

不同品种滴眼液细菌内毒素检查方法建立与风险分析

耿雪^{1,2}, 肖英¹, 周倩³, 祝清芬^{1*} (1.山东省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药一致性评价重点实验室, 山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心, 济南 250101; 2.山东中医药大学, 济南 250355; 3.山东省中医药研究院, 济南 250014)

摘要: 目的 研究建立各品种滴眼液中内毒素定量检测方法, 监测内毒素污染, 发现风险品种。方法 收集 17 家企业生产的 26 个滴眼液品种, 采用中国药典 2020 年版细菌内毒素检查光度法(动态浊度法)对供试品细菌内毒素含量进行定量检测。滴眼剂 pH 一般为 6.0~8.0, 符合细菌内毒素检查供试液 pH 要求标准, 不干扰凝胶反应, 无需调节可直接取供试品用 BET 水稀释。试验时一般选择 1:2 稀释倍数进行检测, 若存在干扰, 则选择供试品从原液 2 倍比稀释, 参照中国药典 2020 年版四部通则 1143 进行试验, 找到供试品最小不干扰稀释倍数, 并在此或更大稀释倍数下对其余批次供试品进行细菌内毒素检查。结果 建立了 26 种滴眼剂动态浊度法细菌内毒素检测方法, 根据临床用途和 USP 对眼用制剂的内毒素限值规定为依据筛选出 2 个风险品种; 发现 2 个品种细菌内毒素含量存在不同厂家间的显著差异。结论 对于风险品种和同品种不同厂家产品细菌内毒素含量存在显著差异时, 应对该品种或生产厂家予以关注。

关键词: 滴眼液; 细菌内毒素; 风险监测

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)11-1526-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221867

引用本文: 耿雪, 肖英, 周倩, 等. 不同品种滴眼液细菌内毒素检查方法建立与风险分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1526-1530.

Method Establishment and Risk Analysis of Bacterial Endotoxin Content for Different Eye drops

GENG Xue^{1,2}, XIAO Ying¹, ZHOU Qian³, ZHU Qingfen^{1*} (1.Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Consistency Evaluation of Generic Drugs, Jinan 250101, China; 2.Shandong Traditional Medicine University, Jinan 250355, China; 3.Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish quantitative detection methods for endotoxins in various types of eye drops, monitor endotoxin contamination, and identify high-risk varieties. **METHODS** A total of 26 eye drops produced by 17 companies were collected. The bacterial endotoxin content of the test samples was quantitatively detected using the dynamic turbidity method specified in the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia. The pH of the eye drops ranged from 6.0 to 8.0, meeting the pH requirements for bacterial endotoxin testing of test solutions and not interfering with gel reactions. Therefore, no adjustment was necessary and the test samples could be directly diluted with BET water. Generally, a dilution factor of 1:2 was used for testing. In the presence of interference, the test samples were diluted at a 2-fold dilution factor from the stock solution, and the experiment followed the guidelines specified in Part 1143 of the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia. The minimum dilution factor that did not interfere with the test sample was determined, and the remaining batches of test samples were tested for bacterial endotoxin using this dilution factor or a higher one. **RESULTS** A dynamic turbidity method for bacterial endotoxin detection in 26 eye drops was established. Two high-risk varieties were identified based on clinical use and the endotoxin limit specified in the USP for ophthalmic preparations. Significantly different bacterial endotoxin levels were found among different manufacturers of these two varieties. **CONCLUSION** When significant differences in bacterial endotoxin levels are observed among high-risk varieties or different manufacturers with the same variety, attention should be paid to the variety or manufacturer in question.

KEYWORDS: eye drops; bacterial endotoxin; risk monitoring

发热是临床最常见的药物不良反应之一, 根据国家和山东省提供的药品不良反应数据, 每年有大量的临床不良反应表现为发热、寒颤、畏寒等症状^[1]。发热反应最常见的原因是药品中污染了致热物质, 在 GMP 生产条件下, 一般认为, 药品

中致热物质主要是革兰氏阴性杆菌细胞膜上的脂多糖类物质, 即细菌内毒素^[2]。滴眼液生产采用了无菌生产工艺, 一般通过过滤方式去除了活体菌株, 但无法去除可能存在的内毒素, 从而极有可能使眼睛受到感染^[3]。尤其是当眼睛、角膜等存在

作者简介: 耿雪, 女, 博士, 主管药师
zhuqingfen73@163.com

E-mail: gengxue5927111@163.com

*通信作者: 祝清芬, 男, 博士, 主任药师 E-mail:

创伤面或者感染发炎时,滴眼液中含有的内毒素就会有进入人体血液的可能,进而诱发眼部一些炎症的发生或加重以及眼前节毒性反应。眼前节毒性反应综合征(toxic anterior segment syndrome, TASS)为炎症反应的一种,1992年 Monson 等首次提出,这是一种急性无菌性炎症反应^[4]。临床表现为视力下降、眼部红痛不适或无明显症状,裂隙灯显微镜检查可见弥漫性的角膜水肿、前房纤维渗出明显,甚至可见前房积脓。本病真正的病因不明,可能与眼内接触的药物或液体的成分、浓度等的变化引起的毒性反应有关。2003年,美国 Cytosol Laboratories 公司生产的平衡盐溶液曾被发现内毒素水平过高,而引起 TASS^[5]。基于 TASS 是一种眼内手术后定位于眼球前段的无菌炎症状态,2014年美国 FDA 发布指南要求对一次性使用眼内器械进行细菌内毒素的检查^[6]。

中国药典 2020 年版通则 0105 眼用制剂中描述“滴眼剂系指由原料药物与适宜辅料制成的供滴入眼内的无菌液体制剂”,要求进行无菌项目的检查^[7]。《药品 GMP 指南》“2.1”中指出“无菌制剂是指法定药品标准列有无菌检查项目的制剂”,明确将滴眼剂的生产纳入无菌药品管理的范畴,并提到“其质量保证的重点在于无菌保证、细菌内毒素和微粒污染的限制”^[8]。国际制药工程协会指南<无菌生产设施>^[9]设计规范要求对无菌生产设施内非活性(微粒)、活性(微生物)和内毒素污染进行控制以保障安全性。中国药典 2020 年版规定滴眼液进行无菌检测,使用抑菌剂的滴眼剂还应进行抑菌效力检查^[10]。目前,中国药典或局颁标准均无滴眼液细菌内毒素质量标准收载。而无菌检测仅局限于检查样本中存在的活体菌株,现有标准并未考虑死亡细菌释放出的内毒素污染风险。另有研究者发现一些主要成分系抗菌药物的滴眼液,即使被细菌污染,无菌检查仍为阴性,凝胶法细菌内毒素检查能检出阳性结果。所以,对滴眼液的细菌内毒素污染进行风险监测至关重要,有必要建立滴眼液中细菌内毒素检测方法,对滴眼液中细菌内毒素含量进行风险监测。本研究利用动态浊度法对多个厂家多个品种滴眼液产品进行细菌内毒素含量分析,首次建立了部分品种的细菌内毒素检查方法,并对这些产品的细菌内毒素风险进行了初步评估,将有利于加强风险监管,为中国滴眼液产品的质量控制提供技术支

撑,保障人民群众的用药安全。

1 仪器与试剂

PKF96 型细菌内毒素测定仪(ACC 公司);ZH-2 型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);试验用试管、刻度吸管等玻璃器材按规定清洗,250℃干烤 1 h 除去外源性内毒素。

细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,批号:150601-202088;规格:每支 60 EU);细菌内毒素检查用水(湛江安度斯生物有限公司)。动态浊度法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:2103261;可测内毒素范围 10~0.010 EU·mL⁻¹;规格:1.25 mL;有效期 2024/02)。

2 方法

2.1 细菌内毒素标准曲线的建立和可靠性分析

用 BET 水将细菌内毒素标准品进行稀释,使其最终细菌内毒素浓度分别为 2.0, 0.5, 0.125, 0.031 25 EU·mL⁻¹ 或 1.25, 0.25, 0.05, 0.01 EU·mL⁻¹, 各取 0.1 mL, 分别加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入细菌内毒素检测仪内进行检测,每一浓度重复 3 管,同时做阴性对照。以平均反应时间的对数(lgT)为纵坐标,内毒素浓度的对数(LgC)为横坐标,绘制标准曲线。相关系数 r 绝对值应>0.980,阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,细菌内毒素标准曲线成立。

2.2 供试品检测

根据标准曲线内毒素浓度的设置,选择 0.125 EU·mL⁻¹ 作为 λm , 取供试品,用 BET 水将供试品稀释制成一定浓度的供试品溶液(A 液),同时制备含上述供试品浓度并含内毒素浓度为 λm (0.125 EU·mL⁻¹) 的溶液(B 液),分别取上述各液 0.1 mL, 加到预先加有 0.1 mL 鲎试剂的反应管内,混合均匀,插入仪器内进行测定,每个浓度重复 2 管。测定结束后,按标准曲线回归方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素 λm 的供试品溶液的内毒素含量,并计算该试验条件下的回收率。回收率均在 50%~200%,符合要求。计算细菌内毒素含量。如回收率不符合规定,则调整稀释倍数重新进行测定。

3 结果

3.1 样品抽样总体情况

抽样 26 个品种,涉及企业 17 家(山东省内 5 家),实际抽样各品种信息见表 1。

表 1 细菌内毒素定量检测样品抽样情况

Tab. 1 Sampling situation of bacterial endotoxin quantitative detection samples

检品名称	批号	生产单位(代号)	检品名称	批号	生产单位(代号)
玻璃酸钠滴眼液	21050602	A	双氯芬酸钠滴眼液	2104251	I
	21050802	A		2102241E	F
	1B0432M05	D		14091101	S
	2130401	M	妥布霉素地塞米松滴眼液	1D0341M01	D
	HZ210302	N		1D0351M01	D
氟康唑滴眼液	200903	G		210608	L
复方硫酸软骨素滴眼液	21042501	A	硝酸毛果芸香碱滴眼液	21041101	A
	21042401	A		20111101	A
	21030301	A	溴芬酸钠滴眼液	2104193101 3	B
复方新斯的明牛磺酸滴眼液	21010602	A		2014203101 1	B
	21010702	A		1E0112M11	D
利巴韦林滴眼液	04210101	C		1D0101M10	D
	21051201	J	盐酸奥洛他定滴眼液	0G0012M21	D
硫酸软骨素滴眼液	20111201	A		0L0201M17	D
	2011023011	E	盐酸环丙沙星滴眼液	06200701	C
	2011013011	E		06210501	C
硫酸锌尿囊素滴眼液	21031501	A		06200701	C
	21030101	A	盐酸左氧氟沙星滴眼液	2104123101	B
氯化钠滴眼液	21042702	A		2104133101	B
	21030802	A		20080903	A
氯霉素滴眼液	01210401	C		14062106	S
	01210403	C		2105113101	B
	21032901	A		2011263101	B
	21041001	A		2104153101	B
	210301	P	氧氟沙星滴眼液	2101203101	B
	21022401	A		2101193101	B
	21022001	A		05210101	C
	21040701	A		20090501	A
	21060901	A		21041603	A
	21050501	A		05210401	C
马来酸噻吗洛尔滴眼液	2103033101	B		2011193101	B
	2103023101	B	右旋糖酐 70 滴眼液	0F0112M06	D
	20111001	A		0H0021M02	D
萘非滴眼液	21031201	A	阿昔洛韦滴眼液	21020401	O
	20110501	A		20102701	A
萘敏维滴眼液	21042801	A	色甘酸钠滴眼液	21030402	O
	21041701	A		20100404	O
	210403	G	苄达赖氨酸滴眼液	21012102	Q
	2103071	K		21040801	Q
	21052801	A		210504D	R
牛磺酸滴眼液	20080501	J		210412D	R
	200802068	P			
	200901	L			
	210101	H			
诺氟沙星滴眼液	2104053101	B			
	2104063101	B			
	03210401	C			
	2010303102	B			
	2010303102	B			
	03210501	C			

3.2 各品种细菌内毒素检测方法学建立

对各品种进行细菌内毒素动态浊度法方法学研究,得到了抽检的 26 个品种的最小不干扰稀释倍数,所有品种均成功建立了细菌内毒素检查方法,结果见表 2。

3.3 各品种细菌内毒素含量测定结果

对所有批次样品的内毒素含量按建立的方法进行检测,其中 74 批样品在建立的标准曲线范围内并未检测到细菌内毒素,17 批供试品包括硫酸软骨素滴眼液、萘敏维滴眼液、牛磺酸滴

表 2 各品种细菌内毒素检查方法建立情况

Tab. 2 Establishment of bacterial endotoxin test methods in various varieties

名称	最小不干 扰稀释倍数	批次	方法是否适用
玻璃酸钠滴眼液	1 : 4	3	是
氟康唑滴眼液	1 : 2	1	是
复方硫酸软骨素滴眼液	1 : 4	3	是
复方新斯的明牛磺酸滴眼液	1 : 16	2	是
利巴韦林滴眼液	1 : 2	2	是
硫酸软骨素滴眼液	1 : 2	3	是
硫酸锌尿素滴眼液	1 : 64	2	是
氯化钠滴眼液	1 : 2	2	是
氯霉素滴眼液	1 : 8	10	是
马来酸噻吗洛尔滴眼液	1 : 2	3	是
萘非滴眼液	1 : 4	2	是
萘敏维滴眼液	1 : 4	5	是
牛磺酸滴眼液	1 : 4	4	是
诺氟沙星滴眼液	1 : 32	6	是
双氯芬酸钠滴眼液	1 : 4	3	是
妥布霉素地塞米松滴眼液	1 : 8	3	是
硝酸毛果芸香碱滴眼液	1 : 64	2	是
溴芬酸钠滴眼液	1 : 32	4	是
盐酸奥洛他定滴眼液	1 : 2	2	是
盐酸环丙沙星滴眼液	1 : 4	3	是
盐酸左氧氟沙星滴眼液	1 : 8	7	是
氧氟沙星滴眼液	1 : 4	7	是
右旋糖酐 70 滴眼液	1 : 8	2	是
阿昔洛韦滴眼液	1 : 4	2	是
色甘酸钠滴眼液	1 : 8	2	是
苄达赖氨酸滴眼液	1 : 8	4	是

眼液、诺氟沙星滴眼液、双氯芬酸钠滴眼液、溴芬酸钠滴眼液、阿昔洛韦滴眼液、苄达赖氨酸滴眼液，检测到样品中存在的细菌内毒素，结果见表 3。

4 讨论

美国 FDA 药品审评与研究中心于 2021 年 9 月 20 日发布了《行业指南：质量相关受控函问答》，指南中指出局部眼用制剂放行和稳定性质量标准不要求有细菌内毒素项目，标签显示产品为无热源产品者除外。但是如果局部眼用制剂的标签中使用指导有包括在外科手术期间使用或用于受损眼部，则可能需要制订细菌内毒素标准。美国药典 USP 对部分类型眼用制剂的内毒素限值做出规定，眼科冲洗产品的限值为 $\leq 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，注射或植入眼用产品的限值为 $\leq 2.0 \text{ EU/剂/眼}^{[1]}$ ，眼科黏性装置

表 3 测得样品细菌内毒素含量汇总

Tab. 3 Summary of measured bacterial endotoxin content of samples

供试品名称	批号	细菌内毒素含量/ $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	生产单位 (代号)
硫酸软骨素滴眼液	20111201	0.128	A
	2011013011	0.097	A
萘敏维滴眼液	2103071	0.047	K
牛磺酸滴眼液	20080501	0.060	J
	200901	0.060	L
	210101	0.046	H
诺氟沙星滴眼液	2104053101	1.255	B
	2104063101	0.842	B
	2010303102	33.1	B
双氯芬酸钠滴眼液	2104251	0.263	I
溴芬酸钠滴眼液	2104193101 3	0.635	B
	2014203101 1	1.223	B
	1E0112M11	2.745	D
	1D0101M10	0.347	D
阿昔洛韦滴眼液	20102701	0.094	A
苄达赖氨酸滴眼液	21012102	3.91	Q
	21040801	0.768	Q

为代表的眼内液限值为 $0.2 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本研究共有 8 个品种滴眼液中检测到了细菌内毒素的存在。其中，在含量 $> 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3 个品种中，诺氟沙星滴眼液和溴芬酸钠滴眼液均常用于术后预防感染，所以对这 2 个品种的潜在风险应予以关注，可参考 USP 对部分类型眼用制剂的内毒素限值规定严格制定产品的细菌内毒素限值。以诺氟沙星滴眼液为例，经查阅说明书，本品用量为每次 1~2 滴，每日 3~6 次。又依据 USP<711>，滴眼剂每滴大小在 $20 \sim 70 \mu\text{L}$ ，故每日最大用量约为 0.84 mL 。若以注射或植入眼用制剂 2.0 EU/剂/眼 的限度为参考，可制订内毒素限值为 $2.4 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为生产企业产品质量放行标准。

此外，本研究发现同品种不同厂家生产产品细菌内毒素含量存在差异时，应予以关注，如苄达赖氨酸滴眼液，共抽检到 2 个厂家各 2 批产品，R 公司 2 批产品均未检测到细菌内毒素含量，而 Q 公司 2 批产品细菌内毒含量均 $> 0.50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；诺氟沙星滴眼液共抽检到 2 个厂家的 5 批产品，其中，C 公司生产的 2 批产品均未检测到细菌内毒素含量，而 B 公司生产的 3 批产品细菌内毒含量均 $> 0.50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其中 1 批次供试品细菌内毒素含量为 $33.1 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，应予以重点关注。

本研究建立了 26 种滴眼剂动态浊度法细菌内毒素检测方法,并排查出了风险品种,测得了部分产品中细菌内毒素含量,为企业加强产品质量控制,提供参考方法与细菌内毒素限值建立依据,将有助于保证滴眼液制剂的使用安全。但本次监测存在抽检生产企业不全和个别品种抽检批次较少的不足,可能存在未发现的风险。除内毒素污染风险外,眼用制剂致不良反应临床上报道以过敏反应、变态反应和心血管系统反应居多,所以在未来的工作中,课题组应根据本次风险监测结果,对重点品种和生产厂家予以关注,并进一步对特定产品进行质量评价,排查风险点。

REFERENCES

- [1] 耿东明. 注射用美洛西林钠舒巴坦钠致 3 例寒颤高热的病例分析[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2018, 40(2): 132-133.
- [2] 温小丹, 江茵, 王诗硕, 等. 细菌内毒素对小鼠的毒性和致热性试验[J]. 现代畜牧科技, 2020(11): 10-12, 18.
- [3] CHEN R M, LIANG F L, MA D Y, et al. Study on the bacterial endotoxin test of ofloxacin eye drops[J]. J Zhaoqing Univ(肇庆学院学报), 2018, 39(5): 34-38.
- [4] MA Y, HE J. Research progress of toxic anterior segment syndrome[J]. Int Eye Sci(国际眼科杂志), 2017, 17(4): 669-672.
- [5] FAN Z Y, GUO M. Establishment of bacterial endotoxin test standard for ophthalmic balanced salt solution[J]. J Pharm Res(齐鲁药事), 2012, 31(8): 454-455.
- [6] Food and Drug Administration. Endotoxin testing recommendations for single-use intraocular ophthalmic devices: guidance for industry and food and drug administration staff; 2015[EB/OL]. <http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm393376.pdf>.
- [7] 中国药典. 四部[S]. 2020: 通则 0105.
- [8] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 无菌药品: 药品 GMP 指南[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [9] The ISPE Baseline Guide: Sterile Product Manufacturing Facilities (Third Edition)[S]. Tampa, FL: ISPE, 2018.
- [10] LI H, ZHOU F Y, YANG X L, et al. Introduction to the revision of the antimicrobial effectiveness testing of Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(6): 655-660.
- [11] USP43-NF38 Vol 47(3)[S]. 2021: 6993-6999. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99560_04_01.
- [12] USP43-NF38 Vol 44(4)[S]. 2020: 7665-7679. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M2245_03_01.

收稿日期: 2022-05-21
(本文责编: 陈怡心)