

胆固醇的细菌内毒素检查方法研究

陈晨, 赵小燕, 裴宇盛* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 目的 为难溶性辅料胆固醇(供注射用)建立细菌内毒素检测方法。方法 通过筛选出适合溶解胆固醇的有机溶剂, 并经过 9 种排除干扰的方法筛选, 采用凝胶法和动态浊度法进行干扰试验, 排除了有机溶剂和胆固醇对内毒素检查法的干扰, 最终建立了胆固醇的细菌内毒素质量控制方法。检测条件: 取胆固醇用无水乙醇配制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚氧乙烯(35)蓖麻油水溶液代替细菌内毒素检查用水稀释 100 倍, 按内毒素检查法动态浊度法检测。结果 3 批样品使用 2 个厂家的动态浊度法试剂的回收率均在 50%~200%, 并且内毒素检测值均 $<0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。如使用凝胶法, 该品种只能使用 1 个厂家最高灵敏度的试剂进行检测。因此, 胆固醇不建议使用凝胶法进行检测。结论 建立了胆固醇(供注射用)细菌内毒素动态浊度法检测方法, 用于质量控制。

关键词: 胆固醇; 难溶性辅料; 细菌内毒素; 方法学研究

中图分类号: R927.12

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)01-0082-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.010

引用本文: 陈晨, 赵小燕, 裴宇盛. 胆固醇的细菌内毒素检查方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 82-85.

Study on Bacterial Endotoxin Test of Cholesterol

CHEN Chen, ZHAO Xiaoyan, PEI Yusheng* (National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a bacterial endotoxin detection and control method for insoluble excipient cholesterol(for injection). **METHODS** The bacterial endotoxin quality control method for cholesterol was established by screening the organic solvent suitable for cholesterol dissolution and screening through 9 methods to eliminate the interference of organic solvent and cholesterol to the endotoxin test. The detection conditions were as follows: cholesterol was prepared with anhydrous ethanol into $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ solution, diluted 100 times with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ polyoxyethylene(35) castor oil solution instead of bacterial endotoxin test water, and detected by kinetic-turbidimetric assay of endotoxin test. **RESULTS** The recoveries of the kinetic-turbidimetric assay limulus reagent from two manufacturers were 50%–200%, and the values of endotoxin were all $<0.1 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$. At present, this variety could only be tested with the most sensitive reagent from one manufacturer when use gel method. Therefore, cholesterol detection by gel method was not recommended. **CONCLUSION** A kinetic-turbidimetric assay for the determination of bacterial endotoxin in cholesterol(for injection) is established for quality control.

KEYWORDS: cholesterol; insoluble excipients; bacterial endotoxin; methodological research

胆固醇又称胆甾醇, 是一种环戊烷多氢菲的衍生物。早在 18 世纪, 人们已从胆石中发现了胆固醇, 1816 年化学家本歇尔将这种具有脂类性质的物质命名为胆固醇。胆固醇广泛存在于动物体内, 以脑及神经组织中最为丰富, 在肾、脾、皮肤、肝和胆汁中含量也较高, 其溶解性与脂肪类似, 不溶于水, 易溶于乙醚、氯仿等溶剂。胆固醇作为一种药用辅料, 可用于药品乳剂中的乳化剂或乳膏剂中的软骨基质^[1-3], 还可作为脂质体包含物的载体, 用于制造脂质体, 因此为了临床用药安全, 必须严格控制胆固醇的细菌内毒素含量。

曾有文献报道, 胆固醇的细菌内毒素检测方法为称取胆固醇粉末加细菌内毒素检查用水(BET 水)制成 $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液, 经震荡制成均匀

无颗粒的乳液, 进行样品及同浓度含 2λ 的内毒素样品稀释, 从而测定其内毒素含量。但热原的体积很小, 大约在 $1\sim5 \text{ nm}$, 而乳剂的直径一般在 $0.1\sim100 \mu\text{m}$ ^[4], 热原物质理论上有可能被包裹在胆固醇中, 文献中样品阳性对照(positive product control, PPC)制备方法只能检测到内毒素添加到胆固醇乳滴外的水溶液中, 未验证被包裹的内毒素是否可以被检测出来, 难以证明胆固醇中是否含有热原物质, 无法反映出真实的内毒素含量。

为了解决上述问题, 需找到适合的有机溶剂, 完全溶解胆固醇后, 在胆固醇溶液中添加内毒素, 再进行验证, 即可准确检测出胆固醇中内毒素含量。外加的有机溶剂由于其特性, 会干扰内毒素与鲎试剂的反应。本研究拟筛选出适合溶解胆固

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2018ZX09101-001)

作者简介: 陈晨, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: candychen0110@163.com

*通信作者: 裴宇盛, 男, 硕士, 副研究员 E-mail:

pysh@nifdc.org.cn

醇的有机溶剂,并经过9种排除干扰的方法筛选,采用凝胶法和动态浊度法进行干扰试验,排除有机溶剂和胆固醇对内毒素检查法的干扰,建立了胆固醇的细菌内毒素质量控制方法。

1 仪器与试剂

AE240 电子天平(Mettler 公司);Vortex-Genie2 涡旋混合器(Scientific Industries 公司);ELX-88 细菌内毒素测定仪(BioTek 公司);WNE45 恒温水浴(Memmert 公司)。

胆固醇(广州白云山制药股份有限公司,批号: I10171001, I10171002, I10171003);无水乙醇(分析纯,批号: 20150917)、正己烷(分析纯,批号: 20181207)均购自国药集团化学试剂有限公司;内毒素分散剂(湛江安度斯生物有限公司,批号: 1711290);植物源重组人血白蛋白注射液(武汉禾元生物科技股份有限公司,批号: C001201901001);PBS(HyClone 公司,批号: AD20616267, 1X);聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)(BASFSE, 批号: 40159588Q0);细菌内毒素国家标准品(中国食品药品检定研究院,批号: 150800-201601;效价: 9 000 EU·支⁻¹);凝胶法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,灵敏度: 0.03 EU·mL⁻¹;批号: 1802050。福州新北生化试剂有限公司,灵敏度: 0.03 EU·mL⁻¹;批号: 17080612。厦门鲎试剂生物科技有限公司,灵敏度: 0.03 EU·mL⁻¹;批号: 18011001);动态浊度法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,检测限范围: 10~0.01 EU·mL⁻¹;批号: 1903290。厦门鲎试剂生物科技有限公司,检测限范围: 10~0.01 EU·mL⁻¹;批号: 170924。福州新北生化试剂有限公司,检测限范围: 10~0.01 EU·mL⁻¹;批号: 17102212);细菌内毒素检查用水(BET 水)(湛江安度斯生物有限公司,批号: 1810260;厦门鲎试剂生物科技有限公司,批号: 171211)。

2 方法和结果

2.1 凝胶法

2.1.1 鲎试剂灵敏度复核 参照中国药典 2015 年版四部^[5]1143 细菌内毒素检查法中鲎试剂灵敏度复核试验。本次试验使用 3 个厂家凝胶法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司、福州新北生化试剂有限公司、厦门鲎试剂生物科技有限公司)。结果显示,3 个厂家鲎试剂灵敏度复核测定值分别为 0.03, 0.015, 0.03 EU·mL⁻¹, 鲎试剂的灵敏度复核试验符合规定,可用于细菌内毒素检查。

2.1.2 溶剂筛选 根据企业内控标准,胆固醇的

细菌内毒素限值为 0.10 EU·mL⁻¹,由于胆固醇不溶于水,供试品 PPC 无法添加,干扰难以排除。本实验用乙醇(无水乙醇)和 20%正己烷+80%乙醇 2 种溶液来溶解胆固醇,配制成浓度为 20 mg·mL⁻¹ 的溶液,必要时使用水浴加热使其快速溶解,使用灵敏度为 0.03 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂进行试验,最大有效稀释倍数(maximum valid dilution, MVD)为 64 倍,PPC 采取预先添加标准内毒素再稀释的配制方法,即:取 10 μL 400 EU·mL⁻¹ 内毒素标准溶液加入到 1 mL 胆固醇溶液(20 mg·mL⁻¹)中,再用 BET 水稀释 64 倍,同时,设置 PPC 和阴性对照。结果为 3 个厂家鲎试剂阴性试验均为阴性,阳性试验均为阳性,使用 2 种有机溶剂溶解的结果见表 1。

表 1 使用 2 种溶剂溶解样品的干扰预实验
Tab. 1 Interference pretest using two solvents to dissolve samples

溶剂	试液	实验结果			
		湛江安度斯生物有限公司	厦门鲎试剂生物科技有限公司	福州新北生化试剂有限公司	BET 水稀释后样品状态
乙醇(无水乙醇)	T	--	--	--	浑浊溶液
	PPC	--	--	--	
20%正己烷+80%乙醇(无水乙醇)	T	--	--	--	澄清溶液,有白色块状物析出
	PPC	--	--	--	

注: T-样品溶液; PPC-阳性样品对照; "--" -阴性。
Note: T-test sample; PPC-positive product control; "--"-negative.

根据上述结果得出,使用乙醇(无水乙醇)和 20%正己烷+80%乙醇(无水乙醇)溶解后的胆固醇,使用细菌内毒素检查用水稀释,样品均存在干扰,但 20%正己烷+80%乙醇(无水乙醇)使用细菌内毒素检查用水稀释后,溶液有白色块状物析出,有内毒素被包裹在胆固醇中的可能性,不能准确测出其内毒素含量。因此,选取乙醇(无水乙醇)溶解胆固醇进行后续试验。

2.1.3 稀释剂的筛选 选用乙醇(无水乙醇)溶解胆固醇,配制成 20 mg·mL⁻¹ 溶液;样品 PPC 采取 10 μL 400 EU·mL⁻¹ 内毒素标准溶液加入到上述制备的 1 mL 胆固醇溶液(20 mg·mL⁻¹)中,并用 4 种稀释剂 9 种不同方法平行对上述制备的样品及样品阳性对照进行 64 倍稀释,筛选出可以用于排除干扰,准确测出内毒素含量的实验方案。结果为使用 2 个厂家的鲎试剂阴性试验均为阴性,阳性试验均为阳性,使用 9 种不同方法稀释的结果见表 2。

表 2 9 种不同方法稀释样品的干扰预实验

Tab. 2 Interference pre-experiment of 9 different dilution methods

序号	两步稀释方法		试液	实验结果	
	第一步稀释 8 倍使用的稀释液	第二步稀释 8 倍使用的稀释液		湛江安度斯生物有限公司	福州新北生化试剂有限公司
1	分散剂	水	T	--	--
			PPC	++	--
2	分散剂	分散剂	T	--	--
			PPC	--	--
3	20%人血白蛋白	水	T	--	--
			PPC	--	--
4	PBS	水	T	--	--
			PPC	--	--
5	1 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	水	T	--	--
			PPC	++	+-
6	0.1 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)/水	水	T	--	--
			PPC	--	--
7	0.1 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	0.1 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	T	--	--
			PPC	--	--
8	0.5 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	0.5 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	T	--	--
			PPC	++	--
9	1 mg·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	0.1 ng·mL ⁻¹ 聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL35)	T	--	--
			PPC	++	--

注: T-样品溶液; PPC-阳性样品对照; “-” -阴性; “+” -阳性。
Note: T-test sample; PPC-positive product control; “-”-negative; “+”-positive.

根据上述结果得出, 共有 4 种方法, 通过使用湛江安度斯生物有限公司的鲎试剂对试验无干扰, 它们分别是: 分别使用 0.5 mg·mL⁻¹ EL35 稀释 2 次 8 倍(简称方法 A); 先用 1 mg·mL⁻¹ EL35 稀释 8 倍再用 BET 水稀释 8 倍(简称方法 B); 先用分散剂稀释 8 倍再用 BET 水稀释稀释 8 倍(简称方法 C); 先用 1 mg·mL⁻¹ EL35 稀释 8 倍再用 0.1 mg·mL⁻¹ EL35 稀释 8 倍(简称方法 D), 但上述 4 种方法使用新北生化试剂有限公司的鲎试剂仍存在干扰。其余剩下的 5 种稀释方法, 使用 2 个厂家的鲎试剂对试验均有干扰。

2.1.4 方法适用性的确定 根据细菌内毒素检查法应用指导原则中规定, 应使用 2 个生产厂家的鲎试剂对 3 批样品进行干扰试验, 因此使用乙醇(无水乙醇)溶解胆固醇, 配制成 20 mg·mL⁻¹ 溶液; 样品 PPC 采取 10 μ L 400 EU·mL⁻¹ 内毒素标准溶液加入到上述制备的 1 mL 胆固醇溶液(20 mg·mL⁻¹) 中, 再用筛选出的 4 种稀释方法, 对 3 个批次的胆固醇样品, 用 3 个厂家的鲎试剂再次进行筛选, 最终找出可以是排除干扰因素的实验方法。实验结果为 3 个厂家鲎试剂阴性试验均为阴性, 阳性试验均为阳性, 使用 3 个批次样品溶解的具体结果见表 3。

表 3 4 种不同方法稀释样品的干扰预实验

Tab. 3 Interference pre-test of samples diluted by 4 different methods

稀释方法	样品批号	实验结果					
		湛江安度斯生物有限公司		厦门鲎试剂生物科技有限公司		福州新北生化试剂有限公司	
		样品	PPC	样品	PPC	样品	PPC
方法 A	I10171001	--	++	--	--	--	--
	I10171002	--	++	--	--	--	--
	I10171003	--	++	--	--	--	--
方法 B	I10171001	--	++	--	--	--	--
	I10171002	--	++	--	--	--	--
	I10171003	--	++	--	--	--	--
方法 C	I10171001	--	++	--	--	--	--
	I10171002	--	++	--	--	--	--
	I10171003	--	++	--	--	--	--
方法 D	I10171001	--	++	--	--	--	--
	I10171002	--	++	--	--	--	--
	I10171003	--	++	--	--	--	--

注: “-” -阴性; “+” -阳性。
Note: “-”-negative; “+”-positive.

以上 4 种方法仅能使湛江安度斯生物有限公司的鲎试剂才能排除干扰。并且本实验已经使用了凝胶法中灵敏度(0.03 EU·mL⁻¹)最高的鲎试剂。

鉴于鲎试剂作为一种生物试剂, 不同生产厂家工艺不同, 批间差异较大。一般建立法定方法应能使用 ≥ 2 个厂家鲎试剂进行检测, 但目前该品种只能使用 1 个厂家最高灵敏度的试剂进行检测。因此, 胆固醇不建议使用凝胶法进行检测。

2.2 光度测定法

2.2.1 标准曲线可靠性验证试验 按照中国药典 2015 年版四部^[5]1143 细菌内毒素检查法中标准曲线的可靠性试验。本次试验使用 3 个厂家动态浊度法鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, 福州新北生化试剂有限公司, 厦门鲎试剂生物科技有限公司), 结果显示, 在 10, 1, 0.1, 0.01 EU·mL⁻¹ 4 个浓度的标准曲线中, 3 个厂家鲎试剂的相关系数(r)的绝对值分别为 0.999, 0.997, 0.999, 鲎试剂的标准曲线可靠性试验复核规定, 可用于细菌内毒素检查。

2.2.2 干扰试验 经过凝胶法预实验研究, 选择操作相对简便的方法 A 聚氧乙烯(35)蓖麻油分散法进行动态浊度法研究。

2.2.2.1 样品溶液的配制 取胆固醇约 400 mg, 用无水乙醇配制成 20 mg·mL⁻¹ 溶液, 必要时加热到 60 $^{\circ}$ C 加快溶解, 制备成供试品原液。

2.2.2.2 标准曲线稀释 取内毒素国家标准品, 用细菌内毒素检查用水稀释至 10, 1, 0.1, 0.01 EU·mL⁻¹ 4 个浓度, 每个浓度 2 个平行孔, 加入动态浊度法鲎试剂中。

2.2.2.3 样品 MVD 的计算 公式： $MVD=L\times C/\lambda$ 其中 L 为胆固醇的细菌内毒素限值 $0.10\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ ， C 为胆固醇样品溶液的浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ， λ 为标准曲线最低点的浓度，即 $0.01\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (此批鲎试剂可检测内毒素范围在 $10\sim0.01\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

则胆固醇的 MVD 为 $MVD=0.1\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}\times 20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}/0.01\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}=200$ 倍。

2.2.2.4 样品溶液的制备 取 0.1 mL 供试品原液加入 0.9 mL 的 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 聚氧乙烯(35)蓖麻油水溶液，混匀得到供试品原液的 10 倍稀释液，取 0.1 mL 供试品原液的 10 倍稀释液加入 0.9 mL 的 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 聚氧乙烯(35)蓖麻油水溶液，混匀得到

100 倍稀释液，平行 2 孔，加入动态浊度法鲎试剂中。

2.2.2.5 样品阳性对照 取细菌内毒素国家标准品用内毒素检查用水配制成 $1\,000\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液，取 $1\,000\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内毒素标准溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 加入到 1 mL 胆固醇溶液($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)中，混匀，得含标准内毒素 $10\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的胆固醇溶液，即供试品 PPC 原液；按照样品溶液制备方法，制备得到供试品 PPC 原液 100 倍的稀释液，平行 2 孔，加入动态浊度法鲎试剂中。

2.2.2.6 结果 标准曲线 $|r|>0.980$ ，阴性反应时间>标准曲线最低点反应时间，样品内毒素的回收率结果见表 4。

表 4 样品溶液的细菌内毒素检查

Tab. 4 Bacterial endotoxin test of sample solution

样品批号	湛江安度斯生物有限公司鲎试剂 (批号: 1903290)			厦门鲎试剂生物科技有限公司鲎试剂 (批号: 170924)			福州新北生化试剂有限公司鲎试剂 (批号: 17102212)		
	回收率/%	样品内毒素 浓度/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	内毒素含量/ $\text{EU}\cdot\text{mg}^{-1}$	回收率/%	样品内毒素 浓度/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	内毒素含量/ $\text{EU}\cdot\text{mg}^{-1}$	回收率/%	样品内毒素 浓度/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$	内毒素含量/ $\text{EU}\cdot\text{mg}^{-1}$
I10171001	96.6	<1	<0.05	32.7	/	/	92.7	<1	<0.05
I10171002	100.8	<1	<0.05	36.0	/	/	114.4	<1	<0.05
I10171003	98.2	<1	<0.05	34.8	/	/	98.1	<1	<0.05

使用湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化试剂有限公司的试剂生产的鲎试剂回收率结果在 $50\%\sim200\%$ ，在此条件下供试品溶液不存在干扰；而厦门鲎试剂生物科技有限公司生产的试剂回收率结果< 50% ，干扰实验不通过。即胆固醇能使用 2 个厂家鲎试剂(使用湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化试剂有限公司的试剂生产的鲎试剂)进行动态浊度法检测。

2.3 细菌内毒素检查

选择湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化试剂有限公司的鲎试剂，样品原液稀释 100 倍，限值 L 按 $<0.1\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 为判定标准，对上述 3 批胆固醇细菌内毒素进行检查，结果见表 4。由表 4 试验结果可以得出： 3 批样品均符合规定。

3 讨论

胆固醇不溶于水，无法直接溶解在水中进行细菌内毒素检查，且胆固醇作为脂质体的包裹载体，可将自身以及药品生产过程中的内毒素随机包裹，无法确定是否彻底释放内毒素，如不能完全释放与鲎试剂反应后将产生假阴性的结果。因此，需要使用适合的助溶剂使胆固醇成为澄清溶液，再进行细菌内毒素检查。本研究采用 20% 正己烷+ 80% 乙醇(无水乙醇)时发现，将胆固醇配制成 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 母液时，使用最大有效稀释倍数稀释后， 2 种浓度的母液均有白色块状物析出，说明存

在干扰的不是助溶剂本身，而是白色析出物。

细菌内毒素标准品为含有乳糖和聚乙二醇 $8\,000$ 作为辅料的冻干制剂，只能用水来溶解，因此药典中规定的供试品阳性对照难以制备。笔者课题组根据其特点，选取无水乙醇为助溶剂，聚氧乙烯(35)蓖麻油为分散剂稀释，使用动态浊度法，准确测出内毒素含量，解决了胆固醇中内毒素无法添加和排除干扰的问题，最终确定胆固醇采用细菌内毒素检查是可行的，能够采用细菌内毒素检查法进行质量控制，确定其质量标准为限值应< $0.1\text{ EU}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。为进一步对难溶于水的药物及辅料的细菌内毒素方法学研究提供实验数据和参考依据。

REFERENCES

- [1] ZENG C, HUANG W, HE C H, et al. Composite phospholipids liposomes: research advances[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2015, 42(1): 91-95.
- [2] ZHONG L, LOU X F. Preparation of long-circulating cationic teniposide-containing liposomes[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2017, 32(6): 771-774.
- [3] LI R, CHEN L, QI J, et al. Preparation of DNA photolyase liposome from Antarctic ice microalgae and its quality evaluation[J]. Chem Bioeng(化学与生物工程), 2017, 34(10): 25-31.
- [4] 张强, 武凤兰. 药剂学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 95-96, 470-480.
- [5] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 154-156.

收稿日期: 2022-01-20

(本文责编: 沈倩)