

· 实验研究 ·

基于质量源于设计理念建立硫酸新霉素中外源 DNA 的检测方法

张培培,姚尚辰,李 进,张 夏,邹文博,许明哲,王 琰,宁保明
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要] **目的:**基于分析方法质量源于设计(analytical quality by design, AQBd)理念进行实验设计(design of experiment, DOE),建立硫酸新霉素药物中外源 DNA 荧光染色检测方法。**方法:**利用 MODDE[®] Pro11 软件进行 DOE 开发,对关键影响因素和模型参数进行考察和优化,再采用基于荧光染色原理的 Qubit[®] DNA 检测试剂盒进行方法建立。**结果:**建立了硫酸新霉素中外源 DNA 的通用性检测方法。该方法的关键影响因素为溶剂种类、溶剂浓度和供试液浓度;溶剂种类选择氯化钠,最优分析条件为溶剂浓度 $1.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、供试液浓度 $1.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;该方法线性关系良好($r=0.9957, n=2$),加样回收率 $>81.0\%$,耐用性实验中加样回收率均在优化标准 $80\% \sim 120\%$ 范围内。**结论:**该方法准确度高、稳固性强、通用性好,为建立发酵来源化学药品中的外源 DNA 方法提供了参考。

[关键词] 硫酸新霉素;外源 DNA;新霉素-DNA 相互作用;荧光染色法;质量源于设计理念

[中图分类号] R932 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)09-0947-08

Development of the detection method for exogenous DNA of neomycin sulfate based on QbD concept

ZAHNG Pei-pei, YAO Shang-chen, LI Jin, ZHANG Xia, ZOU Wen-bo, XU Ming-zhe,
WANG Yan, NING Bao-ming
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a detection method for exogenous DNA in neomycin sulfate drugs based on the concept of analytical quality by design (AQBd). **Methods:** The MODDE Pro11 software was used to design the experiment, investigate the key influencing factors and optimize the parameters. Qubit[®] DNA detection kit based on fluorescence staining method was employed for the determination of exogenous DNA. **Results:** The universal detection method of exogenous DNA in neomycin sulfate was established. The key effect factors are solvent type, solvent concentration and sample concentration. When NaCl was used as solvent, the optimal analysis conditions were solvent concentration at $1.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and sample concentration at $1.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The linear range of DNA standard was $20 \sim 100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9957, n=2$). The accuracy was above 81.0% . The recoveries in ruggedness tests were $80\% \sim 120\%$. **Conclusion:** The established method is accurate, robust and universal. This study provides reference for the development of determination of exogenous DNA in aminoglycoside antibiotics.

[Key words] neomycin; exogenous DNA; the binding of neomycin-DNA; fluorescence staining method; analytical quality by design concept

硫酸新霉素是从弗氏链霉菌发酵液中提取得到 为主,属于第一代氨基糖苷类抗生素,化学结构式如
的多组分药物,主要成分为新霉素 B 和 C,以组分 B 图 1 所示^[1-2]。其对革兰阴性菌有效,作用机理主

[基金项目] 国家药典委员会药品标准制修订研究课题资助项目(2021Y04);国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室课题学科建设项目(2023HYZX19)

[作者简介] 张培培,女,药师,主要从事抗生素药品检验工作。联系电话:(010)53851551,E-mail:zhangpeipei@nifdc.org.cn。姚尚辰,女,主任药师,主要从事药物质量分析与研究。E-mail:yaoshangchen@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 王琰,男,研究员,主要从事抗感染药物质量控制分析与研究。联系电话:(010)53851561,E-mail:wy@nifdc.org.cn。宁保明,男,研究员,主要从事药品质量分析研究。联系电话:(010)53851575,E-mail:ningbm@nifdc.org.cn。

要与细菌核糖体 30S 亚单位结合,抑制细菌蛋白质的合成,在临床上广泛应用^[3-4]。自 1949 年被发现至今,新霉素在世界范围内被广泛使用,我国生产的新霉素应用于全球市场,需求量比较大^[5]。

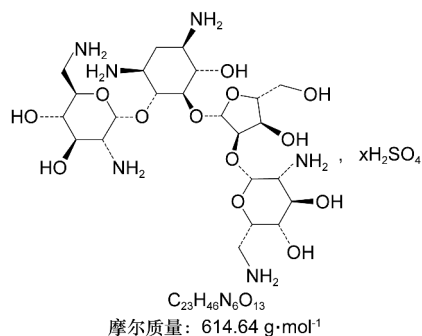


图 1 硫酸新霉素化学结构式

近年来,宿主细胞 DNA 残留问题引起了制药行业的极大关注。目前,对疫苗、生化制品和重组产品中残留 DNA 的研究比较成熟^[6-7],但对发酵来源化学药品的关注较少。发酵类化学药品中残留的外源性 DNA 同样具有传递肿瘤或者病毒相关基因的可能性,对患者健康造成潜在威胁,给该类药品质量控制带来新挑战^[8-9]。国内外药品监管机构,如欧洲 EMA 和我国国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)等,已对进出口发酵来源化学药品提出要求,对于发酵来源化学药品应提供外源性 DNA 的检测结果,用以证明产品质量^[10-11]。但对于发酵来源化学药品中外源性 DNA 的质量控制,国内外并没有统一的检测方法和判断标准,因此建立一个通用性好、准确度高的残留 DNA 检测方法尤为关键。

但实验中发现硫酸新霉素中残留 DNA 很难被有效测定,回收率低不能达到检测要求。众所周知,核酸可与某些小分子药物发生相互作用。DNA 与小分子药物的相互作用模式通常归纳为 3 类:非共价结合、共价结合和剪切作用,其中非共价作用分为嵌入作用、静电作用、沟槽作用^[12]。硫酸新霉素化学结构中存在较多氨基和羟基,其所形成的氨基糖和氨基醇等官能团容易与 DNA 结构上的碱基对、磷酸骨架发生相互作用^[13-15]。Constantinou-Kokotou 等^[16]最早运用 HPLC 法研究了氨基糖苷类抗生素与 DNA 双螺旋结构之间的相互作用,其中新霉素被证明是最强的结合物。李秀丽等^[17]通过 SPR 生物传感器发现新霉素与 DNA 之间可能存在序列作用和静电作用。Zhou 等^[18]采用吡啶橙荧光探针证明

了新霉素与 DNA 之间的主要结合模式为氢键和范德华力,还存在沟槽作用。氢键和范德华力本质上都是静电作用,因此新霉素与 DNA 之间的相互作用可以归纳为静电作用和沟槽作用。硫酸新霉素溶液中残留 DNA 以结合态的形式存在,导致定量分析硫酸新霉素中 DNA 残留量存在较大困难。考虑到静电作用和沟槽作用属于非共价作用,本研究尝试通过筛选合适的溶剂消除硫酸新霉素和 DNA 的相互作用,进而解决了硫酸新霉素中残留 DNA 很难被有效测定的难题。

传统方法开发大多采用单因素变量法(one factor at time, OFAT),即固定其他因素,考察单个因素对分析目标的影响,确定该因素最佳水平后,再考察下一个因素,直至获得最佳分析条件^[19]。该方法虽容易操作,但是工作量大、缺乏对各因素之间交互作用的考察,最终得到的是固定、单一的分析条件,方法稳固性较差,优化效果有限。ICH Q8 和 FDA 指出,质量源于设计(quality by design)理念可以应用到分析方法的建立、评估和验证中,分析方法质量源于设计(analytical quality by design, AQBd)理念顺势而生^[20-22]。AQBd 理念主要以预期的分析结果为分析目标,对方法建立过程中的关键方法参数进行风险评估,利用实验设计(design of experiment, DOE)筛选关键影响因子,并对方法进行优化,得到一个高稳固的设计空间,然后进行方法学验证,在方法实施过程中持续验证和改进^[23-24]。AQBd 理念科学、系统、高效、稳固的开发优势深受药物分析工作者的青睐。

本文运用 AQBd 理念进行 DOE 开发,以硫酸新霉素与 DNA 存在相互作用不易被测定为问题切入点,根据通用性强的荧光染色原理,采用 MODDE[®] 软件对硫酸新霉素中外源性 DNA 检测方法进行建立和优化;并对比 OFAT 法,对方法开发策略进行探讨。该研究为发酵来源化学药品的相关研究提供了分析思路和参考。

材料与方 法

1 试药和试剂

硫酸新霉素(浙江孚诺医药股份有限公司,批号:200302,200401,200501);大肠杆菌 DNA 标准品(中国食品药品检定研究院,批号:270027-201101,含量:96.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);DNA 检测试剂盒 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher 公司,货号:Q32854);

牛血清蛋白 (BSA, AMRESKO 公司, 货号: 0332-100G, 批号: 0985C081); 氯化钠、乙酸钠、饱和酚溶液、氯仿 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); TE 缓冲液 (Solarbio 公司, pH 8.0); 实验所用溶液均使用电阻率 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的超纯水配制。

2 仪器

Qubit[®] 3.0 荧光仪 (Thermo Fisher 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); MSA225 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 移液枪 (Eppendorf 公司); 计算机软件 MODDE[®] Pro 11.0 (MKS Umetrics AB 公司); Cary Eclipse 荧光光度计 (安捷伦公司)。

3 溶液的配制

3.1 溶剂的配制 称取氯化钠适量, 置于锥形瓶中, 加水溶解并稀释制成浓度为 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液。

3.2 DNA 标准品溶液的配制 精密量取 DNA 标准品适量, 加 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液稀释制成含 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大肠杆菌 DNA 的贮备液; 然后精密量取上述贮备液适量至 2 mL 试管中, 加 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液稀释制成含大肠杆菌 DNA 分别为 $20.0, 40.0, 50.0, 80.0, 100.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液。

3.3 供试液的配制 精密称取硫酸新霉素适量, 加 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液溶解并稀释制成含硫酸新霉素约 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 待用。

3.4 加样回收溶液的配制 精密量取供试液各 $100 \mu\text{L}$, 分别加入上述浓度为 $40.0, 50.0, 80.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DNA 标准品溶液各 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 制成 DNA 浓度水平为 $20, 25, 40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的加样回收溶液, 待用。

3.5 Qubit 试剂盒工作液 精密量取 DNA 染料 (红色, 试剂盒 Qubit[®] dsDNA HS Reagent) 适量, 采用缓冲液 (试剂盒 Qubit[®] dsDNA HS Buffer) 按 1:200 倍稀释, 待用 (临用现配, 避光保存)。

3.6 BSA 溶液的配制 精密称取 BSA 适量, 加供试液溶解并稀释制成含 BSA 约 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的贮备液; 精密量取 BSA 贮备液适量置于 5 mL 试管中, 加供试品稀释制成含 BSA 约 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3.7 高浓度 DNA 溶液的配制 精密称取大肠杆菌 DNA 标准品适量, 加供试液稀释制成含大肠杆菌 DNA 约 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 待用。

4 荧光光谱法

激发波长设置为 480 nm , 扫描范围为 $500 \sim 700 \text{ nm}$ 。

5 测定方法

Qubit[®] 荧光计标准曲线校正: 精密量取试剂盒标准溶液 S1 和 S2 (Qubit[®] dsDNA HS Standard #1 and #2) 各 $10 \mu\text{L}$ 分别置于 EP 管中, 分别加 $190 \mu\text{L}$ 的 Qubit 工作液, 混匀, 进行仪器标准曲线校正, 仪器通过校正后即可进行样品检测。

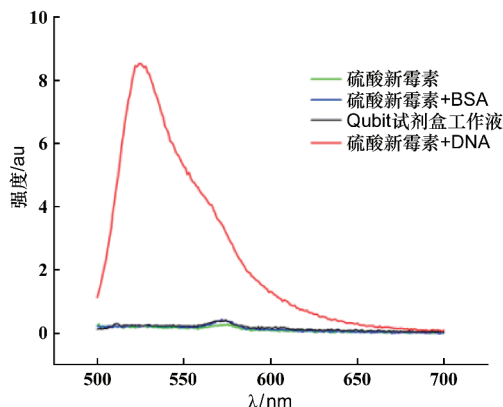
供试液测定: 精密量取供试液 $10 \mu\text{L}$ 溶液置于 Qubit 小管中, 加 $190 \mu\text{L}$ 的 Qubit 工作液, 混匀。采用校正过的 Qubit[®] 荧光计测定, 记录测得的 DNA 浓度数值。将供试液 DNA 浓度 ($C, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 再代入下列公式计算, 得出样品中 DNA 含量。

$$\text{待检样品残留 DNA 含量}/\% = \frac{C \times V}{W} \times 100\%$$

结 果

1 方法学考察

1.1 专属性 该法中所用 DNA 荧光染料对 dsDNA 具有较强特异性, 可以在含有 ssDNA, RNA 和游离核苷酸的样品中专属检测 dsDNA; 具有较低的序列依赖性, 可以准确测定多种来源的 DNA, 包括基因组 DNA、病毒 DNA、小量提取 DNA 或 PCR 扩增产物。精密量取“3.3”“3.6”“3.7”项下的溶液, 分别和“3.5”项下的 Qubit 试剂盒工作液按体积比 10:190 混合, 采用“4”项下方法测定, 结果见图 2。在波长 480 nm 激发下, 大肠杆菌 DNA 溶液与 Qubit 试剂盒中的染料结合后产生强荧光信号, 硫酸新霉素溶液、BSA 溶液、Qubit 试剂盒工作液均无荧光信号。因此, 该方法专属性良好。



硫酸新霉素 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 硫酸新霉素 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 BSA $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Qubit 试剂盒工作液: 荧光染料; 硫酸新霉素 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大肠杆菌 DNA $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 2 大肠杆菌 DNA、硫酸新霉素、硫酸新霉素 + BSA 和 Qubit 试剂盒工作液结合的全扫描荧光谱

1.2 最低检出限 (LOD) 与最低定量限 (LOQ)

Qubit[®] dsDNA HS (高灵敏度) 试剂盒的检测范围为 0.1 ~ 120 ng, 样品体积为 10 μL , 故检测范围为 10 ~ 12 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 当 DNA 浓度 $< 10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 仪器已无法读取数值, 均显示“out of range”, 故将检测下限 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 定为最低检测限, 相当于 0.001% (供试液为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。以 3 倍 LOD 计算 LOQ 得 0.003%。

1.3 线性关系 精密量取“3.2”项下的 DNA 标准品溶液, 采用“5”项下的方法测定, 记录数值 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。以 DNA 标准品溶液的实测浓度 ($y, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为纵坐标, DNA 标准品溶液的理论浓度 ($x, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制得到线性标准曲线。结果显示, 标准曲线线性方程为 $y = 0.9992x - 2.7049, r = 0.9957$ 。DNA 浓度在 20 ~ 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

1.4 准确度验证 精密称取硫酸新霉素适量, 按“3.4”项下的方法配制加样回收溶液, 然后采用“5”项下的方法进行测定, 记录 DNA 浓度数值 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。根据下列公式计算加样回收率, 考察 DNA 浓度水平分别为 20, 25, 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的准确度。结果显示, 供试液浓度 1.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、溶剂浓度 1.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 方法准确度为 81.3% (DNA 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 92.2% (DNA 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 89.1% (DNA 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.5 耐用性考察 精密称取硫酸新霉素、氯化钠适量, 按图 3 中样品浓度和溶剂浓度配制, 采用“5”项下的方法进行测定, 记录 DNA 浓度数值 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。然后计算加样回收率, 考察 DNA 浓度水平为 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的准确度 (DNA 为非显著因素, 故选高浓度水平考察)。耐用性实验结果见图 3, 加样回收率为 90% ~ 102.4%, 均在优化标准 (80% ~ 120%) 范围内。该方法稳固性好, 但是对氯化钠溶液浓度比较敏感, 实验操作中需小心控制。

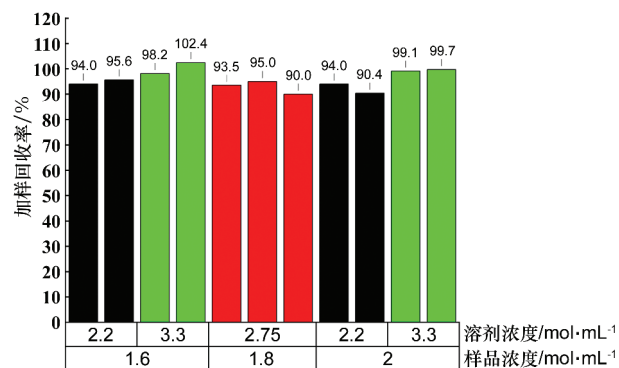


图 3 耐用性实验结果

4 样品测定

取硫酸新霉素适量, 按“3.3”项下的方法配制供试液, 采用方法“5”项下的方法对样品中残留 DNA 含量进行测定, 结果均低于 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即产品中残留 DNA 含量均低于 0.001%, 未检出。

讨 论

1 破坏新霉素-DNA 作用力的溶剂筛选过程

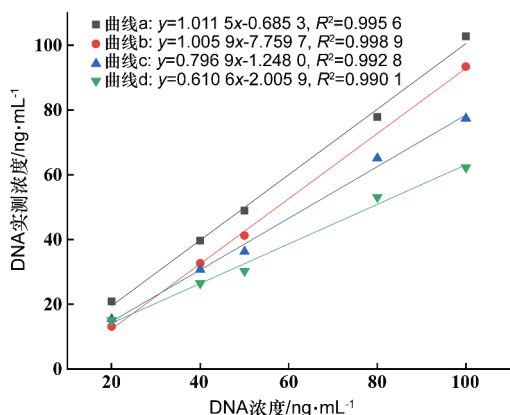
本研究采用 Qubit[®] dsDNA 检测试剂盒测定硫酸新霉素中外源性 DNA 的残留量。根据前期研究提出的“溶剂考察一般步骤”^[9], 结合新霉素-DNA 作用力导致硫酸新霉素中 DNA 很难测定的问题, 本研究主要从供试液与 DNA 试剂盒试剂相溶性、DNA 稳定性以及加样回收率 3 个关键点对溶剂的种类进行筛选和考察。根据 DNA 试剂盒溶剂适用性, 选用水、TE 缓冲液、乙酸钠、0.14 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠等水溶性溶液作为溶剂进行考察。实验结果显示, 水、TE 缓冲液、乙酸钠、0.14 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠作为溶剂时, 虽然供试液与 DNA 试剂盒试剂相溶性良好、DNA 稳定性满足要求, 但是加样回收率为 0, 表明加入的定量大肠杆菌 DNA 也与硫酸新霉素产生相互作用, 以结合态存在, 故方法准确性差。当选用有机溶剂酚和氯仿处理样品提取 DNA 时, 方法准确性依然很差。水溶性溶剂和有机溶剂均无法破坏硫酸新霉素与 DNA 的相互作用。溶剂考察实验进一步验证采用一般溶剂定量分析硫酸新霉素中结合态外源性 DNA 存在困难。

文献报道, 离子强度对 DNA 和小分子之间的静电作用和沟槽作用有很大影响^[17-18,25], 结合 DNA 在不同浓度氯化钠溶液中构象不同的理化特性, 本研究尝试选用不同浓度的强电解质氯化钠溶液破坏硫酸新霉素与 DNA 之间的作用力。实验考察过程中发现氯化钠溶液达到一定浓度时, 加样回收率可达到 60% 以上, 说明一定浓度的氯化钠溶液可以有效破坏硫酸新霉素与 DNA 之间的相互作用力。因此, 该方法选用氯化钠溶液作为溶剂对 DNA 进行提取。

2 OFAT 法建立方法

溶剂考察过程中, 发现氯化钠浓度、硫酸新霉素浓度、DNA 浓度对该方法准确性存在一定影响。本研究首先采用 OFAT 法对影响因素进行考察和分析。根据 DNA 在氯化钠溶液中的溶解度曲线和 Qubit 试剂盒的耐盐浓度, 设计了 3 个浓度水平的氯化钠溶液: 1, 2 和 4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为考察方法灵敏度和

准确性,硫酸新霉素溶液设计为 1, 2.5 和 5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, DNA 浓度设计为 20, 50 和 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过 OFAT 法结合 Qubit 荧光染料法进行实验,考察结果表明(见图 4), 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液中标准 DNA 响应值最接近理论值,线性最好;逐渐低于或高于此浓度,标准 DNA 响应值逐渐变低。因此,氯化钠溶液固定为 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,考察硫酸新霉素溶液浓度,结果显示随着硫酸新霉素浓度的增大,标准 DNA 响应值逐渐降低,当硫酸新霉素溶液为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,方法准确性达到 75.2%。这表明氯化钠溶液 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和硫酸新霉素溶液 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可破坏新霉素与 DNA 之间的结合作用,使 DNA 分子较好游离于溶液中,从而被有效测定。实验中还发现当 DNA 浓度过低时,加样回收率不到 60%,初步判断该方法关键影响因素为样品浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、溶剂浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 DNA 浓度 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。



a: TE 缓冲液 (TE buffer); b: 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液;
 c: 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液; d: 4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液

图 4 不同溶剂中 DNA 标准曲线

OFAT 法开发方法确定的关键影响因素为溶剂浓度、供试液浓度和 DNA 浓度;初步优化结果为氯化钠溶液 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸新霉素溶液为 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,方法准确性为 75.2%。虽然 OFAT 法筛选出的最优实验方法准确度满足 60% ~ 150% 的要求,但是与 80% ~ 120% 的优化标准还有一定差距。除此之外,OFAT 法并未考察各因素之间的交互影响,优化结果比较单一,可操作空间较小,方法稳固性差。

3 DoE 法优化方法

本研究提出基于 AQB 理念对硫酸新霉素中外源性 DNA 分析方法进行科学理解和优化,主要运用 DoE 对该方法中的关键方法参数进行系统考察,运用统计软件对实验参数进行优化,最终得到设计空

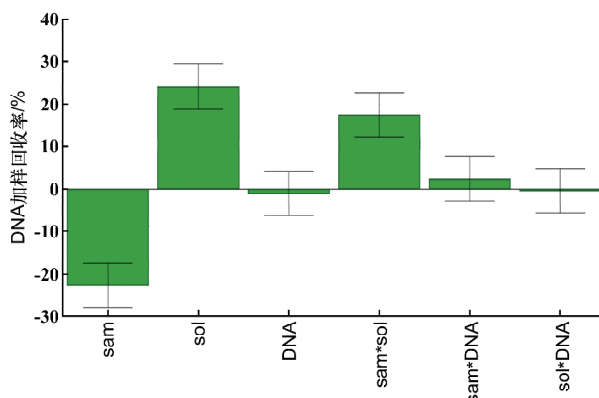
间 (Design Space), 进行方法学验证,初步探索了基于 AQB 理念开发残留 DNA 检测方法的可行性。

将残留 DNA 分析方法中的加样回收率 (%) 作为优化目标,即响应结果。根据预实验确定关键方法参数,影响因素分别为残留 DNA 分析方法中的样品浓度、溶剂浓度和 DNA 浓度,范围分别为 1 ~ 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 1 ~ 4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 20 ~ 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.1 确定关键影响因素 采用 MODDE[®] Pro 11 软件设计筛选实验,根据软件推荐的 Frac Fac Res V + 模型,设计了 11 组三因素变量实验,其中 9, 10, 11 为重复性实验,用于考察体系的稳定性。实验设计条件及响应结果如表 1 所示,对响应结果建模分析,得到系数直方图。通过系数直方图 5 可以直观看出,样品浓度与加样回收率呈负相关,样品浓度越高,加样回收率越低;氯化钠浓度与加样回收率呈正相关,氯化钠浓度越高,加样回收率越高;对于响应结果,样品浓度、溶剂浓度为显著因素, DNA 浓度为非显著因素。

表 1 筛选试验运行表和运行结果

实验组	$C_{\text{样品}}$ / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{\text{溶剂}}$ / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	C_{DNA} / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	DNA 回收率 /%
1	1	1	20	81.47
2	5	1	20	0
3	1	4	20	99.17
4	5	4	20	80.17
5	1	1	50	78.95
6	5	1	50	0
7	1	4	50	87.74
8	5	4	50	85.38
9	2.5	2.5	35	73.49
10	2.5	2.5	35	68.67
11	2.5	2.5	35	65.06



$N=11, R^2=0.990, RSD=5.349, DF=4, Q^2=0.854, \text{Confidence}=0.95$

图 5 筛选实验系数直方图

3.2 模型的建立与优化

根据筛选实验确认的关键影响因素及其考察范围,利用 MODDE[®] Pro 11 软件设计优化实验,运用软件推荐的 CCF 设计模型,得到 11 组实验,优化实验条件及响应结果见表 2。对响应结果进行建模,并对模型进行方差分析(见图 6),置信度为 0.95,模型 Q^2 为 0.899, R^2 为 0.976, R^2_{adj} 为 0.966,RSD 为 5.025%,表明模型预测的准确度较高。模型预测最优条件为样品浓度 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶剂浓度 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过实验验证,该条件下响应结果为 89.1%,满足要求。

表 2 优化实验运行表和运行结果

实验组	$C_{\text{样品}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{\text{溶剂}}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	DNA 回收率/%
1	1	1	124.86
2	5	1	22.86
3	1	4	105.69
4	5	4	80.00
5	1	2.5	104.38
6	5	2.5	58.63
7	3	1	65.74
8	3	4	93.94
9	3	2.5	82.74
10	3	2.5	77.26
11	3	2.5	80.55

20210409opt (MLR)

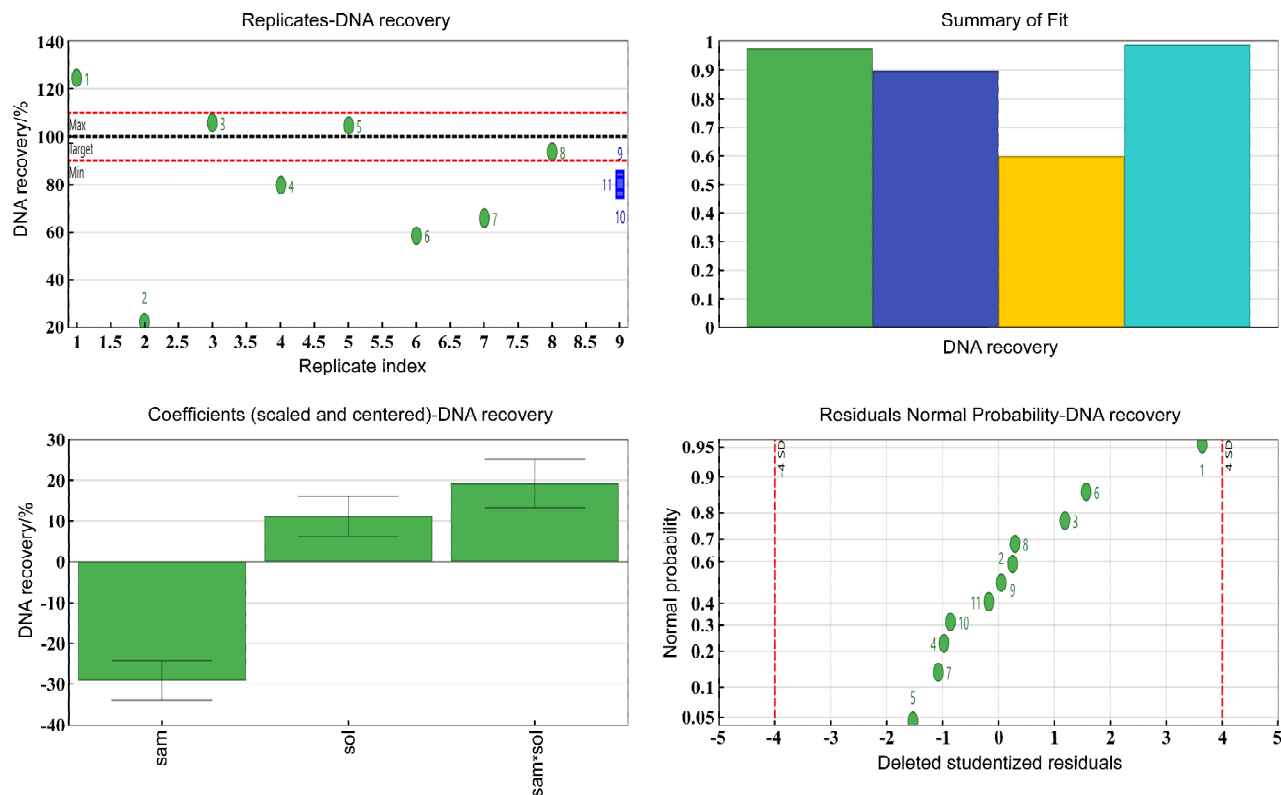


图 6 方差分析图

3.3 设计空间 设计空间如图 7 所示,绿色部分为方法的可操作空间,在此空间内任选一组实验条件,响应结果应在优化标准内。根据设计空间确认耐用性实验的考察范围,对方法耐用性进一步验证。在可操作空间中随机划出一部分区域:样品浓度为 $1.6 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,氯化钠浓度为 $2.2 \sim 3.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通

过确定的考察区间,分析各因素对响应结果的影响。采用 Plackett-Burman Design 设计模型考察方法的耐用性,实验运行条件和结果见图 2。耐用性考察结果表明加样回收率均在优化标准 $80\% \sim 120\%$ 范围内,证明该方法稳定性好。

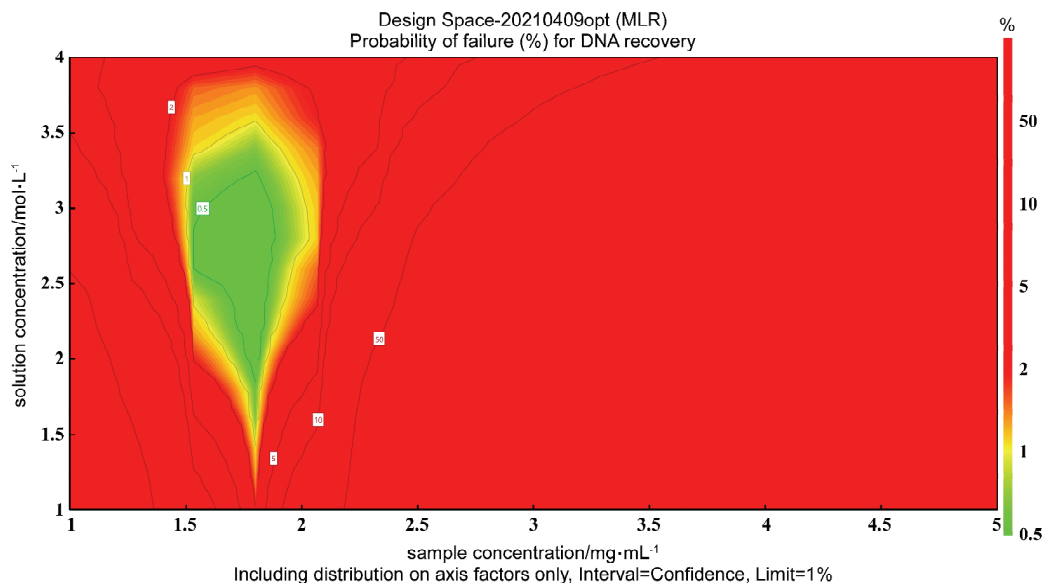


图7 空间设计图

4 DoE 法与 OFAT 法开发策略探讨

与传统 OFAT 法相比,基于 AQBd 理念建立的硫酸新霉素中残留 DNA 的检测方法有以下优势(见表 3):科学、准确地确定了关键影响因素:氯化钠浓度和硫酸新霉素浓度;模型预测最优条件为硫酸新霉素浓度 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、氯化钠浓度 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;优

化条件验证结果均 $>81.0\%$,准确度明显提高;设计空间范围内,随机选取分析条件,实验验证结果均在 $80\% \sim 120\%$ 范围内,方法稳健性良好;优化标准从 $60\% \sim 150\%$ 提高到 $80\% \sim 120\%$;通过少量的实验数据得到最优目标,工作效率显著提高。

表3 DoE 法与 OFAT 法对比结果

方法	溶剂	关键影响因素	加样回收率/%	优化标准/%	设计空间	实验次数
DoE 法	氯化钠	溶剂浓度 硫酸新霉素浓度	>81.0	$80 \sim 120$	见图 7	22
OFAT 法	氯化钠	溶剂浓度 硫酸新霉素浓度 DNA 浓度	75.2	$60 \sim 120$	—	54

本研究揭示了硫酸新霉素中残留 DNA 检测困难的原因:新霉素与 DNA 之间存在的静电作用和沟槽作用,导致残留 DNA 以结合态的形式存在。通过 MODDE 11.0 软件筛选和考察溶剂,提出 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液作为溶剂的解决方案,有效消除了硫酸新霉素与 DNA 分子之间的相互作用。本研究基于 AQBd 理念,利用荧光染色法建立了硫酸新霉素中残留 DNA 的检测方法,最优条件为硫酸新霉素浓度 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、氯化钠浓度 $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,方法简单、高效、稳固性和通用性良好。该方法初步探索了残留 DNA 杂质分析基于 AQBd 理念开发策略的可行性,为氨基糖苷类抗生素中残留 DNA 普适性

方法建立提供了科学参考,对该类化学药品的质量控制具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] 管玉霞,刘志琼.一种提高新霉素产率新方法的初步研究[J].产业与科技论坛,2007,6(7):89-90.
- [2] 秦涛,张春景,郭江云,等.一种硫酸新霉素的发酵工艺:CN112410390A[P].2021-02-26.
- [3] 黄敏文,张倩,侯玉荣,等.硫酸新霉素软膏的质量评价[J].中国抗生素杂志,2020,45(3):259-266.
- [4] 张晶,岳荣,关莹,等.新霉素微生物检定法的改进[J].中国医药工业杂志,2019,50(11):1285-1289,1295.
- [5] 袁耀佐,张玫,金少鸿.氨基糖苷类抗生素质量控制进展[J].中国抗生素杂志,2019,44(11):1244-1255.
- [6] 贾惠言,姚雪静.生物制品宿主细胞残留 DNA 检测限定标准及方法浅析[J].药学研究,2018,37(2):115-118.

- [7] 彭燕, 杨晓明. 生物技术药物中残留 DNA 检测方法的比较[J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 39(2): 73-76.
- [8] 王兰, 王军志. 关于生物制品残余 DNA 质量控制问题[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(8): 678-683, 687.
- [9] 王琰, 张培培, 崔生辉, 等. 发酵类脂溶性药物中残留 DNA 检测关键影响因素: 溶剂的筛选与确定[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(4): 651-658.
- [10] EMA. Guideline on summary of requirements for active substances in the quality part of the dossier, dated 1 February 2005 for coming into operation[EB/OL]. [2021-12-30]. <https://www.ema.europa.eu/en/summary-requirements-active-substances-quality-part-dossier.pdf>.
- [11] The European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). European Pharmacopoeia [S]. 10th Edition. 2019: 882-884.
- [12] KUMAR CV, ASUNCION EH. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(19): 8547-8553.
- [13] ARYA DP, MICOVIC L, CHARLES I, *et al.* Neomycin binding to Watson-Hoogsteen (W-H) DNA triplex groove: a model[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(13): 3733-3744.
- [14] ARYA DP, XUE L, WILLIS B. Aminoglycoside (neomycin) preference is for A-form nucleic acids, not just RNA: results from a competition dialysis study[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(34): 10148-10149.
- [15] WANG SW, SINGH M, LING MH, *et al.* Synthesis of nucleobase-neomycin conjugates and evaluation of their DNA binding, cytotoxicities, and antibacterial properties[J]. *Med Chem Res*, 2018, 27(5): 1517-1527.
- [16] CONSTANTINO-KOKOTOU T, KARIKAS G, KOKOTOS G. Study of aminoglycoside-nucleic acid interactions by an HPLC method[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(8): 1015-1018.
- [17] 李秀丽. 药物残留的表面等离子体共振生物传感技术研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2007.
- [18] ZHOU HF, BI SY, WANG Y, *et al.* Characterization of the binding of neomycin/paromomycin sulfate with DNA using acridine orange as fluorescence probe and molecular docking technique[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, 35(10): 2077-2089.
- [19] PARR MK, SCHMIDT AH. Life cycle management of analytical methods[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 506-517.
- [20] The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Harmonized Tripartite Guideline, Q8(R2), Pharmaceutical Development, Current step 5 Version, 2009-08[EB/OL]. [2021-12-30]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29%20Guideline.pdf>.
- [21] U. S. Food and Drug Administration (FDA). Pharmaceutical CGMPs for the 21st Century-A Risk Based Approach Progress Report, 2007-5[EB/OL]. [2021-12-30]. <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/pharmaceutical-quality-21st-century-risk-based-approach-progress-report>.
- [22] SCHWEITZER M, POHL M, HANNA-BROWN M, *et al.* Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements[J]. *Pharm Technol*, 2010, 34(2): 52, 54, 56-59.
- [23] 斯文, 杨悦. 质量源于设计在美国复杂仿制药监管中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(6): 846-854.
- [24] 孙颖. 基于 AQbD 理念的头孢类抗生素液相方法开发策略探讨[D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [25] 卓琳. DNA 与小分子相互作用的研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2005, 22(5): 440-445.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2022-11-21