·实验研究·

注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素检查法研究

刘　洋,王　瑶,孟长虹,陆益红
(江苏省食品药品监督检验研究院,南京 210019)

[摘要]　**目的**:对注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素检查法进行方法学验证。**方法**:参照《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 1143 方法Ⅰ(凝胶法),用二甲基亚砜(DMSO)溶解注射用醋酸奥曲肽微球并用水稀释制成溶液,对此溶液用 2 个厂家凝胶法鲎试剂进行了干扰实验和内毒素回收实验。**结果**:注射用醋酸奥曲肽微球浓度稀释至 0.007 mg·mL^{-1}对细菌内毒素与鲎试剂的反应无干扰,DMSO 溶解液细菌内毒素回收率在 50% ~200% 之间,可以用 DMSO 溶解注射用醋酸奥曲肽微球进行细菌内毒素检查。**结论**:细菌内毒素检查法适用于注射用醋酸奥曲肽微球的检查。

[关键词]　醋酸奥曲肽微球;细菌内毒素;回收率;干扰实验
[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003 - 3734(2021)14 - 1340 - 05

Study on bacterial endotoxin test of octreotide acetate microspheres for injection

LIU Yang, WANG Yao, MENG Chang-hong, LU Yi-hong
(*Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To verify the method of bacterial endotoxin test for octreotide acetate microspheres for injection. **Methods**: According to the bacterial endotoxin test method of Chinese Pharmacopoeia (2020 edition), octreotide acetate microspheres for injection was dissolved by DMSO and diluted with water. Interference test and endotoxin recovery test were carried out with two manufacturers' gel limulus amebocyte lysate. **Results**: There was no interference between bacterial endotoxin and limulus reagent when the concentration of octreotide acetate microspheres for injection was diluted to 0.007 mg·mL^{-1}. The recovery of bacterial endotoxin in DMSO solution was between 50% and 200%. DMSO can be used for dissolving octreotide acetate microsphere to perform bacterial endotoxin test. **Conclusion**: Bacterial endotoxin test is suitable for the detection of octreotide acetate microspheres for injection.

[**Key words**]　octreotide acetate microspheres; bacterial endotoxin; recovery rate; interfering test

注射用醋酸奥曲肽微球是一种人工合成的八肽环状化合物,是天然生长抑素类似物,临床主要适应证为肢端肥大症。注射用醋酸奥曲肽微球能高度结合生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR),直接抑制生长激素(growth hormone, GH)的过度分泌,从而治疗肢端肥大症[1]。微球制剂需要根据药物性质进行制备,其具有缓释、控释和靶向的特点,具有广阔的市场前景。但是微球制剂不使用药品传统的制备程序,在制备过程中,可能更容易污染或不易除去热原物质。为避免该类注射剂在临床应用时出现热原反应而造成严重的不良后果,急需建立、完善此类制剂的热原物质检验检测方法[2]。经文献检索,本品为进口制剂,国内尚无对其细菌内毒素检查方法学研究的报道。本文依据《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(凝胶法)”和细菌内毒素检查干扰/确证实验的实

[作者简介]　刘洋,女,主管药师,主要从事药理毒理研究。E-mail: liuyang1986@sina.com。
[通讯作者]　陆益红,女,主任药师,主要从事药物化学研究。E-mail: yihonglu@163.com。

验设计,建立了注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素的检查方法[3],报道如下。

材　　料

1　试药与试剂

注射用醋酸奥曲肽微球(诺华制药有限公司,批号:S0039,S0070,S0086,规格:30 mg);专用溶剂(诺华制药有限公司,批号:346579,规格:2 mL);鲎试剂 1(湛江安度斯生物有限公司,批号:1804233,灵敏度:0.25 EU·mL^{-1},批号:1805241,灵敏度:0.06 EU·mL^{-1});鲎试剂 2(湛江博康海洋生物有限公司,批号:1805180,灵敏度:0.25 EU·mL^{-1},批号:1809292,灵敏度:0.06 EU·mL^{-1});细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-201784,规格:80 EU·支$^{-1}$);细菌内毒素检查用水(BET 水,中国食品药品检定研究院,批号:160006-201704,规格:5 mL·支$^{-1}$);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,批号:20180515,规格:500 mL)。

2　仪器

ET－96 型内毒素凝胶法测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH－2 自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂)。

方法与结果

1　样品细菌内毒素限值(L)的确定

按照《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(凝胶法)”规定,$L = K/M$,一般注射剂的 K 值为 5.0 EU·kg^{-1}·h^{-1},M 为人用每千克体重每小时的最大样品剂量。注射用醋酸奥曲肽微球的最大临床使用剂量为 0.55 mg·kg^{-1}·h^{-1},细菌内毒素限值 $L = K/M$ = 5.0 EU·kg^{-1}·h^{-1}/0.55 mg·kg^{-1}·h^{-1} = 9 EU·mg^{-1},所以将本品细菌内毒素检查的限值拟定为 9 EU·mg^{-1}。

2　鲎试剂灵敏度复核

按《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”规定[4],进行鲎试剂灵敏度复核。用 BET 水分别将细菌内毒素工作标准品稀释成 2.0 λ,1.0 λ,0.5 λ 和 0.25 λ 4 个浓度的内毒素标准溶液,按下列公式计算鲎试剂灵敏度的测试值(λ_c):$\lambda_c = \log^{-1}(\sum X/4)$,实验结果见表 1。4 批鲎试剂 λ_c 均在 0.5 λ ~ 2.0 λ 范围内,结果均符合规定,可用于细菌内毒素检查。

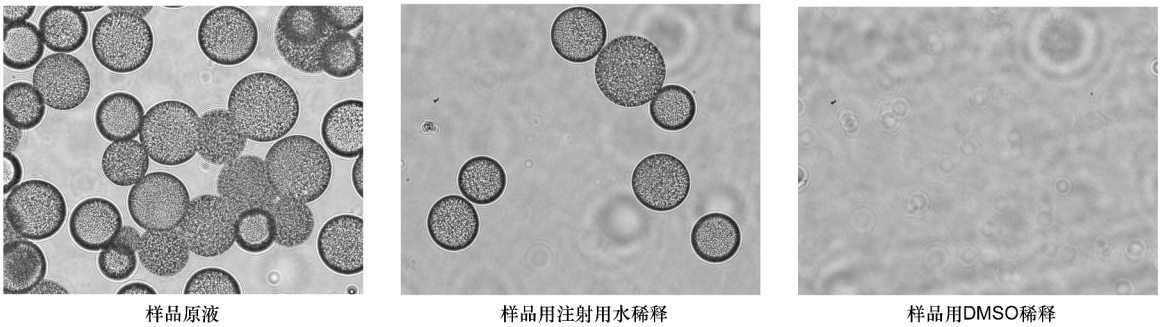
表 1　鲎试剂灵敏度复核结果

批号	细菌内毒素浓度/EU·mL^{-1}						NC	λ_c
	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015		
1804233	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −			− −	0.25
1805241			+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06
1805180	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −			− −	0.25
1809292			+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06

+:阳性;−:阴性(下同)

3　样品处理

注射用醋酸奥曲肽微球用专用溶剂溶解,滴至载玻片上,并覆盖盖玻片,置显微镜(15 × 40)下观察,并与用注射用水和 DMSO 溶解稀释的溶液比较,结果见图 1,可见注射用醋酸奥曲肽微球在水中不溶,而在加入 DMSO 后,微球完全溶解分散,成为透明溶液,然后才能进行细菌内毒素检查。



样品原液　　样品用注射用水稀释　　样品用DMSO稀释

图 1　样品溶液显微镜观察结果

4 内毒素检查方法确证实验

4.1 DMSO 对细菌内毒素的干扰实验 因为注射用醋酸奥曲肽微球在水中不溶,无法直接用 BET 水溶解本品进行细菌内毒素凝胶法实验。因此考虑先用 DMSO 将样品制备成溶液后,再用 BET 水逐级稀释进行实验。考虑 DMSO 属于有机溶剂,需进行 DMSO 对细菌内毒素的干扰实验。

DMSO 对细菌内毒素的干扰实验采用在 DMSO 中外加细菌内毒素,以测定 DMSO 对细菌内毒素有无干扰。因样品先用 DMSO 制备成 1 mg·mL^{-1}溶液,样品内毒素限值定为 9 EU·mg^{-1},1 mg·mL^{-1}样品的 DMSO 溶液中含内毒素限值为 9 EU·mL^{-1}。将内毒素标准溶液用 DMSO 稀释至 9 EU·mL^{-1},再用 BET 水逐级稀释,取灵敏度为 0.25 EU·mL^{-1}的 2 个厂家鲎试剂,按《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 1143 中的供试品干扰实验项进行实验,结果见表 2,用 BET 水和 DMSO 稀释内毒素标准品的反应终点浓度均符合鲎试剂灵敏度复核实验要求,说明内毒素浓度为 9 EU·mL^{-1}样品的 DMSO 溶液,经 DMSO 短暂处理对细菌内毒素活性无明显影响。

表 2 DMSO 对细菌内毒素的干扰实验

鲎试剂批号	供试品批号	细菌内毒素浓度/EU·mL^{-1}				NC	反应终点浓度/EU·mL^{-1}
		0.5	0.25	0.125	0.06		
1804233	BET 水	+ +	+ +	− −	− −	− −	0.25
	DMSO	+ + + +	− − − −	− − − −	− − − −	− −	0.5
1805180	BET 水	+ +	+ +	+ +	− −	− −	0.25
	DMSO	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.5

4.2 注射用醋酸奥曲肽微球干扰实验预实验 依据公式最小有效稀释浓度 MVC = λ/*L*,其中注射用醋酸奥曲肽 *L* 为9 EU·mg^{-1},λ 为鲎试剂标示灵敏度。目前市售鲎试剂灵敏度 λ 通常在 0.5 ~ 0.03 EU·mL^{-1},则注射用醋酸奥曲肽微球对应最小稀释浓度为 0.055 ~ 0.003 mg·mL^{-1}。取样品用 DMSO 溶解并稀释为 0.055 ~ 0.003 mg·mL^{-1},将此系列稀释溶液记为 NPC;同时在上述系列溶液中添加等体积细菌内毒素标准溶液,使各浓度实验液中均含有 2λ 浓度的细菌内毒素,记此系列溶液为 PPC。

取灵敏度为 0.25 EU·mL^{-1}的 2 个不同厂家的鲎试剂,分别与上述 NPC 和 PPC 进行反应,各浓度重复 2 管,并设阴性对照(NC)和阳性对照(PC),结果见表 3。干扰预实验结果可以初步了解,注射用醋酸奥曲肽微球在稀释到 0.007 mg·mL^{-1}时,对 2 个厂家的鲎试剂与细菌内毒素的反应均无干扰抑制作用。因此,在正式干扰实验时,样品浓度选择为 0.007 mg·mL^{-1}。

表 3 注射用醋酸奥曲肽微球干扰预实验测定结果

鲎试剂批号	样品批号	稀释倍数/倍				供试品	NC	反应终点倍数/倍	回收率/%
		80	160	320	640				
1805241	S0039	+ + + +	+ + − −	− − − −	− − − −	− −	− −	113	71
	S0070	+ + + +	+ + + −	− − − −	− − − −	− −	− −	134	84
	S0086	+ + + +	+ + − −	− − − −	− − − −	− −	− −	113	71
1809292	S0039	+ + + +	+ + + −	− − − −	− − − −	− −	− −	134	84
	S0070	+ + + +	+ + − −	− − − −	− − − −	− −	− −	113	71
	S0086	+ + + +	+ − − −	− − − −	− − − −	− −	− −	95	59

4.3 注射用醋酸奥曲肽微球正式干扰实验 取 3 批注射用醋酸奥曲肽微球用 DMSO 溶解并稀释成 0.007 mg·mL^{-1}的溶液(样品阴性对照液)。分别将细菌内毒素稀释成 0.125,0.06,0.03,0.015 EU·mL^{-1}的含样品(浓度为 0.007 mg·mL^{-1})及不含样品的内毒素溶液,取灵敏度为 0.06 EU·mL^{-1}的 2 个厂家鲎试剂,按《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 1143 中的干扰实验项进行实验,计算内毒素标准品溶液的反应终点浓度的几何平均值,结果见表 4。供试品溶液及阴性对照平行管均为阴性,内毒素

标准溶液系列及含供试品的内毒素溶液系列均符合鲎试剂灵敏度复核实验要求。因此认为供试品在 0.003 mg·mL^{-1}浓度下,对 2 个厂家的鲎试剂与细菌内毒素的反应均无明显干扰抑制作用,可进行细菌内毒素检查。

表 4 注射用醋酸奥曲肽微球的正式干扰实验

鲎试剂批号	样品批号	内毒素浓度/EU·mL^{-1}				NC	反应终点浓度/EU·mL^{-1}
		0.125	0.06	0.03	0.015		
1805241	BET 水	+ +	+ +	− −	− −	− −	0.06
	S0039	+ + + +	+ + − −	− − − −	− − − −	− −	0.088
	S0070	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06
	S0086	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06
1809292	BET 水	+ +	+ +	− − − −	− − − −	− −	0.06
	S0039	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06
	S0070	+ + + +	+ + − −	− − − −	− − − −	− −	0.088
	S0086	+ + + +	+ + + +	− − − −	− − − −	− −	0.06

4.4 注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素回收率实验 取 3 批注射用醋酸奥曲肽微球用 DMSO 溶解混匀后,取 0.4 mL 醋酸奥曲肽微球(10 mg·mL^{-1})与 3.1 mL DMSO 及 0.5 mL 的细菌内毒素标准品溶液(80 EU·mL^{-1})混合,制成 4 mL 含 10 EU·mL^{-1}内毒素的供试品溶液。再用 BET 水分别制成 80,160,320 和 640 倍稀释液,使用灵敏度为 0.06 EU·mL^{-1}的鲎试剂进行细菌内毒素检验,通过计算各反应终点浓度的几何平均值来计算初始溶液中的内毒素的含量,进而确定醋酸奥曲肽微球的内毒素回收率,见表 5。结果表明:3 批醋酸奥曲肽回收率均在 50% ~200% 之间,符合要求,可认为用 DMSO 作为溶剂溶解醋酸奥曲肽微球,对样品中细菌内毒素的检出无影响,可用于醋酸奥曲肽微球的细菌内毒素检查。

表 5 醋酸奥曲肽微球溶液内毒素回收率实验结果

样品批号	S0039		S0070		S0086	
鲎试剂批号	1805241	1809292	1805241	1809292	1805241	1809292
稀释倍数						
80	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
160	+ + − −	+ + + −	+ + + −	+ + − −	+ + − −	+ − − −
320	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −
640	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −	− − − −
供试品溶液组	− −	− −	− −	− −	− −	− −
阴性对照组	− −	− −	− −	− −	− −	− −
反应终点倍数/倍	113	134	134	113	113	95
内毒素回收率/%	71	84	84	71	71	59

内毒素回收率 = 反应终点倍数 × 鲎试剂标示灵敏度(0.06 EU·mL^{-1})/细菌内毒素初始溶液效价(10 EU·mL^{-1}) ×100%

4.5 注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素检查 取 3 批注射用醋酸奥曲肽微球用 DMSO 溶解并稀释成 0.007 mg·mL^{-1}的溶液(NPC),并同时设立样品阳性对照管(PPC)、NC 管和 PC 管。取灵敏度为 0.06 EU·mL^{-1}的 2 个厂家鲎试剂,按《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”对样品进行细菌内毒素检查,结果见表 6。结果表明:3 批注射用醋酸奥曲肽微球经 2 个厂家的鲎试剂测试,结果均为符合规定。

表 6 注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素检查结果

鲎试剂批号	样品批号	浓度/mg·mL^{-1}	NPC	PPC	NC	PC	实验结果
1805241	S0039	0.007	- -	+ +	- -	+ +	符合规定
	S0070	0.007	- -	+ +			符合规定
	S0086	0.007	- -	+ +			符合规定
1809292	S0039	0.007	- -	+ +	- -	+ +	符合规定
	S0070	0.007	- -	+ +			符合规定
	S0086	0.007	- -	+ +			符合规定

讨　论

微球制备生产技术是一种新型的给药技术,可以通过调节、控制药物的释放度实现长效控释、缓释、靶向作用,在目前的临床应用上已经看出具有明显的优势,该剂型正在成为一种非常具有潜力的剂型[5]。微球制剂不同于传统的注射液或粉针,需要采用特殊试剂来溶解微球,才能检测到微球内部包含的细菌内毒素。为了将微球溶解和破碎,一般会选用毒性较小的 DMSO[6]。DMSO 是一种极性非质子溶剂,可与许多有机溶剂和水互溶。用 DMSO 可以完全溶解微球,并且在 DMSO 中预添加细菌内毒素进行干扰实验,鲎试剂灵敏度复核符合要求,所以 DMSO 对细菌内毒素的活性无明显影响,可用于微球类制剂内部细菌内毒素检查的溶剂。用 DMSO 溶解微球需要进行内毒素回收率的测定,要求在 50% ~200% 之间,说明 DMSO 对样品中细菌内毒素的检出无影响。对 3 批注射用醋酸奥曲肽微球用 2 个厂家的鲎试剂进行了细菌内毒素检查,结果均符合规定。因此本品适合用细菌内毒素进行产品的质量检查。

[参 考 文 献]

[1] 王磊, 沙春洁, 余飞,等. 醋酸奥曲肽缓释微球在大鼠体内的药动学与药效指标评价研究[J]. 中国新药杂志, 2019,28(11):1318 - 1324.

[2] 郭宁子, 辛中帅, 杨化新. 微球制剂质量控制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015,24(18): 2115 - 2121.

[3] 裴宇盛, 蔡彤, 高华,等. 中华人民共和国药典 2010 年版细菌内毒素检查法仲裁方法研究[J]. 药物分析杂志, 2013,33(9):1628 - 1632.

[4] 许倩, 郑正, 蒋菲, 等. 中华人民共和国药典 2015 年版四部特性检查法主要增修订内容解析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017,4(84): 16617 - 16618.

[5] 王玉静, 孙秀芝, 徐丽, 等. 微球制剂的研究进展及前景分析[J]. 生物化工, 2017,3(2): 80 - 83.

[6] 许雷鸣, 武谷, 堵伟锋, 等. 米力农原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国现代应用药学, 2014,31(9): 1110 - 1114.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 04 - 23