25 mL,轻摇待澄清后,得到复溶的显色鲎试剂。取 $E_{0.005}$ 、 $E_{0.05}$ 、 $E_{0.5}$ 、 E_5 、 S_{20} 、 S_{40} 、 S_{80} 、 $S_{20}E_{0.5}$ 、 $S_{40}E_{0.5}$ 、 $S_{80}E_{0.5}$ 0.1 mL,分别与 TAL0.1 mL 反应,加至 96 孔板内(如表 3 所示),每个浓度做 3 个平行,另外取 3 管 BET 水作为阴性对照。将 96 孔板放入酶标仪中,设置反应温度为 37 °C,检测波长为 405 nm,预设 A 为 0.05, T 为 3 600 s,进行检测。

表 3 96 孔板加样模板示意图

Tab. 3 Schematic diagram of 96 - well plate loading template

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	●	●	●						
B	★	★	★	◎	◎	◎						
C	★	★	★	●	●	●						
D	★	★	★									
E	★	★	★									
F	◎	◎	◎									
G	●	●	●									
H	◎	◎	◎									

注:○. 空白对照(negative control) ★. 标准品(standard substance) ◎. 样品(sample) ●. 阳性对照(positive control)
1 ~ 12. 96 孔板竖列序号(vertical serial number of 96 - well plate) A ~ H. 96 孔板横排序号(horizontal serial number of 96 - well plate)

2.3.5 供试品干扰初筛结果 结果见表 4,回收率符合 2020 年版《中国药典》三部通则 1143 中细菌内毒素检查法吸收度测定法规定,均在 50%~200% 范围内,说明 MSC 悬液在稀释 20~80 倍时对试验均无干扰^[11]。经分析比较,选择无干扰且回收率接近 100% 的 40 倍稀释倍数,设为干扰试验的稀释倍数。

2.4 供试品的干扰实验

取 3 批 MSC 悬液,用 BET 水对 3 批细胞悬液进行 40 倍稀释,作为供试品溶液 A,用于干扰验证实验。其余溶液制备按照干扰初筛试验的方法进行。结果见表 3,3 批次的 MSC 悬液的回收率均在 50%~200% 范围内,符合 2020 年版《中国药典》三部通则 1143 中细菌内毒素检查法光度测定法的规定,表明在 40 倍稀释条件下供试品对试验无干扰,测得的内毒素结果真实有效^[11]。

采用动态显色法检测 3 批 MSC 悬液的细菌内毒素含量均小于标准曲线的最低值,回收率均符合规定,供试品的细菌内毒素浓度均小于规定的限值,判定供试品符合规定。

3 讨论

从 USP 20 收录鲎试验以来,各国药典等相继收录该方法。1993 年版《中国药典》第二增补本开始收录鲎试验用于检测内毒素,2005 年版《中国药典》正式将光度法(浊度法和显色法)收录作为内毒素的测试方法。由于鲎试验的灵敏度远远高于家兔法,操作简单,成本低廉,标准化程度高,重复性好,此后鲎试验逐渐替代家兔热原试验。但是,对某些注射

表 4 脐带间充质干细胞悬液干扰初筛试验结果

Tab. 4 The results of preliminary screening tests of MSC suspension

稀释倍数 (dilution multiple)	T/s	实测值 (measured value)/EU · mL ⁻¹	RSD/%	回收率 (recovery)/%
20	903	0.299 93	3.62	59.8
	840			
	871			
40	756	0.492 95	1.6	98.4
	780			
	763			
80	798	0.404 76	1.4	80.7
	808			
	821			

表 5 脐带间充质干细胞悬液干扰试验结果

Tab. 5 The results of interference tests of MSC suspension

样品批号 (lot number of sample)	稀释倍数 (dilution multiple)	T/s	样品阳性实测值 (positive measured value of the sample)/ (EU · mL ⁻¹)	RSD/%	回收率 (recovery)/%	供试品实测值 (measured values for the test product)/ (EU · mL ⁻¹)	供试品限值 (test product limits)/ (EU · mL ⁻¹)
Z211120001	40	913	0.459 36	1.4	91.6	0.001 14	0.5
		939					
		924					
Z211123001	40	927	0.435 00	0.96	86.8	0.001 14	0.5
		943					
		942					
Z211124001	40	870	0.507 10	3.9	101.2	0.001 14	0.5
		940					
		896					

用药品及原料在进行细菌内毒素检查时,需要排除干扰因素,以适应用鲎试剂检测细菌内毒素时所需的基本条件。往往在样品检测前需加入 2 价阳离子调节剂、碱性或酸性调节剂,或者采用稀释法来消除样品对鲎试剂的干扰^[13]。但由于部分药品自身特殊性无法消除干扰,故鲎试验还是无法完全取代家兔热原试验。

2020 年版《中国药典》三部中,凝胶法和动态显色法均为细菌内毒素检测规定的方法,但是凝胶法检测结果只能定性,即使采用凝胶半定量法,也会有很大的误差范围,而且它的操作复杂,时间长,每次检测的样品数量少而且容易受到人为、环境等因素的影响造成假阳性的结果。动态显色基质法是基于

显色基质颜色的变化速率来定量检测内毒素,因此对于有些干扰凝胶形成或浊度测定的因素不会影响反应^[14-17]。而且它能快速地定量检测样品中的内毒素含量,能较为准确评估产品在生产过程中污染的相对风险。每次检测的样品数量较多,数据还具有可追溯性,能利于追踪产品质量趋势;还可以通过回收率判断出干扰的趋势,尤其对于研究性质的样品更具有优势。

对 MSC 悬液在进行细菌内毒素检查法方法学验证试验时,进行了干扰初筛试验。其可以分析不同样品质量浓度对鲎试剂与细菌内毒素凝集反应的干扰程度,以便初步筛选其干扰试验的浓度。这样可以避免干扰试验的盲目性。进行干扰试验,以加标

回收率来分析样品对鲎试验的抑制/增强效果,能确定样品的干扰情况和保证数据可靠性。在细菌内毒素检测样品之前,进行上述 2 个试验既节省了大量的时间和试剂,也降低了成本,同时还提高了工作效率。本试验所采用的动态显色法对 MSC 悬液细菌内毒素的检测方法进行验证,结果表明,标准细菌内毒素的浓度在 $0.005 \sim 5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,标准曲线线性关系良好, $|r| > 0.980$, $\text{RSD} < 20\%$,供试品阳性对照的回收率在 $50\% \sim 200\%$ 范围内。因此,使用动态显色法对 MSC 悬液进行细菌内毒素检测是可行的。

参考文献

- [1] PHINNEY DG, PROCKOP DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of trans differentiation and modes of tissue repair—current views[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2896
- [2] REINE EO, JACQUELINE B, STOLTZ JF, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(5):523
- [3] 刘梦婷,饶巍,韩兵,等. 人脐带间充质干细胞的体外免疫调节特性[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(7):1063
- LIU MT, RAO W, HAN B, *et al.* Immunomodulatory characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2020, 24(7): 1063
- [4] 项楠,汪国生,厉小梅. 我国干细胞临床研究现状分析、政策回顾及展望[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2020, 10(5):303
- XIANG N, WANG GS, LI XM. Status quo, policy review and prospect of stem cell clinical trials in china [J]. *Chin J Cell Stem Cell (Elect Edit)*, 2020, 10(5): 303
- [5] 蒋伟民,黄元华,马燕琳. 人胚胎干细胞建株与维持培养条件的优化[J]. *生命科学研究*, 2014, 18(4):349
- JIANG WN, HUANG YH, MA YL. The optimization of generating and culturing human embryonic stem cells [J]. *Life Sci Res*, 2014, 18(4): 349
- [6] 周琪,任小波,杨旭,等. 面向未来的新一轮医疗技术革命—干细胞与再生医学研究战略性先导科技专项进展[J]. *中国科学院院刊*, 2015, 30(2): 262
- ZHOU Q, RENG XB, YANG X, *et al.* Confronting coming medical renovation—progress on stem cell and regenerative medicine research[J]. *Bull Chin Acad Sci*, 2015, 30(2): 262
- [7] 祝贺,郝捷,周琪,等. 临床级干细胞库及干细胞制剂[J]. *生命科学*, 2016, 28(8): 895
- ZHU H, HAO J, ZHOU Q, *et al.* Clinical-grade stem cell bank and stem cell products[J]. *Life Sci*, 2016, 28(8): 895
- [8] 张军霞,郭姣梅,周继春,等. 动态显色法检测 4 种清热解毒类中药注射液中细菌内毒素含量[J]. *中国药房*, 2018, 29(13):1806
- ZHANG JX, GUO JM, ZHOU JC, *et al.* Content determination of bacterial endotoxin in 4 kinds of heat-clearing and detoxifying TCM injections by kinetic chromogenic assay [J]. *China Pharm*, 2018, 29(13): 1806
- [9] 李树徐,梁进. 微量动态显色法定量检测 3 种大输液的细菌内毒素[J]. *中国药师*, 2014, 17(6): 1052
- LI SY, LIANG J. Application of micro-kinetic chromogenic method in endotoxin quantitative detection of three kinds of infusions [J]. *China Pharm*, 2014, 17(6): 1052
- [10] 杨晨曦. 细菌内毒素试验凝胶定性法与动态浊度定量法的比较[J]. *临床血液学杂志*, 2010, 23(6): 366.
- YANG CX. Comparison of gel qualitative method and dynamic turbidity quantitative method for bacterial endotoxin test [J]. *J Clin Hematol*, 2010, 23(6): 366
- [11] 中华人民共和国药典 2020 年版. 三部[S]. 2020:179
- ChP 2020. Vol III [S]. 2020:179
- [12] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:178
- ChP 2020. Vol IV [S]. 2020:178
- [13] 林金海,陈晓佳,丁友玲. 注射用盐酸溴己新原料中细菌内毒素的检测[J]. *上海医药*, 2020, 41(7): 75
- LIN JH, CHEN XJ, DING YL. Study on the bacterial endotoxin test in the raw material of bromhexine hydrochloride for injection [J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2020, 41(7): 75
- [14] 马莉,张焱,王安航,等. 细菌内毒素定量检测方法的常见问题剖析[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(9): 733
- MA L, ZHANG S, WANG AH, *et al.* Analysis of common problems in quantitative detection of bacterial endotoxin [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2013, 33(9): 733
- [15] 田祥学. 细菌内毒素检查法及其在药品检验中的应用[J]. *中国医药指南*, 2015, 13(23): 278
- TIAN XX. Bacterial endotoxin test and its application in drug inspection [J]. *Guid Chin Med*, 2015, 13(23): 278
- [16] 王巨才,王雪. 动态显色法定量检测磺达肝癸钠注射液中细菌内毒素[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(1): 180
- WANG JC, WANG X. Determination of bacterial endotoxin in fondaparinux sodium injection by kinetic chromogenic assay [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(1): 180
- [17] 裴宇盛,蔡彤,高华. 细菌内毒素检查新方法进展[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(3): 392
- PEI YS, CAI T, GAO H. Progress on new methods of bacterial endotoxin test [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(3): 392

(本文于 2022 年 8 月 21 日修改回)