

于该方法简单快捷,结果清晰直观,易于标准化,美国 FDA 已经批准微柱凝胶实验用于鉴定 A、B 和 RhD 抗原。

在中国,长期以来使用进口微柱凝胶卡,成本较高^[5-6],近几年国产微柱凝胶卡已经投放市场,为了了解国产微柱凝胶卡的性能,笔者对比了进口微柱凝胶卡与国产微柱凝胶卡鉴定 A、B 和 RhD 抗原的效果,从比较结果可见,国产卡检测 A 抗原、B 抗原、RhD 抗原的性能与进口微柱凝胶卡相关性较好,2 种微柱凝胶卡检测结果的差异无统计学意义($P>0.05$),国产微柱凝胶卡能够满足对血型鉴定的要求。

参考文献

[1] 兰炯采, 负中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 77-79.

• 检验仪器与试剂评价 •

[2] 章文, 李德发, 陈月生, 等. 3 种交叉配血方法在儿童输血安全中的应用评价[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(3): 242-243.

[3] 马曙轩, 刘景汉, 李锡金. 应用微柱凝胶法鉴定 ABO 及 RH(D) 血型[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(1): 53-54.

[4] 蓝欲晓. 罕见 Rh, Kidd 血型系统复合抗体引起速发性溶血性输血反应的调查研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(3): 128-130.

[5] 罗广平, 叶欣, 戎霞, 等. Sephadex-G50 微柱凝胶血型试剂的研制和应用[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(7): 657-659.

[6] 管政, 张军, 陈丽, 等. 3 种微柱凝胶抗人球蛋白卡在检测孕妇 IgG 血型抗体效价中的应用比较[J]. 蚌埠医学院学报, 2011, 36(8): 872-874.

(收稿日期: 2013-01-12)

阿伦尼乌斯方程在体外诊断试剂有效期预测中的应用

杨 梅, 刘君君[△], 牟晓然, 金 炜, 余枝广

(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 广东深圳 518055)

摘要:目的 建立阿伦尼乌斯方程预测体外诊断试剂有效期的方法, 探讨该方法的适用性。方法 直接胆红素(DBil)、 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)和超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)试剂进行 30、34、37、40、45 ℃ 5 个温度梯度的加速破坏, 并利用质控偏差对试剂失效进行监控, 从而根据阿伦尼乌斯方程建立起失效时间与储存温度之间的模型, 进而推测出试剂储存温度下的有效期。结果 DBil、 α -HBDH 和 hs-CRP 的阿伦尼乌斯方程分别为 $Y=11.130X-29.932$, $Y=8.822X-21.950$, $Y=10.730X-28.298$, 线性回归的相关系数 r 均大于 0.98, 预测 3 种试剂在 8 ℃ 储存温度下有效期分别为 23、20 和 32 个月。结论 数据表明 DBil、 α -HBDH 和 hs-CRP 3 个项目的试剂加速破坏过程符合一级反应, 试剂的降解速率和绝对温度之间的关系符合阿伦尼乌斯方程。

关键词: 体外诊断试剂; 稳定性; 有效期; 阿伦尼乌斯方程

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.047

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)12-1586-03

在整个储存效期中,在特定条件下产品保持厂家宣称的特性或者性能的能力称为稳定性^[1]。稳定性是产品性能的关键指标之一。《GB/T26124-2011 临床化学诊断试剂盒(中华人民共和国国家标准)》中描述了利用效期末试剂的方法进行稳定性评价。毫无疑问,效期稳定性(也即实时稳定性)是研究产品稳定性和确定产品有效期最可靠的方法,但是该方法周期长,极大程度地限制了其使用。例如在新产品开发或者产品更改阶段中,一种更快捷有效的方法就显得尤为重要。基于阿伦尼乌斯方程为理论依据的加速稳定性测试方法是公认的策略之一,近年来越来越多的研究证明了它的适用性和准确性^[2-8]。2002 年欧洲标准化委员会发表的《EN13640 体外诊断试剂稳定性检测》文件以及 2009 年美国临床和实验室标准化研究院(CLSI)发布的《EP25-A 体外诊断试剂稳定性评价》文件均推荐了使用该方法确定体外诊断试剂的使用效期^[1,9]。本实验正是根据此方法检验了 2 个常规生化项目和 1 个免疫项目,旨在建立阿伦尼乌斯方程预测体外诊断试剂有效期的方法及研究其适用性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 迈瑞 BS-400 全自动生化分析仪 1 台,晟泽 LNEYA 药品稳定性测试箱 5 台。采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的试剂盒及配套校准质控品,具体信息见表 1。直接胆红素(DBil)和 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)使用常规复合生化校准品进行校准,使用常规复合生化质控品进行测

试;超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)使用试剂盒自制校准品进行校准,使用特种蛋白质控品进行测试。

1.2 方法

1.2.1 试剂加速 将同一批次试剂分为 6 组,分别放入 30、34、37、40、45 ℃ 的恒温箱进行加速处理,同时 1 组置于 2~8 ℃ 作为冷藏对照;不定期取出进行测试。

1.2.2 测试 实验前对迈瑞 BS-400 全自动生化分析仪进行校准和维护,使用迈瑞配套校准品对各个项目进行定标。每种试剂设置 6 个测试项目,分别对应于 2~8 ℃ 冷藏对照试剂,30 ℃ 加速、34 ℃ 加速、37 ℃ 加速、40 ℃ 加速和 45 ℃ 加速试剂。实验过程中,不定期取出各个加速温度的试剂在迈瑞 BS-400 全自动生化分析仪对迈瑞配套质控品进行测试,每个质控品测试 3 次,取其平均值;以 2~8 ℃ 冷藏试剂同步测试质控品,计算加速试剂与冷藏对照试剂的质控浓度(或反应度)均值的比值作为质控的相对浓度,以下记为 C(%)。

1.3 统计学处理 统计分析参照 EN13640 文件,以相对浓度的对数值(lgC)为 Y,加速时间(t)为 X 进行线性回归,得到回归方程 $Y=aX+b$;以 $C(\%)=100\pm 10$ (当 $C>100\%$ 时取 110%,当 $C<100\%$ 时取 90%)作为试剂是否稳定的接受标准,计算每个加速温度下对应的稳定期(S);以 lgS 为 Y,绝对温度(T)的倒数为 X,再次进行线性回归,得到回归方程 $Y=mX+n$,通过此方程即可计算出储存温度下的稳定期也即该试剂的有效期。

[△] 通讯作者, E-mail: liujunjun@mindray.com。

2 结 果

2.1 不同加速温度下的测试结果见表 2。将表 2 中各加速温度下的 lgC-t 作图(t 为加速时间),显示为直线,说明 DBil、α-HBDH、hs-CRP 试剂的加速过程为典型的一级反应。根据 lgC-t 回归方程计算当质控偏差等于±10%的时间 S,结果见表 3。

2.2 根据阿伦尼乌斯方程定律,lgK=lgA-E/2.303RT(其中 K 是反应速度常数,A 为频率因子,E 为活化能,R 是气体常

数,T 是绝对温度),有效期的对数和绝对温度的倒数具有线性关系。将 lgS 对 1/T 作图得到线性回归方程,DBil、α-HBDH、hs-CRP 的阿伦尼乌斯回归方程分别为:Y=11.130X-29.932(r=0.985 4)、Y=8.822X-21.950(r=0.991 9)、Y=10.730X-28.298(r=0.981 4),显示 lgS 与 1/T 具有良好的线性关系,DBil、α-HBDH、hs-CRP 试剂降解过程符合阿伦尼乌斯方程。通过计算,8℃条件下的有效期结果见表 4。

表 1 试剂和校准质控品信息

试剂/校准品/质控品	批号	效期	备注
DBil 测定试剂盒(钒酸盐氧化法)	140711014	2012-09	/
α-HBDH 测定试剂盒(DGKC 法)	1405511005	2012-08	/
hs-CRP 测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)	43411003	2012-05	含校准品
常规复合生化校准品	SM302	2012-4-30	/
常规复合生化质控品(正常水平)	QMN302	2012-7-11	/
常规复合生化质控品(病理水平)	QMP303	2012-9-15	/
特种蛋白质控品(正常水平)	QPN301	2012-2-22	/
特种蛋白质控品(病理水平)	QPP301	2012-2-22	/

/:无备注。

表 2 DBil、α-HBDH 和 hs-CRP 试剂在不同加速温度下的浓度值变化

温度(℃)	DBil 试剂*			α-HBDH 试剂*			hs-CRP 试剂#		
	加速时间(h)	相对浓度(%)	lgC	加速时间(h)	相对浓度(%)	lgC	加速时间(h)	相对浓度(%)	lgC
30	366	104.3	2.018 3	368	97.2	1.987 6	501	97.1	1.987 3
	494	106.0	2.025 3	578	94.7	1.976 4	776	93.7	1.971 7
	629	107.5	2.031 4	957	92.5	1.966 2	886	92.5	1.966 3
	743	108.2	2.034 2	1 156	91.0	1.958 9	1 041	91.7	1.962 6
	876	111.3	2.046 5	1 406	87.9	1.944 2	1 135	90.5	1.956 8
34	341	103.6	2.015 4	765	93.8	1.972 3	500	96.4	1.984 1
	404	104.9	2.020 8	831	92.3	1.965 1	610	94.1	1.973 5
	467	107.1	2.029 9	921	91.6	1.961 7	771	92.3	1.965 1
	621	109.0	2.037 3	964	90.2	1.955 4	882	89.8	1.953 4
	733	112.3	2.050 4	1 073	87.7	1.942 8	1 037	88.1	1.945 2
37	129	102.0	2.008 5	364	96.5	1.984 7	363	93.9	1.972 6
	319	108.0	2.033 2	505	93.6	1.971 4	405	91.9	1.963 3
	422	111.2	2.046 1	595	91.4	1.960 9	488	89.0	1.949 3
	485	113.5	2.055 1	638	89.7	1.953 0	554	85.7	1.933 1
	554	115.2	2.061 6	681	87.8	1.943 5	599	85.1	1.930 0
40	89	101.8	2.007 7	133	97.7	1.990 0	217	96.6	1.984 8
	133	103.7	2.015 8	217	96.4	1.984 2	286	93.7	1.971 5
	217	108.2	2.034 2	306	94.2	1.974 1	365	89.8	1.953 4
	259	111.9	2.048 8	390	93.1	1.969 1	451	87.5	1.942 1
	319	115.1	2.061 1	571	88.7	1.948 2	517	85.1	1.930 0
45	88	105.4	2.022 7	132	97.4	1.988 6	132	97.9	1.990 9
	132	107.1	2.029 7	216	94.8	1.976 7	216	91.7	1.962 5
	174	111.1	2.045 8	286	92.1	1.964 3	285	87.0	1.939 3
	216	113.7	2.055 8	324	90.1	1.954 7	305	85.6	1.932 3
	258	116.5	2.066 3	389	86.1	1.935 1	322	84.6	1.927 4

*:基于常规复合生化质控品(病理水平)的反应度数据;#:基于特种蛋白质控品(正常水平)的浓度值数据。

表 3 DBil、α-HBDH 和 hs-CRP 试剂在不同加速温度下的有效期

温度(℃)	DBil 试剂		α-HBDH 试剂		hs-CRP 试剂	
	回归方程	S(h)	回归方程	S(h)	回归方程	S(h)
30	$Y=0.000\ 05X+1.999\ 1(r=0.982\ 0)$	821	$Y=-0.000\ 04X+2.001\ 4(r=0.989\ 5)$	1\ 212	$Y=-0.000\ 05X+2.009\ 3(r=0.990\ 8)$	1\ 184
34	$Y=0.000\ 08X+1.987\ 2(r=0.987\ 9)$	639	$Y=-0.000\ 09X+2.043(r=0.982\ 3)$	967	$Y=-0.000\ 07X+2.019\ 2(r=0.994\ 3)$	899
37	$Y=0.000\ 1X+1.992\ 5(r=0.999\ 2)$	386	$Y=-0.000\ 1X+2.032\ 4(r=0.982\ 0)$	624	$Y=-0.000\ 2X+2.039\ 3(r=0.994\ 1)$	457
40	$Y=0.000\ 2X+1.985\ 3(r=0.996\ 6)$	237	$Y=0.000\ 1X+2.004(r=0.995\ 0)$	521	$Y=-0.000\ 2X+2.023(r=0.996\ 3)$	379
45	$Y=0.000\ 3X+1.997\ 9(r=0.993\ 7)$	164	$Y=-0.000\ 2X+2.018\ 8(r=0.984\ 7)$	317	$Y=-0.000\ 3X+2.035(r=0.999\ 9)$	241

表 4 DBil、α-HBDH 和 hs-CRP 有效期预测结果(月)

产品	8℃有效期 预测	测试前时间	8℃有效期 预测修正值
DBil 试剂	21.34	2	23
α-HBDH 试剂	17.06	3	20
hs-CRP 试剂	26.40	6	32

3 讨 论

早在 1962 年, Garrett^[10]就提出运用化学动力法通过高温实验评估药物稳定性; 后续, 阿伦尼乌斯方程逐渐被应用于药物的稳定性研究^[11-12]。近年来, 在药学领域逐渐形成了几种较为成熟的操作方法, 如经典恒温加速法、 $t_{0.9}$ 法, 初均速法、Weibul 分布拟合法; 然而该方程在体外诊断试剂领域的应用却几乎没有报道。本试验的研究成功尝试和证明了阿伦尼乌斯方程在体外诊断试剂有效期预测中的适用性和可操作性。

本次实验研究了 2 个常规生化项目 DBil 和 α-HBDH 以及 1 个免疫类项目 hs-CRP, 迈瑞 DBil 试剂盒采用钒酸盐氧化法、α-HBDH 采用 DGKC 法, hs-CRP 采用乳胶免疫比浊法利用抗原抗体反应进行测定, 结果表明常规生化项目和免疫项目加速测试的降解过程都可能符合阿伦尼乌斯方程。从试剂稳定性影响因素(化学稳定性、物理稳定性和生物稳定性) 上看, 阿伦尼乌斯方程更适用于以化学稳定性为主要影响因素的试剂; 从降解的反应级数上看, 该方程适用于零级反应、一级反应和伪一级反应; 从试剂组成上分析, 该方程更适用于含有易变成分的试剂, 如蛋白质类物质。尽管如此, 由于体外诊断试剂成分复杂, 同一个测试项目也有不同的方法学, 因此阿伦尼乌斯方程是否适用于某种试剂盒仍然需要有针对性的实验验证。

预实验将加速温度确定为 30、34、37、40、45℃, 在测试中观察到, 随着时间的延长质控品偏差逐渐增大, 尤其是高温加速 45℃ 最为明显; 随着加速温度的升高, 质控品变化率逐渐增大。数据表明, DBil、α-HBDH 和 hs-CRP 三个项目的试剂加速破坏过程符合一级反应, 试剂的降解速率和绝对温度之间的关系符合阿伦尼乌斯方程。本实验采取以同步冷藏试剂作为对比计算相对浓度(或反应度) 的方法, 减小了开瓶稳定性、质控品稳定性、仪器稳定性对结果造成的误差, 优化了实验操作; 本实验采用 EN13640 文件中的数据处理方法, 与传统的 $t_{0.9}$ 法颇为相似, 但是克服了 $t_{0.9}$ 法对 $t_{0.9}$ 时间点估计不准确的缺点, 使得操作上更简便结果上更准确; 本实验研究了液体剂型试剂的

加速稳定性测试, 良好的精密度、瓶间差等分析性能为本实验顺利进行提供了保障。已有研究表明阿伦尼乌斯方程同样适用于固体药物的稳定性评价^[5], 但应用于干粉剂型的体外诊断试剂尚未发现报道。综上所述, 本方法的建立对快速确定试剂的有效期, 缩短试剂开发周期具有现实意义。

参考文献

[1] European Committee for Standardization. EN 13640 Stability testing of in vitro diagnostic reagents[S]. Brussels: European Committee for Standardization, 2002.

[2] Anderson G, Scott M. Determination of product shelf life and activation energy for five drugs of abuse[J]. Clin Chem, 1991, 37(3): 398-402.

[3] Sungthongjeen S. Application of Arrhenius equation and Plackett-Burman design to ascorbic acid syrup development[J]. Naresuan Univ J, 2004, 12(2): 1-12.

[4] 董亚林, 董海燕, 姚红萍, 等. 金裕星注射液稳定性及其有效期预测[J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(2): 163-164.

[5] 李春花, 王丽萍, 吉春巧, 等. 经典恒温加速实验法确定苟甘滴丸的有效期[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 543-544.

[6] 汝玲, 韩方璇, 黄春新, 等. 经典恒温加速法和多元线性模型预测头孢米诺钠水溶液的稳定性[J]. 中国药房, 2006, 17(19): 1500-1502.

[7] 熊建华, 孙丽蓉, 王淑君, 等. 注射用阿洛西林钠在 5% 木糖醇注射中的稳定性考察[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(3): 248-251.

[8] 刘建军, 尚茂林, 陈芳. 经典恒温加速法与 $t_{0.9}$ 法再氧氟沙星滴耳液热稳定性预测中的比较[J]. 安徽医药, 2009, 13(1): 26-27.

[9] CLSI. EP25-P Evaluation of stability of in-vitro diagnostic reagents[S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.

[10] Garrett ER. Prediction of stability of drugs and pharmaceutical preparations[J]. J Pharm Sci, 1962, 51(9): 811-833.

[11] Porterfield RI, Capone JJ. Application of kinetic models and Arrhenius methods to product stability evaluation[J]. Med Devices Diagn Indm April, 1984; 45-50.

[12] Ertel KD, Carstensen JT. Examination of a modified Arrhenius relationship for pharmaceutical stability prediction[J]. Intern J Pharm, 1990, 61(1): 9-14.

(收稿日期: 2012-11-08)