

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

陈卫¹, 陈莉¹, 刘小艳², 杜鹏飞², 季文君¹, 程继业¹, 戴国英¹, 陶渊达¹

(1. 苏州市药品检验检测研究中心, 苏州 215104;

2. 苏州海特比奥生物技术有限公司, 苏州 215421)

摘要 目的:建立纳米胶束载体聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物细菌内毒素动态显色定量方法。**方法:**按照《中华人民共和国药典》2015年版四部的要求,用细菌内毒素检查用水稀释细菌内毒素标准品或供试品,制备标准品或供试品系列溶液,并以内毒素检查用水作为阴性对照,分别与动态显色试剂反应,采用酶标仪自动记录各溶液吸光度,绘制标准曲线并计算各溶液中内毒素的含量。通过标准曲线的可靠性实验,供试品的干扰实验以及方法的精密性和准确性验证实验,建立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的定量方法,并对该方法进行初步应用。**结果:**标准曲线可靠性验证中,得到标准曲线回归方程为 $\lg T = -0.27 \lg C + 5.98$, $r > 0.999$, 干扰实验中,供试品用水浓度 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (稀释 40 倍) 时对内毒素(终浓度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的干扰作用较小,回收率接近 100%。标准曲线各浓度点测量结果的变异系数均 $< 7\%$, 加入各浓度的内毒素标准品的测定结果的变异系数均 $< 5\%$, 回收率在 94% ~ 112% 之间,检测供试品 3 批,内毒素含量结果均小于限值,阳性回收率在 97% ~ 105% 之间。**结论:**本法可用于定量检测 mPEG-PLA 中的细菌内毒素。

关键词:动态显色法;纳米胶束载体聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物;细菌内毒素;定量

中图分类号:R 921.2

文献标识码:A

文章编号:1009-3656(2019)-2-0000-0

doi:10.19778/j. chp. 2019. 03. 00?

Determination of bacterial endotoxin in mPEG-PLA polymeric micelles by kinetic chromogenic method

CHEN Wei¹, CHEN Li¹, LIU Xiaoyan², DU Pengfei², JI Wenjun¹, CHENG Jiye¹,
DAI Guoying¹, TAO Yuanda¹

(1. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215104, China;

2. Suzhou Hightechbio Biotechnology Co., Ltd., Suzhou 215421, China)

Abstract Objective: To establish the kinetic chromogenic quantitative method of bacteria endotoxin in mPEG-PLA polymeric micelles. **Methods:** According to general notice in Chinese Pharmacopoeia 2015 Volume IV, the bacterial endotoxin standards and test samples were diluted with water for bacterial endotoxin test to prepare the standard endotoxin solutions and test solutions, and water for bacterial endotoxin test was used as negative control solution. The endotoxin was reacted with kinetic chromogenic TAL reagent, then the absorbance of each solution was automatically recorded. The standard curve was established for calculation of endotoxin. The quantitative method of bacteria endotoxin in mPEG-PLA polymeric micelles was established after reliability test of standard curve, interference test of test samples, precision and accuracy verification of the method. Then the established method was pre-

第一作者简介:陈卫,副主任药师,研究方向:药物分析及药品检验。Tel:0512-67079921 E-mail:flone@163.com

liminarily applied. **Results:** Theregression equation of standard curve was $\lg T = -0.27 \lg C + 5.98$ with $r > 0.999$. The test sample had less interference on test of endotoxin ($0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$) after diluted to $0.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (40 times dilution), and the recovery rates of endotoxin approached to 100%. The coefficients of variation of test concentrations in the standard curve were less than 7%, and those of test samples added with standard endotoxin were less than 5%, and the recovery rates were between 94% and 112%. The endotoxin results of three batches of samples were all less than the limit and the recovery rates of the test samples were between 97% and 105%. **Conclusion:** The established method can be applicable to the quantitative determination of endotoxin in mPEG-PLA polymeric micelles.

Key words: kinetic chromogenic method; mPEG-PLA polymeric micelles; bacteria endotoxin; quantitation

近年来,针对难溶性药物的纳米载药技术已经受到了越来越多的关注^[1]。其中,由双亲嵌段共聚物在水溶液中自组装形成的纳米胶束载体系统,凭借其优越的安全性和可控性已经成为一种新型的具有巨大应用前景的药物载体^[2]。聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段聚合物便是其中一种,具有核-壳状结构,其中核为疏水性部分,壳为亲水性部分,通过将难溶性药物包裹于部分以达到对难溶性药物的增溶的作用,同时作为生物可降解材料,其在人体内最终降解为二氧化碳和水,安全性高^[3]。一定分子量的聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物可以形成胶束,这些胶束与某些原料药制备成药物剂型后,具有缓释、靶向、安全、易吸收和副作用小的优点,可以广泛应用于各种药物剂型,应用类似结构辅料的新型紫杉醇注射剂紫杉醇 Genexol-PM 因其高效低毒的特点已经在韩国上市,并正在美国申请上市^[4]。

但是正是由于其对难溶性药物较好的增溶作用,也意味着其也能增加内毒素的溶解度,所以在质量控制中的细菌内毒素的检测与控制就显得尤为重要。而细菌内毒素又是目前最普遍和最主要的外源性致热原,对人体危害较大,达到一定量时可引起机体发热、心动过速、甚至休克^[5],因此在该载体应用于药物制剂进入临床之前,必须建立相应的内毒素检查方法,对内毒素的进行控制。

目前所使用的内毒素检查法多为凝胶限值法,但其是一种限值测定方法,无法给出准确的含量,而为了更好地满足药品检查和生产过程质控的严格要求,内毒素检测已逐渐向定量方向发展^[6]。动态显色法(Kinetic Chromogenic Assay, KCA)就是内毒素定量测定方法中常用的一种,具有批量大^[7]、灵敏度高等优点,一般可在 $0.005 \sim 50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内进行定量检测,能更详细地反映药品的质量^[8]。因此,本研究参照《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015年版细菌内毒素检查法进行试

验,采用动态显色法检测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含量,并对方法进行验证及初步应用,建立合适的内毒素测定方法,也为后期应用该载体制备给药系统的制剂建立合适的内毒素定量方法提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器

Biotek Elx808 酶标仪,美国 Biotek 公司。

1.2 试药

聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物(0.2 g/瓶,批号:20140820,20140901,20180328,苏州海特比奥生物技术有限公司);细菌内毒素工作标准品,批号 150601-201581 规格 80 EU/支,湛江安度斯生物有限公司;动态显色法鲎试剂,批号 110604 规格 1.25mL/支,标示灵敏度 $0.005 \sim 50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,湛江安度斯生物有限公司;细菌内毒素检查用水 BET 水,批号 1701170,规格 5 mL,湛江安度斯生物有限公司。

1.3 细菌内毒素限值的确定

聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物内毒素的限值为 $0.02 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,该限值参照已在国外上市的紫杉醇注射剂中结构类似的药物辅料的内毒素限值(未公开)。另外与《中国药典》2015年版二部中收录的紫杉醇注射液的内毒素限值相比,紫杉醇注射液内毒素限值度 $0.4 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,该载体辅料的内毒素限值为紫杉醇注射液内毒素限值的 1/20,该限值可满足内毒素控制的需求。试验中聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物规格为 0.2 g/瓶,其限值可表示为 $4 \text{ EU} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 。

1.4 标准曲线的可靠性验证

取细菌内毒素工作标准品 1 支(80 EU)加入 0.8 mL BET 水复溶,浓度为 $100 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,将 $10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准品用 BET 水稀释为 1.25、

0.25、0.05、0.01 EU · mL⁻¹ 的标准内毒素系列溶液。取无热原微孔板,每孔加入 100 μL 的 BET 水作为阴性对照和各浓度标准液,标准品为平行 3 个复孔,再加入 100 μL 的动态显色试剂并混匀,放入酶标仪中于 37 °C 孵育 60 min 每隔 30 s 检测样品在 405 nm 的吸光度。

1.5 最大有效稀释倍数的计算

聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物胶束的配置方法为:固体粉末用水溶解后可形成胶束,固体粉末规格为 0.2 g/瓶,限值为 0.02 EU · mg⁻¹,最大有效稀释倍数 (Maximum valid dilution, MVD) 为根据 $MVD = cL/\lambda$, C 为供试品浓度,在本实验中所用供试品浓度为 25 mg · mL⁻¹, L 为限值, λ 为标准曲线的最低浓度 0.01 EU · mL⁻¹, 则 $MVD = 50$ 倍 (0.5 mg · mL⁻¹)。

1.6 供试品干扰实验

根据 MVD 的结果,取批号为 20180328 的注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物样品 1 瓶 (0.2 g),用内毒素检查用水 8 mL 溶解 (25 mg · mL⁻¹),用 BET 水依次稀释成 5 倍 (5 mg · mL⁻¹)、10 倍 (2.5 mg · mL⁻¹)、15 倍 (1.67 mg · mL⁻¹)、20 倍 (1.25 mg · mL⁻¹) 4 个梯度,作为供试品溶液,以制备最终稀释倍数分别为 10 倍 (2.5 mg · mL⁻¹)、20 倍 (1.25 mg · mL⁻¹)、30 倍 (0.83 mg · mL⁻¹)、40 倍 (0.625 mg · mL⁻¹) 的供试品回收溶液,选择 0.25 EU · mL⁻¹ 作为靠近曲线中点的内毒素浓度 λ_m ,将 2 倍于对应稀释浓度的供试品稀释液与 0.5 EU · mL⁻¹ 的内毒素标准液 1:1 稀释,制备内毒素终浓度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的供试品回收溶液,阴性对照和供试品和供试品回收溶液均做 2 个平行复孔,置酶标仪中孵育并检测,按当次回归所得的标准曲线计算细菌内毒素的含量和回收率。

1.7 准确性验证

在终浓度为 0.625 mg · mL⁻¹ 的供试品中加入内毒素标准品,使其终浓度分别为 1.25、0.25、0.50、0.01 EU · mL⁻¹ 的标准内毒素,测定 2 个复孔,同时按上文“1.4”项下方法测定标准曲线,采用当次回归得到的标准曲线计算回收率。

1.8 精密性验证

用建立的方法的检测标准内毒素的各个浓度 (1.25、0.25、0.50、0.01 EU · mL⁻¹),每个浓度重复检测 3 次,计算变异系数 (Coefficient of Variation, CV);在供试品中加入内毒素标准品,使其终浓度分别为 1.25、0.25、0.50、0.01 EU · mL⁻¹ 的标准内毒

素,测定 2 个复孔,同时按“1.4”项下标准曲线浓度测定标准曲线,测定 3 次,采用当次回归得到的标准曲线计算结果,并计算 3 次结果间的 CV。

1.9 方法的初步应用

细菌内毒素标准品按“1.4”项下方法制备细菌内毒素标准系列溶液;3 批次注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物样品按“1.6”项下方法制备供试品溶液,并制备含标准内毒素的供试品溶液 (添加的标准内毒素终浓度为 0.25 EU · mL⁻¹),供试品用细菌内毒素检查用水依次稀释至不超过供试品的 MVD,每个浓度设 2 个平行孔;另取 2 孔加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水作为阴性对照;再向上述各孔中分别加入 0.1 mL 动态显色试剂,混匀后放入酶标仪进行检测,经酶标仪的 Gen 软件处理数据,并自动计算出供试品的内毒素含量检测结果以及对应的回收率。

2 结果

2.1 标准曲线的可靠性验证

以反应时间的对数 $\lg T$ 为纵坐标 (T 为到达反应终点所需的时间,单位为毫秒),内毒素浓度的对数 $\lg C$ 为横坐标 (C 为内毒素的浓度,单位为 EU · mL⁻¹),绘制标准曲线线性回归方程, $\lg T = -0.256 \lg C + 5.84$, $r = 0.999$,标准曲线的线性较好 (见图 1),且阴性对照的反应时间大于标准曲线最低内毒素浓度 0.01 EU · mL⁻¹ 的反应时间,各平行孔的 CV 均小于 10%,标准曲线成立。

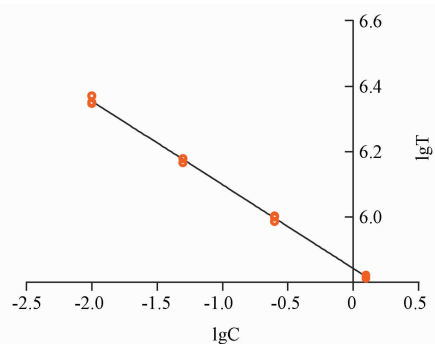


图 1 动态显色法标准曲线可靠性验证的标准曲线

Fig. 1 Reliability of standard curve of KCA

2.2 干扰试验

根据标准曲线计算不同稀释倍数样品的内毒素的含量及回收率。标准曲线回归方程为 $\lg T = -0.271 \lg C + 5.98$ $r = 0.999$

计算结果的如表 1 结果显示,在动态显色法中,供试品浓度为 0.83 和 0.625 mg · mL⁻¹ (稀释 30 倍和 40 倍)时,其回收率平均值分别为 82% 和

99%,在 50% ~ 200% 范围内,且接近 100%,对检测结果干扰较小,因此采用 40 倍稀释液进行检验。

表 1 动态显色法供试品干扰试验结果

Tab. 1 The interference test results of the samples for KCA

样品浓度 (sample concentration)/ (mg · mL ⁻¹)	稀释倍数 (dilution times)	内毒素浓度 (endotoxin concentration)/ (EU · mL ⁻¹)	结果 (result) (EU · mL ⁻¹)	回收率 (recovery rate)/ %	平均回收率 (the average recovery rate)/%
2.5	10	0.25	0.112	45	49.
		0.25	0.132	53	
1.25	20	0.25	0.162	65	69
		0.25	0.181	72	
0.83	30	0.25	0.194	78	82
		0.25	0.217	87	
0.625	40	0.25	0.230	92	99
		0.25	0.264	105	

2.3 方法的准确性

本次检测的标准曲线回归方程为:

$$\lg T = -0.298 \lg C + 5.93 \quad r = 0.999$$

检测结果显示,含有内毒素终浓度为 1.25、

0.25、0.50、0.01 EU · mL⁻¹ 的注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物供试品的回收率在 94% ~ 112% 之间,见表 2,表明该方法准确性较好。

表 2 动态显色法检测供试品内毒素含量的准确性

Tab. 2 The accuracy of KCA for endotoxin test in test samples

内毒素浓度 (endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)	结果 (result)/(EU · mL ⁻¹)	回收率 (recovery rate)/%	平均回收率 (the average recovery rate)/%
1.25	1.233	99	101
	1.276	102	
0.25	0.234	94	94
	0.234	94	
0.05	0.055	110	112
	0.057	113	
0.01	0.010	92	97
	0.011	101	

2.4 方法的精密性

检测结果显示,4 个浓度的标准内毒素检测结果的变异系数 CV 值均 < 7%,见表 3;加入各浓度内毒素标准品的注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物供试品检测结果的 CV 值均 < 5%,见表 4。表明该方法精密性较好。

2.5 方法的初步应用

采用动态显色法对 3 批注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物进行内毒素检测,均未检出内毒

素,见表 5,结果符合规定。

3 讨论

聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物是一种新型的纳米聚合物胶束,具有对小分子难溶性药物的增溶作用,但同时也容易增加内毒素的溶解度,需要对内毒素含量进行准确的控制,以满足质量控制的要求,因此就需要建立内毒素的定量方法。

表3 动态显色法检测内毒素标准品的精密性

Tab.3 The precision of KCA for standard endotoxin solution test

内毒素浓度 (endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)	结果(result)/(EU · mL ⁻¹)			CV/ %
	1次(time)	2次(time)	3次(time)	
1.25	1.278	1.310	1.258	1.68
0.25	0.232	0.241	0.256	5.01
0.05	0.055	0.048	0.052	6.80
0.01	0.010	0.011	0.010	5.00
标准曲线回归方程(Standard curve regression equation)	lgT = -0.289lgC + 5.98	lgT = -0.282lgC + 5.95	lgT = -0.288lgC + 5.94	
r	0.998	0.998	0.999	

表4 动态显色法检测供试品内毒素含量的精密性

Tab.4 The precision of KCA for endotoxin testin test samples

供试品中添加的内毒素标准品浓度 (standard endotoxin concentration in the sample)/(EU · mL ⁻¹)	结果 (result)/(EU · mL ⁻¹ , n = 3, $\bar{x} \pm s$)	CV/ %
1.25	1.237 ± 0.030	2.46
0.25	0.242 ± 0.009	3.52
0.05	0.054 ± 0.002	2.75
0.01	0.105 ± 0.001	4.76

表5 动态显色法检测3批次注射用聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物细菌内毒素含量的结果

Tab.5 The test results of endotoxin in 3 batches of mPEG-PLA polymeric micelles samples by KCA

批号 (batch No.)	稀释倍数 (dilution times)	回收率 (recovery rate)/%	CV/ %	测定值 (measured)/(EU · mL ⁻¹)
20140820	40	105	2.18	<0.01
20140901	40	102	4.81	<0.01
20180328	40	97	3.16	<0.01

根据预实验结果,纳米聚合物胶束具有一定的浊度,综合考虑了检测方法对浊度的抗干扰能力,以及检测灵敏度,因此本实验优先采用了对浊度的抗干扰能力较强并且检测灵敏度较高的动态显色法进行方法的开发。根据产品的质控信息及研发材料提供的信息显示该载体分子量与内毒素分子量大小接近^[3],甚至小于内毒素分子量,故不能较好的包裹分子量较大的内毒素,所以本文采用了水溶液直接提取供试品中的内毒素。

实验首先考察样品对细菌内毒素检查的干扰情况。干扰实验结果显示,高浓度样品溶液确实对动态显色法的测定存在干扰,但是干扰作用随着样品浓度的降低逐渐减小,在样品稀释至 0.625 mg · mL⁻¹时,其干扰作用几乎消失,加标回收率在 100% 左右,并且该样品的稀释倍数在最大有效稀释倍数范围内,确认了通过样品的稀释,可排除样品本身对检测的干扰,所以后续检测均采用此浓度作为

终浓度进行测定。本实验还参照国内外文献资料^[8-9]对动态显色法测定聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物的方法进行了验证,结果表明内毒素标准品浓度在 0.01 ~ 1.25 EU · mL⁻¹ 范围内,标准曲线线性关系良好, $r > 0.99$ 。样品中加入各浓度的内毒素标准品,检测结果的变异系数均 ≤ 10%,回收率在 50% ~ 200% 之间,表明该方法具有较好的精密性和准确性。在方法的初步应用中,将 3 批样品稀释至终浓度为 0.625 mg · mL⁻¹ 时进行检测,检查结果均小于限值,结果均符合规定。

综上所述,用动态显色法对聚乙二醇单甲醚聚乳酸嵌段共聚物中细菌内毒素含量进行控制是可行的。该方法相对于传统的内毒素凝胶检测法而言,具有灵敏度高,操作简便等优点,能更好地满足质控的要求。在后续的研究中,我们还将继续对该载体与内毒素的相互作用做进一步的探索,并采用不同的内毒素提取的方法对内毒素测定准确性的进行比

较和验证,对该载体与内毒素相互作用的方式进行表征,以期建立更加准确和可靠的内毒素测定方法,确保临床使用的安全性,为该新型纳米胶束载体将来临床应用的安全性提供技术保障。

参考文献

- [1] 金光明,金明姬,尹学哲,等. 聚合物纳米载药系统的研究现状[J]. 中国新药杂志, 2016,25(5):548
JIN GM, JIN MJ, YIN XZ, *et al.* Current status of polymer nanoparticles drug delivery system[J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25(5):548
- [2] 王九成,梁丹,梁国正. 聚乳酸类可生物降解型高分子材料在制备载药微球或微囊中的研究和应用[J]. 材料导报, 2008,22(10):95
WANG JC, LIAN D, LIANG GZ. Research and application of biodegradable polymer containing poly(lactic acid) in preparation of drug loaded microspheres or microcapsules[J]. *Mater Rev*, 2008, 22(10):95
- [3] 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]. 2016
Not publicizing the inventor. One polyethylene glycol monomethyl ether-poly(lactic acid) block copolymer and its preparation method: , CN 104761710 B[P]. 2016
- [4] 涂增清,李敬豪,周月广. PLA 嵌段 PEG 聚合物胶束载药系统的研究进展[J]. 广州化工, 2014(15):13
TU ZQ, LI JH, ZHOU YG. Progress of PLA block PEG copolymers micelles used in drug delivery system [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2014, (15):13
- [5] 孔雯雯,张明森,林秀菁,等. 动态显色法检测注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子中内毒素的含量[J] 中国当代医药, 2014,21(7):12
KONG WW, ZHANG MS, LIN XJ, *et al.* Content detection of the endotoxin in rhGM-CSF by kinetic chromogenic method[J]. *China Mod Med*, 2014, 21(7):12
- [6] 申应德,张新,李杰,等. 动态浊度法测定吡拉西坦氯化钠注射液细菌内毒素含量[J]. 中国药品标准,2016,17(1):41
SHEN YD, ZHANG X, LI J, *et al.* Determination of bacterial endotoxin in piracetam and sodium chloride injection by kinetic turbidimetry[J]. *Drug Stand China*, 2016, 17(1):41
- [7] 夏博,郭锋. 动态显色法定量测定加替沙星原料药中细菌内毒素含量[J]. 中国药物评价,2015,(5):273
XIA B, GUO F. Content determination of bacterial endotoxin in gatifloxacin by kinetic chromogenic analysis [J]. *Chin J Drug Evaluat*, 2015, (5):273
- [8] 邓杰,张珂,袁涛,等. 动态显色法检测白喉毒素突变体 CRM197 的细菌内毒素含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2013,26(12):1835
DENG J, ZHANG K, YUAN T, *et al.* Determination of bacterial endotoxin content of diphtheria toxin mutant CRM 197 by kinetic chromogen[J]. *Chin J Biol*, 2013, 26(12):1835
- [9] FINGOLA FF, ALBERTINO SRG, ABRANTES SDMP, *et al.* Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-biotoxic serum[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85:93
(收稿日期:2018-11-26)