

注射用 L-缬氨酸细菌内毒素检查法的研究

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 400044; 2. 重庆大学生物医学工程教育部与重庆市重点实验室, 重庆 400044; 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:目的 通过鲎试剂的干扰试验, 研究注射用 L-缬氨酸原料中细菌内毒素检查法的可行性。方法 依据中国药典 2000 年版中细菌内毒素检查法进行操作。结果 在 16 倍稀释级下, L-缬氨酸 ($c = 2.5\%$) 对鲎试剂无干扰, 检测细菌内毒素的鲎试剂灵敏度 $\leq 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 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, 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 年版的规定 ($5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

关键词: L-缬氨酸; 细菌内毒素检查; 干扰试验; 鲎试剂

中图分类号: R977.4 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)08-0702-03

A Study of Bacterial Endotoxin Test (BET) of L-Valine 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 400044, China; 2. Key Laboratory of Biomedical Engineering of Educational Ministry and Chongqing City, Chongqing 400044, China; 3. Department of Bio-engineering, Yibin University, Yibin 644000, China; 4. College of Chemistry, Chongqing Normal University, Chongqing 400030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the feasibility of the method for examination of bacterial endotoxin in L-valine for injection by tachypleus amoebocyte lysate (TAL) interference test. **METHODS** The test was operated according to the method for examination of bacterial endotoxin on Chinese Pharmacopoeia (2000 edition). **RESULTS** L-Valine ($c = 2.5\%$) did not interfere with TAL reagent in 1-16 times diluted concentration, it could be tested with TAL that sensitivity was $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The method of bacterial endotoxin test of L-valine for injection was feasible, and could replace the rabbit test for pyrogen. The limit value of endotoxin in L-valine for injection was $0.04 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, more less than the value ($5 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$) recorded on Chinese Pharmacopoeia (2005 edition) obviously.

KEY WORDS: L-valine; bacterial endotoxin test; interference test; TAL reagent

经过 20 多年的努力, 注射用氨基酸原料药国产化逐渐完善和成熟, 同时对国产原料药的质量要求也越来越高。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^[1-11], 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^[12-14]。我们采用鲎试剂 (TAL) 检查注射用氨基酸原料细菌内毒素代替家兔法检查原料的热原, 现将依据中国药典 2000 年版“细菌内毒素检查法”^[15]对注射用 L-缬氨酸原料用鲎试剂检查细菌内毒素的试验结果报道如下。

1 材料

1.1 原料药

L-缬氨酸 (批号 20000909) 由南宁市安力泰药业有限公司提供。原料药用家兔法检查热原合格。

鲎试剂 (TAL): 灵敏度 (λ) $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ (批号 000624); $\lambda 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ (批号 000908), 均由厦门鲎试剂厂提供。

支⁻¹ (批号 000624); $\lambda 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ (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)

$10 \text{ EU} \cdot \text{支}^{-1}$ (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 $< 0.01 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ (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 $< 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (批号 0011240351), 由成都青山制药有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 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鲎试剂灵敏度复核试验规定进行。

2.1.1 $\lambda_0 = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂灵敏度, 复核结果见表 1。

表 1 TAL灵敏度复核结果

Tab 1 Results of sensitivity check of TAL

CSE浓度 EU·mL ⁻¹	1.0	0.5	0.25	0.125	阴性对照
试验试管结果	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-

根据计算灵敏度公式计算:灵敏度 $\lambda_c = \log^{-1} \{1/4(\log 1.0 \times 1 + \log 0.5 \times 3)\} = 0.59 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (即测定值),在 $0.5 \sim 2.0\lambda_c$ 范围内,符合药典规定。

2.1.2 $\lambda_c = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂灵敏度,复核结果见表 2。同理计算灵敏度 $\lambda_c = \log^{-1} \{1/4(\log 0.5 \times 1 + \log 0.25 \times 3)\} = 0.30 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (即测定值),亦在 $0.5 \sim 2.0\lambda_c$ 范围内,符合药典规定。

表 2 TAL灵敏度复核结果

Tab 2 Results of sensitivity check of TAL

CSE浓度 EU·mL ⁻¹	0.5	0.25	0.125	0.0625	阴性对照
试验试管结果	+	+	-	-	-
	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-
	+	+	-	-	-

2.2 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值,静脉注射的 K为 $5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$; 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 $10 \text{ mL} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$,中国药典 2000年版收载体 L-缬氨酸原料热原检查项规定每 kg家兔注射 10 mL,故此 $L = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 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为佳 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,鲎试剂灵敏度 λ 为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,故此 L-缬氨酸原料最大稀释倍数 D_{\max} 为 16,有效稀释倍数 D为 1~16。

2.4 最大非干扰浓度的测定

分别用氯化钠注射液溶解 L-缬氨酸 ($C = 2.5\%$),再用 WBET分别将其稀释至 1~16倍系列,用法 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ TAL进行如下试验:①分别将各个稀释级 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;②用 WBET溶解 TAL后,分别加入对应稀释液作为供试阴性系列;③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 3。

表 3 L-缬氨酸最大非干扰浓度的测试结果

Tab 3 Results of maximum non-interference concentration test for L-valine

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

由上说明, L-缬氨酸在各稀释级下无可测出的内毒素(供试阴性均为“-”),由中国药典 2000年版可知,能用于干扰试验。在 16倍范围内 L-缬氨酸对细菌内毒素的凝聚试验无干扰。

2.5 干扰试验

按中国药典 2000年版设计方案如下:以 WBET、L-缬氨酸 ($C = 2.5\%$) 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 E_s 和 E_t 值,干扰试验结果见表 4。缬氨酸 E_t 值测定:根据干扰试验结果及计算 $E_s = \log^{-1} \{1/4 \times (\log 0.5 \times 4)\} = 0.50$, $E_t = \log^{-1} \{1/4 \times (\log 0.5 \times 4)\} = 0.50$ 。

表 4 L-缬氨酸干扰试验测定结果

Tab 4 Results of interference test for L-valine

CSE浓度	1.0 EU·mL ⁻¹	0.5 EU·mL ⁻¹	0.25 EU·mL ⁻¹	0.125 EU·mL ⁻¹	N
WBET试验管	++++	++++	----	----	----
缬氨酸试验管	++++	++++	----	----	----

注: N阴性对照

通过计算可知: E_s 值在 $0.5 \sim 2.0\lambda_c$ 范围内, E_t 值在 $0.5 E_s \sim 2.0 E_s$ 范围内,故通过直接溶解, L-缬氨酸可采用 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鲎试剂检查其细菌内毒素。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^[16]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,可能与生产厂家的质量不同有关^[12]。

3 讨论

本实验采用鲎试剂法检查注射用氨基酸原料的细菌内毒素,代替传统的家兔法检查热原,所试的 L-缬氨酸可用鲎试剂法来检查细菌内毒素,细菌内毒素限值为 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。鲎试剂法为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] 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.
- [2] 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.
- [3] 吴招娣,黎 A,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].药物分析杂志,1995,15(4):44-45.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 侯辉,李伟平,王锡戒.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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.

- [14] 谭伟荣.注射用原料-甘氨酸细菌内毒素检查方法的研究 [J].中华综合临床医学杂志(北京),2004,6(8):17-19.
- [15] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005年版.二部) [S]. 2005:附录 86.
- [16] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005年版.二部) [S]. 2005:855.

收稿日期:2006-10-25