

醋酸戈舍瑞林缓释植入剂细菌内毒素检查方法学研究

胡宇驰, 杨赞昀, 朱春玥, 周建平 (北京市药品检验所, 北京 100035)

[摘要] 目的 对醋酸戈舍瑞林缓释植入剂细菌内毒素检查的方法学进行验证。方法:用乙腈溶解醋酸戈舍瑞林缓释植入剂后形成混悬液,用水稀释乙腈混悬液后制成溶液,对此溶液进行凝胶法检查干扰试验;同时对乙腈溶解缓释植入剂的步骤进行内毒素回收率试验。结果 缓释植入剂乙腈混悬液稀释 200倍后,对凝胶法内毒素检查无干扰。乙腈溶解液回收率在 25%~35%之间,需要对乙腈溶解液的内毒素限值进行折算降低。结论 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂进行凝胶法内毒素检查是可行的。

[关键词] 醋酸戈舍瑞林;缓释植入剂;细菌内毒素;回收率

[中图分类号] R927.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2010)01-0036-04

Study on gelation method of bacterial endotoxin test in goserelin acetate sustained-release depot

HU Yu-chi, YANG Yun-yun, ZHU Chun-yue, ZHOU Jian-ping (Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective** To confirm the feasibility of gelation method of bacterial endotoxins tests for goserelin acetate sustained-release depot. **Methods** Acetonitrile were added to dissolve the sustained-release depot, the goserelin acetate will be precipitated out. Then the suspension could be removed to pyrogen-free water, the goserelin acetate will be dissolved; the interference test of the dilute solution can be conducted, the endotoxin recovery tests of acetonitrile suspension was conducted also. **Results** 200-fold diluents of the acetonitrile suspension dose not interfere with the test for bacterial endotoxins. The endotoxin recovery of acetonitrile suspension was 25 percent to 35 percent, thus should to decrease the endotoxin limit of the acetonitrile suspension. **Conclusion** Gelation clot test is suitable for the detection of Goserelin Acetate Sustained-Release Depot.

[Key words] goserelin acetate; sustained-release depot; bacterial endotoxin; endotoxin recovery

醋酸戈舍瑞林用于前列腺癌的治疗^[1],其缓释植入剂临床每 12周使用一次,每次采用腹部皮下注射一剂。醋酸戈舍瑞林缓释植入剂为我国进口药品,目前仅阿斯特拉公司生产。为更好控制产品质量,保证用药安全,有必要对缓释植入剂中的内毒素进行检测。但醋酸戈舍瑞林缓释植入剂为短棒状固体制剂,在水溶液中不溶,吸水后仅缓慢膨胀,因此必须采用 100%的乙腈进行溶解,然后将乙腈溶解液稀释进行凝胶法细菌内毒素检查。本研究目的是确定醋酸戈舍瑞林缓释植入剂的内毒素限值,进行乙腈溶液的鲎试剂干扰试验和内毒素回收率试验,为该产品采用凝胶法进行内毒素检查提供依据。

1 实验材料

醋酸戈舍瑞林缓释植入剂 (AstraZeneca UK Limited,规格 10.8 mg,批号为 EJ276、EK499、EK502);鲎试剂 (湛江博康海洋生物有限公司,规格

0.1 ml,批号为 0810230,灵敏度 0.25 EU/ml;规格 0.1 ml,批号为 0801220,灵敏度 0.06 EU/ml);鲎试剂 (湛江安度斯生物有限公司,规格 0.1 ml,批号为 0806181,灵敏度 0.25 EU/ml;规格 0.1 ml,批号为 0710171,灵敏度 0.03 EU/ml);细菌内毒素工作标准品 (中国药品生物制品检定所,规格 10 000 EU/支,批号为 150600-200707);细菌内毒素检查用水 (大同市惠达药业有限责任公司,规格 10 ml/支,批号为 0709021);乙腈 (Honeywell international Inc. Burdick & Jackson,优级纯,批号为 CU979)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核 按照《中国药典》2005年版二部附录 XIE细菌内毒素检查法规定^[2],进行鲎试剂灵敏度复核,结果见表 1和表 2。

4批鲎试剂用细菌内毒素标准品检查, c均为的 0.5~2.0倍,结果均符合规定。

2.2 内毒素限值(L)的确定 因醋酸戈舍瑞林缓释植入剂临床每 12周使用一次,作为皮下植入的缓释制剂其限值不如静脉注射剂要求严格,故将其限

[作者简介] 胡宇驰 (1975-),男,主管药师。E-mail: yuchihu@263.net

值定为应小于 300 EU/剂,与临床一次静脉注射给药的內毒素限值要求相同。

表 1 鲎试剂灵敏度复核 ()

TAL批号	标示灵敏度 (EU/ml)	內毒素浓度 (EU/ml)				NC	灵敏度 _c (EU/ml)
		0.5	0.25	0.125	0.06		
0806181	0.25	++++	++++	-----	-----	--	0.25
0810230	0.25	++++	++++	-----	-----	--	0.25

表 2 鲎试剂灵敏度复核 ()

TAL批号	标示灵敏度 (EU/ml)	內毒素浓度 (EU/ml)					NC	灵敏度 _c (EU/ml)
		0.125	0.06	0.03	0.015	0.0075		
0808220	0.06	++++	++++	-----	-----	-----	--	0.06
0710171	0.03		++++	++++	-----	-----	--	0.03

2.3 干扰试验预试验

2.3.1 有效稀释倍数的计算^[3] 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂为短棒状固体制剂,在水溶液中不溶,吸水后缓慢膨胀,然后戈舍瑞林从棒状制剂中缓慢释放。因此,必须采用适当的方法,比较快速地破坏短棒状固体制剂制成溶液,使缓释植入剂中的內毒素在溶液中均匀分散,然后才能进行內毒素检查。

根据 AstraZeneca UK Limited提供的说明,采用 100%乙腈可以较快速溶解醋酸戈舍瑞林缓释植入剂,形成混悬溶液。实验中每 1剂加入 6 ml乙腈,约 1 h后缓释植入剂溶解形成混悬溶液。混悬液用水稀释后,混悬物溶解成为透明溶液,然后可进行內毒素检查。

醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解混悬液內毒素检查有效稀释倍数 (MVD)的计算:

$$\text{公式 } MVD = L /$$

其中 L为醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解混悬液的细菌內毒素限值:

$$L = 300 \text{ EU/剂} \div 6 \text{ ml} = 50 \text{ EU/ml}$$

为鲎试剂标示灵敏度,目前市售鲎试剂灵敏度通常在 0.5~0.03 EU/ml,则醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解混悬液的对应有效稀释倍数为:

$$MVD_{0.5} = 50 / 0.5 = 100 \text{ 倍}; MVD_{0.25} = 50 / 0.25 = 200 \text{ 倍}; MVD_{0.125} = 50 / 0.125 = 400 \text{ 倍}; MVD_{0.06} = 50 / 0.06 = 800 \text{ 倍}; MVD_{0.03} = 50 / 0.03 = 1600 \text{ 倍}。$$

2.3.2 干扰预试验 将 1批醋酸戈舍瑞林缓释植入剂用 6 ml乙腈溶解 1剂,制成混悬液,摇匀后用

细菌內毒素检查用水分别稀释为 50、100、200、400、800、1600倍稀释液,将此系列稀释溶液记为 NPC。同时在上述系列溶液中加入细菌內毒素标准溶液,使每一浓度的试验液中均含有 2 及 0.25 浓度的细菌內毒素,记此系列溶液分别为 PPC1和 PPC2。

取灵敏度分别为 0.25 EU/ml的鲎试剂,分别与上述 PPC和 NPC进行反应,每一浓度重复 2管,并设阳性和阴性对照。结果见表 3。

表 3 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂干扰预试验结果

系列	样品稀释倍数					NC	PC
	100	200	400	800	1600		
NPC	-	-	-	-	-	-	++
PPC1	+	+	+	+	+	-	-
PPC2	-	-	-	-	-	-	-

注:鲎试剂批号:0806181, =0.25 EU/ml

由以上干扰预试验结果可以初步了解,醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解混悬液在稀释到 200倍及 200倍以上时对鲎试剂与內毒素的凝集反应无干扰。

2.4 干扰试验 取 3批醋酸戈舍瑞林缓释植入剂各 1剂,分别用 6 ml乙腈溶解,制成混悬液,摇匀后用细菌內毒素检查用水分别稀释为 100、200倍稀释液,并用內毒素稀释为含內毒素为 0.5、0.25、0.125、0.06 EU/ml的 200倍稀释液,按《中国药典》2005年版二部附录中的“细菌內毒素检查供试品干扰试验项”进行试验,结果见表 4、表 5。

表 4 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂內毒素干扰试验结果 ()

样品	內毒素浓度 (EU/ml)				NC	Es(EU/ml)	Et(EU/ml)
	0.5	0.25	0.125	0.06			
BET水	++++	++++	-----	-----	--	0.25	-
EK502	++++	++	-----	-----	--	-	0.30
EJ276	++++	++	-----	-----	--	-	0.35
EK499	++++	++++	-----	-----	--	-	0.35

注:鲎试剂批号:0806181, =0.25 EU/ml

表 5 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂内毒素干扰试验结果 ()

样品	内毒素浓度 (EU/ml)				NC	Es (EU/ml)	Et (EU/ml)
	0.5	0.25	0.125	0.06			
BET水	++++	++++	-----	-----	-	0.25	-
EK502	++++	+ - ++	-----	-----	-	-	0.30
EJ276	++++	+ - ++	-----	-----	-	-	0.30
EK499	++++	++++	-----	-----	-	-	0.25

注:鲎试剂批号:0810230, =0.25 EU/ml

正式干扰试验结果表明, Es/Et均在 0.5 ~ 2.0 范围之内, 确认醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解液在稀释到 200倍及 200倍以上对内毒素与鲎试剂的凝集反应无干扰。

2.5 细菌内毒素回收率试验 因本品需用 100% 乙腈溶解的缓释植入剂, 需要考察此过程的内毒素回收率, 根据内毒素回收率的数据制定的方法, 才能真实测定缓释植入剂中的内毒素。

取 3批醋酸戈舍瑞林缓释植入剂各 1剂, 分别

用 5.7 ml乙腈溶解混匀, 加入 0.3 ml 1 000 EU/ml 内毒素标准品稀释液, 制成 6 ml混悬液, 即内毒素加入量为 50 EU/ml。将 6 ml混悬液摇匀后用细菌内毒素检查用水分别稀释为 100、200、400、800、1 600倍稀释液; 将系列稀释液与灵敏度为 0.06 EU/ml或 0.03 EU/ml的鲎试剂反应, 采用凝胶半定量的测定方法, 测定加入内毒素后溶液中的内毒素量。结果如下, 见表 6和表 7, 可知内毒素的回收率在 25% ~ 35%之间。

表 6 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解液内毒素回收率试验 ()

内毒素浓度 (EU/ml)	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	NC	计算	回收率
水溶液	++++	++++	-----	-----	-	=0.0625	
样品	100倍	200倍	400倍	800倍	1600倍		
EK502	++++	++++	+ - - -	-----	-----	237倍	30%
EJ276	++++	++++	-----	-----	-----	200倍	25%
EK499	++++	++++	-----	-----	-----	200倍	25%

注 1:回收率 =计算倍数 ×灵敏度 ÷50EU/ml, 50EU为每 1ml乙腈混悬液中加入内毒素量。注 2:鲎试剂, 批号:0808220, =0.06 EU/ml

表 7 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解液内毒素回收率试验 ()

内毒素浓度 (EU/ml)	0.0625	0.0313	0.0156	0.078	NC	计算	回收率
水溶液	++++	++++	-----	-----	-	=0.03125	
样品	200倍	400倍	800倍	1600倍			
EK502	++++	++++	+ + - -	-----	-----	564倍	35%
EJ276	++++	++++	-----	-----	-----	400倍	25%
EK499	++++	++++	-----	-----	-----	400倍	25%

注 1:回收率 =计算倍数 ×灵敏度 ÷50EU/ml, 50EU为每 1ml乙腈混悬液中加入内毒素量。

注 2:鲎试剂, 批号:0710171, =0.03 EU/ml

尽管植入剂中内毒素含量很低, 但上表中的内毒素回收率计算未减去缓释植入剂本身的内毒素。如计算植入剂中已有的内毒素, 则植入剂经乙腈溶解后的内毒素回收率还应略低于 25% ~ 35%的范围。

因内毒素回收率低于 50%, 约在 25% ~ 35%的范围之内, 为更好保证采用乙腈溶解缓释植入剂进行内毒素测定的准确性, 有必要调整乙腈溶液 1ml对应的缓释植入剂的比例。考虑到凝胶半定量法的误差较大, 我所将其由 1/6调整为 1/12, 以保证内毒素的测定在中国药典要求的凝胶法 50% ~ 200%的误差范围之内。

2.6 样品的细菌内毒素检查 根据以上的干扰试验和内毒素回收率试验, 我所制定的醋酸戈舍瑞林的内毒素检查标准为: 取本品 1剂, 加入乙腈 6 ml制成混悬溶液, 摇匀后按每 1 ml乙腈溶液含 1/12剂缓释植入剂计算, 依法检查 (中国药典 2005年版二部附录 XIE), 每 1剂醋酸戈舍瑞林缓释植入剂中含内毒素的量应小于 300 EU。

根据此检查标准, 按《中国药典》2005年版细菌内毒素检查法, 使用两批不同厂家的鲎试剂分别对 3批样品进行细菌内毒素检查, 并同时设立样品的自身阳性对照管, 结果见表 8和表 9, 样品检验结果均符合拟订标准规定。

表 8 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂样品细菌内毒素检查 ()

样品批号	样品稀释倍数	NPC	PPC	阳性	阴性
EK502	200倍	- -	++	++	- -
EJ276	200倍	- -	++	++	- -
EK499	200倍	- -	++	++	- -

注:鲎试剂批号: 0807220, =0.06 EU/ml

表 9 醋酸戈舍瑞林缓释植入剂样品细菌内毒素检查 ()

样品批号	样品稀释倍数	NPC	PPC	阳性	阴性
EK502	200倍	- -	++	++	- -
EJ276	200倍	- -	++	++	- -
EK499	200倍	- -	++	++	- -

注:鲎试剂批号: 0710171, =0.03EU/ml

3 讨论

近年来随着制剂学的发展,越来越多的微球制剂和植入剂应用到注射剂中^[4,5]。上述两种剂型的内毒素检查与传统的输液或粉针有很大不同,因为需要采用特殊试剂来破坏微球或溶解植入剂,才能检测微球内或植入剂内的内毒素含量。选用的特殊试剂进行内毒素检查,我们认为必须考虑以下几点: 必须能够破坏微球或溶解植入剂,以准确检测微球或植入剂内的内毒素; 尽量选用能与水互溶的试剂,否则需要用水来进行萃取,步骤繁琐且试验误差大; 特殊试剂和制剂本身的赋型剂、辅料等的量远远大于传统注射剂,有可能对鲎试剂与内毒素的反应造成干扰,因此应先进行干扰试验; 破坏微球或溶解植入剂的过程,必须进行内毒素回收率的测定。因为赋型剂和辅料的量比较大,经特殊试剂处理可能不能完全提取出微球或植入剂内的内毒素;或者特殊试剂对内毒素有破坏作用;或者特殊试剂与水不能互溶,需要用内毒素检查用水萃取特殊试剂溶液中的内毒素;因此必须测定特殊试剂处理微球或植入剂过程的内毒素回收率,根据回收率数据制定最终测试溶液中内毒素量与样品中的内毒素量的计算关系,才能正确地测定微球或植入剂中的

内毒素含量; 尽量选用无毒的试剂,以免试验对人健康的影响大。

本研究考察的醋酸戈舍瑞林缓释植入剂,选用 100%乙腈先溶解制成混悬液,然后用水稀释混悬液成为透明水溶液。因乙腈与水互溶,不需进行萃取而可直接稀释后进行实验,经干扰试验结果可以发现,醋酸戈舍瑞林缓释植入剂乙腈溶解液在稀释 200倍及 200倍以上时对鲎试剂与内毒素凝集反应无干扰。建议在其他的微球制剂或植入剂的内毒素测定时,应尽量采用这种可以与水互溶的试剂来进行处理。

内毒素回收率试验结果表明,在乙腈溶解液中加入内毒素,其回收率仅为 25% ~ 35%。尽管本研究采用的不是定量测定方法,但其回收率也超出了中国药典要求的凝胶法误差在 50% ~ 200%之间的要求。根据本文测定的回收率数据,我们将缓释植入剂乙腈溶解液 1ml对应的缓释植入剂比例降低一倍,由 1/6调整为 1/12,以保证内毒素的理论回收率达 50%以上,从而符合中国药典凝胶法检查的要求。

根据本研究,醋酸戈舍瑞林缓释植入剂采用凝胶法进行内毒素检查是可行的,按照拟订的质量标准检验,3批样品均符合规定,其内毒素限值低于 300EU 剂。

【参考文献】

- [1] Perry CM, Brogden RN. Goserelin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in benign gynaecological disorders[J]. Drugs, 1996, 51 (2): 319.
- [2] 中国药典 2005年版. 二部 [S]. 2005:附录 XIE.
- [3] 黄清泉,夏振民. 药品细菌内毒素检查的实验设计 [J]. 中国药理学杂志, 1997, 032 (2): 72.
- [4] 任海霞,朱家璧,汤 玥. 微球制剂的应用研究进展 [J]. 药学进展, 2007, 31 (2): 59.
- [5] 王 馨,黄 华. 植入剂的研究与应用 [J]. 中国药业, 2006, 15 (6): 3.

[收稿日期] 2009-11-04

[修回日期] 2009-11-30

(上接第 35 页)

【参考文献】

- [1] 马忠杰,马志力. 长矩延胡索的显微与薄层鉴别 [J]. 解放军药学学报, 1998, (04): 13.
- [2] 中国人民解放军医疗机构制剂规范 1991年版 [S]. 北京:人

民军医出版社, 1991: 84.

- [3] 中国药典 2005年版 [S]. 一部. 2005: 211.
- [4] 邓筱华,王 建. HPLC法测定清热除湿剂中黄芩苷的含量 [J]. 中国药师, 2004, 6 (7): 446.

[收稿日期] 2009-06-19

[修回日期] 2009-07-15