

重组 C 因子法检测福沙匹坦二葡甲胺中细菌内毒素的方法学研究

裴宇盛¹, 蔡彤¹, 陈晨¹, 高华^{1*}, 祝清芬² (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 建立福沙匹坦二葡甲胺的细菌内毒素检测方法。方法 使用凝胶法、动态显色法、重组 C 因子法对福沙匹坦二葡甲胺进行方法学研究。结果 凝胶法在检测浓度范围内结果均为阳性结果, 不符合凝胶法进行干扰实验的前提。动态显色法中, 出现了不同稀释倍数回收率符合药典规定的情况下, 内毒素检测结果差异极大(结果差异>200 倍), 使用了抗增液仍存在该问题。重组 C 因子法中, 当样品浓度 $<0.062\ 5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即不存在干扰作用并且不存在上述问题, 结果符合规定。结论 福沙匹坦二葡甲胺无法使用经典的凝胶法和动态显色法进行内毒素检测。重组 C 因子法经过方法学研究, 可以用于福沙匹坦二葡甲胺的内毒素质量控制。

关键词: 细菌内毒素检查; 福沙匹坦二葡甲胺; 重组 C 因子法; 鲎试剂; 干扰实验

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)01-0001-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.01.001

引用本文: 裴宇盛, 蔡彤, 陈晨, 等. 重组 C 因子法检测福沙匹坦二葡甲胺中细菌内毒素的方法学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 1-4.

Methodological Study on the Detection of Bacterial Endotoxin in Fosaprepitant Dimeglumine by Recombinant Factor C

PEI Yusheng¹, CAI Tong¹, CHEN Chen¹, GAO Hua^{1*}, ZHU Qingfen² (1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Shandong Institutes for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a bacterial endotoxin test method for fosaprepitant dimeglumine. **METHODS** The methodological study of fosaprepitant dimeglumine was carried out by gel colt method, dynamic chromogenic method and recombinant factor C method. **RESULTS** The result of gel colt method was positive in the range of detection concentration, which did not meet the premise of the gel colt method for interference experiments. In the dynamic chromogenic method, when the recovery ratio of different dilution multiples met the requirements of the pharmacopoeia, the endotoxin detection results were extremely different(the difference was greater than 200 times), and the problem still existed with the use of endotoxin-specific buffer. When the sample concentration was lower than $0.062\ 5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, there was no interference existed, and the results were in compliance with the regulations using recombinant factor C method. **CONCLUSION** It is not possible to detect endotoxin in fosaprepitant dimeglumine by classical gel method and dynamic chromogenic method. The recombinant factor C method can be used for the endotoxin quality control of fosaprepitant dimeglumine based on the methodology research.

KEYWORDS: bacterial endotoxin test; fosaprepitant dimeglumine; recombinant factor C method; limulus amebocyte lysate; test for interference

铂类、阿霉素等多种抗肿瘤药物在使用过程中会产生严重的呕吐反应, 可导致患者脱水、电解质紊乱, 严重者可能因消化道黏膜损伤而出血、感染甚至死亡。呕吐反应会导致患者依从性明显降低, 严重影响治疗效果, 因而止吐药物是抗肿瘤治疗重要的辅助药物。阿瑞匹坦和福沙匹坦二葡甲胺是 2 种止吐药, 它们同属选择性的 P 物质

/NK-1 受体抑制剂, 作用机制主要通过阻断大脑恶心和呕吐信号而发挥作用。其中, 福沙匹坦二葡甲胺是阿瑞匹坦的前体药物, 注射后可在体内迅速转化^[1-3]。

为保障临床使用的安全性, 福沙匹坦二葡甲胺作为注射剂, 必须进行热原物质(细菌内毒素)控制。鲎试剂是检测细菌内毒素的专用试剂, C

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2018ZX09101001-004-005)

作者简介: 裴宇盛, 男, 助理研究员 Tel: (010)53851594 E-mail: pysh@nifdc.org.cn *通信作者: 高华, 女, 博士, 教授 Tel: (010)53851589 E-mail: huag55@163.com

因子是鲎试剂中对细菌内毒素具有高亲和力的一种丝氨酸蛋白酶，细菌内毒素激活 C 因子后，活化的 C 因子能激活鲎试剂的凝集反应。重组 C 因子法是利用人工重组的 C 因子来检测细菌内毒素的一种新方法，重组 C 因子被内毒素激活后可水解人工合成的三肽底物，因而能够替代传统的鲎试剂用于内毒素检测^[4]。美国 FDA2012 年 7 月发布的“热原检测指南-问与答”中将重组 C 因子法作为现有方法的补充替代方法。而国内少有关于该方法应用的研究报道。

为了建立福沙匹坦二葡甲胺的细菌内毒素检测方法学，本研究使用凝胶法、动态显色法、重组 C 因子法分别对福沙匹坦二葡甲胺进行方法学研究。

1 仪器与试剂

WNE45 型恒温水浴(德国 Memmert 有限公司); SynergyHT 型多功能酶标仪(加拿大 Biotek 生物技术公司); 1389 A2 型生物安全柜(美国 Thermo 有限公司)。

凝胶法鲎试剂($0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，湛江安度斯生物有限公司，批号：1707122); 凝胶法鲎试剂($0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，湛江博康海洋生物有限公司，批号：1803142); 凝胶法鲎试剂($0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，福州新北生化有限公司，批号：17080612); 动态显色法鲎试剂($0.005 \sim 50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，湛江安度斯生物有限公司，批号：1611182); 抗增液(货号：BG126，Charles River endosafe，批号：L72352); 重组 C 因子试剂盒(美国 Lonza Walkersville，批号：0000591563); M9005 酶标板(Charles River Endosafe, Inc); 福沙匹坦二葡甲胺原料药(齐鲁制药有限公司，批号：160330，160222)。

2 方法与结果

2.1 凝胶法方法学研究

凝胶法干扰实验为凝胶法方法学的主要内容，根据中国药典 2015 年版通则 1143 细菌内毒素检查法的相关要求，干扰实验使用的供试品应为未检出内毒素且不超过最大有效稀释倍数(maximum valid dilution, MVD)的溶液。按照《中国药品检验标准操作规范》，进行干扰实验预试验来寻找在不超过 MVD 的情况下供试品和鲎试剂的反应结果显阴性(即未检出)的供试品浓度。确定该浓度后，才可进行干扰实验。

该品种细菌内毒素检查限度为 $0.6 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。目前常见的鲎试剂灵敏度为 $0.03 \sim 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，因此按照《中国药品检验标准操作规范》，将福沙匹坦二葡甲胺原料药配置成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液作为样品原液进行研究，计算 MVD $0.03 \sim 0.5$ ，使用凝胶法进行干扰实验预试验研究，并采用 3 个厂家的鲎试剂作为供试品阳性对照(positive product control, PPC)，以确定使用何种浓度进行药典中的干扰实验。

3 个厂家生产的鲎试剂在常用的 $0.03 \sim 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灵敏度范围内，无法找到未检出内毒素的样品浓度，该 2 批样品不符合凝胶法干扰实验对供试品的要求，因此无法进行凝胶法的方法学研究。结果见表 1~3。

表 1 凝胶法干扰实验预试验结果(湛江安度斯, $n=2$)

Tab. 1 Pre-test results of gel interference test(Zhanjiang A&C Biological Co., Ltd., $n=2$)

MVD	稀释倍数	160330		160222	
		样品结果	PPC结果	样品结果	PPC结果
MVD _{0.5}	60	++	++	++	++
MVD _{0.25}	120	++	++	++	++
MVD _{0.125}	240	++	++	++	++
MVD _{0.06}	500	++	++	++	++
MVD _{0.03}	1 000	++	++	++	++

表 2 凝胶法干扰实验预试验结果(湛江博康海洋, $n=2$)

Tab. 2 Pre-test results of gel interference test(Zhanjiang Bokang Marine Biological Co., Ltd., $n=2$)

MVD	稀释倍数	160330		160222	
		样品结果	PPC结果	样品结果	PPC结果
MVD _{0.5}	60	++	++	++	++
MVD _{0.25}	120	++	++	++	++
MVD _{0.125}	240	++	++	++	++
MVD _{0.06}	500	++	++	++	++
MVD _{0.03}	1 000	++	++	++	++

表 3 凝胶法干扰试验预试验结果(福州新北生化, $n=2$)

Tab. 3 Pre-test results of gel interference test(Fuzhou Xinbei Biochemical Industry Co., Ltd., $n=2$)

MVD	稀释倍数	160330		160222	
		样品结果	PPC结果	样品结果	PPC结果
MVD _{0.5}	60	++	++	++	++
MVD _{0.25}	120	++	++	++	++
MVD _{0.125}	240	++	++	++	++
MVD _{0.06}	500	++	++	++	++
MVD _{0.03}	1 000	++	++	++	++

2.2 动态显色法方法学研究

动态显色法干扰实验为动态显色法方法学的主要内容,根据中国药典 2015 年版通则 1143 细菌内毒素检查法的相关要求,将样品配制成 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,将供试品稀释 100, 200, 400, 800 等倍数进行干扰实验,供试品阳性对照为 $0.5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$,标准曲线范围为 $0.005\sim 50\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

200, 400, 800 倍的稀释结果,符合药典规定,实验结果有效。但 200 倍稀释的结果值与 400 倍稀释的检测值结果差异>200 倍。结果见表 4。

表 4 动态显色法干扰试验结果($n=2$)

Tab. 4 Interference test result of dynamic chromogenic method($n=2$)

稀释倍数	160330		160222	
	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%
100	61.2	24.7	149.5	16.8
200	435.9	93.0	550.5	103.7
400	<2	83.2	<2	105.0
800	<4	95.3	<4	51.0

一般情况下,细菌内毒素不同稀释倍数之间会存在一定结果差异,而这些差异不会超过 50%~200%。因此,考虑到 β -葡聚糖能和鲎试剂中的 G 因子发生反应并引起鲎试剂异常凝集,并且该种干扰作用具有一定浓度依赖性,其表现与表 4 中的结果类似。抗增液是内毒素检查法常用的检测辅剂,能够封闭 β -葡聚糖和鲎试剂中的 G 因子发生反应。为了检测上述情况是否由 G 因子引起,进一步实验采用抗增液,按其使用说明书溶解鲎试剂。结果见表 5。

表 5 动态显色法干扰试验结果(应用抗增液, $n=2$)

Tab. 5 Interference test result of dynamic chromogenic method(endotoxin specific buffer applied, $n=2$)

稀释倍数	160330		160222	
	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%
100	44.6	21.7	153.8	13.9
200	343.2	80.6	695.0	111.1
400	<2	77.1	<2	89.6
800	<4	83.8	<4	85.4

由表 5 可见,采用抗增液后仍然存在回收率符合药典规定的前提下,不同稀释倍数之间内毒素测定值存在极大差异的情况。因此判定该品种不适合使用动态显色法进行检测。

2.3 重组 C 因子法方法学研究

重组 C 因子法方法学主要内容为干扰实验,根据中国药典 2015 年版通则 1143 细菌内毒素检查法和试剂使用说明书的相关要求,将样品配置成 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,将供试品稀释 100, 200, 400, 800, 1600 等倍数进行干扰实验,供试品阳性对照为 $0.5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$,标准曲线范围为 $0.005\sim 5\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果见表 6。

表 6 重组 C 因子法干扰试验结果($n=2$)

Tab. 6 Interference test result of recombinant factor C method($n=2$)

稀释倍数	160330		160222	
	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%	样品结果/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPC 结果/%
100	—	0	—	0
200	—	0	—	0
400	—	42.8	—	20.8
800	<4	92.4	<4	96.7
1 600	<8	95.2	<8	94.5

注: “—” 代表检测值低于仪器检测限度。

Note: “—” represents the detection value is lower than the instrument detection limit.

试验结果表明, $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液经 100 倍、200 倍稀释后回收率为 0%, 表明存在强烈抑制作用。随着稀释, 400 倍稀释后回收率逐渐升高, 表明抑制部分被排除, 800 倍稀释后回收率均在 50%~200%之内, 符合药典中对回收率的要求。因此确定 800 倍稀释即为样品的不干扰稀释倍数(即不干扰浓度为 $0.0625\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 且内毒素含量为 $<4\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0.08\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。此过程中回收率随着稀释倍数增大而逐渐提高, 也未出现在回收率符合规定的情况下, 不同稀释倍数内毒素含量存在较大差异。符合药典中对内毒素检测的相关要求。

3 讨论

有报告使用凝胶法针对注射用福沙匹坦二葡甲胺的细菌内毒素检测进行了研究^[5], 然而该研究结果并不适用于原料药的质量控制。并且该品种样品生产制备方法不同^[6-7], 而细菌内毒素的干扰常常由杂质引起, 因此不同工艺生产的相同品种其干扰情况却迥异。本研究使用凝胶法、动态显色法、重组 C 因子法进行全面的方法学研究, 解决了福沙匹坦二葡甲胺原料药内毒素难以检测的情况。其他有类似干扰情况的品种可依照本研究方法进行尝试。

福沙匹坦二葡甲胺在凝胶法干扰实验中, 在

所有试验浓度都与鲎试剂均成阳性反应,不符合药典对凝胶法干扰试验供试品的基本要求,造成无法按药典要求进行凝胶法干扰试验。药典中要求必须使用与鲎试剂反应显阴性的供试品进行干扰实验,是由于凝胶法是一种定性试验,要通过一系列梯度浓度的供试品液与鲎试剂发生反应,确定反应终点浓度(反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个显阳性结果的浓度),才能确定供试品的回收率。如本研究进行干扰实验,所有结果均为阳性,无法确定反应终点浓度,回收率结果亦无法确定。

福沙匹坦二葡甲胺在动态显色法干扰实验中,出现在回收率符合规定的情况下,不同稀释倍数内毒素检测值出现较大差异(>50%~200%的范围),此种情况在细菌内毒素检查过程中罕见。从药典规定的角度来说,2个检测结果都为有效结果。但是2个结果比值超过200倍,无法确定其真实内毒素含量,给日常检测造成极大困惑。随着细菌内毒素检查法应用的不断推广,出现了越来越多的干扰问题^[8-9],重组C因子法可以作为备选方法,尝试解决目前存在的问题。

重组C因子法检测体系与经典动态显色法和凝胶法相比,缺少B因子、G因子、凝固蛋白原、凝固酶原等物质^[10-12],推测重组C因子法不存在上述检测问题,应与其组成成分有关。差异产生的具体机制有待进一步研究阐明。

REFERENCES

[1] AAPRO M, CARIDES A, RAPOPORT B L, et al. Aprepitant

and fosaprepitant: a 10-year review of efficacy and safety [J]. *Oncologist*, 2015, 20(4): 450-458.

- [2] MILNES V, GONZALEZ A, AMOS V. Aprepitant: a new modality for the prevention of postoperative nausea and vomiting: an evidence-based review [J]. *J Perianth Nurs*, 2015, 30(5): 406-417.
- [3] AZUMA J, FUKASE H. Pharmacokinetics of a single 150-mg intravenous infusion of fosaprepitant: effects of concentration and infusion time in healthy Japanese men [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2013, 2(4): 394-399.
- [4] 中国药典. 四部[S]. 2015: 154-155.
- [5] QI J, LIU T, LI Z, et al. Expression of limulus factor C in silkworm larvae by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system [J]. *Chin J Biotech(生物工程学报)*, 2014, 30(10): 1594-1601.
- [6] ZHANG Y B, XU L M. Determination of bacterial endotoxin of fosaprepitant dimeglumine for injection [J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2013, 17(8): 1298-1300.
- [7] REN W J, LIU W T, WANG F, et al. Synthesis of fosaprepitant dimeglumine [J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2017, 48(1): 20-23.
- [8] ZHAO J, RAN C C, DONG W C, et al. Determination of fosaprepitant dimeglumine for injection by HPLC [J]. *West Chin J Pharm Sci(华西药科学杂志)*, 2015, 30(4): 476-477.
- [9] PEI Y S, CAI T, ZHANG G L, et al. Solutions to treatment for out of specification of bacterial endotoxin test [J]. *Sci Tech Rev(科技导报)*, 2017, 35(10): 71-75.
- [10] PEI Y S, CAI T, ZHANG Y C, et al. Research on judgment standard of interfering factors test of gel-clot technique for bacterial endotoxin test in Chinese Pharmacopoeia 2010 edition [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2014, 34(7): 1296-1299.
- [11] PEI Y S, CAI T, Gao H. Progress on new methods of bacterial endotoxin test [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2014, 34(3): 392-395.
- [12] SANG J, CHEN S H, MENG H, et al. Study of the application of *in vitro* human cell line activation test with four hair dyes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志)*, 2018, 35(4): 484-487

收稿日期: 2018-07-17

(本文责编: 李艳芳)