

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.023

泊沙康唑原料药细菌内毒素检查方法研究*

张 辉¹, 黄有兴^{2△}, 王美娜²

(1. 海南省药品和医疗器械审评服务中心, 海南 海口 570216; 2. 海南海灵化学制药有限公司, 海南 海口 570311)

摘要:目的 建立泊沙康唑原料药细菌内毒素的检查方法。方法 依照2020年版《中国药典(四部)》通则1143细菌内毒素检查法,用N,N-二甲基甲酰胺溶解泊沙康唑,再用细胞内毒素检查用水(BET用水)稀释,采用凝胶法,用2个厂家的鲎试剂进行干扰试验和内毒素回收干扰验证试验,对泊沙康唑进行细菌内毒素检查。结果 泊沙康唑先用2%的N,N-二甲基甲酰胺溶解,再用BET用水制备质量浓度≤0.833 mg/mL的供试品溶液时,对其细菌内毒素检查结果无影响。结论 本研究中建立的细菌内毒素检查方法可行,可用于制剂生产中泊沙康唑原料药细菌内毒素的控制。

关键词:泊沙康唑;细菌内毒素;干扰试验;质量控制

中图分类号:R94;R978.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)12-0094-04

Method for Bacterial Endotoxin Test of Posaconazole Active Pharmaceutical Ingredients

ZHANG Hui¹, HUANG Youxing², WANG Meina²

(1. Hainan Center for Drug and Medical Device Evaluation and Service, Haikou, Hainan, China 570216; 2. Hainan Hailing Chemical Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou, Hainan, China 570311)

Abstract: Objective To establish a method for bacterial endotoxin test of posaconazole active pharmaceutical ingredients (API). **Methods** According to bacterial endotoxin test (BET) method in the general rule 1143 in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV), posaconazole was dissolved with N,N-dimethylformamide, diluted with BET water, the gel method was used to carry out interference test and endotoxin recovery interference verification test with limulus amoebocyte lysate reagents from two manufacturers, and then the BET of posaconazole was performed. **Results** Posaconazole was dissolved with 2% N,N-dimethylformamide and then prepared into a test solution with a mass concentration ≤ 0.833 mg/mL with BET water, which had no effect on the results of BET. **Conclusion** The BET method established in this study is feasible, which can be used to control the bacterial endotoxin of posaconazole API in the production of preparations.

Key words: posaconazole; bacterial endotoxin; interference test; quality control

泊沙康唑是伊曲康唑的衍生物,为第2代三唑类抗真菌药物^[1],抗菌谱更广,抗菌作用更强,对念珠菌、各种曲霉菌及其他致病真菌均有较强活性^[2-3],适用于因免疫功能严重低下而具有高风险感染侵袭性曲霉菌和念珠菌的患者。建立相应细菌内毒素检测方法,从源头上减少内毒素污染风险,对于泊沙康唑注射剂成品的质量控制及临床用药安全具有重要意义。目前尚未见

泊沙康唑原料细菌内毒素检查方法学研究的相关报道。为此,本研究中参考国内其他药物相应研究^[4-9],并依据2020年版《中国药典(四部)》通则1143细菌内毒素检查法相应规定^[10]和其他国内标准^[11-12],并参考2021年版《英国药典》(BP2021)和2020年版《美国药典-国家处方集》(USP-NF2020),建立了泊沙康唑细菌内毒素的检查方法。现报道如下。

*基金项目:海南省海口市创新平台建设项目[2020-060]。

第一作者:张辉,男,大学本科,副主任药师,高级工程师,研究方向为药品和医疗器械技术审评及药品检查,(电子信箱)zhanghui1969@126.com。

△通信作者:黄有兴,男,大学本科,高级工程师,研究方向为药品质量管理,(电子信箱)HYX@hailingpharm.com。

- 苗注射液的包材相容性[J]. 沈阳药科大学学报,2019,36(9): 805-811.
- [11] 支旭然,宋浩静,王 觅,等. 注射用艾司奥美拉唑钠配伍稳定性考察[J]. 中国现代应用药学,2017,34(12): 1727-1730.
- [12] 蒋 煜,马玉楠,霍秀敏,等. 《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则》解读——提取迁移试验方法设计[J]. 中国新药杂志,2014,23(15):1738-1742.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:457-460.
- [14] 刘兴兰,王晓兰,杨 婧. LC/MS/MS测定注射用头孢噻肟钠包装所用胶塞中抗氧1076的迁移量[J]. 药物分析杂志,2017,37(11):2101-2105.
- [15] 李立根,张毅兰. 药用胶塞及其与药品的相容性简述[J]. 中国医药工业杂志,2015,46(12):1366-1367.

(收稿日期:2021-10-19;修回日期:2021-12-15)

1 仪器与试药

1.1 仪器

DK-98-II型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);漩涡混匀器(德国IKA公司);XS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 试药

泊沙康唑原料药(博瑞制药<苏州>有限公司,批号分别为SPO-I-210401、SPO-I-200305、SPO-I-200306);鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号为2007203;福州新北生化工业有限公司,批号为21030112;规格均为每支0.1 mL,灵敏度均为0.125 EU/mL);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号为150601-202089,规格为每支90 EU);细菌内毒素检查用水(BET用水,湛江安度斯生物有限公司,批号为2010210,规格为每瓶100 mL);*N,N*-二甲基甲酰胺(国药集团化学试剂有限公司,批号为20200422,规格为每瓶500 mL)。

2 方法与结果

2.1 限值确定

泊沙康唑临床1次最大剂量为800 mg/kg,则成人每千克体质量每小时的最大剂量(*M*)为13.33 mg/(kg·h),注射剂成人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量(*K*)=5 EU/(kg·h),根据公式内毒素限值(*L*)=*K*/*M*,计算,则*L*=0.37 EU/mg,从严控制,限值定为0.3 EU/mg。根据公式*MVC*= $\lambda/L^{[7,9-10]}$ 计算供试品最小有效稀释质量浓度(λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度),得*C*_{0.50}=1.666 mg/mL、*C*_{0.25}=0.833 mg/mL、*C*_{0.125}=0.416 mg/mL、*C*_{0.06}=0.2 mg/mL、*C*_{0.03}=0.1 mg/mL;在不低于对应最小有效稀释质量浓度条件下进行细菌内毒素检查。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验

取细菌内毒素工作标准品适量,加BET用水分别制备成2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 的溶液,以BET用水为阴性对照(NC),依照2020年版《中国药典(四部)》通则1143细菌内毒素检查法规定^[10],对使用的2批鲎试剂进行复核试验,结果实测灵敏度(λ_c)与标示灵敏度一致,详见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

TAL批号	内毒素灵敏度(EU/mL)				NC	灵敏度(λ_c , EU/mL)
	0.25	0.125	0.06	0.03		
2007203	++++	++++	----	----	--	0.125
21030112	++++	++++	----	----	--	0.125

注: - 为阴性反应, + 为阳性反应。下表同。

Note: - refers to a negative reaction and + refers to a positive reaction (for Tab. 1-8).

2.3 预干扰试验 I

泊沙康唑不溶于水,需用*N,N*-二甲基甲酰胺溶解制成供试品溶液,用0.125 EU/mL鲎试剂进行预干扰试验。泊沙康唑溶解后制成质量浓度为5 mg/mL的供试品溶液,加BET用水分别稀释,制得质量浓度为3.332, 1.666, 0.833, 0.417, 0.2, 0.1 mg/mL的系列阴性对照(NPC)溶液;取除0.1 mg/mL质量浓度外的上述溶液,对半稀释加入4 λ 的内毒素标准品溶液,制得质量浓度分别为1.666, 0.833, 0.417, 0.2, 0.1 mg/mL的系列阳性对照(PPC)溶液。取上述两组溶液进行干扰预试验,并设阳性对照(PC)和阴性对照(NC)各2管。结果见表2。

表2 供试品干扰预试验 I 结果

鲎试剂批号	系列溶液	供试品质量浓度(mg/mL)					NC	PC
		1.666	0.833	0.417	0.2	0.1		
2007203	NPC	--	--	--	--	--	--	++
	PPC	--	--	--	--	++	--	--
21030112	NPC	--	--	--	--	--	--	++
	PPC	--	--	--	--	++	--	--

可见,泊沙康唑溶液仅在质量浓度为0.1 mg/mL时,对内毒素与鲎试剂反应无干扰。考虑*N,N*-二甲基甲酰胺本身浓度过高,对内毒素检查有一定的干扰作用。故需考察该溶剂不对内毒素与鲎试剂反应产生干扰的浓度,再重新进行预干扰试验。

2.4 溶剂对细菌内毒素的干扰试验

溶剂预干扰试验:取*N,N*-二甲基甲酰胺适量,加BET用水分别稀释至4%、2%、1%、0.5%、0.25%体积分数,作为NPC。同时制备含有2 λ 内毒素的相同浓度*N,N*-二甲基甲酰胺溶液,作为PPC,均采用0.125 EU/mL鲎试剂,依照药典方法进行干扰试验,并设PC和NC管。结果见表3。可知,*N,N*-二甲基甲酰胺体积分数在0.25%~2%时,对内毒素与鲎试剂反应无干扰作用,故正式干扰试验中选择其体积分数为0.25%~2%。

正式干扰试验:取内毒素标准品适量,加BET用水稀释分别配成2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 的溶液,同时制备含相同内毒素的2% *N,N*-二甲基甲酰胺溶液,进行干扰试验。结果显示,在*N,N*-二甲基甲酰胺体积分数 \leq 2%

表3 溶剂对细菌内毒素与鲎试剂反应的影响

鲎试剂批号	系列溶液	溶剂体积分数(%)					PC	NC
		4	2	1	0.5	0.25		
2007203	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	++	++	++	++	--	--
21030112	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	++	++	++	++	--	--

表4 溶剂干扰试验结果

Tab. 4 Results of the interference test

鲎试剂 批号	系列 溶液	内毒素灵敏度(EU/mL)						λ_c (EU/mL)
		0.25	0.125	0.06	0.03	NPC	NC	
2007203	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	2% N,N-二甲基 甲酰胺溶液	++++	++++	--	--	--	--	0.125
21030112	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	2% N,N-二甲基 甲酰胺溶液	++++	++++	--	--	--	--	0.125

时对内毒素与鲎试剂反应均无明显干扰。详见表4。

2.5 干扰预试验 II

取泊沙康唑0.5 g,精密称定,加5 mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,配成100 mg/mL的溶液,用BET用水分别稀释,即得泊沙康唑质量浓度分别为1.666,0.833,0.417,0.2,0.1 mg/mL的系列NPC溶液,另外制备上述质量浓度溶液中含有2 λ 细菌内毒素的PPC溶液,进行预干扰试验。并设PC和NC,结果见表5。可见,泊沙康唑质量浓度不超过0.833 mg/mL时不影响内毒素与鲎试剂反应。

表5 供试品干扰预试验 II 结果

Tab. 5 Results of the pre-interference test II

鲎试剂 批号	系列 溶液	供试品溶液质量浓度(mg/mL)					PC	NC
		1.666	0.833	0.417	0.2	0.1		
2007203	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	++	++	++	++		
21030112	NPC	--	--	--	--	--	++	--
	PPC	--	++	++	++	++		

2.6 溶剂处理供试品的内毒素回收干扰验证试验

取泊沙康唑0.5 g,精密称定,加入5.0 mL N,N-二甲基甲酰胺溶解配制成100 mg/mL的溶液,加BET用水逐步稀释成质量浓度为0.833 mg/mL的泊沙康唑溶液;另取100 mg/mL的泊沙康唑N,N-二甲基甲酰胺溶液1 mL,加入30 EU/mL内毒素溶液,用BET用水稀释制成内毒素浓度为0.25 EU/mL,泊沙康唑质量浓度为0.833 mg/mL的溶液(2 λ),后用同浓度的泊沙康唑溶液逐级稀释为分别含0.125,0.06,0.03 EU/mL细菌内毒素的泊沙康唑溶液,同时配制含相同浓度内毒素的水溶液进行试验,试验时N,N-二甲基甲酰胺浓度控制在2%及以下。结果显示,N,N-二甲基甲酰胺在该浓度下对供试品中细菌内毒素无干扰作用。结果见表6。

2.7 正式干扰试验^[10-12]

取3个批次的泊沙康唑适量,制得0.833 mg/mL供试品溶液,并进行正式干扰试验。结果见表7。可知,该浓度下供试品对2个厂家的鲎试剂与细菌内毒素的

表6 细菌内毒素回收干扰验证试验结果

Tab. 6 Results of the verification test of bacterial endotoxin recovery interference test

鲎试剂 批号	水/供试品 批号	内毒素灵敏度(EU/mL)				NPC	NC	λ_c (EU/mL)
		0.25	0.125	0.06	0.03			
2007203	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	SPO-I-210401	++++	++++	----	----	--	--	0.125
21030112	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	SPO-I-210401	++++	++++	----	----	--	--	0.125

表7 供试品干扰试验结果

Tab. 7 Results of the interference test of samples

鲎试剂 批号	水/供试品 批号	内毒素灵敏度(EU/mL)				NPC	NC	λ_c (EU/mL)
		0.25	0.125	0.06	0.03			
2007203	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	SPO-I-210401	++++	++++	----	----	--	--	0.125
	SPO-I-200305	++++	++++	----	----	--	--	0.125
	SPO-I-200306	++++	++++	----	----	--	--	0.125
21030112	BET用水	++	++	--	--	--	--	0.125
	SPO-I-210401	++++	++++	----	----	--	--	0.125
	SPO-I-200305	++++	++++	----	----	--	--	0.125
	SPO-I-200306	++++	++++	----	----	--	--	0.125

反应均无明显干扰,可进行细菌内毒素检查。

2.8 细菌内毒素检查

将3个批次的泊沙康唑稀释后,进行细菌内毒素检查。结果均符合内控标准规定,见表8。

表8 供试品细菌内毒素检查结果

Tab. 8 Results of BET of the samples

鲎试剂批号	供试品批号	供试品质量 浓度(mg/mL)	NPC	PPC	PC	NC
2007203	SPO-I-210401	0.417	--	++		
	SPO-I-210305	0.417	--	++	++	--
	SPO-I-210306	0.417	--	++		
21030112	SPO-I-210401	0.417	--	++		
	SPO-I-210305	0.417	--	++	++	--
	SPO-I-210306	0.417	--	++		

3 讨论

细菌内毒素属外源性热原,具有致热性,普遍存在于自然界中。人和动物对内毒素有一定耐受力,但当过量内毒素进入血液后会引发机体严重的病理反应,轻则致发热、休克、心率过快,重则引起致命性败血症,并伴有多器官功能衰竭,甚至死亡。细菌内毒素是制药工业中最普遍和最主要的外源性热原,制药过程中细菌内毒素超标提示产品在生产过程中可能存在某些风险因素,控制了细菌内毒素,相当于控制了热原污染。细菌内毒素检查在制药领域具有重要意义;如泊沙康唑注射液生产过程中,一般采用除菌过滤加终端灭菌的