



三氯甲烷在 ω -3 脂肪酸甘油三酯细菌内毒素检查法中可行性探讨

张婷婷¹, 鹿麟¹, 窦佳¹, 刘进朋¹, 孙经宽^{2*}

(1. 大连市药品检验所, 大连 116021; 2. 大连医科大学附属第二医院, 大连 116027)

摘要 目的: 建立 ω -3 脂肪酸甘油三酯细菌内毒素检查方法。方法: 将 ω -3 脂肪酸甘油三酯溶解于三氯甲烷, 再加水漩涡振荡混匀, 取上层制备供试品溶液; 进行方法干扰试验的同时考察内毒素的回收率。结果: 采用三氯甲烷溶解 ω -3 脂肪酸甘油三酯, 再用水振荡萃取的方法制备供试品溶液, 对细菌内毒素检查法无干扰作用。该方法的回收率在 70%~84% 之间, 符合检测要求。结论: 用三氯甲烷溶解脂溶性的该样品, 然后加水制备细菌内毒素检查用供试品溶液是可行的, 方法重复性和可操作性较好。其限度拟订为 0.1 EU·mg⁻¹。

关键词: ω -3 脂肪酸甘油三酯; 细菌内毒素; 干扰试验; 萃取; 回收率

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)02-0341-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.02.22

Discussion on method employing chloroform as a solvent to detect bacterial endotoxin in omega-3-acid-triglycerides

ZHANG Ting-ting¹, LU Lin¹, DOU Jia¹, LIU Jin-peng¹, SUN Jing-kuan^{2*}

(1. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China; 2. The Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract Objective: To develop a bacterial endotoxin test (BET) method for omega-3-acid-triglycerides.

Methods: Water was added after an aliquot of drug substance dissolved in chloroform and then the mixture was vortexed for 30 seconds, the upper layer was used as sample solutions. The interference test and the recovery test were conducted. **Results:** There was no interference to bacterial endotoxin test for omega-3-acid-triglycerides by water extraction after chloroform dissolving. The recovery rate of spiked endotoxin was between 70% and 84%.

Conclusion: Chloroform may be as a feasible solvent for drug substances with slightly soluble in water for BET test. For omega-3-acid-triglycerides, the endotoxin limit is specified in 0.1 EU·mg⁻¹.

Keywords: omega-3-acid-triglycerides; bacterial endotoxin; interference test; extraction; recovery rate

ω -3 脂肪酸甘油三酯 (omega-3-acid-triglycerides), 富含长链 ω -3 脂肪酸, 主要为二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA), 是 ω -3 鱼油脂肪乳注射液的主要原料。 ω -3 鱼油脂肪乳可以为机体提供所

需脂肪, 还可显著改善肝损伤^[1-2], 并有调节免疫应答和降低机体的炎症反应的作用^[3-6], 临床上经常作为肠外营养补充剂, 为无法正常进食或摄取量不足的患者提供营养和能量, 也用于某些心血管疾病、神经

* 通信作者 Tel: 13322225085; E-mail: sj.k010@163.com

第一作者 Tel: (0411) 84255012; E-mail: zt2646@139.com

系统疾病、感染性疾病的辅助治疗。现行版《中华人民共和国药典》和 JP16 均未收载, USP、BP 和 EP^[7-9] 均有收载, 但未制定细菌内毒素检查项。细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分, 对哺乳动物有致热、致死等多种生物活性, 考虑本品作为肠外给药制剂, 应制定细菌内毒素检查项。

鲎试剂与内毒素的反应一般都是在水溶液中进行, ω -3 脂肪酸甘油三酯不溶于水, 细菌内毒素检查无法正常进行。曾报道^[10-12] 用水振荡混匀后取水层进行细菌内毒素检查, 或用乙醇、二甲基亚砜 (DMSO) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 等溶解样品^[13-17], 或加入表面活性剂助溶进行细菌内毒素检查^[18]。本文考察了三氯甲烷溶解后加水振荡萃取的方法, 并对该方法进行较详细的研究, 为细菌内毒素检查提供依据。

1 仪器与材料

电热干燥箱 (DHG-9075A 型), 上海一恒科技有限公司; 漩涡混合器 (Digital 型), 德国 IKA 公司; 试管恒温仪 (TAL-40D 型), 湛江安度斯生物有限公司; 电子天平 (XS204 型), 赛多利斯有限公司; 台式冷冻离心机 (Allegra X-30R 型) BECKMAN 公司。

ω -3 脂肪酸甘油三酯原料药 (批号 0001121836、0001133439、0001054806); 鲎试剂 1 (湛江博康海洋生物有限公司, 规格 0.1 mL·支⁻¹, 批号 1604280, 灵敏度 0.25 EU·mL⁻¹); 鲎试剂 2 (湛江安度斯生物有限公司, 规格 0.1 mL·支⁻¹, 批号 1605302, 灵敏度 0.25 EU·mL⁻¹); 细菌内毒素工作标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号 150601-201681, 规格 80 EU·支⁻¹); 细菌内毒素检查用水 (BET 水) (湛江博康海洋生物有限公司, 批号 1602010, 规格 5 mL); 三氯甲烷 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 规格: 500 mL, 批号 20160805, 分析纯); 二甲基亚砜 (DMSO) (北京百灵威科技有限公司, 规格: 500 mL, 批号 LE20Q60, HPLC 级, 纯度 99.9%)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值的确定

ω -3 脂肪酸甘油三酯临床用药最大注射剂量为 15 mg·(kg·h)⁻¹, 限值计算如下式:

$$L=K/M=\frac{5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}}{15 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}}=0.33 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$$

根据《注射剂安全性检查法应用指导原则》的要求^[19], 为确保临床用药安全, 将其限值 (L) 拟订为 0.1 EU·mg⁻¹。

2.2 鲎试剂灵敏度复核

经复核, 所用鲎试剂灵敏度的测定值 (λ_c) 均在 0.5 λ ~ 2.0 λ 之间, 结果均符合规定。

2.3 供试品稀释浓度范围

目前市售鲎试剂灵敏度 (λ) 范围一般在 0.5~0.03 EU·mL⁻¹ 之间, L 为 0.1 EU·mg⁻¹, 最小有效稀释浓度 MVC= λ/L 。因此, ω -3 脂肪酸甘油三酯进行细菌内毒素检查时, 0.5~0.03 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂相对应 ω -3 脂肪酸甘油三酯最小有效稀释浓度为 5.0~0.3 mg·mL⁻¹。

2.4 三氯甲烷作为溶剂对细菌内毒素的影响

2.4.1 三氯甲烷饱和水溶液的干扰试验 取三氯甲烷 1 mL, 加入 BET 水 1 mL 漩涡混匀, 静置 30 s, 取上清液制成三氯甲烷饱和水溶液, 使用灵敏度为 0.25 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂进行干扰试验。用 BET 水和三氯甲烷饱和水溶液, 分别将细菌内毒素工作标准品稀释成 0.5、0.25、0.125、0.0625 EU·mL⁻¹ 系列浓度的溶液。同时, 分别用 BET 水和三氯甲烷饱和 BET 水溶液做阴性对照进行试验, 计算 E_s 和 E_t 。结果表明, E_s 均在 0.5 λ ~ 2.0 λ 范围内, 三氯甲烷饱和水溶液的 E_t 均在 0.5 λ ~ 2.0 λ 范围内, 说明三氯甲烷饱和水溶液对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。

2.4.2 三氯甲烷加标回收试验 取细菌内毒素工作标准品 1 支, 加入 DMSO 溶解制成浓度为 100 EU·mL⁻¹ 的溶液。取上述溶液 10 μ L, 加入三氯甲烷 2 mL 充分混匀, 加入 BET 水 2 mL 漩涡混匀, 静置 30 s, 取上清液 (内毒素浓度为 0.5 EU·mL⁻¹), 将上清液稀释制成浓度分别为 0.25、0.125 和 0.06 EU·mL⁻¹ 的系列溶液, 使用灵敏度为 0.25 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂进行试验。结果回收率为 84%, 表明三氯甲烷对细菌内毒素含量没有影响。

2.5 ω -3 脂肪酸甘油三酯内毒素检查

2.5.1 干扰预试验 精密称取 ω -3 脂肪酸甘油三酯, 加入三氯甲烷 2 mL 使溶解, 分别加入不同体积的 BET 水, 萃取制成相当于供试品质量浓度为 10.0、5.0、2.5 mg·mL⁻¹ 的系列溶液作为供试品溶液 (NPC), 同时每一浓度下均制备含有 2 λ 细菌内毒素的系列溶液作为供试品阳性对照 (PPC), 并设阳性对照 (PC) 和阴性对照 (NC)。结果, ω -3 脂肪酸甘油三酯浓度在相当于 10 mg·mL⁻¹ 以下时, 对 λ 为 0.25 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂与细菌内毒素的反应均无干扰作用。

2.5.2 正式干扰试验 用 λ 为 0.25 EU·mL⁻¹ 的 2

个厂家的鲎试剂进行检查,测定用 BET 水制成的内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值 (E_s) 和用供试品制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值 (E_t)。精密称取 ω -3 脂肪酸甘油三酯 20 mg,加入三氯甲烷 2 mL 溶解,再用 BET 水萃取制成相当于 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,用 BET 水和供试品溶液分别将细菌内毒素工作标准品稀释成 2 λ 、

λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 浓度的 BET 水系列细菌内毒素溶液和供试品系列细菌内毒素溶液,同时用上述供试品溶液和 BET 水各做阴性对照管,计算 E_s 和 E_t ,结果见表 1。结果 E_s 均在 0.5 λ ~2.0 λ 范围内,供试品的 E_t 均在 0.5 λ ~2.0 λ 范围内,说明供试品在相当于 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或更低浓度时,对 2 个不同厂家的鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用。

表 1 ω -3 脂肪酸甘油三酯干扰试验结果

Tab. 1 Results of interference test of omega-3-acid triglycerides

TAL 生产厂家和批号 (manufacturer and batch number)	供试品批号 (batch number)	细菌内毒素浓度 (endotoxin concentration)/(EU·mL ⁻¹)				NC	E_s	E_t
		0.5	0.25	0.125	0.06			
湛江博康海洋生物有限公司 (Zhanjiang Bokang Marine Biological Co., Ltd.) 1604280	BET 水 (BET water)	++++	++++	----	----	--	0.25	
	0001121836	++++	++++	----	----			0.25
	0001133439	++++	++++	+---	----			0.21
	0001054806	++++	++++	--+-	----			0.21
湛江安度斯生物有限公司 (Zhanjiang A&C Biological Co., Ltd.) 1605302	BET 水 (BET water)	++++	+---	----	----	--	0.42	
	0001121836	++++	+--+	----	----			0.35
	0001133439	++++	-+--	----	----			0.42
	0001054806	++++	+--+	----	----			0.30

2.5.3 供试品回收率试验 精密称取供试品 10、20 mg,分别加入“2.4.1”项下细菌内毒素工作标准品溶液 10、20 μL 混匀,加入三氯甲烷 2 mL 溶解,加入 BET 水萃取制成细菌内毒素浓度均为 0.5 EU·mL⁻¹

的溶液,然后用 BET 水稀释 1、2、4、8 倍(终点稀释倍数)。采用湛江博康海洋生物有限公司生产的灵敏度为 0.25 EU·mL⁻¹ 的鲎试剂,对供试品进行加标回收试验,结果供试品回收率均在 50%~200% 之间,见表 2。

表 2 ω -3 脂肪酸甘油三酯中细菌内毒素的回收率

Tab. 2 Recovery rate of spiked endotoxin in omega-3-acid-triglycerides

供试品批号 (batch number)	供试品稀释倍数 (dilution ratio)	细菌内毒素浓度 (endotoxin concentration) (EU·mL ⁻¹)				灵敏度 (λ_c) (sensitivity)/ (EU·mL ⁻¹)	内毒素含量 (measured endotoxin)/ (EU·mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/ (%)
		0.5	0.25	0.125	0.062 5			
BET 水 (BET water) 0001121836		++	++	--	--	0.25		
		++	++	--	--			
		终点稀释倍数 (end point dilution)						
		1	2	4	8			
	2	++	++	--	--	/	0.7	70
	4	++	+-	--	--		1.68	84

注:内毒素含量 = $\text{antilg}[\sum \lg(\text{供试品稀释倍数} \times \text{终点稀释倍数} \times \lambda_c)/4]$

Note: measured endotoxin = $\text{antilg}[\sum \lg(\text{dilution ratio} \times \text{end point dilution} \times \lambda_c)/4]$

2.5.4 供试品细菌内毒素检查 取 ω -3 脂肪酸甘油三酯 3 批,按“2.5.1”项下方法制成相当于浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,用 λ 为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 2 个厂家的鲎试剂进行细菌内毒素检查,并用此溶液将细菌内毒素工作标准品稀释为 2λ 的溶液,作为供试品的阳性对照;另外以 BET 水建立阳性对照和阴性对照进行检查^[2]。结果,阴性对照管均为阴性,供试品阳性对照管和阳性对照管均为阳性,试验有效;供试品管均为阴性,表明样品中所含细菌内毒素未超过限度规定,细菌内毒素检查均符合规定。

3 讨论

ω -3 脂肪酸甘油三酯为油状液体,在水中几乎不溶,为测定其中的细菌内毒素,需将供试品与 BET 水充分振荡混匀,制备混悬液进行内毒素测定。本研究曾参考文献^[10-11],采用在 ω -3 脂肪酸甘油三酯中加入 BET 水,漩涡振荡分散均匀后, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取下层溶液制备供试品溶液。由于 ω -3 脂肪酸甘油三酯密度小,与水混合后在上层,离心后下层管壁有明显的细小油状供试品贴壁,取样时不小心容易取出,不仅操作复杂,且操作不当易导致结果假阳性,重现性差;而离心增加了操作步骤,易污染,导致结果不可靠。采用月桂醇聚醚-10($\text{C}_{12}\text{E}_{10}$)等非离子表面活性剂溶解、制备样品,需要稀释较大倍数才能消除溶剂的干扰,且需采用灵敏度高的鲎试剂进行实验^[13]。

曾有报道^[20]采用三氯甲烷萃取水溶液中的脂,结果萃取不影响供试品中内毒素的含量,同时参考经典的细菌内毒素提取苯酚-三氯甲烷-石油醚法(PCP法),选取与 ω -3 脂肪酸甘油三酯互溶,且密度比水大的三氯甲烷溶解样品,使 ω -3 脂肪酸甘油三酯溶解于三氯甲烷层,取上层水溶液检查。干扰试验和回收率结果证明,三氯甲烷对内毒素活性和含量无干扰。该方法如果用水饱和三氯甲烷溶解样品,可减少乳化的发生,更有利于消除干扰,保证试验结果。

DMSO 与水、乙醇、丙醇和三氯甲烷等混溶。加标回收试验中,用 DMSO 溶解细菌内毒素工作标准品,可使细菌内毒素均匀分散于样品中,然后依次用三氯甲烷溶解、水提取。回收试验结果表明,以萃取后的水相溶液做细菌内毒素检查,能够较准确反映 ω -3 脂肪酸甘油三酯中的细菌内毒素含量,也为

水中不易溶解的弱极性原料药细菌内毒素检查提供参考。

参考文献

- [1] ZHU XH, WU YF, QIU YD, *et al.* Liver-protecting effects of omega-3 fish oil lipid emulsion in liver transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(42): 6141
- [2] 李智强,杨大刚,王惠群. ω -3 鱼油脂肪乳对肝细胞氧化损伤的修复作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2016, 56(47): 25
LI ZQ, YANG DG, WANG HQ. Repair function of ω -3 fish oil fat emulsion on oxidative damage in liver cells and its mechanism [J]. *Shandong Med J*, 2016, 56(47): 25
- [3] 吴振华. TPN 联合 ω -3 鱼油脂肪乳对 SIRS 患者 C-反应蛋白和体液免疫功能的影响 [D]. 山西:山西医科大学, 2011
WU ZH. Effects of ω -3 Fish Oil Fat Emulsion Combined with Total Parenteral Nutrition on The Crp and Humoral Immune Function in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) [D]. Shanxi: Shanxi Medical University, 2011
- [4] 薛平慧,刘君,林松. ω -3 鱼油脂肪乳对大肠癌患者术后机体免疫的影响 [J]. *华南国防医学杂志*, 2011, 25(2): 138
XUE PH, LIU J, LIN S. Effect of ω -3 fish-oil fat emulsion on postoperative immune function of patients with colorectal tumor [J]. *Mil Med J S Chin*, 2011, 25(2): 138
- [5] 黄剑. ω -3 鱼油脂肪乳对食管恶性肿瘤术后免疫功能和炎性反应的影响 [D]. 杭州:浙江大学, 2013
HUANG J. The Influence of ω -3 Fish Oil Fat Emulsion on Immunologic Function and Inflammatory Reaction of Patients with Esophageal Cancer after Operation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [6] GARIB R, GARLA P, TORRINHAS RS, *et al.* Effects of parenteral fish oil lipid emulsions on colon morphology and cytokine expression after experimental colitis [J]. *Nutr Hosp*, 2013, 28(3): 849
- [7] USP 40-NF 35 [S]. 2017: 6784
- [8] BP 2017 [S]. 2017: 1320
- [9] EP 9.0 [S]. 2017: 3209
- [10] 胡容融. 注射用油细菌内毒素检查方法的研究 [J]. *广东药学院学报*, 2002, 18(2): 99
HU RR. Study on the gelation dotmethod of bacterial endotoxin test in injection oil [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*, 2002, 18(2): 99
- [11] 胡宇驰,李娜,周建平. 十一酸睾酮注射液细菌内毒素检查方法学研究 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(12): 2425
HU YC, LI N, ZHOU JP. Study on gelation clot method of bacterial endotoxin test in testosterone undecanoate injection [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(12): 2425
- [12] 刘骅,许雷鸣. 黄体酮注射液细菌内毒素检查的方法比较研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(6): 1113
LIU H, XU LM. Comparative study on bacterial endotoxin test in progesterone injection [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(6): 1113



- [13] SHAPOVALOVA OV, DOLGOVA GV, NEUGODOVA NP, *et al.* Organic solvents for determination of bacterial endotoxin index in water-insoluble pharmaceutical substances [J]. *Antibiot Khimioter*, 2013, 58(9-10): 41
- [14] 许雷鸣, 武谷, 堵伟, 等. 丁酸氯维地平的细菌内毒素检查法 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(9): 1004
XU LM, WU G, DU W, *et al.* Bacterial endotoxin test for clevipipine butyrate [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2013, 30(9): 1004
- [15] 许雷鸣, 武谷, 堵伟, 等. 米力农原料药细菌内毒素检查方法的建立 [J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(9): 1110
XU LM, WU G, DU W, *et al.* Establishment of bacterial endotoxin test method for milrinone raw material [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2014, 31(9): 1110
- [16] 夏博, 郭锋. 动态显色法定量测定加替沙星原料药中细菌内毒素含量 [J]. *中国药物评价*, 2015, 32(5): 273
XIA B, GUO F. Content determination of bacterial endotoxin in gatifloxacin by kinetic chromogenic analysis [J]. *Chin J Drug Eval*, 2015, 32(5): 273
- [17] CHEN DD. A new method for the analysis of bacterial endotoxins in ultrapure paraffin oil [J]. *J Anal Methods Chem*, 2014, 2014: 575246
- [18] SAKAI H, HISAMOTO S, FUKUTOMI I, *et al.* Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by limulus amoebocyte lysate test with kinetic turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(2): 310
- [19] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 400
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 400
- [20] 邱树胜, 张铭穷. 鲎实验检查盐酸丁卡因注射液细菌内毒素 [J]. *海峡药学*, 2007, 19(11): 57
QIU SH, ZHANG QM. The method of bacterial endotoxin test for omega-3-acid-triglycerides [J]. *Strait Pharm J*, 2007, 19(11): 57

(本文于 2018 年 3 月 22 日收到)