

气相色谱-质谱联用辅助鉴定细菌内毒素 标准品菌种来源的纯度

岳丽娜^{1,2}, 李京华², 贺高红¹, 于万滢², 邵英光², 王俊德²

(1. 大连理工大学精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116012;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为分析内毒素标准品菌种来源的纯度, 建立了采用气相色谱-质谱联用法、以 *N,O*-双三甲基硅三氟乙酰胺作为硅烷化试剂对待测物进行衍生、对内毒素标准品所含的 3-羟基脂肪酸种类进行检测的方法。色谱柱为 DB-5 (60 m × 0.25 mm i. d.), 载气为氦气, 恒压, 柱前压 206 kPa, 进样器温度 250 °C, 柱箱初始温度为 90 °C, 保持 5 min, 以 5 °C/min 的升温速率升至 280 °C, 保持 5 min。进样量为 1 μL, 不分流进样。质谱离子源为电子轰击离子源 (EI), 离子源温度为 250 °C, 接口温度为 280 °C。通过对内毒素标准品和大肠杆菌、绿脓杆菌、去离子水中 3-羟基脂肪酸种类的比较, 探讨了通过 3-羟基脂肪酸种类来辅助判断内毒素标准品菌种来源的问题。结果显示, 来源为大肠杆菌的 9 000 EU/支内毒素国家标准品中只含有 3-羟基十四烷酸, 20 EU/支的内毒素工作标准品中除含有 3-羟基十四烷酸外, 还含有 3-羟基十二烷酸, 说明其含有非大肠杆菌的细菌。

关键词: 气相色谱; 质谱; 3-羟基脂肪酸; 内毒素标准品; 大肠杆菌

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)01-0010-04 栏目类别: 研究论文

Analysis of the Impurity of Bacterium Source of Standard Endotoxin by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

YUE Lina^{1,2}, LI Jinghua², HE Gaohong¹, YU Wanying², SHAO Yingguang², WANG Junde²

(1. State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: To analyse the impurity of bacterium source of standard endotoxin, 3-hydroxy fatty acid species in different endotoxin standards was determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as the silanizing reagent. GC/MS analysis was performed using a gas chromatograph equipped with a 60 m × 0.25 mm i. d. DB-5 fused silica capillary column and an injector at 250 °C. Helium was used as the carrier gas under a constant pressure of 206 kPa. The oven was programmed at a rate of 5 °C/min from 90 °C (held for 5 min) to 280 °C (held for 5 min). The sample size was 1 μL. The transfer line was kept at 280 °C. The quadrupole mass spectrometer was operated in electron impact (EI) ionization mode, and the temperature of the source was kept at 250 °C. The kind of 3-hydroxy fatty acids in 9 000 EU/tube national standard endotoxin, 20 EU/tube working standard endotoxin, *escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* and deionized water were determined to study the purity of bacterium source of the standard endotoxin. It was shown that 9 000 EU/tube endotoxin standard and *escherichia coli* only contained 3-hydroxytetradecanoic acid. There was 3-hydroxydodecanoic acid in 20 EU/tube working standard endotoxin, which indicated the presence of impurity of bacterium source.

Key words: gas chromatography (GC); mass spectrometry (MS); 3-hydroxy fatty acids; endotoxin standard; *escherichia coli*

细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的脂多糖成分。在化学结构上, 主要由多糖和类脂 A 组

成, 后者是脂多糖的毒性及生物活性中心。内毒素可引起人体发热甚至休克, 因此, 各国药典^[1,2]对注

收稿日期: 2005-01-28

第一作者: 岳丽娜, 女, 硕士, E-mail: 1107lina@163.com.

通讯联系人: 贺高红, 女, 教授, 博士生导师, E-mail: hgaohong@dlut.edu.cn.

基金项目: 大连化学物理研究所 2003 年博士探索基金资助项目.

射类药品中的细菌内毒素限量有严格的规定。内毒素标准品是细菌内毒素的标准物质,用于内毒素检测试剂的灵敏度复核和各种阳性对照^[1],通常它是从大肠杆菌中分离提取制备而来的,例如美国内毒素标准品的大肠杆菌种类为 O₁₁₁,日本从大肠杆菌 UKTB 中提取内毒素作为日本的标准参考内毒素。不同菌种来源的内毒素的活力相差很大,菌种的来源直接决定标准品的各种生物学活性^[3]、稳定性等指标,因此,监控菌种纯度和杂菌的污染对内毒素标准品的生产和应用都具有十分重要的意义。

类脂 A 的长链脂肪酸部分经水解形成相应的 3-羟基脂肪酸,经生化后可通过气相色谱-质谱法(GC/MS)进行检测^[4]。应用这种方法可检测特定场所中的空气、尘埃等环境样品中的内毒素^[5,6]。不同菌种来源的类脂 A 所含的 3-羟基脂肪酸的碳链长度或种类各有特点:肠道菌(主要为大肠杆菌等)脂多糖的类脂 A 的共同特征是含有 4 个分子的 3-OH-C_{14:0},它们对称地分布于两个 D-氨基葡萄糖分子上,即两个 D-氨基葡萄糖的 2-位和 3-位的氨基和羟基上^[3],经水解后可生成 4 个分子的 3-羟基十四烷酸^[7];与肠道菌类脂 A 不同,非肠道菌类脂 A 脂肪酸组成中以 C_{10:0} ~ C_{18:0} 为多见,且含有奇数碳原子的脂肪酸,特殊类型的类脂 A 与酰胺键相连的不是常见的 3-羟基脂肪酸,而是非常罕见的 3-(或 4-)-酮-脂肪酸;另有其他细菌的类脂 A,仅含有以酰胺键相连的 3-脂酰基脂肪酸。本工作根据这一特点,利用气相色谱-质谱联用仪,检测两种内毒素标准品和 3 种实际样品中不同碳数的 3-羟基脂肪酸组成,探讨其菌种纯度情况,以便对内毒素标准品使用中的异常情况做出辅助判断和解释。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Finnigan Trace GC/Trace MS 气相色谱-质谱联用仪(美国 Finnigan 公司)。3-羟基十三烷酸标样、3-羟基十四烷酸标样(Larodan,瑞典,纯度 > 98%),*N,O*-双三甲基硅三氟乙酰胺(Avocado,英国)。内毒素国家标准品 9 000 EU/支(中国药品生物制品检定所,批号 981),内毒素工作标准品 20 EU/支(中国湛江海洋生物制品厂,批号 20030610),大肠杆菌(大连农产品检测中心微生物室提供,依照《生活饮用水标准检查法》GB5750-85 中细菌学指标菌落总数和总大肠菌群的检测方法培养而得),绿脓杆菌(大连医科大学附属第一医院检验科提供,按照非肠道革兰氏阴性杆菌培养方法培养,采用梅里埃 API 20NE 系统软件鉴定),其他试

剂均为分析纯。所有的实验用玻璃仪器(试管,吸头)都用重铬酸钾洗液浸泡过夜,用去离子水冲洗干净,放入马弗炉中于 250 °C 加热 1 h 去除内毒素。

1.2 分析条件

色谱条件:色谱柱为 DB-5(60 m × 0.25 mm i. d.);载气为氦气,恒压,柱前压 206 kPa;进样口温度 250 °C;柱温:初始温度 90 °C,在此温度下保持 5 min,然后以 5 °C/min 的升温速率升至 280 °C,在此温度下保持 5 min;进样量为 1 μL,不分流进样。

质谱条件:电子轰击离子源(EI);离子源温度为 250 °C;接口温度为 280 °C;质谱扫描范围:*m/z* 13 ~ 449。溶剂延迟时间为 10 min。

1.3 标样处理

在 3-羟基十三烷酸标样(约 0.5 mg)、3-羟基十四烷酸标样(约 0.5 mg)中加入 0.9 mL 甲醇和 0.1 mL 乙酰氯,密封后于 100 °C 反应 1 h,依次用 1 mL 细菌内毒素检查用水、1.5 mL 正己烷萃取后,再用 1 mL 正己烷萃取,合并两次的正己烷层,真空干燥,加入 *N,O*-双三甲基硅三氟乙酰胺 50 μL、吡啶 5 μL,于 80 °C 反应 15 min,真空干燥后溶于 2 mL 正己烷中备用。

1.4 样品处理

将大肠杆菌和绿脓杆菌各约 0.5 g 用甲醇清洗,离心,弃去上清液,于 30 °C 下真空干燥。取 5 mL 去离子水样品,直接经 30 °C 真空干燥。在干燥后的大肠杆菌、绿脓杆菌、去离子水及 9 000 EU/支内毒素国家标准品(1 支)、20 EU/支内毒素工作标准品(1 支)中分别加入 0.75 mL 甲醇和 0.3 mL 乙酰氯,于 100 °C 下反应 18 h,用 1 mL 细菌内毒素检查用水、1.5 mL 正己烷萃取后,再用 1 mL 正己烷萃取,合并两次的正己烷层,真空干燥,加入 *N,O*-双三甲基硅三氟乙酰胺 50 μL、吡啶 5 μL,于 80 °C 下反应 15 min,真空干燥后溶于 20 μL 正己烷备用。

2 结果

2.1 3-羟基脂肪酸标准品的选择离子流色谱图

图 1 为 3-羟基十三烷酸、3-羟基十四烷酸标样衍生物的选择离子流色谱图(*m/z* 175),其中 3-羟基十四烷酸标样的保留时间(*t_R*)为 33.37 min。

2.2 内毒素标准品、大肠杆菌、绿脓杆菌及水中的 3-羟基脂肪酸

内毒素标准品、大肠杆菌、绿脓杆菌和去离子水经样品处理生化后,皆形成 3-甲氧基三甲基硅衍生物。

在上述实验条件下,对 9 000 EU/支内毒素国家标准品、20 EU/支内毒素工作标准品进行了分析。

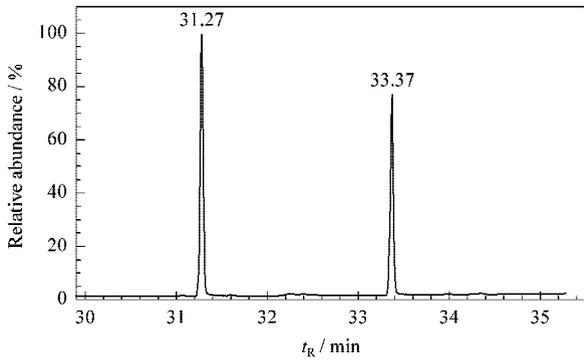


图 1 3-羟基十三烷酸、3-羟基十四烷酸
标样衍生物的选择离子流图

Fig.1 Selected ion current chromatogram of 3-hydroxytridecanoic acid and 3-hydroxytetradecanoic acid methyl ester trimethylsilyl (TMS) derivatives (m/z 175)

31.27 min : 3-hydroxytridecanoic acid ;
33.37 min : 3-hydroxytetradecanoic acid.

利用 GC/MS 定性,同时利用已有的 3-羟基十四烷酸标样的保留时间进行对照。分析结果见图 2-a b。其中 9 000 EU/支内毒素国家标准品(图 2-a)中只含有 3-羟基十四烷酸($t_R = 33.34$ min),而 20 EU/支内毒素工作标准品(图 2-b)中除含有 3-羟基十四烷酸($t_R = 33.36$ min)外,还含有 3-羟基十二烷酸($t_R = 29.07$ min, 质谱定性,其质谱图见图 3-b)。大肠杆菌、绿脓杆菌、去离子水中的 3-羟基脂肪酸的分析结果依次见图 2-c, d, e。其中大肠杆菌中只含有 3-羟基十四烷酸(图 2-c $t_R = 33.39$ min),绿脓

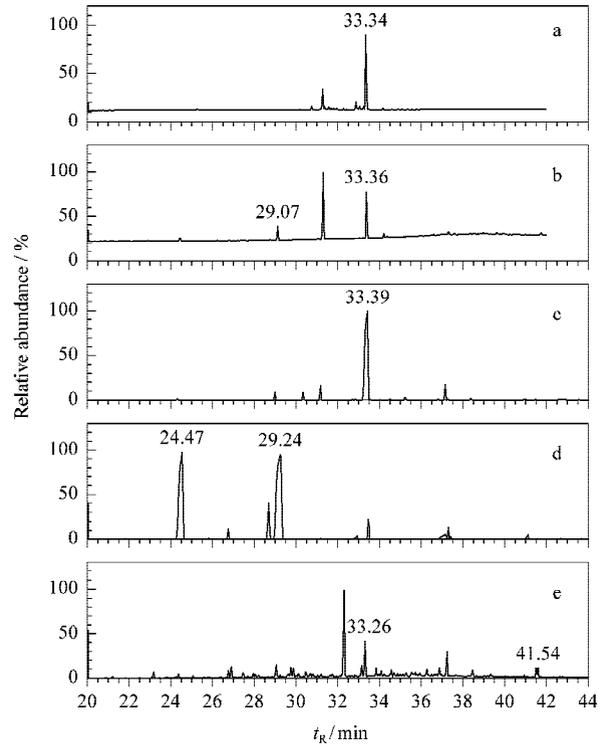


图 2 (a) 9 000 EU/支内毒素国家标准品、(b) 20 EU/支内毒素工作标准品、(c) 大肠杆菌、(d) 绿脓杆菌和 (e) 去离子水中 3-羟基脂肪酸衍生物的选择离子流色谱图 (m/z 175)

Fig.2 Selected ion current chromatograms of 3-hydroxy fatty acid methyl ester TMS derivatives in (a) 9 000 EU/tube national standard endotoxin, (b) 20 EU/tube working standard endotoxin, (c) *escherichia coli*, (d) *pseudomonas aeruginosa* and (e) deionized water (m/z 175)

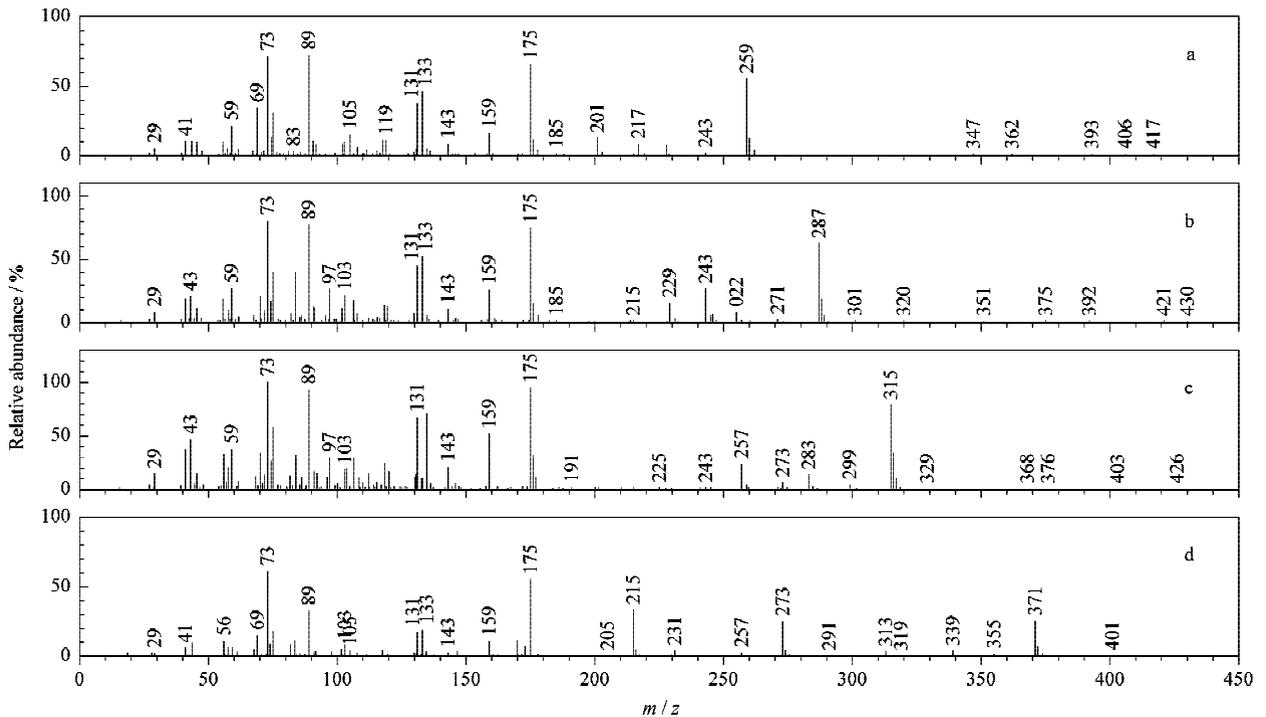


图 3 (a) 3-羟基十烷酸、(b) 3-羟基十二烷酸、(c) 3-羟基十四烷酸、(d) 3-羟基十八烷酸衍生物的质谱图

Fig.3 Mass spectra of 3-methoxy TMS derivatives of (a) 3-hydroxydecanoic acid, (b) 3-hydroxydodecanoic acid, (c) 3-hydroxytetradecanoic acid and (d) 3-hydroxyoctadecanoic acid

杆菌中含有 3-羟基十四烷酸(图 2-d, $t_R = 24.47$ min, 质谱定性,其质谱图见图 3-a)和 3-羟基十二烷酸(图 2-d, $t_R = 29.24$ min, 质谱定性,其质谱图见图 3-b),去离子水中含有 3-羟基十四烷酸(图 2-e, $t_R = 33.26$ min)和 3-羟基十八烷酸(图 2-e, $t_R = 41.54$ min, 质谱定性,其质谱图见图 3-d)。

2.3 3-羟基脂肪酸的质谱分析

图 3 为不同碳数的 3-羟基脂肪酸衍生物的质谱图。其中 3-羟基十四烷酸为标样,其余为样品中的脂肪酸的质谱图。3-羟基十四烷酸质谱图(图 3-c)中 m/z 73 是 $(CH_3)_3Si^+$ 碎片离子峰, m/z 131 和 175 是 $C_2 \sim C_3$ 、 $C_3 \sim C_4$ 键断裂产生的碎片离子峰。 m/z 315 是 $[M - 15]$ 的离子峰。对于其他 3-羟基脂肪酸,其 $[M - 15]$ 的离子峰分别为 m/z 259 (3-羟基十烷酸,图 3-a)、 m/z 287 (3-羟基十二烷酸,图 3-b)、 m/z 371 (3-羟基十八烷酸,图 3-d),其余特征峰 m/z 73, 131, 175 与 3-羟基十四烷酸相同。

3 讨论

内毒素中的 3-羟基脂肪酸种类同其菌株来源有着直接的关系。应用气相色谱/质谱联用检测得到大肠杆菌中只含有 3-羟基十四烷酸,这同文献 [3] 报道的结论相同。非肠道菌绿脓杆菌和去离子水中检测到除 3-羟基十四烷酸以外的其他碳数的 3-羟基脂肪酸,这是由于样品中所含细菌种类不同引起的。

不同细菌的内毒素,其生物活性不同^[8,9]。与其他菌种来源的内毒素相比,由大肠杆菌制备的内毒素同内毒素检测试剂的反应活性处于中值的位置,并且稳定、可溶,因此被选为参考标准品^[3]。我国药典规定内毒素国家标准品系自大肠杆菌提取精制而成。而大肠杆菌型别对 3-羟基脂肪酸种类无影响,即只要出现 3-羟基十四烷酸以外的 3-羟基脂肪酸就可以断定此种内毒素标准品含有大肠杆菌以外的菌种。9 000 EU/支内毒素国家标准品是由大肠杆菌制得的,GC/MS 检测结果表明其中只含有 3-羟基十四烷酸。在 20 EU/支内毒素工作标准品

中,除了检测到 3-羟基十四烷酸外,还检测到 3-羟基十二烷酸,这说明该内毒素工作标准品中含有非肠道菌的细菌。标准品中引入其他菌种的内毒素,则其稳定性以及在使用时溶解、稀释过程中的凝聚和吸附等各种性质都会受到影响,这无疑会在检测结果中引入额外的误差。

此外,内毒素标准品中所含 3-羟基脂肪酸为偶数碳,应用以上方法,利用奇数碳的 3-羟基十三烷酸标样作内标(图 1, $t_R = 31.27$ min),可以对内毒素标准品做进一步的定量分析,从而对其含量、活性及溶解、稀释等过程中出现的各种现象做出更精确的解释。

4 小结

气相色谱-质谱联用法检测细菌内毒素标准品中的 3-羟基脂肪酸系单纯的化学方法,不受内毒素标准品及细菌的生物活性的限制,可用于细菌内毒素标准品菌株来源的辅助监控及应用中的异常情况的研究分析。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社), 2000. Appendix 86
- [2] The United States Pharmacopeia. USP 28 NF 23. Rockville, MD: The United States Pharmacopeia, 2005. 2 264
- [3] Jiao Binghua. Molecular Endotoxicology. Shanghai: Shanghai Literature of Science and Technology Press (焦炳华. 分子内毒素学. 上海: 上海科学技术文献出版社), 1995. 49
- [4] Mielniczuk Z, Mielniczuk E, Larsson L. J Microbiol Meth, 1993, 17: 91
- [5] Martensson L, Gradowska W, Larsson L. Aerobiologia, 1997, 13: 99
- [6] Gradowska W, Larsson L. J Microbiol Meth, 1994, 20: 55
- [7] Mielniczuk Z, Alugupalli S, Mielniczuk E, Larsson L. J Chromatogr A, 1992, 623: 115
- [8] Wakeham S G, Pease T K, Benner R. Org Geochem, 2003, 34: 857
- [9] Cai Tong, Zhang Guolai, Li Bo. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (蔡彤, 张国来, 李波. 药物分析杂志), 2002, 22(5): 406