doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.20.019

甘精胰岛素原料药细菌内毒素检查方法学研究*

张红梅[1,2],方　芳[2],李祥胜[2],许雷鸣[1,2△]

(1. 安徽中医药大学,安徽 合肥　230012;　2. 安徽省食品药品检验研究院,安徽 合肥　230051)

摘要:目的　建立甘精胰岛素原料药的细菌内毒素检查方法。**方法**　以 0.01 mol / L 盐酸溶液溶解样品,细菌内毒素检查用水稀释,用 2 个不同厂家的鲎试剂,按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1143 项下凝胶法进行细菌内毒素干扰试验。**结果**　样品的细菌内毒素检查限值为 10 EU / mg,在此条件下,样品细菌内毒素检查的最大不干扰质量浓度为 0.4 mg / mL,2 个不同厂家的鲎试剂均可对样品进行细菌内毒素检查。**结论**　所建立的方法可用于甘精胰岛素原料药的细菌内毒素检查。

关键词:甘精胰岛素;原料药;细菌内毒素检查;干扰试验;盐酸溶液

中图分类号:R927.1　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 - 4931(2022)20 - 0072 - 03**

Bacterial Endotoxin Test Methodology of Insulin Glargine Active Pharmaceutical Ingredients

ZHANG Hongmei[1,2], *FANG Fang*[2], *LI Xiangsheng*[2], *XU Leiming*[1,2]

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China　230012;　2. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei, Anhui, China　230051)

Abstract: Objective　To establish a bacterial endotoxin test (BET) method for insulin glargine active pharmaceutical ingredients (API). **Methods**　The samples were dissolved with 0.01 mol / L hydrochloric acid solution, and were diluted with water for BET. According to the gel method in general rule 1143 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume Ⅳ), the bacterial endotoxin interference test was carried out with tachypleus amebocyte lysate (TAL) from two different manufacturers. **Results**　The BET limit of the sample was 10 EU / mg. Under this condition, the maximum noninterference mass concentration of the sample for the BET was 0.4 mg / mL. TAL from two different manufacturers could be used for the BET of samples. **Conclusion**　The established method can be used for the BET of insulin glargine.

Key words: insulin glargine; active pharmaceutical ingredients; bacterial endotoxin test; interference test; hydrochloric acid solution

甘精胰岛素是采用基因重组技术获得的一种新型人胰岛素类似物,属于长效胰岛素[1]。与人胰岛素相比,甘精胰岛素结构 A 链的 21 位置由甘氨酸代替了天门冬酰胺,B 链的 C 末端增加了 2 个精氨酸残基,其等电点也升至 6.7,这使得其注射后在人体皮下的 pH 环境下会形成沉淀,延长了药物吸收和作用的时间。作用时间较长,代谢时间也较长,对血糖的影响较小,导致的低血糖概率较低,适用于各阶段的 1 型糖尿病患者和部分 2 型糖尿病患者[2 - 3]。甘精胰岛素原料药为白色或类白色粉末,难溶于水,故需溶解后再行细菌内毒素检查,否则可能导致假阴性结果。依据 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1143 细菌内毒素检查法(选其中凝胶法)[4]178 - 181、通则 9301 注射剂安全性检查法应用指导原则[4]517 - 518、通则 9251 细菌内毒素检查法应用指导

*基金项目:安徽省药品监督管理局科技创新项目[AHYJ - KJ - 202004]。

第一作者:张红梅,女,在读硕士研究生,研究方向为药检药理及生物制品质量控制,(电子信箱)1423239662@qq.com。

△通信作者:许雷鸣,男,博士,副主任药师,研究方向为药检药理及生物制品质量控制,(电子信箱)xuleiming1980@163.com。

[3] 吕婷婷,吴娇娇. 板蓝根颗粒霉菌和酵母菌总数不确定度评定[J]. 中国药物评价,2019,36(4):278 - 280.
[4] JJF 1059.1 - 2012,测量不确定度评定与表示[S].
[5] SN / T 4091 - 2015,食品微生物学测量不确定度评估指南[S].
[6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS - CL01 - G003:2019《测量不确定度的要求》[EB / OL]. (2019 - 04 - 09)[2021 - 10 - 08]. https: // www.cnas.org.cn / rkgf / sysrk / rkyyzz / 2020 / 12 / 904400.shtml.
[7] 陆　明,范国荣,汪　杨,等. 测量不确定度在药品检测领域的研究进展[J]. 中国药事,2013,27(5):485 - 492.
[8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS - CL01:2018《检测和校准实验室能力认可准则》[EB / OL]. (2018 - 03 - 01)[2021 - 10 - 08]. https: // www.cnas.org.cn / rkgf / sysrk / jbzz / 2019 / 02 / 895558.shtml.
[9] 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,2020:47 - 49.
[10] 吕婷婷,吴娇娇. 板蓝根颗粒霉菌和酵母菌总数不确定度评定[J]. 中国药物评价,2019,36(4):278 - 280.
[11] 王　娟,李兵兰,许　春,等. 中国药典 2010 年版和 2015 年版微生物计数检查法比较[J]. 中国药师,2017,20(9):1687 - 1689.
[12] 杨玲玲,李海芳. 食品菌落总数测定盲样考核结果不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(14):3780 - 3783.
[13] 姚丽芳,朱洪坤,李　蔚,等. 大肠菌群 MPN 计数法不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(1):193 - 199.

(收稿日期:2021 - 12 - 29;修回日期:2022 - 04 - 15)

原则[4]515-516及相关细菌内毒素检查文献[5-7]，采用0.01 mol/L盐酸溶液作为溶剂，研究甘精胰岛素对细菌内毒素的干扰情况，建立甘精胰岛素原料药的细菌内毒素检查方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ET-96型内毒素凝胶法测定仪（天大天发科技有限公司）；XS105DU型电子天平（德国Mettler Toledo公司）；HS-1300型净化工作台（苏净集团安泰公司）；MS3 Digital型旋涡混匀器（德国IKA公司）。

1.2 试药

甘精胰岛素原料药（合肥天麦生物科技发展有限公司，批号分别为B201901001，B201901002，B201901003）；鲎试剂（湛江博康海洋生物有限公司，批号为2103101；福州新北生化工业有限公司，批号为21080912；灵敏度均为0.25 EU/mL，规格均为0.1 mL/支）；细菌内毒素工作标准品（冻干品，中国食品药品检定研究院，批号为150601-202089，效价为每支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2002260，规格为每瓶50 mL）；盐酸（上海沃凯生物技术有限公司，批号为20171107，规格为每瓶500 mL）。

2 方法与结果

2.1 样品细菌内毒素检查限值确定

参照《美国药典（第43版）》《欧洲药典（第10版）》和《日本药局方（第17版）》，确定甘精胰岛素原料药细菌内毒素检查限值（L）为10 EU/mg。

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用水溶解，旋涡15 min，按2020年版《中国药典（四部）》通则1143项下方法进行灵敏度复核试验，结果见表1（+为凝胶形成且倒转不会变形或滑脱；-为凝胶未形成或凝胶形成但倒转会变形。下表同）。结果两个不同厂家的鲎试剂灵敏度均为0.5 λ～2.0 λ，符合规定。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 1 Results of the verification of TAL sensitivity

鲎试剂批号	标示灵敏度（λ，EU/mL）	内毒素浓度（EU/mL）				阴性对照	实测灵敏度（λ_c，EU/mL）
		0.5	0.25	0.125	0.06		
2103101	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25
21080912	0.25	++++	++++	----	----	--	0.25

2.3 干扰试验预试验

目前市售鲎试剂λ多为0.5～0.03 EU/mL，依据公式$C=\lambda/L$，则甘精胰岛素对应的最小有效稀释浓度分别为0.05，0.025，0.012 5，0.006，0.003 mg/mL。取样品（批号为B201901001）16.10 mg，精密称定，先加2.0 mL 0.01 mol/L盐酸溶液溶解，再加BET用水分别制成0.8，0.4，0.2，0.1，0.05 mg/mL的系列NPC溶液，稀释过程中无样品析出。同法制备上述系列溶液，分别加入2.2项下细菌内毒素标准溶液，使溶液均含2 λ（即0.5 EU/mL，下同）的内毒素，得系列PPC溶液。取系列NPC和PPC溶液各适量，分别与2批鲎试剂混匀后封口，在内毒素凝胶法测定仪中37 ℃保温60 min。每个浓度平行2管，同时设阴性对照（NC）和阳性对照（PC）。干扰试验预试验结果见表2。结果表明，样品在0.4 mg/mL及以下质量浓度可能不干扰鲎试剂和细菌内毒素的凝集反应。

表2 干扰试验预试验结果

Tab. 2 Results of the preliminary interference test

鲎试剂	样品	组别	样品稀释浓度（mg/mL）					NC	PC
			0.8	0.4	0.2	0.1	0.05		
2103101	B201901001	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	++	++	++	++	--	++
21080912	B201901001	NPC	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	++	++	++	++	--	++

2.4 预先添加标准内毒素的细菌内毒素干扰试验

取细菌内毒素工作标准品20 EU加入16.13 mg样品中，加2.0 mL 0.01 mol/L盐酸溶液使溶解，加BET用水稀释至含内毒素2 λ的样品稀释液，按2.3项下方法制备0.4 mg/mL的样品稀释液，同法制成含内毒素λ、0.5 λ、0.25 λ的溶液，按2020年版《中国药典（四部）》通则1143项下细菌内毒素检查法中的凝胶法进行干扰试验，结果见表3（E_t为2 λ/供试品溶液反应终点浓度的几何平均值；E_s为2 λ/BET用水反应终点浓度的几何平均值。结果表明，0.01 mol/L盐酸溶液溶解样品未使预先添加的细菌内毒素失去活性。

表3 预先添加标准内毒素的干扰试验结果

Tab. 3 Results of the interference test for added standard endotoxin in advance

鲎试剂	样品	内毒素浓度（EU/mL）					E_s（EU/mL）	E_t（EU/mL）
		0.5	0.25	0.125	0.06	NC/NPC		
2103101	B201901001	++++	----	----	----	--		0.5
	BET用水	++	++	--	----	--	0.25	
21080912	B201901001	++++	----	----	----	--		0.5
	BET用水	++	++	--	--	--	0.25	

2.5 正式试验

分别取批号为B201901001，B201901002，B201901003的样品16.04，16.17，16.16 mg，精密称定，分别加2.0 mL 0.01 mol/L盐酸溶液使溶解，再用BET用水稀释制成0.4 mg/mL的供试品溶液，按凝胶法进行干扰试验，结果见表4。结果表明，采用灵敏度为0.25 EU/mL的2个不同厂家生产的鲎试剂，E_s及E_t均为0.5 λ～2.0 λ。表明样品稀释制成0.4 mg/mL后对细菌内毒素检查无干扰作用。

表4 正式干扰试验结果

Tab. 4 Results of the formal interference test

鲎试剂	样品	内毒素浓度(EU/mL)					E_S	E_I
		0.5	0.25	0.125	0.06	NC	(EU/mL)	(EU/mL)
2103101	B201901001	++++	----	----	----	--		0.5
	B201901002	++++	----	----	----	--		0.5
	B201901003	++++	----	----	----	--		0.5
	BET用水	++	++	--	--	--	0.25	
21080912	B201901001	++++	++++	----	----	--		0.25
	B201901002	++++	++++	----	----	--		0.25
	B201901003	++++	++++	----	----	--		0.25
	BET用水	++	++	--	--	--	0.25	

2.6 质量标准建立

取样品适量，加0.01 mol/L盐酸溶液溶解制成每1 mL中含8 mg的溶液，按2020年版《中国药典(四部)》通则1143项检查，每1 mg样品中含内毒素的量应小于10 EU。

2.7 样品细菌内毒素检查

根据2.5项下干扰试验结果，分别取上述0.4 mg/mL供试品溶液，用2批鲎试剂按上述质量标准和凝胶法进行试验，结果见表5。结果表明，3批样品中的细菌内毒素限量均符合本研究拟订的质量标准。

表5 细菌内毒素检查结果

Tab. 5 Results of the BET

鲎试剂	样品	NPC	PPC	PC	NC
2103101	B201901001	--	++	++	--
	B201901002	--	++	++	--
	B201901003	--	++	++	--
21080912	B201901001	--	++	++	--
	B201901002	--	++	++	--
	B201901003	--	++	++	--

3 讨论

目前《中国药典》细菌内毒素检查为鲎试剂法，相较于家兔热原检查法，该方法具有检测速度快、结果精准等优点[8-16]。2020年版《中国药典(四部)》通则1143细菌内毒素检查法收录了凝胶法和光度测定法，均可用于样品细菌内毒素检查，但当检测结果有争议时，多以前者试验结果为准[4]。故本研究中采用凝胶法建立甘精胰岛素原料药的细菌内毒素检查法。

甘精胰岛素原料药难溶于水，在酸性条件下溶解度较好。若直接加水制成混悬液对样品进行细菌内毒素检查可能会导致检测结果不准确甚至出现假阴性结果。故考虑先用稀盐酸溶液溶解样品，再以BET用水稀释进行试验。为确保所选择的处理方法能有效排除干扰且不会使内毒素失活，须使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验[4]。为确认溶剂不会使样品中的细菌内毒素失活，进行了预先添加标准内毒素的细菌内毒素干扰试验，结果表明采用0.01 mol/L盐酸溶液溶解样品，对样品的细菌内毒素检查结果无影响。

干扰预试验可用来评估甘精胰岛素对鲎试剂与内毒素凝集反应的干扰程度，初步筛查出不干扰细菌内毒素检查的供试品溶液浓度范围。正式干扰试验是进一步确认干扰预试验初筛出的无干扰供试品溶液质量浓度。由于不同厂家鲎试剂的生产工艺和质量参数存在差异，抗干扰能力可能有所不同，故本试验中采用2个厂家鲎试剂进行试验。本研究中，甘精胰岛素细菌内毒素检查的最大不干扰质量浓度为0.4 mg/mL，故可以选择市售任意灵敏度鲎试剂对甘精胰岛素进行细菌内毒素检查。

综上所述，本研究建立的方法可用于甘精胰岛素原料药的细菌内毒素检查，并可为采用稀盐酸作为溶剂的细菌内毒素检查方法的建立提供参考。

参考文献

[1] 戈梦佳，刘婉婷，孙忠实. 胰岛素百年发展历程[J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21(9)：1148-1152.
[2] 刘 宇，叶吉明，冉忠梅，等. 甘精胰岛素临床的应用[J]. 中国误诊学杂志，2006，23(5)：825-827.
[3] 纪立农. 探寻超重或肥胖2型糖尿病患者基础胰岛素起始剂量——来自甘精胰岛素临床试验的启示[J]. 中国糖尿病杂志，2021，29(11)：875-876.
[4] 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.
[5] 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.
[6] 黄 婧，白玲玲，王 婷，等. 醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业，2021，30(7)：55-57.
[7] 陈 晨，裴宇盛，杜 颖，等. 长春西汀原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药业，2021，30(22)：78-81.
[8] 晏成倩，黄梅梅，王红平，等. 一种难溶性原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师，2018，21(2)：365-368.
[9] 贾首前，呼延婷婷，焦 洁，等. 依达拉奉细菌内毒素检查法的研究[J]. 中国药品标准，2019，20(3)：251-254.
[10] 何 燕，陈 炜，罗 峰. 一种原料药的细菌内毒素检查法可行性研究[J]. 中国药品标准，2019，20(5)：427-432.
[11] 赵武群，赵云蓝，付 强. 二氯甲烷萃取法检测帕莫酸多奈哌齐中细菌内毒素[J]. 中国药业，2021，30(3)：45-49.
[12] 许雷鸣，武 谷，堵伟锋，等. 丁酸氯维地平的细菌内毒素检查法[J]. 中国现代应用药学，2013，30(9)：1004-1008.
[13] 钱明明，刘益庆. 动态浊度法检测复方蒲公英注射液中细菌内毒素[J]. 中国药业，2021，30(4)：53-55.
[14] 张 璞. 硼替佐米原料药细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国药业，2021，30(24)：81-83.
[15] 范治云，刘 瑞，赵 岩，等. 碘克沙醇注射液细菌内毒素检查法质量标准修订建议[J]. 中国药业，2021，30(22)：82-84.
[16] 刘 洋，王 瑶，孟长虹，等. 注射用醋酸奥曲肽微球细菌内毒素检查法研究[J]. 中国新药杂志，2021，30(14)：1340-1344.

(收稿日期：2022-01-04；修回日期：2022-03-17)