

文章编号:1000-582X(2008)03-0255-04

四种注射用氨基酸原料细菌内毒素的检查

杨善彬^{1,2,3}, 梅 虎^{1,2}, 孙宇阳⁴, 李志良^{1,2}

(1. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030; 2. 重庆大学 化学化工学院 药物化学研究所, 重庆 400030;
3. 宜宾学院 生物工程系, 四川宜宾 644000; 4. 重庆师范大学 化学学院 重庆 400030)

摘 要:通过鲎试剂的干扰试验,研究注射用氨基酸原料中细菌内毒素检查法的可行性。依据中国药典 2000 年版中细菌内毒素检查法进行操作。在 2~16 倍稀释级下, L-缬氨酸($c=2.5\%$)和 L-异亮氨酸($c=2.5\%$)对鲎试剂无干扰,检测细菌内毒素的鲎试剂灵敏度小于等于 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,而在 16 倍稀释级范围内, L-脯氨酸($c=4.5\%$)和 L-亮氨酸($c=2.0\%$)对鲎试剂检查法有抑制作用。实验表明注射用 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸用灵敏度为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲎试剂检查其细菌内毒素方法可行,可以代替家兔法检查热原。供注射用 L-缬氨酸细菌内毒素应小于 $0.04 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,显著高于中国药典 2005 年版的規定。

关键词:L-脯氨酸;L-缬氨酸;L-亮氨酸;L-异亮氨酸;细菌内毒素检查;干扰试验;鲎试剂
中图分类号:R927.12 **文献标志码:**A

Bacterial Endotoxin Test of Four Individual Amino Acids for Injection

YANG Shan-bin^{1,2,3}, MEI Hu^{1,2}, SUN Yu-yang⁴, LI Zhi-liang^{1,2}

(1. College of Bio-engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China; 2. Institute of Medicinal Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China;
3. Department of Bioengineering, College of Yibin, Yibin Sichuan 644000, P. R. China;
4. College of Chemistry, Chongqing Normal University, Chongqing 400030. P. R. China)

Abstract: The feasibility study is validated for examination of bacterial endotoxin in amino acids for injection by tachypleus amebocyte lysate (TAL) interference test. The test is carried out according to the method for examination of bacterial endotoxin on Chinese Pharmacopoeia (2000 edition). L-Valine ($c=2.5\%$) and L-isoleucine ($c=2.5\%$) do not show interference with TAL reagent in 2~16 folds diluted concentration, and the sensitivity for TAL is $0.5 \text{ EU} \cdot \text{ml}^{-1}$. However, L-proline ($c=4.5\%$) and L-leucine ($c=2.0\%$) display inhibition with TAL under 16 times diluted scales. The method proposed herein is feasible, and may replace the rabbit test for pyrogen. The limit value of endotoxin in L-valine for injection was $0.04 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, which is much less than the value ($5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$) of Chinese Pharmacopoeia (2005 edition).

Key words: L-proline; L-leucine; L-valine; L-isoleucine; bacterial endotoxin test; interference test; TAL reagent

临床上常因使用输注药液引起病人发热、冷感、寒战、恶心、呕吐、头痛、腰及四肢关节痛、肤色灰白、白细胞下降、血管通透性增强、昏迷甚至休克、死亡等一系列症状称为热原反应,所有能引起热原反应

的物质称为热原(pyrogen)。普遍认为革兰氏阴性细菌产生的内毒素是热原的主要来源^[1]。细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖成分,于细菌死亡解体后释放,在体内作用于单核巨噬细胞产生多

收稿日期:2007-12-01

作者简介:杨善彬(1963-),男,重庆大学博士研究生,主要从事药物设计、开发方向研究,(Tel)023-65106677;
(E-mail)shanbiny@126.com。

种炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子、白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-8、前列腺素、凝血素、干扰素、血小板激活因子等,这些因子适量时可激活免疫系统,对机体产生有益作用,过量时可引起机体严重的病理生理反应,表现为发热、低血压、心动过速、休克、多器官功能衰竭(MOF)及死亡。因此,检测细菌内毒素在药品质量控制和临床治疗监测中具有重要意义。鲎血变形细胞溶解物(tachypleus amebocyte lysate, TAL)与微量细菌内毒素产生凝胶反应而建立的鲎试剂细菌内毒素检查法自1980年正式载入美国药典开始^[2],已在英国、日本以及欧洲药典相继收载。中国药典(1990年版增补本)也开始收载^[3]。鲎试剂法以其灵敏、快速、简便、特异等优点代替家兔法检查热原已成为一种趋势,到2005年,中国药典已经公布的可用细菌内毒素检查法代替家兔热原检查试验的药品达195个^[4]。

复合氨基酸注射液用鲎试剂检查细菌内毒素的方法多见文献报道^[5-15],而制造复合氨基酸注射液的氨基酸原料用鲎试剂法检查其细菌内毒素则报道较少^[16-17]。依据中国药典“细菌内毒素检查法”^[18]对L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸4种注射用原料检查细菌内毒素。

1 材料

1.1 原料药

L-脯氨酸(批号20000801),由河北冀荣氨基酸公司提供;L-缬氨酸(批号20000909)、L-亮氨酸(批号20000802)、L-异亮氨酸(批号20000711)均由南宁市安力泰药业有限公司提供。原料药均用家兔法检查热原合格。

鲎试剂(TAL):灵敏度 λ 为0.5 EU·mL⁻¹, 0.5 mL·支⁻¹(批号000624); λ 为0.25 EU·mL⁻¹, 0.5 mL·支⁻¹(批号000908),均由厦门鲎试剂厂提供。

1.2 细菌内毒素工作标准品(CSE)

10 EU·支⁻¹(批号9908),中国药品生物制品检定所提供;细菌内毒素检查用水(WBET):内毒素含量小于0.01 EU·mL⁻¹, 2 mL·支⁻¹(批号000820),由厦门鲎试剂厂提供。

1.3 氯化钠注射液

经检查,内毒素含量小于0.25 EU·mL⁻¹(批号0011240351),由成都青山制药有限责任公司提供。

1.4 实验仪器

HHS-11型电热恒温水浴箱(苏州大隆仪器仪表有限公司),DHG-9053A台式鼓风干燥箱(南京

昕航科学仪器有限公司),微量移液器(上海金林生化试剂仪器厂),ZH-2型旋涡混合器(天津药典标准仪器厂)。实验器具均需彻底清洗干净,于250℃烘烤至少1h除去热原,并自然冷却。

2 原理、方法与结果

2.1 原理

热原主要来自细菌内毒素,细菌内毒素由细胞壁上的脂多糖组成,内毒素的量用内毒素单位(EU)表示。鲎血细胞溶解物中的凝固酶原,能够被微量的细菌内毒素激活生成凝固酶,促使可凝蛋白向凝固蛋白转化,最终形成凝胶样物质。中国药典细菌内毒素检查法即是利用鲎试剂与细菌内毒素的凝聚反应是否生成坚实凝胶判断样品所含内毒素大于(用“+”)或小于(用“-”)限值。

2.2 方法

取装有0.1 mL鲎试剂溶液的10 mm×75 mm试管5支,其中2支加入0.1 mL按最大有效稀释倍数稀释的供试品溶液,1支加入0.1 mL内毒素溶液作为阳性对照管,1支加入0.1 mL细菌内毒素检查用水作为阴性对照,1支加入0.1 mL供试品阳性对照溶液(供试品溶液加内毒素溶液,做干扰试验者不设此管)。将试管轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入(37±1)℃的恒温器中,保温(60±2) min后,将试管取出,缓缓倒转180°,若管内凝胶不变形、不从管壁脱落为阳性(用“+”),凝胶不能保持完整并从管壁脱落为阴性(用“-”),阳性对照管和供试品阳性对照管应为(+),阴性对照管应为(-),否则试验无效。

2.3 鲎试剂(TAL)灵敏度复核

按中国药典2000年版细菌内毒素检查法中规定进行。标示度 $\lambda_b = 0.5$ EU·mL⁻¹和 $\lambda_b = 0.25$ EU·mL⁻¹的灵敏度复核结果见表1,均在0.5~2.0 λ_b 范围内,符合药典规定。

表1 TAL灵敏度复核结果 EU·mL⁻¹

CSE 浓度	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	阴性对照	测定值
$\lambda_b = 0.5$	++++	+++	----	----	----	-	0.59
$\lambda_b = 0.25$		++++	+++	----	----	-	0.30

2.4 细菌内毒素限值(L)的计算

按公式 $L = K/M$, K 为按规定途径给药临床无任何不良反应的细菌内毒素阈剂量,静脉注射的 K 为5 EU·(kg·h)⁻¹; M 为人用最大剂量,大容量注射液的细菌内毒素限值计算时 M 为10 mL·(kg·h)⁻¹,中国药典2000年版收载4种氨基

算原料热原检查项均规定 1 kg 家兔注射 10 mL,故此 $L=0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 有效稀释倍数(D)的计算

根据中国药典 2000 年版 $D=L/\lambda$,已求得 L 为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 鲎试剂灵敏度 λ 为 $0.5 \sim 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,故 4 种氨基酸原料有效稀释倍数 D 为 $1 \sim 16$ 。

2.6 最大非干扰浓度的测定

分别用氯化钠注射液溶解 L-脯氨酸 ($c = 4.5\%$), L-缬氨酸 ($c = 2.5\%$), L-亮氨酸 ($c = 2.0\%$), L-异亮氨酸 ($c = 2.5\%$),再用 WBET 分别将其稀释至 2~16 倍系列,用 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ TAL 进行如下试验:分别将 4 个品种的各个稀释级 0.5 mL 溶解 TAL,然后每管加入 $1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CSE 0.1 mL 作为供试阳性系列;用 WBET 溶解 TAL 后,分别加入对应品种的稀释液作为供试阴性系列;按中国药典 2000 年版规定设阳性对照和阴性对照管。试验结果见表 2。

由表 2 结果得知,供试阴性均为“-”,说明 4 种氨基酸在各稀释级下无可测出的内毒素,依据中国药典 2000 年版判断能用于干扰试验。L-脯氨酸与 L-亮氨酸因阳性对照为“-”,在 16 倍稀释范围内对细菌内毒素的凝聚试验有抑制作用,以目前鲎试剂灵敏度范围不能用内毒素检查法测试。L-缬氨酸在各稀释级下阳性对照为“+”,说明无干扰,而 L-异亮氨酸稀释级 2 倍以上阳性对照为“+”,说明稀释 2 倍以上可排除干扰。即在 2~16 倍稀释级下,L-缬氨酸 ($c = 2.5\%$) 和 L-异亮氨酸 ($c = 2.5\%$) 对鲎试剂无干扰。

表 2 4 种氨基酸最大非干扰浓度的测试结果

品名	试管名	稀释倍数					阳性对照	阴性对照
		1	2	4	8	16		
L-脯氨酸	供试阳性	-----					+	-
	供试阴性	-----						
L-缬氨酸	供试阳性	++	++	++	++	++	+	-
	供试阴性	-----						
L-亮氨酸	供试阳性	-----					+	-
	供试阴性	-----						
L-异亮氨酸	供试阳性	---	++	++	++	++	+	-
	供试阴性	-----						

2.7 干扰试验

按中国药典 2000 年版设计方案如下:以 L-缬氨酸 ($c = 2.5\%$)、L-异亮氨酸 ($c = 1/2 \times 2.5\%$) 分别将 CSE 溶解成 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的稀释度,用 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂按“灵敏度复核方法”测定 Es 值和 Et 值,干扰试验结果见表 3。

缬氨酸 Et 和异亮氨酸 Et 值的测定:根据干扰试验结果及计算 $Es = \log^{-1} \{ 1/4 \times (\log 0.5 \times 4) \} = 0.50$, 缬氨酸 $Et = \log^{-1} \{ 1/4 \times (\log 0.5 \times 4) \} = 0.50$, 异亮氨酸 $Et = \log^{-1} \{ 1/4 \times (2\log 1.0 + 2\log 0.5) \} = 0.71$ 。

表 3 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸干

CSE 浓度	扰试验测定结果				阴性对照	EU. mL ⁻¹ 测定值
	1.0	0.5	0.25	0.125		
WBET 管	++++	++++	-----	-----	-	0.50
缬氨酸管	++++	++++	-----	-----	-	0.50
异亮氨酸管	++++	++--	-----	-----	-	0.71

Es 值在 $(0.5 \sim 2.0)\lambda_b$ 范围内,Et 值均在 $(0.5 \sim 2.0)$ Es 范围内,故通过以上稀释处理或直接溶解,L-异亮氨酸和 L-缬氨酸均可采用 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂检查。

3 讨论

采用鲎试剂检查注射用氨基酸原料的细菌内毒素代替传统的用家兔法检查热原,发现所试的 L-缬氨酸、L-异亮氨酸均可用 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂来检查细菌内毒素。折算成注射用 L-缬氨酸原料的细菌内毒素应小于 $0.04 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,与中国药典 2005 年版规定^[19] 供注射用缬氨酸的细菌内毒素应小于 $5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 不一致,注射用 L-异亮氨酸原料的细菌内毒素含量应小于 $0.08 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,与中国药典 2005 年版规定^[20] 供注射用异亮氨酸的细菌内毒素应小于 $20 \text{ EU} \cdot \text{g}^{-1}$ 不一致,所试 L-脯氨酸和 L-亮氨酸对鲎试剂法有干扰,与文献报道亮氨酸浓度小于等于 $13.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对鲎试剂无干扰不一致,这与不同厂家提供的原料质量不同有关^[16]。因此,鲎试剂法为原料生产厂家和制剂生产厂家控制氨基酸原料的质量提供一项简单、快速、可靠的方法,值得深入研究和推广。

参考文献:

[1] NOORDWIJK V J. European worksho Pon detection and quantification of pyrogen [C]// The European Pharmeuropa Forum. [S. L]: Special Issue, 1989,1:1-5.
 [2] FDA. USP20-NF15. Bacterial endotoxins test [S]. Maryland: the United State Pharmacopaid Convention, Inc, 1980:888.
 [3] 国家药典委员会. 细菌内毒素检查法[S]//中国药典 1990 年版第二增补本. 北京:化学工业出版社, 1993:57.

- [4] 国家药典委员会. 细菌内毒素检查法[S]//中国药典(二部). 北京:化学工业出版社,2005:附录 85.
- [5] 刘玲,姜宁,刘先觉,等. 对鲎试剂用于 18-氨基酸注射液质量控制的探讨[J]. 中国药业,2000,9(7):23-24.
LIU LING, JIANG NING, LIU XIAN-JUE, et al. Approach to quality control of 18-aminoacis injection using TAL test [J]. Chinese Pharmaceuticals, 2000, 9(7): 23-24.
- [6] 张慧莉. 四种大输液的细菌内毒素检查[J]. 中国药品标准,2003,4(2):28-30.
ZHANG HUI-LI. Bacterial endotoxins test for four kinds of infusion[J]. Drug Standards of China,2003,4(2):28-30.
- [7] 吴招娣,黎旸,李爱芬,等. 用鲎试剂法检测复方氨基酸注射液热原的考察[J]. 药物分析,1995,15(4):44-45.
WU ZHAO-DI, LI YANG, LI AI-FEN, et al. Investigation to check pyrogen in compound aminoacids injection by TAL test[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 1995, 15(4):44-45.
- [8] 王志平,张秀峰,张玉臣. 18-氨基酸注射液细菌内毒素法检测热原探讨[J]. 西北药学杂志,1997,12(2):74.
WANG ZHI-PING, ZHANG XIU-FENG, ZHANG YU-CHEN. Approach to check pyrogen in 18-aminoacids injection by bacterial endotoxins test[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 1997, 12(2):74.
- [9] 李展,张黎利,李亦明. 复方氨基酸注射液(3AA)细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业,1999,8(10):44.
LI ZHAN, ZHANG LI-LI, LI YI-MING. Approach to bacterial endotoxins test for compound aminoacids injection (3AA) [J]. Chinese Pharmaceuticals, 1999, 8(10):44.
- [10] 卢海涛,刁建芳,冯宏伟. 鲎试验法检测 18-氨基酸注射液细菌内毒素[J]. 西北药学杂志,2000,15(6):283.
LU HAI-TAO, DIAO JIAN-FANG, FENG HONG-WEI. Bacterial endotoxins chech of 18-aminoacids injection by TAL test[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2000, 15(6):283.
- [11] 王艳萍,史沛海,傅玲,等. 六合氨基酸注射液细菌内毒素检查法的探讨[J]. 中国药师,2001,4(1):69-70.
WANG YAN-PING, SHI PEI-HAI, FU LING, et al. Approach to bacterial endotoxins test for compound aminoacids injection(6AA)[J]. China Pharmacist, 2001, 4(1): 69-70.
- [12] 韦奇志. 复方氨基酸注射液细菌内毒素检查法的研究[J]. 中国药品标准,2000,1(2):52-53.
WEI QI-ZHI. Approach to bacterial endotoxins test for compound aminoacids injection [J]. Drug Standards of China, 2000, 1(2):52-53.
- [13] 侯辉,李伟平,王锶戒. 复方氨基酸注射液细菌内毒素检查法的实验研究[J]. 宁夏医学院学报,2004,26(2):117-119.
HOU HUI, LI WEI-PING, WANG SI-RONG. Experimental approach to bacterial endotoxins test for compound aminoacids injection [J]. Journal of Ningxia Medical College, 2004, 26(2):117-119.
- [14] 姜俊勇,叶鹏,冯晓东. 肾必氨注射液细菌内毒素鲎试剂检查法[J]. 中国药业,2004,13(12):40-41.
JIANG JUN-YONG, YE PENG, FENG XIAO-DONG. Bacterial endotoxin test for Shenbi' an injection by limuluslysate agent [J]. Chinese Pharmaceuticals, 2004, 13(12):40-41.
- [15] 郝秋红. 17-复合氨基酸注射液细菌内毒素检查的可行性分析[J]. 山西职工医学院学报,2004,14(4):62.
HAO QIU-HONG. Feasibility analysis of bacterial endotoxins test for compound aminoacids injection (17AA) [J]. Journal of Shanxi Medical College for Continuing Education, 2004, 14(4):62.
- [16] 高丹玲,林秀明,陈引秀. 亮氨酸细菌内毒素检查法的探讨[J]. 海峡药学,1996,8(3):17.
GAO DAN-LING, LIN XIU-MING, CHEN YIN-XIU. Approach to bacterial endotoxins test for leucine [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 1996, 8(3):17.
- [17] 顾炳仁. 甘氨酸中细菌内毒素的检查方法[J]. 苏州医学院学报,2000,20(4):345-346.
GU BING-REN. Bacterial endotoxins test for glycine[J]. Acta Academiae Medicinae Suzhou, 2000, 20(4):345-346.
- [18] 国家药典委员会. 细菌内毒素检查法[S]//中国药典(二部). 北京:化学工业出版社,2000:附录 86.
- [19] 国家药典委员会. 缬氨酸[S]//中国药典(二部). 北京:化学工业出版社,2005:855.
- [20] 国家药典委员会. 异亮氨酸[S]//中国药典(二部). 北京:化学工业出版社,2005:216.

(编辑 侯湘)