

添加表面活性剂检测西罗莫司原料药细菌内毒素的含量

温耀明¹, 范建辉¹, 吴文清², 邹昕¹, 邱观荣¹, 李平¹, 肖丽华¹ (1. 福建省微生物研究所, 福州 350007; 2. 福建科瑞药业有限公司, 福州 350313)

摘要 目的: 采用添加表面活性剂建立难溶性西罗莫司原料药细菌内毒素的检测方法。方法: 以0.1% (W/V) 聚山梨酯-80 溶解西罗莫司原料药, 用细菌内毒素检查用水 (BET水) 稀释后进行凝胶法细菌内毒素检查的方法学研究。结果: 西罗莫司原料药用0.1% (W/V) 聚山梨酯-80 溶解并用BET水稀释至0.4 mg · mL⁻¹浓度及以下时对鲎试剂凝集反应无干扰作用。结论: 通过添加聚山梨酯-80 的凝胶法可检测西罗莫司原料药细菌内毒素的含量, 操作简便。

关键词: 西罗莫司原料药; 细菌内毒素; 聚山梨酯-80; 表面活性剂; 凝胶法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)03-0301-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.03.010

Determination of Bacterial Endotoxin Content in Sirolimus API by Adding Surfactant

Wen Yaoming¹, Fan Jianhui¹, Wu Wenqing², Zou Xin¹, Qiu Guanrong¹, Li Ping¹, Xiao Lihua¹ (1. Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China; 2. Fujian Kerui Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou 350313, China)

Abstract Objective: To establish a method for the test of bacterial endotoxin in insoluble sirolimus API by adding surfactant. **Methods:** The methodological study on bacterial endotoxin test by gel-clot method was carried out with 0.1% (W/V) polysorbate-80 dissolving sirolimus API and bacterial endotoxin test water (BET water) diluting sirolimus API. **Results:** When sirolimus API was dissolved with 0.1% (W/V) polysorbate-80 and diluted with BET water to the concentration of 0.4 mg · mL⁻¹ or less, it had no interference effect on the agglutination reaction of tachypleus amebocyte lysate. **Conclusion:** By adding polysorbate-80, the content of bacterial endotoxin in sirolimus API can be detected by gel-clot method, and it is easy to operate.

Keywords: sirolimus API; bacterial endotoxin; polysorbate-80; surfactant; gel-clot method

西罗莫司 (Sirolimus), 是吸水链霉菌 (Streptomyces Hygroscopic) 发酵产生的大环内酯类抗生素, 因该菌最早从太平洋Rapa Nui岛 (复活岛) 的土壤中分离得到, 故原命名为雷帕霉素

(Rapamycin)^[1-2]。1977年发现西罗莫司具有免疫抑制功能, 并在1999年开发成抗移植排斥反应的制剂在美国批准上市, 随后也在欧洲、中国、日本等地批准上市。此外, 西罗莫司作为药物涂层的冠

状动脉支架已经在临床大规模应用,可以有效预防支架术后再狭窄^[3-5];近年来,西罗莫司在抗肿瘤^[6]、延长哺乳类动物寿命^[7]和治疗结节性硬化症^[8]等方面的研究热度很高。但是,西罗莫司原料药(Active Pharmaceutical Ingredients, API)(以下简称西罗莫司API)在水中几乎不溶,无法采用细菌内毒素检查(Bacterial Endotoxin Test, BET)用水(BET水)溶解的方法进行细菌内毒素凝胶法检测。本研究采用0.1%(W/V)聚山梨酯-80进行溶解的方法,建立西罗莫司API细菌内毒素检查法,该法操作简便,并为其他脂溶性原料药建立细菌内毒素检查法提供参考。

1 仪器与试剂

电子天平:CPA225D,赛多利斯科学仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9070,上海鸿都电子科技有限公司;高压蒸汽灭菌器:ES-315, TOMY SEIKO CO., LTD;水浴锅:常州智博瑞仪器制造有限公司;快速混匀器:XK-80A,江苏新康医疗器械有限公司。

鲎试剂1:标示灵敏度为 $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号为2103163,湛江安度斯生物有限公司(经复核,灵敏度符合规定);鲎试剂2:标示灵敏度为 $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号为20181038,厦门鲎试剂生物科技股份有限公司(经复核,灵敏度符合规定);细菌内毒素工作标准品:规格为每支10 EU,批号为190201,福州新北生化工业有限公司;细菌内毒素检查用水(BET水):批号为19040105,福州新北生化工业有限公司;聚山梨酯-80:规格为500 mL,批号为K1724104,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;西罗莫司API:批号为201201、201202、201203,福建科瑞药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)确定和稀释倍数的确定

西罗莫司API在国内外暂无相关标准,根据制剂开发商提供数据设定该原料药细菌内毒素的限值(L)为 $0.3 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。市售凝胶限度法鲎试剂灵敏度一般为0.5、0.25、0.125、0.06、0.03、0.015 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,根据 $c=\lambda/L$ 公式计算最小有效稀释浓度分别为1.67、0.83、0.42、0.2、0.1、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,假设西罗莫司API样品浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,则对应有有效稀释倍数为1.2、2.4、4.8、10、20、40倍。

2.2 溶剂筛选

根据《中国药典》2020年版四部1143细菌内毒素检查法^[9]中供试品溶液的制备方法,原料药需要通过水溶解或者稀释,或者在水性溶液中浸提制成供试品溶液^[10]。西罗莫司API在水中几乎不溶,无法通过稀释的方法获得有效稀释浓度之内的样品溶液。文献报道,可以采用无水乙醇^[11]、二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)^[12]或二氯甲烷^[13]等作为溶剂溶解样品并进行细菌内毒素检查。二氯甲烷与水混合后分层,需要进行离心提取细菌内毒素,操作复杂;尝试无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO)溶解样品后,稀释过程西罗莫司API会析出,样品析出可能包裹部分细菌内毒素,导致假阴性出现。

聚山梨酯-80是一种非离子型表面活性剂,易溶于水。经试验,西罗莫司API在0.1%(W/V)聚山梨酯-80(BET水稀释制备)中的溶解度大于 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在本研究的稀释过程未出现析出和分层现象,故选择0.1%(W/V)聚山梨酯-80作为溶剂进行研究。

2.3 干扰预试验

供试品阴性对照(Negative Product Control, NPC):精密称取西罗莫司API(批号:201201)加0.1%(W/V)聚山梨酯-80溶解至 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,以此为母液分别用BET水稀释,使其浓度成为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,将后5个浓度0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 计为NPC管系列。

供试品阳性对照(Positive Product Control, PPC):取上述1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品溶液添加等体积含 4λ 细菌内毒素工作标准品溶液,混匀,制成含 2λ 细菌内毒素的PPC管系列。

内毒素回收管1:取上述西罗莫司API母液($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入等体积细菌内毒素工作标准品溶液,用BET水稀释成含 2λ 细菌内毒素的浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,再用 2λ 的细菌内毒素工作标准品溶液稀释制成 0.4 、 0.2 、 0.1 、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列,作为内毒素回收管1系列。

内毒素回收管2:取1支细菌内毒素工作标准品(安瓿瓶),在安瓿瓶中加入西罗莫司API,封口后用快速混匀器混合,用0.1%(W/V)聚山梨酯-80溶解至 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,用BET水稀释成含 2λ 细菌内毒素的浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,再用 2λ

的细菌内毒素工作标准品溶液稀释制成0.4、0.2、0.1、0.05 mg · mL⁻¹的系列，作为内毒素回收管2系列。

取上述NPC系列、PPC系列及内毒素回收管1和2系列，分别用2个厂家的鲎试剂进行干扰预试验，每一个浓度重复2管，同时作阳性对照（Positive

Control, PC）和阴性对照（Negative Control, NC）各2管，结果见表1，说明西罗莫司API在稀释至 0.4 mg · mL⁻¹浓度及以下时，对不同厂家的鲎试剂均无干扰。同时，内毒素回收管均为阳性，说明聚山梨酯-80未影响细菌内毒素干扰试验。

表1 干扰预试验结果

鲎试剂批号	系列	样品浓度 / (mg · mL ⁻¹)					NC	PC
		0.8	0.4	0.2	0.1	0.05		
2103163	NPC	+-	--	--	--	--	--	++
	PPC	++	++	++	++	++		
	内毒素回收管 1	++	++	++	++	++		
	内毒素回收管 2	++	++	++	++	++		
20181038	NPC	--	--	--	--	--	--	++
	PPC	++	++	++	++	++		
	内毒素回收管 1	++	++	++	++	++		
	内毒素回收管 2	++	++	++	++	++		

2.4 溶剂聚山梨酯-80干扰试验

0.1%（W/V）聚山梨酯-80（BET水稀释制备）用BET水配制成与上述“2.3”项下NPC管系列中所含0.1%（W/V）聚山梨酯-80浓度一致，即稀释2.5、5、10、20、40倍，计为溶剂阴性对照系列；在稀释1.25、2.5、5、10、20倍的系列中添加等体积细菌内毒素标准品溶液制成含2λ溶

剂阳性对照系列。每个浓度平行2管，分别与2个厂家鲎试剂进行试验，另取BET水作为阴性对照（NC），2λ浓度细菌内毒素标准品溶液作为阳性对照（PC），结果见表2，说明0.1%（W/V）聚山梨酯-80稀释2.5倍及以上均未干扰鲎试剂凝集反应。

表2 聚山梨酯-80干扰试验结果

鲎试剂批号	系列	0.1%（W/V）聚山梨酯-80 稀释倍数					NC	PC
		2.5	5	10	20	40		
2103163	溶剂阴性对照系列	--	--	--	--	--	--	++
	溶剂阳性对照系列	++	++	++	++	++		
20181038	溶剂阴性对照系列	--	--	--	--	--	--	++
	溶剂阳性对照系列	++	++	++	++	++		

2.5 供试品干扰确证试验

按“2.3”项下方法,为了提升方法的可靠性,选择终点浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 西罗莫司API 3批样品溶液进行干扰确证试验,即 0.1% (W/V) 聚山梨酯-80稀释10倍。细菌内毒素工作标准品用 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 西罗莫司API溶液稀释到2、1、0.5、0.25 λ 4个浓度,每一个浓度平行做4支;另用BET检

查用水配制成相同稀释倍数,每一个浓度平行做2支;另取BET检查用水和供试品稀释液各做2支阴性对照管,按《中国药典》2020年版四部1143细菌内毒素检查法中凝胶法干扰试验进行操作,结果见表3,说明西罗莫司API在浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以及 0.1% (W/V) 聚山梨酯-80稀释10倍情况下对鲎试剂凝集反应无干扰。

表3 供试品干扰确证试验结果

鲎试剂批号	组别	内毒素浓度				BET 检查用水阴性对照	供试品阴性对照	终点浓度
		2 λ	1 λ	0.5 λ	0.25 λ			
2103163	BET 检查用水	++	++	--	--	--		1 λ
	批号 201201	++++	++++	----	----		--	1 λ
	批号 201202	++++	++++	----	----			1 λ
	批号 201203	++++	++++	----	----			1 λ
20181038	BET 检查用水	++	++	++	--	--		0.5 λ
	批号 201201	++++	++++	++++	----		--	0.5 λ
	批号 201202	++++	++++	++++	----			0.5 λ
	批号 201203	++++	++++	++++	----			0.5 λ

2.6 供试品细菌内毒素检测

取上述3批西罗莫司API样品,按“2.3”项下方法,将供试品稀释成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,采用2个

厂家鲎试剂并按《中国药典》2020年版四部1143细菌内毒素检查法检测,结果符合拟定的限度要求,见表4。

表4 供试品细菌内毒素检测结果

鲎试剂批号	供试品批号	供试品	PPC	阳性对照	阴性对照
2103163	201201	--	++	++	--
	201202	--	++		
	201203	--	++		
20181038	201201	--	++	++	--
	201202	--	++		
	201203	--	++		

3 讨论

在细菌内毒素检查法中,细菌内毒素(主要化学成分为脂多糖)激活鲎试剂中的C因子,引起一系列酶促反应,使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶。由于这个反应需在水溶液中进行,对于难溶性固体

一般需要选择合适的溶剂将其全部溶解,再进行提取或稀释。本研究首次采用一种表面活性剂即聚山梨酯-80为增溶剂,将难溶性的西罗莫司API溶解在 0.1% (W/V) 聚山梨酯-80溶液中,再以BET水稀释进行细菌内毒素凝胶法检查,避免了样品复析

或者液体分层带来的操作和验证的繁琐。

聚山梨酯-80又名吐温-80, 化学名为聚氧乙烯去水山梨醇酐单油酸酯, 是一种亲水性非离子表面活性剂。聚山梨酯-80中的去水梨醇环和 $C_{17}H_{33}$ 是亲酯的, 而聚氧乙基是亲水的, 同时分子中的醚键能与水结合成氢键, 所以聚山梨酯-80在水中溶解度高^[14-15]。在水中, 聚山梨酯-80聚集组成“胶束”, 被增溶的西罗莫司分子进入胶束中心或夹缝, 样品中如果存在细菌内毒素便会释放到水中。由于胶束是以胶体粒子的状态存在于液体中, 肉眼观察液体是澄清的, 不影响细菌内毒素检查观察。

为了考察聚山梨酯-80是否影响酶促反应, 进行了溶剂聚山梨酯-80的干扰试验, 结果显示0.1% (W/V) 聚山梨酯-80稀释2.5倍及以上, 鲎试剂凝集反应未受干扰。通过干扰预试验, 确定了西罗莫司API在稀释至 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度及以下时, 对鲎试剂无干扰; 通过2种细菌内毒素添加后的回收确证试验, 进一步说明溶剂聚山梨酯-80能将样品充分溶解并且对细菌内毒素检查无干扰。

上述试验研究表明, 通过添加聚山梨酯-80这种表面活性剂建立的水中难溶的西罗莫司API细菌内毒素检查法是可行的。

参考文献:

- [1] V é zina C, Kudelsk A, Sehgal S N. Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic.I.Taxonomy of the Producing Streptomyces and Isolation of the Active Principle[J]. J Antibiot, 1975, 28 (10): 721-726.
- [2] Sehgal S N, Baker H, V é zina C. Rapamycin (AY-22, 989), a New Antifungal Antibiotic.II.Fermentation, Isolation and Characterization[J]. J Antibiot, 1975, 28 (10): 727-732.
- [3] 郭瑾. 心血管病患者药物涂层支架载入药物的筛选与应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20 (38): 5770-5776.
- [4] 李雪梅, 王贺, 罗明华, 等. 药物涂层球囊治疗支架内再狭窄的研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59 (20): 103-106.
- [5] 王威, 张颖倩, 李中轩, 等. 雷帕霉素抑制冠状动脉支架植入术后血管再内皮化相关机制进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27 (11): 995-999.
- [6] 张晓元, 郝荣华, 刘飞, 等. 雷帕霉素在肿瘤治疗方面研究进展[J]. 食品与药品, 2018, 20 (1): 65-70.
- [7] Harrison D E, Strong R, Sharp Z D, et al. Rapamycin Fed Late in Life Extends Lifespan in Genetically Heterogeneous Mice[J]. Nature, 2009, 460: 392-395.
- [8] 张世敏, 秦炯. 雷帕霉素及其衍生物治疗结节性硬化症研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34 (1): 67-70.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 178-181.
- [10] 丁苏苏, 马若群, 刘慧, 等. 香菇多糖原料药热原检查法和细菌内毒素检查法的建立与比较[J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (15): 1896-1901.
- [11] 赵嘉, 朱社敏, 匡荣. 细菌内毒素检查法中样品复析/乳浊现象时干扰确证方法探讨[J]. 中国药品标准, 2020, 21 (6): 506-509.
- [12] 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.
- [13] 赵武群, 赵云蓝, 付强, 等. 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.
- [14] 陈振江. 中药注射剂中吐温-80的增溶机理及CMC测定[J]. 中成药, 1993, 15 (6): 8-9.
- [15] 马鸿雁, 李霞, 张海燕, 等. 中药注射剂增溶辅料吐温-80物理化学性能研究进展[J]. 中国药事, 2010, 24 (6): 594-596.

(收稿日期 2021年10月4日 编辑 邹宇玲)