

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.015

注射用多西他赛聚合物胶束细菌内毒素定量检测法的建立*

陈莉¹, 刘小艳², 杜鹏飞², 季文君¹, 顾晓红¹, 潘尔卓¹, 周坚^{1△}

(1. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104; 2. 苏州海特比奥生物技术有限公司, 江苏 苏州 215421)

摘要:目的 建立注射用多西他赛聚合物胶束中细菌内毒素的定量检测方法。方法 采用电镜观察和激光粒度仪检测粒径, 筛选破坏胶束的适宜条件(分别以 pH9, 10, 11 的氢氧化钠溶液破坏); 在样品中加入内毒素, 再以 pH10 的氢氧化钠溶液破坏并稀释, 检测内毒素浓度, 并计算加标回收率; 确定胶束破坏后的内毒素检测方法, 并验证方法的准确性和精密度。结果 pH10 的氢氧化钠溶液可破坏胶束; 胶束破坏后加入内毒素并稀释至 0.5 mg/mL (内毒素为 0.5 EU/mL) 时内毒素的加标回收率较高 (91.81%), 且方法的准确性和精密度均较好, 当加入内毒素浓度为 1.00, 0.10, 0.01 EU/mL 时, 平均回收率在 96%~108% 之间, 变异系数 < 5%, 均满足检测要求; 3 批样品中均未检出内毒素 (< 0.02 EU/mg)。结论 建立的细菌内毒素定量检测方法可用于注射用多西他赛聚合物胶束细菌内毒素的定量检测。

关键词: 注射用多西他赛聚合物胶束; 破坏试验; 细菌内毒素; 定量检测

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)16-0061-04

Establishment of Quantitative Detection Method of Bacterial Endotoxin in Docetaxel Polymer Micelles for Injection

CHEN Li¹, LIU Xiaoyan², DU Pengfei², JI Wenjun¹, GU Xiaohong¹, PAN Erzhuo¹, ZHOU Jian¹

(1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou, Jiangsu, China 215104; 2. Suzhou Hightechbio Biotechnology Co., Ltd., Suzhou, Jiangsu, China 215421)

Abstract: **Objective** To establish a quantitative detection method of bacterial endotoxin in Docetaxel Polymer Micelles for Injection. **Methods** The particle size were observed by electron microscope and laser particle size analyzer to screen the suitable conditions for destroying micelles (destroyed by sodium hydroxide solution with pH9, 10 and 11, respectively). Endotoxin was added into the sample, and then destroyed and diluted with pH10 sodium hydroxide solution to detect the concentration of endotoxin, and the recovery rate was calculated. The endotoxin detection method after micelle destruction was determined, and the accuracy and precision of the method were verified. **Results** pH 10 sodium hydroxide solution could destroy the micelles. When endotoxin was added after micelle destruction and diluted to 0.5 mg/mL (the concentration of endotoxin was 0.5 EU/mL), the recovery rate of endotoxin was higher (91.81%), and the accuracy and precision of the method were good. When the concentration of endotoxin was 1.00, 0.10 and 0.01 EU/mL, the average recovery rate was in the range of 96% - 108%, and the coefficient of variation was lower than 5%, which met the detection requirements. No endotoxin (< 0.02 EU/mg) was detected in the three batches of samples. **Conclusion** The established quantitative detection method could be used for the quantitative detection of bacterial endotoxin in Docetaxel Polymer Micelles for Injection.

Key words: Docetaxel Polymer Micelles for Injection; destructive test; bacterial endotoxin; quantitative detection

*基金项目: 苏州市科技计划项目 [SYS2019117]。

第一作者: 陈莉, 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为药品检验及安全性评价, (电子信箱) chenli7710@126.com。

△通信作者: 周坚, 男, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为药品检验及安全性评价, (电子信箱) zhoujian_szidc@126.com。

- tors to inhibit TGF- β signaling[J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(19): 3535-3545.
- [13] CUI Y, SONG Y, YAN S, et al. CUEDC1 inhibits epithelial-mesenchymal transition via the T β RI/Smad signaling pathway and suppresses tumor progression in non-small cell lung cancer[J]. Aging, 2020, 12(20): 20047-20068.
- [14] JIN L, ZHU C, WANG X, et al. Urocortin Attenuates TGF β 1-Induced Snail1 and Slug Expressions: Inhibitory Role of Smad7 in Smad2/3 Signaling in Breast Cancer Cells[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(11): 2494-2503.
- [15] WANG W, WU CT, LUO R, et al. CXCR4 antagonist alleviates proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts induced by TGF- β ₁[J]. Gen Physiol Biophys, 2020, 39(2): 187-194.
- [16] MAIER A, PEILLE AL, VUAROQUEAUX V, et al. Anti-tumor activity of the TGF- β receptor kinase inhibitor galunisertib (LY2157299 monohydrate) in patient-derived tumor xenografts[J]. Cell Oncol, 2015, 38(2): 131-144.
- [17] WANG JL, CHEN CW, TSAI MR, et al. Antifibrotic role of PGC-1 α -siRNA against TGF- β ₁-induced renal interstitial fibrosis[J]. Exp Cell Res, 2018, 370(1): 160-167.
- [18] HAN J, LYU W, SHENG H, et al. Ecliptasaponin A induces apoptosis through the activation of ASK1/JNK pathway and autophagy in human lung cancer cells[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(20): 539.
- [19] YANG X, MA L, WEI R, et al. Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activating TGF- β pathway[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 75.
- (收稿日期: 2021-12-15; 修回日期: 2022-02-17)

革兰阴性菌产生的内毒素是药品污染导致毒性反应的最常见原因,其引起临床发热的活性远高于其他已知热原物质,因此在注射剂等临床高风险剂型中,特别需要通过控制内毒素含量,预防临床热原反应和败血症等药品不良反应的发生^[1-2]。但细菌内毒素检测在一些特殊制剂(如聚合物胶束溶液)的内毒素控制应用中仍存在问题。聚合物胶束易在较剧烈条件下如高浓度有机溶剂或高频超声下受到破坏^[3-4],而这些条件极可能干扰后续内毒素检测,进一步降低检测过程中内毒素的回收率。因此,在开发以聚合物胶束为载体的药物的内毒素检测方法时,必须找到既能破坏胶束稳定状态,释放潜在内毒素,又不影响内毒素检测,避免低回收率或假阴性,用于药品中内毒素含量控制和安全监测的方法。前期研究中探讨了聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物胶束特性,发现其疏水链在溶液中存在降解倾向^[5]。故拟采用碱性溶液加速聚合物胶束溶解降价的方法破坏聚合物胶束后,再进行内毒素检测,建立定量检测方法,用于注射用多西他赛聚合物胶束的内毒素含量检测,监控其质量和安全,也为其他类似聚合物胶束内毒素检测方法的开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Robot 100型全自动细菌内毒素检测系统(湛江安度斯生物有限公司);90PLUS ZETA型动态激光粒度仪(测定范围0.3 nm至15 μm,美国Brookhaven仪器有限公司)。

1.2 试剂

注射用多西他赛聚合物胶束(苏州海特比奥生物技术有限公司,批号分别为D19102313, D19102713, 20141118,规格为每瓶0.5 g);细菌内毒素工作标准品(批号为150800-201987,规格为每支80 EU),动态显色法鲎试剂(批号为2004070,规格为每支0.35 mL,标示灵敏度0.01 EU/mL),细菌内毒素检查用水(BET用水,批号为1910150,规格为每瓶100 mL),均购自湛江安度斯生物有限公司;氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司,批号为20200831)。

2 方法与结果

2.1 内毒素限值及最大有效稀释倍数(MVD)的确定

设定样品细菌内毒素限值为0.02 EU/mg^[6]。根据公式 $MVD = cL/\lambda$ 计算,其中, c 为供试品质量浓度(本研究中为50 mg/mL), L 为限值, λ 为标准曲线的最低浓度(即鲎试剂灵敏度),则 $MVD = 100$ 倍(0.5 mg/mL)。

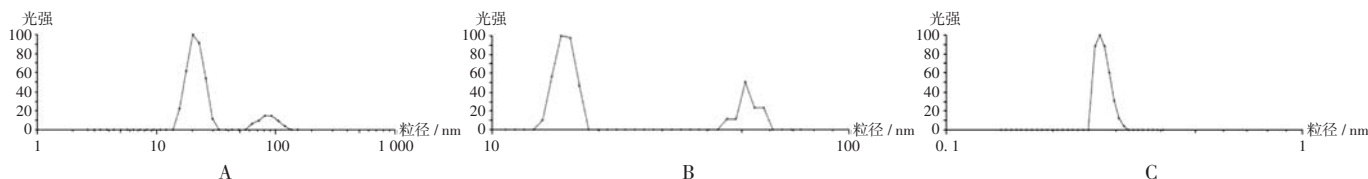
2.2 形态及粒径表征

溶液制备:取样品1瓶,加BET用水10 mL溶解混匀,制成质量浓度为50 mg/mL的溶液;取1 mL,置100 mL容量瓶中,加BET用水定容,制成质量浓度为0.5 mg/mL的供试品溶液I。破坏注射用多西他赛聚合物胶束溶液,取样品3瓶,分别加以BET用水配置成的pH 9, 10, 11的氢氧化钠溶液10 mL溶解混匀,制成质量浓度均为50 mg/mL的溶液;取1 mL,置100 mL容量瓶中,分别加上上述pH 9, 10, 11的氢氧化钠溶液定容,分别制成质量浓度均为0.5 mg/mL的供试品溶液II, III, IV。采用激光粒度仪检测上述供试品溶液II, III, IV,取约2 mL,加入比色皿,以激光粒度仪直接测量,测量温度为25℃。采用透射电镜确认激光粒度仪检测到的可破坏胶束溶液(且pH最接近7)。观察方法为,将聚合物胶束分散在水中得到胶束分散液,充分摇匀后,沾于铜网上,待网上液体将干时,滴加1%磷钨酸溶液1滴进行负染,用滤纸吸去多余染液,铜网在室温下自然晾干,透射电子显微镜下观测,电压设为100 kV^[7]。

供试品溶液II, III, IV中仅供试品溶液II的粒径无明显改变,详见图1。供试品溶液I中胶束粒子的平均粒径为22.74 nm,供试品溶液II和III中胶束粒子的平均粒径分别为20.72 nm和0.29 nm,破坏前后测定的平均粒径和粒径分布图有一定差异。由于激光粒度仪本身检测原理的限制,已无法检测到供试品溶液IV中胶束粒子的粒度,故无法展示。透射电镜结果见图2。可见,供试品溶液I中可观察到边缘较光滑的球状胶束粒子,供试品溶液III中的球状粒子边缘出现棱角,形状不是规则球状。结合2种检测方法的结果可判断,样品经pH10的氢氧化钠溶液溶解并稀释为0.5 mg/mL的溶液时,胶束已被破坏。

2.3 供试品干扰试验

取样品1瓶,用10 mL pH10的氢氧化钠溶液溶解



A. 供试品溶液 I B. 供试品溶液 II C. 供试品溶液 III

图1 注射用多西他赛聚合物胶束粒径分布

A. Test solution I B. Test solution II C. Test solution III

Fig. 1 Particle size distribution of Docetaxel Polymer Micelles for Injection

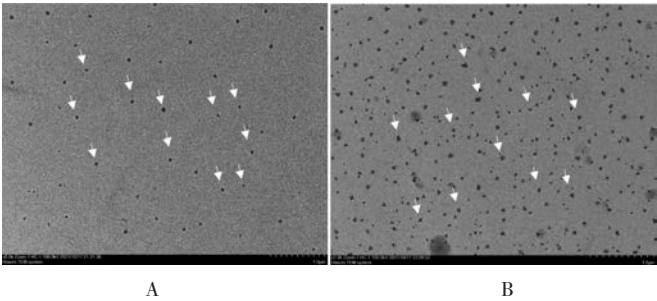


图2 注射用多西他赛聚合物胶束溶液的透射电镜图(图中标尺为1 μm)
A. 供试品溶液 I B. 供试品溶液 III
A. Test solution I B. Test solution III

Fig. 2 Transmission electron microscope photos of Docetaxel Polymer Micelles for Injection (the scale is 1 μm)

制成 50 mg / mL 的供试品溶液 V ,取 1.6 mL,加入细菌内毒素工作标准品中溶解并涡旋混匀 15 min,制成 50 mg / mL(含细菌内毒素 50 EU / mL)的供试品溶液 VI,最后再用 pH10 的氢氧化钠溶液稀释 50 倍或 100 倍制成供试品加标回收溶液;取适量,涡旋混匀 15 min 后,用 pH10 的氢氧化钠溶液稀释 50 倍或 100 倍,作为供试品溶液 VI 进行检测,计算供试品溶液的加标回收率。加样回收率 = (供试品加标溶液的内毒素检测值 - 供试品溶液检测值) / 供试品加标溶液中标准品的理论值 × 100%。

结果见表 1。可见,供试品溶液 VI 质量浓度为 1.0, 0.5 mg / mL 时,其平均加标回收率分别为 72.30% 和 91.81%,符合要求(50% ~ 200%);且在稀释 100 倍后,其加标回收率接近 100%,对检测结果干扰较小。故确认,在供试品溶液中加入 pH10 的氢氧化钠溶液不会破坏供试品中可能存在的内毒素,后续可使用 pH 10 的氢氧化钠溶液对样品溶解并稀释 100 倍后进行内毒素检测。

2.4 方法的精密度和准确性验证

采用 2.3 项下方法对样品进行溶解及稀释,参照 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1143 的内毒素检测方法进行检测,并进行方法精密度和准确性的验证。在供

表1 供试品干扰试验结果

Tab. 1 Results of the interference test on test samples					
样品质量浓度 (mg / mL)	稀释 倍数	内毒素浓度(EU / mL)		加样回收 率(%)	$\bar{X}$ (%)
		理论值	实测值		
1.0	50	1.0	0.714	71.40	72.30
		1.0	0.733	73.30	
		1.0	0.722	72.20	
0.5	100	0.5	0.428	85.63	91.81
		0.5	0.473	94.59	
		0.5	0.476	95.21	

试品溶液 III 中加入内毒素标准品适量,制成内毒素标准品的终浓度分别为 1.0,0.1,0.01 EU / mL,供试品溶液终质量浓度为 0.5 mg / mL,标准曲线溶液浓度为 1.0,0.1,0.01 EU / mL,并以溶剂作为空白对照,连续定量检测 3 次,计算 3 次结果间的变异系数(CV),作为方法精密度的验证指标,同时计算各孔的回收率,作为方法准确性的验证指标。结果显示,含不同浓度内毒素的供试品溶液 III,平均回收率均在 96% ~ 108% 之间,表明该方法准确性较好;检测结果的 CV 值均小于 5%,表明该方法精密度较好。详见表 2。

表2 供试品内毒素含量检测方法的准确性和精密度

Tab. 2 Accuracy and precision of the detection method for endotoxin content in test samples

内毒素浓度(EU / mL)		平均回收率 (%)	CV(%)
理论值	实测值		
1.00	0.963 4 ± 0.022 4	96	2.322 7
0.10	0.010 8 ± 0.005 0	108	4.637 0
0.01	0.009 6 ± 0.000 2	96	2.337 1

2.5 样品内毒素含量测定

取 3 批样品,按 2.4 项下方法制备标准曲线溶液、0.5 mg / mL 供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液(添加的标准内毒素终浓度为 0.1 EU / mL),另取 BET 用水作为空白对照;在无内毒素的 96 孔板中分别加入上述溶液,以及 0.1 mL 动态显色试剂,混匀后以酶标仪检测,并计算供试品的内毒素含量以及对应的回收率。结果 3 批样品均未检出内毒素,详见表 3。

表3 样品细菌内毒素含量测定结果(n = 3)

Tab. 3 Results of content determination of bacterial endotoxin in three batches of samples (n = 3)

批号	样品质量浓度 (mg / mL)	内毒素测定值 (EU / mg)	供试品阳性 回收率(%)	CV(%)
D19102313	0.5	< 0.02	84	1.43
D19102713	0.5	< 0.02	83	1.51
20141118	0.5	< 0.02	93	1.59

3 讨论

注射用多西他赛聚合物胶束,溶解后即是以聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物(mPEG - PDLLA)作为多西他赛药物载体的一种自组装胶束溶液,具有生物可降解性和较好的生物相容性,现主要用作疏水性药物的给药载体[8]。其具有较典型的壳 - 核结构,亲脂性内核可携带疏水性药物,亲水性外壳可增加药物在水溶液中的溶解性,同时可避免药物进入体内后被吸附或吞噬,延长药物在体内的作用时间,提高疗效[9]。但这种具有两亲性的聚合物载体,在增加难溶性药物溶解

度的同时也增加了内毒素的溶解度,同时还可能将内毒素包裹在胶束中,影响内毒素检测结果的准确率,导致漏检或假阴性情况发生^[10]。因此,在内毒素检测前破坏胶束,释放出药物及可能含有的内毒素,再进行检测,则可提高内毒素检测的准确性。

本研究预试验结果显示,氢氧化钠溶液能加速样品降解,因此,首先观察不同pH的氢氧化钠溶液对样品稳定性的影响。激光粒度仪可以通过测量光散射的方法测量溶液中粒子的粒径,但当光强度(kcps)值过低时,测定的准确度会下降。透射电镜可直观地观察胶束粒子的形态,但由于胶束粒子为有机物,透射电镜的电子束会在成像的同时破坏胶束粒子,故本研究中采用激光粒度仪的粒径测量和透射电镜观察两种方法结合,来确认胶束状态。

本研究中首先根据已有文献中对类似聚合物胶束稳定性的试验结果^[3-4],选择了对后续内毒素检测干扰相对较小的、以pH10的氢氧化钠溶液加速胶束降解进行破坏,结合透射电镜的形态观察和激光粒度仪的粒径测定,确定破坏胶束稳定性的条件。结果显示,样品加入pH10的氢氧化钠溶液稀释至0.5 mg/mL,胶束的稳定性即被破坏,表现为粒径变大,且光kcps值较小,提示胶束丁达尔效应消失,稳定状态被破坏^[11]。考虑到激光粒度仪检测胶束粒径主要为仪器更具光散射进行模拟计算得到的结果^[12],因而本研究中还采用透射电镜对溶液进行观察,结果显示,胶束在未破坏时呈现球状形态,被破坏后,球状形态消失。但由于胶束粒子主要是由有机物组成,对电子束的耐受能力较弱,长时间聚焦会加速胶束粒子的破坏和形态的改变^[13],故本研究中仅采用了较小的放大倍数。通过粒径测定和透射电镜的形态观察的结果可以确认,pH10的氢氧化钠溶液可破坏样品并使其中可能包裹的内毒素能释放至溶液中。

加入pH10的碱性溶液破坏聚合物形成胶束的同时,也可能破坏供试品中已经存在的内毒素,为排除其对既有内毒素的影响,本研究中直接在已破坏的样品中加入一定量的内毒素来模拟样品中可能存在的内毒素,然后进行胶束的破坏和稀释,计算检测供试品溶液中内毒素的加标回收率。结果显示,终质量浓度为0.5 mg/mL的供试品溶液(已达MVD)的加标回收率接近100%,说明加入pH10的氢氧化钠溶液进行破坏时,不会对供试品溶液中可能存在的内毒素产生明显的破坏作用。

方法学考察结果显示,供试品溶液中分别加入不同浓度的内毒素标准品后,回收率均接近100%,符合内毒素定量检测方法要求(50%~200%)。对样品重复

检测3次,结果的CV均不超过5%,满足内毒素定量检测方法的要求(一般为不超过10%),表明该方法具有较好的精密度和准确度。将3批样品稀释至终质量浓度为0.5 mg/mL时检测,检查结果均小于限值,符合规定。

综上所述,本研究中对于注射用多西他赛聚合物胶束这一特殊剂型,建立了破坏胶束后再进行内毒素含量检测的方法,相对于直接稀释后进行内毒素检测,该方法可使聚合物胶束中可能存在的细菌内毒素释放至溶液中,避免检测结果的假阴性或遮蔽,提高了检测结果的准确性和药品临床试验的安全性。同时,本研究中采用碱性溶液加速胶束溶液降解,避免了使用高浓度有机溶剂等胶束破坏方法对后续检测的影响,可为此类聚合物胶束类药物内毒素的检测提供参考。

参考文献

- [1] PEI YS, CAI T, ZHANG GL, et al. Detection of bacterial endotoxin in paclitaxel liposome[J]. Chin Pharm Sci, 2018, 27(6): 436-441.
- [2] 贾首前, 王莉芳, 冯润东, 等. 长春西汀注射剂细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业, 2021, 30(21): 69-72.
- [3] OUAHAB A, SHAO C, SHEN Y, et al. Development and characterization of stabilized double loaded mPEG-PDLLA micelles for simultaneous delivery of paclitaxel and docetaxel[J]. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2014, 40(7): 860-868.
- [4] 王书航. 长春瑞滨-顺铂共递送脂质体的构建、评价及在非小细胞肺癌中的药效学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [5] 张明. 紫杉醇聚合物胶束的研究[D]. 沈阳: 中国药科大学, 2004.
- [6] 陈卫, 陈莉, 刘小艳, 等. 纳米胶束载体聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物中细菌内毒素动态显色定量方法的建立[J]. 中国药品标准, 2019, 20(3): 231-236.
- [7] 巨鲜婷, 果秋婷. 阿立哌唑混合纳米胶束的制备与评价[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(4): 621-626.
- [8] 不公告发明人. 一种聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物及其制备方法: CN 104761710 B[P]. 2015-07-08.
- [9] 陈丽青, 黄伟, 高钟镐, 等. 载阿齐他赛聚乙二醇单甲醚-聚乳酸双嵌段共聚物纳米胶束的制备、表征及体外抗肿瘤活性的研究[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(19): 1688-1695.
- [10] WILMAR C, KLAUS B, ULRICH Z, et al. Biophysical Analysis of Lipopolysaccharide Formulations for an Understanding of the Low Endotoxin Recovery (LER) Phenomenon[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2737.
- [11] 陶悦, 宫丽波, 赵云娜, 等. ZetaPlus激光粒度仪测量聚丁二烯胶乳粒径影响因素浅析[J]. 弹性体, 2016, 26(3): 73-76.
- [12] 张春玉, 刘争晖, 徐耿钊, 等. 水分散介质中离子浓度对聚苯乙烯微球粒径表征的影响[J]. 中国粉体技术, 2019, 25(4): 55-60.
- [13] 曾丽珍, 赵少飞. 浅谈高质量透射电镜照片的拍摄[J]. 实验室研究与探索, 2016, 35(7): 295-301.

(收稿日期: 2021-11-30; 修回日期: 2022-02-06)