

方法学研究

Methodology Study

硫酸特布他林原料药细菌内毒素检查方法学研究

王新宇¹, 刘振华², 卢海霞¹, 张界昉¹

(1. 吉林省药品检验研究院, 长春 130033; 2. 长春中医药大学附属第三临床医院 心血管内科, 长春 130118)

摘要 目的: 建立硫酸特布他林原料药细菌内毒素的检查方法。方法: 采用凝胶法对硫酸特布他林进行方法学验证, 并对三批样品进行了干扰试验和细菌内毒素检查。结果: 可用于细菌内毒素检查的硫酸特布他林原料药, 限值定为“每 1 mg 硫酸特布他林中含内毒素的量应小于 0.50 EU”。结论: 鲎试剂凝胶法可用于硫酸特布他林原料药细菌内毒素检查。

关键词: 硫酸特布他林; 原料药; 细菌内毒素; 干扰试验; 凝胶法

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2024)04-0376-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.04.009

Investigation on bacterial endotoxins test of terbutaline sulfate active pharmaceutical ingredient

WANG Xinyu¹, LIU Zhenhua², LU Haixia¹, ZHANG Haofang¹

(1. Jilin Institute for Drug Control Changchun 130033, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, The Third Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130118, China)

Abstract Objective: To establish a method for the detection of bacterial endotoxin in terbutaline sulfate active pharmaceutical ingredients (API). **Methods:** The method of terbutaline sulfate was verified by gel method, and interference test and bacterial endotoxin test were performed on three batches of samples. **Results:** The limit for terbutaline sulfate API that can be used for bacterial endotoxin test was set as “the amount of endotoxin contained in terbutaline sulfate should be less than 0.50 EU per 1 mg”. **Conclusion:** Limulus gel method can be used to detect bacterial endotoxin of terbutaline sulfate API.

Key words: terbutaline sulfate; active pharmaceutical ingredient; bacterial endotoxins test; interference test; gel method

硫酸特布他林为 β_2 -肾上腺素受体激动药, 临床上主要用于治疗支气管哮喘和其他伴有支气管痉挛的肺部疾病等^[1]。由于它的上市剂型包括注射液、颗粒剂、片剂和吸入气雾剂等, 因此, 严格控制细菌内毒素含量可有效降低临床不良反应风险^[2], 为减低硫酸特布他林在生产过程中细菌内毒素污染的风险, 确保临床用药安全。有必要严

格控制其原料的细菌内毒素含量。《中国药典》2020 年版虽收录了硫酸特布他林原料药, 但对细菌内毒素检查项未做控制。根据本版药典二部凡例要求, 需要根据临床用药要求制定相应的质量控制项目^[3]。为此, 本文建立了硫酸特布他林原料药细菌内毒素检查项, 保证药品的安全、有效和质量可控, 为完善硫酸特布他林原料药检查项提

供了一定的参考依据^[4]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ET-96 内毒素凝胶法测定仪(天津市天大天发科技有限公司), DG-800 旋涡混合器(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

1.2 试药

硫酸特布他林(批号:010164-2207001/010164-2208002/010164-2209003)。

1.3 试剂

湛江安度斯生物有限公司, 2212053, 0.25 EU · mL⁻¹; 湛江博康海洋生物有限公司, 2312062, 0.25 EU · mL⁻¹; 细菌内毒素工作标准品来源: 中国食品药品检定研究院, 150601-202193, 80 EU · 支⁻¹; 细菌内毒素检查用水(BET水), 湛江安度斯生物有限公司, 2305240, 5 mL · 支⁻¹。

2 方法与结果

2.1 限值确定

根据《中国药典》吸入制剂通则及 9301《注射剂安全性检查法应用指导原则》细菌内毒素检查项设置的原则, 查阅临床用法用量, 根据 2020 年版《中国药典》四部通则 1143 计算, L 限值: $L = K/M$, 注射剂 K 值 5 EU/(kg · h), M 为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量^[5]:

$$M = 10 \text{ mg/h} \div 2.5 \text{ kg} = 4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}),$$

$$L = 5 \text{ EU}/(\text{kg} \cdot \text{h}) \div 4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}) = 1.25 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1},$$

为更严格控制本品细菌内毒素限值, 建议将细菌内毒素限值定为每 1mg 硫酸特布他林中含内毒素的量应小于 0.50 EU。

表 2 010164-2207001 硫酸特布他林细菌内毒素干扰预试验

Tab. 2 Bacterial endotoxin interference pretest of terbutaline sulfate 010164-2207001

鲎试剂批号 (TAL batch number)	010164-2207001 样品浓度 (sample concentration) (mg · mL ⁻¹)									NC
		20	10	5	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
2212053	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	++	++	++	++	++	++	++	++
2312062	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	++	++	++	++	++	++	++	++

注(note): “-”为阴性结果(was negative result); “+”为阳性结果(was positive result)

2.4 干扰试验

硫酸特布他林用细菌内毒素检查用水配制成

2.2 鲎试剂灵敏度的复核

按药典细菌内毒素检查法规定, 进行鲎试剂的标示灵敏度复核, 结果见表 1, 湛江安度斯生物有限公司(批号 2212053)和湛江博康海洋生物有限公司(批号 2312062)的鲎试剂灵敏度复核结果合格, 复核后的灵敏度值为 0.25 EU · mL⁻¹, λC 与鲎试剂灵敏度的标示值(λ)均一致, 鲎试剂的灵敏度均为 0.25 EU · mL⁻¹。

表 1 鲎试剂灵敏度复核

Tab. 1 Sensitivity review of TAL

鲎试剂批号 (TAL batch number)	内毒素浓度 (concentration of endotoxin)/(EU · mL ⁻¹)				阴性对照 (NC)
	0.5	0.25	0.125	0.06	
2212053	++++	++++	----	----	--
2312062	++++	++++	----	----	--

2.3 硫酸特布他林的预干扰试验

2.3.1 有效稀释浓度(MVC)的计算 $MVC = \lambda/L$

公式里 L 表示硫酸特布他林的细菌内毒素限值 0.50 EU · mg⁻¹; λ 表示鲎试剂的灵敏度, 硫酸特布他林所对应有效稀释浓度为:

$$C_{0.25} = 0.25/0.50 = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.3.2 预干扰试验方法与结果

取三批硫酸特布他林原料药, 用 BET 水溶解并稀释成 20、10、5、1、0.5、0.25、0.125、0.06 mg · mL⁻¹ 的溶液, 用 NPC 表示。取上述配制好的溶液与细菌内毒素标准溶液混合, 制成均含有 2λ 细菌内毒素的溶液, 用 PPC 表示。

用灵敏度复核合格的两个厂家鲎试剂进行实验, 1 mg · mL⁻¹ 的硫酸特布他林溶液对细菌内毒素试验无干扰作用, 结果见表 2~5。

1 mg · mL⁻¹ 浓溶液, 通过使用两个不同厂家鲎试剂对硫酸特布他林(010164-2207001/010164-2208002/

010164-2209003)3个批次,进行细菌内毒素正式干扰试验。结果显示硫酸特布他林在0.5 mg · mL⁻¹浓度时无干扰作用,确定了0.5 mg · mL⁻¹的硫酸特布他林溶液浓度可用于细菌内毒素检查。结果见表4。

表3 010164-2208002 硫酸特布他林细菌内毒素干扰预试验

Tab. 3 Bacterial endotoxin interference pretest of terbutaline sulfate 010164-2208002

鲎试剂批号 (TAL batch number)		010164-2208002 样品浓度 (sample concentration) (mg · mL ⁻¹)								NC
		20	10	5	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
2212053	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	++	++	++	++	++	++	++	++
2312062	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	++	++	++	++	++	++	++	++

注(note):“-”为阴性结果(was negative result);“+”为阳性结果(was positive result)

表4 010164-2209003 硫酸特布他林细菌内毒素干扰预试验

Tab. 4 Bacterial endotoxin interference pretest of terbutaline sulfate 010164-2209003

鲎试剂批号 (TAL batch number)		010164-2209003 样品浓度 (sample concentration) (mg · mL ⁻¹)								NC
		20	10	5	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
2212053	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	+-	++	++	++	++	++	++	++
2312062	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	PPC	--	++	++	++	++	++	++	++	++

注(note):“-”为阴性结果(was negative result);“+”为阳性结果(was positive result)

表5 硫酸特布他林细菌内毒素干扰试验

Tab. 5 Bacterial endotoxin interference test of terbutaline sulfate

鲎试剂批号 (TAL batch number)	供试品批号 (batch number)	内毒素浓度 (concentration of endotoxin) (EU · mL ⁻¹)				NC
		0.5	0.25	0.125	0.062 5	
2312062 λ = 0.25 EU · mL ⁻¹	检查用水 (BET)	++	++	--	--	--
	010164-2207001	++++	++++	----	----	--
	010164-2208002	++++	++++	----	----	--
	010164-2209003	++++	++++	----	----	--
2212053 λ = 0.25 EU · mL ⁻¹	检查用水 (BET)	++	++	--	--	--
	010164-2207001	++++	++++	----	----	--
	010164-2208002	++++	++++	----	----	--
	010164-2209003	++++	++++	----	----	--

注(note):“-”为阴性结果(was negative result);“+”为阳性结果(was positive result)

2.5 细菌内毒素检查

硫酸特布他林细菌内毒素限值拟定为“每1 mg 硫酸特布他林中含内毒素的量应小于0.50 EU”,对3个批次硫酸特布他林原料药进行细菌内毒素检查方法的确认,结果(表6)均符合规定。

3 讨论

根据《中国药典》2020年版吸入制剂通则及9301《注射剂安全性检查法应用指导原则》细菌内

毒素检查项设置的原则,为保证安全用药,可适当严格设定内毒素限值^[6]。建议将硫酸特布他林原料药的细菌内毒素限值拟定为“每1 mg 硫酸特布他林中含内毒素的量应小于0.50 EU”。通过严格控制硫酸特布他林原料药的内毒素含量,可以从源头上有效降低硫酸特布他林制剂生产过程中的质量风险,确保药品质量和安全性^[7]。

细菌内毒素广泛存在于环境中,原料药生产过程可能引入细菌内毒素,内毒素在原料药中的含量

表6 细菌内毒素检查

Tab. 6 The results of bacterial endotoxins test

试剂批号 (TAL batch number)	供试品批号 (batch number)	供试品 (sample)	供试品阳性 (PPC)	阳性对照 (PC)	阴性 (NC)
2312062 $\lambda = 0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	010164-2207001	--	++	++	--
	010164-2208002	--	++	++	--
	010164-2209003	--	++	++	--

注(note): “-”为阴性结果(was negative result); “+”为阳性结果(was positive result)

会直接影响到最终产品中内毒素的含量,从而影响到产品的安全、有效和质量可控。为减低硫酸特布他林在生产过程中细菌内毒素污染的风险,确保临床用药安全。有必要控制其原料的细菌内毒素含量。

参考文献

- [1] 禹曾达,朱文,刘虎. 硫酸特布他林有关物质的合成[J]. 中国药物化学杂志,2022,32(1):19.
YU ZD, Z W, L H. Synthesis of related substances of terbutaline sulfate [J]. Chin J Med Chem, 2022, 32(1):19.
- [2] 于德志,方选,张琪,等. 注射用曲克芦丁发生临床 ADR 后动态浊度法测定细菌内毒素含量[J]. 中国药品标准, 2021, 22(2):187.
YU DZ, FANG X, ZHANG Q, *et al.* Determination of bacterial endotoxin in troxerutin for injection by kinetic turbidimetric method after clinical ADR occurred [J]. Drug Stand China, 2021, 22(2):187.
- [3] 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020:凡例
ChP 2020. Vol II [S]. 2020:General Notice.
- [4] 张昇昉,卢海霞,王钧,等. 奥拉西坦原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(3):295.
ZHANG HF, LU HX, WANG J, *et al.* Investigation on bacterial endotoxins test of oxiracetam active pharmaceutical ingredients [J]. Drug Stand China, 2023, 24(3):295.
- [5] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:通则 1143.
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: General Chapter 1143.
- [6] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:指导原则 9301.
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: Guideline 9301.
- [7] 张昇昉,葛泽勋,刘畅,等. 左乙拉西坦原料药细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(6):622.
ZHANG HF, GE ZX, LIU C, *et al.* Methodological study of bacterial endotoxin test of levetiracetam active pharmaceutical ingredients [J]. Drug Stand China, 2023, 24(6): 622.

(收稿日期:2024-03-28)