doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.24.021

硼替佐米原料药细菌内毒素检查方法研究*

张 璞

（重庆市食品药品检验检测研究院，重庆 401121）

摘要：目的 建立硼替佐米原料药细菌内毒素的检查方法。**方法** 按 2020 年版《中国药典（四部）》通则 1143 细菌内毒素凝胶检查法建立硼替佐米原料药细菌内毒素的检查方法，并进行方法学验证。**结果** 硼替佐米原料药的细菌内毒素限值可设定为 16 EU/mg。将硼替佐米原料药的质量浓度稀释至 0.003 90 mg/mL，使用灵敏度为 0.06 EU/mL 的鲎试剂，对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰。**结论** 所建立的方法可用于硼替佐米的细菌内毒素检查。

关键词：硼替佐米；细菌内毒素；鲎试剂；干扰试验；难溶性原料药

中图分类号：R917 **文献标志码：**A **文章编号：**1006－4931(2021)24－0081－03

Methods for Bacterial Endotoxin Test of Bortezomib

ZHANG Pu

（*Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121*）

Abstract: Objective To establishment a method for bacterial endotoxin test (BET) of bortezomib. **Methods** According the gel－clot technique in bacterial endotoxin test in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume Ⅳ) general chapters 1143, the method for bacterial endotoxin test of bortezomib active pharmaceutical ingredients(API) was established and the methodology validation was conducted. **Results** The bacterial endotoxin limit of bortezomib API could be set as 16 EU/mg. There was no interference in reaction between tachypleus amebocyte lysate and bacterial endotoxin when the mass concentration of bortezomib API was diluted to 0.003 90 mg/mL, and tachypleus amebocyte lysate with sensitivity of 0.06 EU/mL was used. **Conclusion** The established method can be used for the bacterial endotoxin test of bortezomib.

Key words: bortezomib; bacterial endotoxin; tachypleus amebocyte lysate; interference test; insoluble active pharmaceutical ingredients

硼替佐米为首个用于治疗多发性骨髓瘤的蛋白酶抑制剂[1]。硼替佐米作为无菌制剂的非无菌原料药，在 *N*，*N*－二甲基甲酰胺、甲醇中易溶，在水中几乎不溶。本研究中按 2020 年版《中国药典（四部）》通则 1143 细菌内毒素检查法[2]和《中国药品检验标准操作规范（2010 年版）》[3]，对硼替佐米原料药细菌内毒素的检查方法进行研究，为其他难溶性原料药细菌内毒素检查法的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TAL－40D 型试管恒温仪（湛江安度斯生物有限公司）；XPE205 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；VG3 S25 型涡旋混匀器（德国 IKA 公司）；SW－CJ－2FD 型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）。

1.2 试药

硼替佐米原料药（某企业，批号分别以Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ指代）。鲎试剂（湛江安度斯生物有限公司，批号为 1910283，灵敏度为 0.25 EU/mL，规格为每支 0.1 mL；批号为 1910143，灵敏度为 0.06 EU/mL，规格为每支 0.1 mL。福州新北生化工业有限公司，批号为 19120812，灵敏度为 0.25 EU/mL，规格为每支 0.1 mL；批号为 19081612，灵敏度为 0.125 EU/mL，规格为每支 0.1 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 150601－202088，规格为每支 60 EU）；Tris 缓冲液（批号为 2005190，规格为每支 4 mL），细菌内毒素检查（BET）用水（批号为 2010100，规格为每支 5 mL），均购自湛江安度斯生物有限公司；福州新北生化工业有限公司（批号为 19110105，规格为每支 5 mL）；甲醇为色谱级。

2 方法与结果

2.1 供试品细菌内毒素限值（*L*）的确定

美国药典论坛 42(6) InProcess Revision Bortezomib 制订的细菌内毒素限值（*L*）为应小于 16 EU/mg；注射用硼替佐米成人单药治疗推荐剂量为单次 1.3 mg/m^2，根据 2020 年版《中国药典（四部）》规定，$L = K/M$ = [5 EU/(kg·h)]/[1.3 mg/m^2 × 1.62 m^2 ÷ (60 kg·h)] = 142 EU/mg，其中 *K* 为机体每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量，*M* 为用每千克体质量每小时的最

*基金项目：重庆市科研机构绩效激励引导专项[cstc2019jxjl130040]。

第一作者：张璞，女，硕士，主管药师，研究方向为药物分析及药理毒理学，（电话）023－86072759（电子信箱）278783995@qq.com。

大供试品剂量，故原研药将L定为应小于25 EU/mg。综合考虑，将硼替佐米原料药细菌内毒素的 L 确定为16 EU/mg。

2.2 鲎试剂灵敏度复核试验

按2020年版《中国药典（四部）》通则1143细菌内毒素凝胶检查法的相关技术要求，选用标示灵敏度为0.25，0.06 EU/mL的鲎试剂，以BET用水为阴性对照（NC）进行灵敏度复核试验。2个厂家4批次鲎试剂的灵敏度实测值（λ_c）均在0.5 λ～2.0 λ范围内，符合规定，结果见表1。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab. 1 Sensitivity checking results of tachypleus amebocyte lysate

批号	内毒素灵敏度(EU/mL)							λ	λ_c
	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	NC	(EU/mL)	(EU/mL)
1910283	++++	++++	+---	----			--	0.25	0.21
19120812	++++	++++	----	----			--	0.25	0.25
1910143			++++	++++	----	----	--	0.06	0.06
19081612			++++	+-++	----	----	--	0.06	0.07

注：+为阳性反应，–为阴性反应。下表同。

Note: + is the positive reaction, and – is the negative reaction, as well as the following tables.

2.3 干扰预试验

凝胶法市售鲎试剂的 λ 为0.03～0.5 EU/mL，L 为16EU/mg，按最小有效稀释浓度（MVD）= λ/L 计算，得供试品有效稀释质量浓度为0.002 00～0.031 25 mg/mL。选取2个不同生产厂家标示灵敏度为0.25 EU/mL的鲎试剂进行干扰预试验。取3批样品，加甲醇溶解，制成质量浓度为12.5 mg/mL的供试品溶液，用Tris缓冲液稀释至3.125 mg/mL，再加BET用水稀释，分别制得质量浓度为0.031 25，0.015 62，0.007 80，0.003 90，0.002 00 mg/mL的系列阴性对照（NPC）溶液；同法操作配制一组含2 λ细菌内毒素的系列阳性对照（PPC）溶液；以含2 λ即0.50 EU/mL的细菌内毒素溶液为阳性对照（PC），以BET用水为阴性对照（NC）。各平行制作2管，每管加样后混匀，在（37±1）℃的试管恒温仪中保温（60±2）min。试验结果见表2。据此初步判断，供试品溶液质量浓度在0.003 90 mg/mL时对不同厂家的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰。

2.4 正式干扰试验

根据干扰预试验结果，取样品适量，加甲醇制成质量浓度为12.5 mg/mL的供试品溶液，再依次用Tris缓冲液、BET用水稀释，得质量浓度为0.003 9 mg/mL的溶液A。将细菌内毒素工作标准品用BET用水稀释至0.125，0.060，0.030，0.015 EU/mL，即得内毒素工作标准品系列溶液；用溶液A将细菌内毒素工作标准品稀释至0.125，0.060，0.030，0.015 EU/mL，作为供试品A；

表2 硼替佐米干扰预试验结果

Tab. 2 The pre – interference test results of bortezomib

鲎试剂	供试品	系列	供试品灵敏度						
批号	批号	溶液	0.031 25	0.015 62	0.007 8	0.003 9	0.002 0	NC	PC
1910283	Ⅰ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/++	--/++	--/++	--	++
	Ⅱ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/++	--/++	--/++		
	Ⅲ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/++	--/++	--/++		
19120812	Ⅰ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/--	--/++	--/++	--	++
	Ⅱ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/--	--/++	--/++		
	Ⅲ	NPC/PPC	--/--	--/--	--/--	--/++	--/++		

表3 硼替佐米正式干扰试验结果

Tab. 3 The interference test results of bortezomib

鲎试剂	供试品	内毒素灵敏度(mg/mL)					E_s	E_t
批号	批号	0.125	0.06	0.03	0.015	NC	(EU/mL)	(EU/mL)
1910143	NC	++++	++++	----	----	--	0.06	
	Ⅰ	++++	++++	+---	----	--		0.06
	Ⅱ	++++	++++	----	----	--		0.06
	Ⅲ	++++	++++	----	----	--		0.06
19081612	NC	++++	++-+	----	----	--	0.07	
	Ⅰ	++++	++++	----	----	--		0.06
	Ⅱ	++++	+++-	----	----	--		0.07
	Ⅲ	++++	+++-	----	----	--		0.07

表4 硼替佐米细菌内毒素检查结果

Tab. 4 The bacterial endotoxin test results of bortezomib

鲎试剂批号	供试品批号	NPC	PPC	PC	NC	结果
1910143	Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ	--/--/--	++/++/++	++	--	符合规定
19081612	Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ	--/--/--	++/++/++	++	--	符合规定

每个浓度均平行4管。以BET用水作NC，平行2管。通过试验结果计算出细菌内毒素工作标准品系列溶液的内毒素反应终点浓度（E_s）和供试品A内毒素反应终点浓度（E_t）。结果见表3。可见，E_s 及 E_t 均在0.5 λ～2.0 λ范围内，表明供试品溶液质量浓度为0.003 9 mg/mL时，对2个厂家的鲎试剂与细菌内毒素的反应均无明显干扰。

2.5 细菌内毒素检查

取3批次样品各适量，按2.2项下0.003 90 mg/mL NPC溶液的试验方法，同时按药典要求设立PPC管、NC管和PC管。取2个厂家灵敏度为0.06 EU/mL的鲎试剂进行检查。结果见表4。可见，3批次样品中细菌内毒素含量均符合规定。

3 讨论

鲎试剂与内毒素的反应需在水溶液中进行，难溶性药物可根据自身的溶解性选择合适的溶剂如二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、二氯甲烷等[4-7]进行溶解，然后进行细菌内毒素检查。硼替佐米在水中几乎不溶[8]，且高浓度的硼替佐米溶液对鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应