

聚氧乙烯 35 蓖麻油的 UPCC-Q-TOF-MS 成分分析与安全性初探

李 婷^{1#}, 王 珏^{1#}, 袁 铭², 孙会敏^{1*}

- (1. 国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室, 中国食品药品检定研究院, 北京 100050;
2. 沃特世科技有限公司, 上海 201206)

摘要: 建立 UPCC-Q-TOF-MS 法分析聚氧乙烯 35 蓖麻油 (polyoxyethylene 35 castor oil, CrEL) 成分, 并初探样品的安全性。采用 Acquity UPCC Torus Diol 色谱柱 (3.0 mm×100 mm, 1.7 μm), 以 CO₂ 和甲醇-乙腈 (50:50) 为流动相, 梯度洗脱, 柱温 50 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 背压 2 000 psi, 以含 2.5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵的甲醇为离子化试剂, 离子化试剂流速 0.2 mL·min⁻¹, 电喷雾正离子电离连同 MS^E 技术, 结合 Progenesis QI 软件进行快速结构确证及建立主成分分析 (PCA) 模型。以 L-02 细胞和 RBL-2H3 细胞作为细胞模型考察样品的细胞毒性和组胺释放。得到分离良好的 13 类成分, 共 255 个化合物; 以归一化法计算, 所有样品中定义成分聚氧乙烯甘油三蓖麻油酸酯 (polyoxyethylene glycerol tri-ricinoleate, PGTri-蓖麻油酸酯) 仅占 0.36%~2.80%, 主要成分为聚乙二醇、乙氧基化甘油和聚氧乙烯甘油单蓖麻油酸酯。所有样品均存在不同程度的细胞毒性和组胺释放, 与 PGTri-蓖麻油酸酯含量负相关, 与聚氧乙烯脂肪酸酯含量正相关。UPCC-Q-TOF-MS 法简单快速、分离能力强且准确性高, 适用于分析 CrEL 成分; 建议对注射用 CrEL 标准补充脂肪酸组成检查项, 提高 PGTri-蓖麻油酸酯含量和降低聚氧乙烯脂肪酸酯含量, 从而提高产品安全性。

关键词: 聚氧乙烯 35 蓖麻油; 超高效合相色谱; 四级杆飞行时间质谱; L-02 细胞; RBL-2H3 细胞

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)11-2688-07

Safety study and compositional analysis of polyoxyethylene 35 castor oil by UPCC-Q-TOF-MS

LI Ting^{1#}, WANG Jue^{1#}, YUAN Ming², SUN Hui-min^{1*}

- (1. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;
2. Waters Corporation, Shanghai 201206, China)

Abstract: A UPCC-Q-TOF-MS method was established to analyze the components of polyoxyethylene 35 castor oil. The separation was performed at 50 °C on a Waters Acquity UPCC system by an Torus Diol column (3.0 mm × 100 mm, 1.7 μm) with gradient elution of CO₂ and methanol – acetonitrile (50:50); the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the back pressure was 2 000 psi, and methanol containing 2.5 mmol·L⁻¹ ammonium formate was used as ionization reagent, whose flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. Positive ion electrospray ionization (ESI) mode and MS^E technology were used. The qualitative analyses were carried out by using precise mass information of the parent and product ions and a PCA model was established by UPCC-Q-TOF-MS. L-02 cells and RBL-2H3 cells were used to study the cytotoxicity and histamine release of CrEL samples *in vitro*. A total of 13 kinds of CrEL components were obtained and their structures were identified by UPCC-Q-TOF-MS, with 255 compounds in total. The percentage content of 13 types of components was calculated by the normalization method. The content of polyoxyethylene glycerol tri-ricinoleate (PGTri-ricinoleate) in all samples was 0.36% – 2.80% and the main

收稿日期: 2020-04-30; 修回日期: 2020-06-10.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2017ZX09101001006).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-67095721, E-mail: sunhm@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0670

components were polyethylene glycol, polyethylene glycerol and polyoxyethylene glycerol mono-ricinoleate. All samples have different degrees of cytotoxicity and histamine release, which is negatively correlated with the content of PGTri-ricinoleate and positively correlated with the content of polyoxyethylene glycol fatty acid esters. The UPCC-Q-TOF-MS method is simple and rapid, has strong separation ability and high accuracy. It is suitable for the analysis of CrEL components. It is suggested that the fatty acid composition should be included in the monograph of CrEL for injection to increase the content of PGTri-ricinoleate and decrease the content of polyoxyethylene glycol fatty acid esters, so as to improve the product safety.

Key words: polyoxyethylene 35 castor oil; ultraperformance convergence chromatography; quadrupole time-of-flight mass spectrometry; L-02 cell; RBL-2H3 cell

聚氧乙烯 35 蓖麻油 (polyoxyethylene 35 castor oil, CrEL) 是一种非离子型表面活性剂, 常作为口服、眼部和注射制剂的乳化剂或增溶剂, 尤其在注射剂和大输液中, 单位剂量中的最大用量可达到 50% 以上, 属于高风险性药用辅料^[1]。根据《中国药典》2015 年版四部^[2], CrEL 系聚氧乙烯甘油三蓖麻酸酯 (polyoxyethylene glycerol tri-ricinoleate, PGTri-蓖麻油酸酯), 起始物料为甘油、环氧乙烷和蓖麻油^[3], 合成工艺见图 1。事实上因原料蓖麻油脂肪酸组成多样^[4]、环氧乙烷聚合度的差异和酯化程度的不同, CrEL 实际是复杂的混合物, 其组成复杂, 存在结构相似和异构体, 致使分离分析困难, 缺乏快速有效的测定手段。

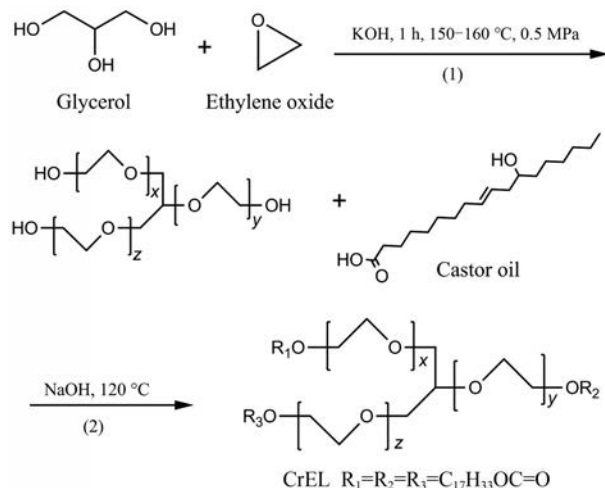


Figure 1 Manufacturing process of polyoxyethylene 35 castor oil (CrEL)

有人用高效液相色谱法测定血液中 CrEL 和 CrEL 中聚乙二醇 (PEG)、蓖麻油酸的含量^[5-8]; 还有研究者通过反相制备型液相色谱分离 CrEL 得到 17 个混合馏分, 用于探究各馏分与逆转多药耐药、氨基酸转运和细胞毒性的相关性^[9]; 也有用胶束电动毛细管色谱-间接紫外检测器法对其进行分离, 再通过延时萃取基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱法 (DE-MALDI-

TOF-MS) 进行定性分析^[10]。人们在上述研究中获取许多对 CrEL 的认知, 然而还是因各种方法自身的局限, 如前处理复杂、成本高、耗时长等, 无法对 CrEL 成分进行快速分离和准确分析。

超高效合相色谱 (ultraperformance convergence chromatography, UPCC) 是建立在成熟的超高效液相色谱 (UPLC) 之上, 以绿色经济的超临界流体 CO_2 作为主要流动相的超临界流体色谱 (SFC), 它兼具气相色谱和超高效液相色谱的特点, 与四级杆飞行时间质谱 (Q-TOF-MS) 等高分辨质谱串联后, 大大提高检测灵敏度, 同时扩大了分析研究的范围。与常规反相超高效液相色谱相比, UPCC 法具有选择性更高、柱效更优、洗脱程序更佳且分析速度更快的优点, 更适用于疏水性较强的物质^[11,12], 还可与 Progenesis QI 分析软件联用, 通过正交偏最小二乘判别法 (OPLS-DA) 快速评价不同来源产品的质量^[13]。因此, 本实验建立 UPCC-Q-TOF-MS 法分析 CrEL 成分。

CrEL 在临床应用中出现了较多不良反应, 如细胞毒性、急性超敏反应、神经毒性、溶血等^[8,14-17], 这些毒性的产生与哪些成分相关的深层次研究相对较少。而注射用 CrEL 引起的过敏反应现已证实属于由补体激活所引起的急性超敏反应^[18], 且与自身成分有关, 主要是乙氧基化和酯化的不饱和脂肪酸或羟化脂肪酸^[19]。为了初步探究 CrEL 产品的安全性, 本研究选用 L-02 细胞为模型考察其体外细胞毒性; 采用 RBL-2H3 细胞作为肥大细胞模型细胞, β -氨基己糖苷酶作为组胺的体外评价指标, 以评价产品的细胞致敏性, 该方法成熟、简便经济、应用广泛且结果稳定性好^[20,21]。

材料与方法

仪器与材料 Acquity 超高效合相色谱仪和 Vion IMS 四级杆飞行时间质谱 (美国沃特世科技有限公司); Forma371 型 CO_2 培养箱和 Multifuge X3R 离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); IX53 倒置荧光显微镜 (日本奥林巴斯); SpectraMax iD3 多功能酶标仪 (美国 MD

公司); Progenesis QI 软件; SoftMax Pro 软件; Origin Pro 软件; CrEL (A、B、C、D、E、F、G、H 8 个厂家, 共 22 批次, 平均相对分子质量为 2 472); 色谱纯甲醇、乙腈和甲酸铵 (德国 Merck 公司); 二氧化碳 (>99.99%, 北京市北氧特种气体研究所有限公司); L-02 细胞 (中国医学科学院肿瘤细胞库); RBL-2H3 细胞 (北纳创联生物科技有限公司); 1640 培养基、MEM (minimum essential medium) 培养基、胎牛血清、双抗和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (美国 Gibco 公司); PBS (美国 HyClone 公司); MTS 染色液 (美国 Progenia 公司); 改良 Tyrode 液 (北京雷根生物技术有限公司, 批号: 0704A18); Compound48/80 (批号: 017M4089V) 和对硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷 (美国 Sigma 公司); TritonX-100 (美国 Amresco 公司); 柠檬酸钠、柠檬酸、碳酸氢钠、碳酸钠均购于国药集团化学试剂有限公司; 生理盐水注射液 (石家庄四药有限公司); 细胞培养用 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

UPCC-Q-TOF-MS 法确证 CrEL 成分结构

CrEL 供试品溶液的配制 取 CrEL 样品适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 制得浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

色谱条件 色谱柱: Acquity UPCC Torus Diol (3.0 mm \times 100 mm, 1.7 μm , 130 A); 流动相: A: CO_2 , B: 甲醇-乙腈 (50:50), 梯度洗脱程序: 0~0.2 min, 94% A; 0.2~18 min, 94% A~75% A; 18~22 min, 75% A~55% A; 22~22.5 min, 55% A~94% A; 22.5~25 min, 94% A; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 离子化试剂: 甲醇 + $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵; 离子化试剂流速: $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; 背压: 2 000 psi (1 psi \approx 6.9 kPa)。

质谱条件 离子化方式: ESI; 离子极性: ES^+ ; 毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: $120 \text{ }^\circ\text{C}$; 采样锥电压: 40 V; 雾化气温度: $500 \text{ }^\circ\text{C}$; 雾化气流速: $900 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 采集模式: MS^E 。

Progenesis QI 数据处理 UPCC-Q-TOF- MS^E 采集样品中各成分的分子离子和碎片离子信息, 采用 Progenesis QI 软件进行结构确证, 导入质谱数据后, 选择参比样品 (A1), 进行保留时间校准; 创建“汇总运行”, 涵盖所有样品中的化合物离子; 选择分析峰和加合离子 (NH_4^+ 、 Na^+ 、 H^+) 与电荷 (1~3 价) 去卷积, 确定中性母离子; 最后使用 MetaScope 检索工具, 对 CrEL 成分进行鉴定。

L-02 细胞毒性实验

样品储备液配制 分别称取 CrEL 样品适量, 用生理盐水注射液溶解, 制得浓度为 $10\ 000 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品储备液。

细胞培养 L-02 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 将 L-02 细胞置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中无菌培养。细胞呈单层贴壁生长, 每 2~3 天传代一次, 传代时用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 室温下消化 2~3 min。

MTS 实验 采用 MTS 法检测不同浓度的 CrEL 样品对 L-02 细胞的细胞毒性。取浓度为每毫升 1×10^5 个的 L-02 细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 。24 h 贴壁后, 弃去孔液, 加入不同浓度的样品溶液 (由 1640 培养基稀释样品储备液制得), 每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 设置 6 个复孔。培养 24 h 后, 加 MTS 溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 继续培养 3 h。选择 490 nm 作为检测波长, 650 nm 作为参比波长, 测定各孔吸光度 (A) 值。用 SoftMax Pro 软件处理结果, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制细胞抑制率曲线, 得到半最大效应浓度 (EC_{50})。 EC_{50} 值越大, 说明样品的体外细胞毒性越小。

RBL-2H3 细胞致敏性实验

阳性对照溶液配制 称取 Compound48/80 适量, 用改良 Tyrode 液 ($137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾, $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白, pH 7.4) 溶解, 制得浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阳性对照溶液。

样品溶液配制 分别称取 CrEL 样品适量, 用改良 Tyrode 液溶解, 制得浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品溶液。

细胞培养 RBL-2H3 细胞培养于含 15% 胎牛血清的 MEM 培养基, 将 RBL-2H3 细胞置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中无菌培养。细胞呈单层贴壁生长, 每 2~3 天传代一次, 传代时用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 室温下消化 2~3 min。

实验方法 取浓度为每毫升 2×10^5 个的 RBL-2H3 细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 $200 \text{ } \mu\text{L}$, 24 h 贴壁后, 弃去孔液, 用改良 Tyrode 液洗 2 遍, 加入各种受试液: ① 阴性对照组加入改良 Tyrode 液; ② 阳性对照组加入阳性对照溶液; ③ 裂解组加改良 Tyrode 液; ④ 试验组加入各组样品溶液, 每孔 $200 \text{ } \mu\text{L}$, 设置 3 个复孔; 孵育 1 h 后, 置于冰上 10 min 终止反应。裂解组相应的复孔中加入 $40 \text{ } \mu\text{L}$ 1.2% TritonX-100, 冰上裂解 10 min, 获得细胞裂解液; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。分别取细胞上清 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 或细胞裂解液 $60 \text{ } \mu\text{L}$, 转移至新 96 孔板, 在各组细胞上清液及阴性对照中加入 1.2% TritonX-100 溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 补齐体积至 $60 \text{ } \mu\text{L}$ 。各孔加入底物 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷 + $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液, pH 4.5)

60 μL ; 孵育 1 h 后, 每孔加入终止液 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 , 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 缓冲液, pH 10.7) 150 μL 终止反应, 于 405 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算 β -氨基己糖苷酶释放率 (%), 见式 (1)。释放率越高, 说明样品的组胺释放越大, 细胞致敏性越大。

$$\beta\text{-氨基己糖苷酶释放率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{裂解}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

Person 相关性分析 采用 Origin Pro 软件分析 CrEL 中 13 类成分含量与其细胞毒性和组胺释放的 Person 相关性, * $P < 0.05$ 表示相关性良好。

结果

1 UPCC-Q-TOF-MS 法测定 CrEL 各成分及建立主成分分析 (PCA) 模型

本文中 CrEL 各成分形成了 3 种分子离子 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 以一价、二价和三价的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 的分子离子及对应的碎片离子数据为主, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的分子离子及对应的碎片离子数据为辅, 利用 Progenesis QI 软件将其还原为中性质量, 排除共流出成分干扰。由于不同系列成分在各自保留时间范围且有规律, 质量误差小于百万分之五, 因此以保留时间和 m/z 作为定性评判标准, 根据原料和合成工艺整理所有系列成分的元素组成, 形成数据库, 通过元素组成与目标成分匹配进行结构确证。

1.1 CrEL 成分表征 UPCC-Q-TOF-MS 分离 CrEL 峰强度 (base peak intensity, BPI) 色谱图见图 2, 分析结果表明 CrEL 含 13 类成分共 255 个化合物, 分别为 PEG、乙氧基化甘油 (PG)、聚氧乙烯甘油单蓖麻油酸酯 (PGM-蓖麻油酸酯)、聚氧乙烯甘油二蓖麻油酸酯 (PGD-蓖麻油酸酯)、PGTri-蓖麻油酸酯、聚氧乙烯甘油单亚油酸酯 (PGM-亚油酸酯)、聚氧乙烯甘油单棕榈酸酯 (PGM-棕榈酸酯)、聚氧乙烯蓖麻油酸酯 (PM-蓖麻油酸酯)、聚氧乙烯花生酸酯 (PM-花生酸酯)、聚氧乙烯

油酸酯 (PM-油酸酯)、聚氧乙烯亚油酸酯 (PM-亚油酸酯)、聚氧乙烯二蓖麻油酸酯 (PD-蓖麻油酸酯) 和聚氧乙烯二软脂油酸酯 (PD-软脂油酸酯) (表 1), 化学结构式见图 3, 其中定义成分 PGTri-蓖麻油酸酯的典型质谱图见图 4。

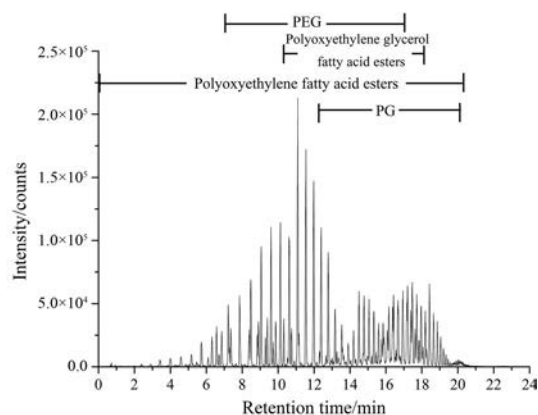


Figure 2 Base peak intensity chromatogram of CrEL

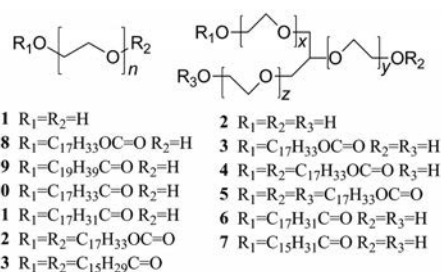


Figure 3 Chemical structures of 13 kinds of components in CrEL ($n = x+y+z$)

1.2 CrEL 样品组成比较 根据每类成分响应, 采用归一化法计算样品中 13 类成分的百分含量。结果显示, 所有样品中定义成分 PGTri-蓖麻油酸酯的含量极低, 仅占 0.36%~2.80%, 而 PEG、PG、PGM-蓖麻油酸酯的含量相对较高, 都大于 15%。按照化学结构式, 13 类成分可被统分为 4 大类: PEG、PG、聚氧乙烯甘油

Table 1 Information of 13 kinds of components in CrEL

No.	Name	Abbreviation	Molecular formula	n
1	Polyethylene glycol	PEG	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	9-32
2	Polyethylene glycerol	PG	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	16-43
3	Polyoxyethylene glycerol mono-ricinoleate	PGM-ricinoleate	$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_5(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	16-35
4	Polyoxyethylene glycerol di-ricinoleate	PGD-ricinoleate	$\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{O}_7(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	20-32
5	Polyoxyethylene glycerol tri-ricinoleate	PGTri-ricinoleate	$\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_9(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	25-29
6	Polyoxyethylene glycerol mono-linoleate	PGM-linoleate	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	19-39
7	Polyoxyethylene glycerol mono-palmitate	PGM-palmitate	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	24-32
8	Polyoxyethylene mono-ricinoleate	PM-ricinoleate	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	4-33
9	Polyoxyethylene mono-arachidate	PM-arachidate	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	37-60
10	Polyoxyethylene mono-oleate	PM-oleate	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	13-19
11	Polyoxyethylene mono-linoleate	PM-linoleate	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	3-33
12	Polyoxyethylene di-ricinoleate	PD-ricinoleate	$\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_5(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	5-33
13	Polyoxyethylene di-soft-oleate	PD-soft-oleate	$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$	13-28

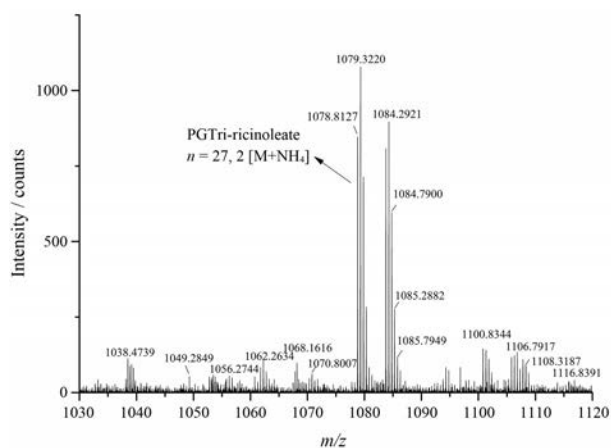


Figure 4 MS spectra of PGTri-ricinoleate ($n = 27, m/z = 1078.8127$)

脂肪酸酯和聚氧乙烯脂肪酸酯, 图5可见A、B、C和D厂家样品的批间一致性较好, E厂家E4样品与其他5批样品有较大差异, A、E4和G厂家样品与其他厂家样品有明显差异: PEG和聚氧乙烯脂肪酸酯含量明显高于其他样品, 而PG和聚氧乙烯甘油脂肪酸酯含量明显低于其他样品。

1.3 PCA模型 基于UPCC-Q-TOF-MS给出的各企业不同批次所含组分的种类和含量, 采用Progenesis QI软件对所有样品建立PCA模型, 结果显示8个厂家

的样品被分为5类, 分别为A、G、B/C/D/F/H、E (除E4) 和E4。其中, D样品为纯化级样品, E样品为注射级样品。如果能够进一步扩大样本量, 获取的分类意义会更加突出, 有望对未知样品的质量属性进行快速评估, 并可对样品进行分级, 如注射级和非注射级。

2 L-02细胞毒性EC₅₀值

图6显示, 所有样品均有体外细胞毒性, 其中A和G厂家样品的体外细胞毒性明显高于其他厂家样品。

3 β-氨基己糖苷酶释放率

选取低、中、高浓度 (100、125 和 150 mg·mL⁻¹) 刺激RBL-2H3细胞, 测定并计算β-氨基己糖苷酶释放率 (%)。结果显示, 3个浓度下所有样品均引起β-氨基己糖苷酶释放, 其中A和G厂家样品的释放率明显高于其他厂家样品 (图7)。

4 Person相关性分析

Pearson相关性结果显示, CrEL的细胞毒性和组胺释放与PGTri-蓖麻油酸酯含量负相关 (约-0.8*), 与聚氧乙烯脂肪酸酯含量正相关 (约0.9*), 说明PGTri-蓖麻油酸酯含量越高, 聚乙二醇脂肪酸酯含量越低, CrEL的细胞毒性和组胺释放越小, 与文献^[9]报道一致。其中, PM-蓖麻油酸酯 (约0.8*), PM-油酸酯 (约0.8*) 和PM-亚油酸酯 (约0.9*) 含量与CrEL的细胞毒

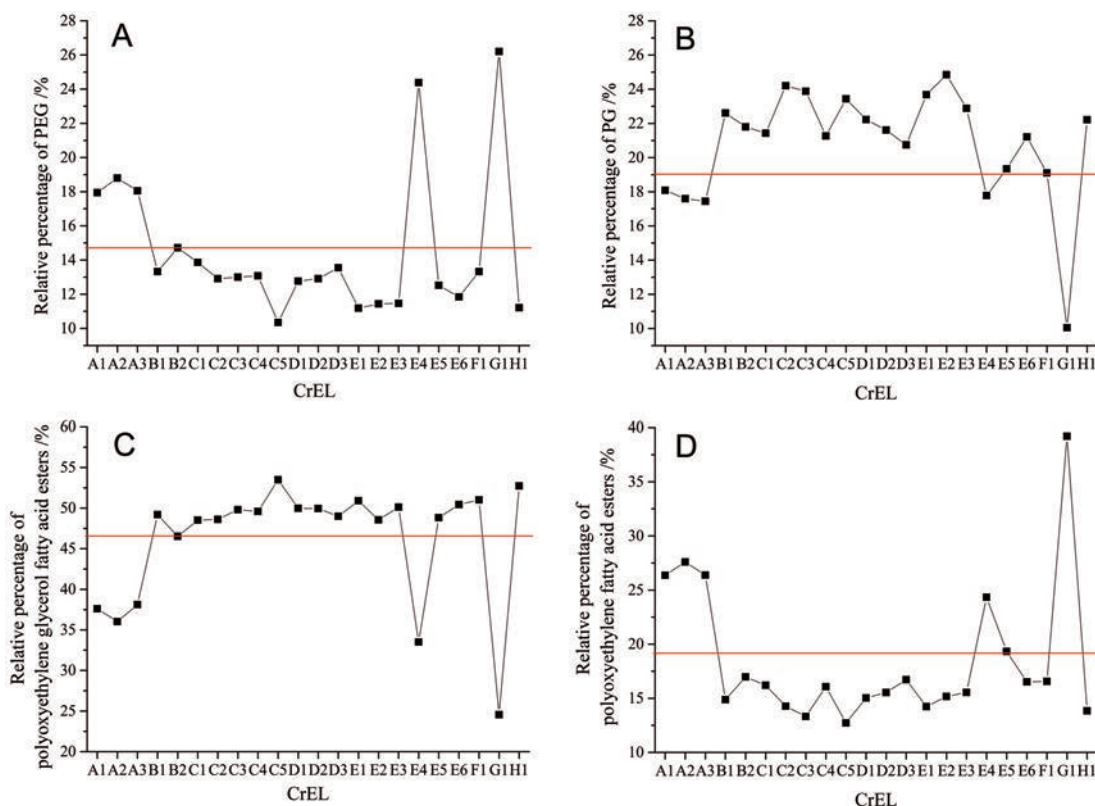


Figure 5 Relative percentage of components in CrEL samples. A: PEG; B: PG; C: Polyoxyethylene glycerol fatty acid esters; D: Polyoxyethylene fatty acid esters; A1–H1: CrEL samples

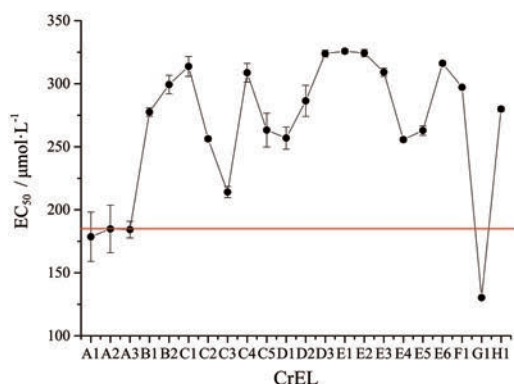


Figure 6 EC₅₀ of CrEL samples by L-02 cell ($n = 6, \bar{x} \pm s$). A1-H1: CrEL samples

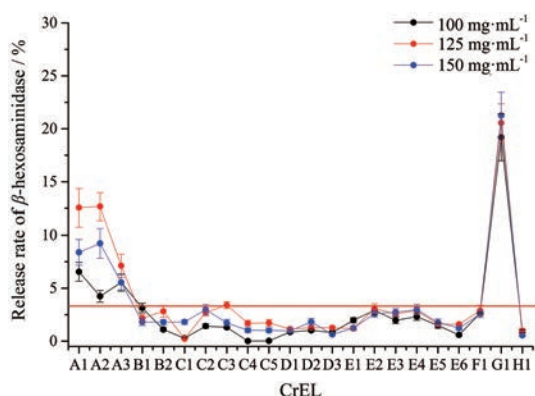


Figure 7 Release rate of β -hexosaminidase of CrEL samples by RBL-2H3 cell ($n = 3, \bar{x} \pm s$). A1-H1: CrEL samples

性和组胺释放有关, 该结论仍需进一步的实验研究。

讨论

CrEL 的组成与其生产原料蓖麻油纯度有关, 因此, 脂肪酸组成检查是原料源头控制的重要指标; 作为高风险制剂 (注射用、眼用) 中使用的 CrEL 需要对其进行质量风险评估, 而现行的中国药典标准中并未设置此检查项, 建议增加该项对主要脂肪酸含量进行控制, 提高生产原料蓖麻油的纯度, 控制定义成分 PGTri-蓖麻油酸酯和聚乙二醇脂肪酸酯的含量, 以减少产品带来的不良反应, 提高含 CrEL 制剂的临床用药安全性。

作者贡献: 孙会敏、王珏、李婷构思和设计实验; 李婷、袁铭进行实验并收集数据; 王珏、李婷完成初稿; 孙会敏、王珏修改文章; 所有作者都对文章内容负有主要责任。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

[1] FDA. Inactive Ingredient Database [EB/OL]. US: FDA, 2020 [2020-04-01]. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/>

index.cfm? event=BasicSearch.page.

- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 629-630.
- [3] Wu ML, Fu X, Pan JJ, et al. Preparation of high purity glycerol polyoxyethylene ricinoleate: CN, 201610597608.6 [P]. 2017-05-10.
- [4] Fan P. Separation and Purification of Biological Macromolecules from Castor Beans and Preparation of its Derivatives (蓖麻籽中生物大分子的分离纯化及其衍生物的制备) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2008.
- [5] Vijaya Bhaskar V, Middha A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitation of Cremophor EL and its applications [J]. Int J Anal Chem, 2013, 2013: 1-11.
- [6] Ghassempour A, Nabid MR, Talebi M, et al. Comparison of pyrolysis mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis of Cremophor EL in drugs and serum [J]. Talanta, 2003, 59: 435-441.
- [7] Sha M, Li HL, Zhou DM. Determination of polyethylene glycol in polyoxy (35) castor oil by HPLC [J]. Chem Ind Times (化工时刊), 2019, 33: 18-20.
- [8] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. Eur J Cancer, 2001, 37: 1590-1598.
- [9] Kessel D, Woodburn K, Decker D, et al. Fractionation of Cremophor EL delineates components responsible for plasma lipoprotein alterations and multidrug resistance reversal [J]. Oncol Res, 1995, 7: 207-212.
- [10] Meyer TH, Waidelich D, Frahm AW. Polyoxyethylene-delta(9, 11)-didehydrostearate and glycerol-polyoxyethylene-delta (9,11)-didehydrostearate: two new components of the non-ionic emulsifier Cremophor EL [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 30: 263-271.
- [11] Quanson JL, Stander MA, Pretorius E, et al. High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1031: 131-138.
- [12] Simeone JL, Rainville PD. Reducing phospholipids-based matrix interferences in bioanalytical studies using UPC²/MS/MS [EB/OL]. US: Waters Corporation, 2013 [2020-04-01]. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004707en.pdf>.
- [13] Hou JJ, Cao CM, Xu YW, et al. Exploring lipid markers of the quality of coix seeds with different geographical origins using supercritical fluid chromatography mass spectrometry and chemometrics [J]. Phytomedicine, 2018, 45: 1-7.
- [14] Yamaguchi JY, Nishimura Y, Kanada A, et al. Cremophor EL, a non-ionic surfactant, promotes Ca²⁺-dependent process of cell death in rat thymocytes [J]. Toxicology, 2005, 211: 179-186.
- [15] Kiss L, Walter FR, Bocsik A, et al. Kinetic analysis of the

- toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102: 1173-1181.
- [16] Gao P, Tu JS. Use and safety of polyoxyethylene castor oil [J]. *Pharm Clin Res (药学与临床研究)*, 2010, 18: 59-63.
- [17] Zhang Y, Zhao H, Wang X, et al. Effects of Cremophor EL/ethanol/oleinic acid/water microemulsion on human blood components and coagulation function [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 180: 254-262.
- [18] Weiszár Z, Czúcz J, Révész C, et al. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45: 492-498.
- [19] Lorenz W, Schmal A, Schult H, et al. Histamine release and hypotensive reactions in dogs by solubilizing agents and fatty acids: analysis of various components in cremophor EI and development of a compound with reduced toxicity [J]. *Agents Actions*, 1982, 12: 64-80.
- [20] Zhao Y, Li Q, Zhang XY. Study progress of type I anaphylaxis reaction and anaphylactoid reaction on the basis of RBL-2H3 cell models [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2010, 15: 1310-1315.
- [21] Guan CW, Jin J, Li J, et al. Study of degranulation induced by injective excipients in a rat mast (RBL-2H3) cell line [J]. *J Toxicol (毒理学杂志)*, 2012, 26: 98-101.