

甲氧氯普胺原料药细菌内毒素检查方法的建立

王相忍*(濮阳市食品药品监督管理局,河南濮阳 457000)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1223-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.25

摘要 目的:建立甲氧氯普胺原料药细菌内毒素检查法。方法:将甲氧氯普胺用pH 3.0盐酸溶液溶解后,根据2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法相关规定进行溶媒干扰排除试验、干扰预试验和供试品正式干扰试验。结果:溶媒pH 3.0盐酸溶液对细菌内毒素未见破坏作用;供试品溶液稀释至0.4 mg/ml及以下质量浓度时,不干扰细菌内毒素。结论:甲氧氯普胺原料药采用细菌内毒素检查法控制其质量是可行的,其细菌内毒素限值可定为10.0 EU/mg。

关键词 甲氧氯普胺;原料药;细菌内毒素;鲎试剂;干扰试验

Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Metoclopramide Raw Material

WANG Xiang-ren(Puyang Institute for Food and Drug Control, Henan Puyang 457000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the bacterial endotoxin test of metoclopramide raw material. METHODS: Metoclopramide was dissolved with pH3.0 hydrochloric acid solution. Solvent interference exclusion test, interference pretest and formal interference test of test sample were conducted according to appendix II of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). RESULTS: No interference from pH 3.0 hydrochloric acid solution was observed in bacterial endotoxin. Metoclopramide sample was diluted to 0.4 mg/ml and below it, the bacterial endotoxin test was not interfered. CONCLUSIONS: It is feasible to control the quality of metoclopramide raw material by bacterial endotoxin test. The limitation value of bacterial endotoxin can be set as 10.0 EU/mg.

KEYWORDS Metoclopramide; Raw material; Bacterial endotoxin; Tachypleus amebocyte lysate (TAL); Interference test

甲氧氯普胺是多巴胺(D₂)受体拮抗药,用于治疗因脑部肿瘤手术、肿瘤放疗及化疗、脑外伤后遗症、急性颅脑损伤以及药物所引起的呕吐,其收载于2010年版《中国药典》(二部)^[1]中,其中注射剂采用细菌内毒素检查法,但原料药尚未将细菌内毒素检查项目列入标准中。为了加强质量控制,笔者对甲氧氯普胺原料药细菌内毒素检查法的可行性进行了探讨。

1 材料

1.1 仪器与器材

TAL-40D型试管恒温仪(湛江安度斯生物有限公司);ZH-2型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);CPA225D电子天平、PB-10型pH计(德国Sartorius公司);试验用试管、刻度吸管等玻璃器材按规定清洗,250℃干烤1h除去外源性内毒素。

1.2 药品与试剂

甲氧氯普胺原料药[开封制药(集团)有限公司,批号:1203002、1207003、1207004,纯度:99.1%、99.1%、99.6%;辽源市银鹰制药有限责任公司,批号:120802、121101,纯度:99.3%、99.2%];鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司,批号:1212242,灵敏度:0.25 EU/ml;湛江博康海洋生物有限公司,批号:1201122,灵敏度:0.25 EU/ml;规格:均为每支0.1 ml);细菌内毒素工作标准品(CSE,中国食品药品检定研究院,批号:150601-201176,效价:每支100 EU);细菌内毒素检查用水(BET水,湛江安度斯生物有限公司,批号:1211250,规格:每支100 ml;批号:1207310,规格:每支2 ml)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度的复核

根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ),将CSE用BET水溶解,

*主管药师。研究方向:药物分析。电话:0393-4439805-8021。
E-mail:936300665@qq.com

在漩涡混合器上混匀15 min,制成2.0 λ 、1.0 λ 、0.5 λ 、0.25 λ (0.50、0.25、0.125、0.0625 EU/ml)的内毒素标准溶液,按2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法^[1]复核鲎试剂灵敏度,结果2批鲎试剂灵敏度测试值(λ_c)均在0.5 λ ~2.0 λ 之间,表明鲎试剂灵敏度符合规定,可用于试验,结果见表1(注:“+”表示鲎试剂试管从恒温器中轻轻取出,缓缓倒转180°,所形成凝胶不变形、不滑脱,即反应呈阳性;“-”表示未形成凝胶或凝胶不结实、变形并脱落,即反应呈阴性。以下各表同)^[2]。

表1 鲎试剂灵敏度复核结果

Tab 1 Results of TAL sensitivity recheck

鲎试剂批号	内毒素浓度, EU/ml				阴性对照	λ_c
	0.5	0.25	0.125	0.0625		
1212242	++++	++++	----	----	--	0.21
1201122	++++	++++	----	----	--	0.25

2.2 样品内毒素限值(L)的确定

按《中国药典》细菌内毒素检查法^[1]的规定: $L=K/M$,K为按规定的给药途径人用每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量,注射剂 $K=5$ EU/(kg·h);M为人用每千克体质量每小时的最大供试品剂量,参照《临床用药须知》^[3],该药每日剂量不超过0.5 mg/kg,滴注时间按1h计算, $M=0.5$ mg/(kg·h)。故 $L=5/0.5=10.0$ EU/mg。

2.3 样品预干扰试验

2.3.1 溶媒干扰排除。甲氧氯普胺在水中几乎不溶,在酸性溶液中溶解^[1]。经过多次试验,用BET水稀释的pH 3.0盐酸溶液既能溶解样品,又不破坏内毒素。为验证pH 3.0盐酸溶液对样品中细菌内毒素的影响,特做下列验证试验:将CSE用pH 3.0的盐酸溶液1.0 ml溶解,在漩涡混合器上混匀15 min,制成100 EU/ml的内毒素溶液,然后用BET水逐级稀释200倍,制成2.0 λ (0.50 EU/ml)的内毒素溶液,作为供试品阳性对照溶液;将pH 3.0的盐酸溶液稀释200倍,作为供试品溶液,照

细菌内毒素检查法^[1]进行验证试验。结果供试品阳性对照和阳性对照(加入CSE)同呈阳性反应,可见pH 3.0的盐酸溶液对细菌内毒素未见破坏作用,详见表2。

表2 验证试验结果

Tab 2 Results of verification test

鲎试剂批号	供试品	供试品阳性对照	阳性对照	阴性对照(BET水)
1212242	--	++	++	--
1201122	--	++	++	--

2.3.2 干扰预试验。干扰试验是在供试品存在的情况下验证内毒素与鲎试剂的反应是否正常,与所使用鲎试剂的灵敏度无关,建议使用较低灵敏度(0.25 EU/ml)的鲎试剂,可尽量避免供试品所含的内毒素对干扰试验造成的阳性影响^[4]。按《中国药典》细菌内毒素检查法^[1]的规定,最大有效稀释倍数(MVD)= cL/λ ,本品为原料药,MVD=1,最小有效稀释浓度 $c=\lambda/L=0.25/10=0.025$ mg/ml。同厂家批次间生产工艺相同,因此每厂家选择1批样品进行预试验^[5-6]。分别精密称取样品32 mg,加入pH 3.0的盐酸溶液使溶解,再用BET水稀释成含甲氧氯普胺为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/ml的溶液,记为NPC;另制备同一系列质量浓度并含有2 λ (0.5 EU/ml)细菌内毒素的样品阳性溶液,记为PPC。用 λ 为0.25 EU/ml的2个厂家的鲎试剂,分别与上述NPC和PPC系列溶液进行反应,每一质量浓度重复2管,并设阴性对照(NC)和阳性对照(PC)各2管。结果当样品稀释至0.4 mg/ml及其以下质量浓度时对2个厂家的鲎试剂均不存在干扰作用,详见表3。

表3 干扰预试验结果

Tab 3 Results of preliminary interference test

鲎试剂批号	样品批号	项目	样品质量浓度,mg/ml							NC	PC
			1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025		
1212242	1203002	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	++	++	++	++
120802	120802	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++	++	++	++
1201122	1203002	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	++
		PPC	--	--	++	++	++	++	++	++	++
	120802	NPC	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		PPC	--	--	++	++	++	++	++	++	++

2.4 供试品正式干扰试验

根据干扰预试验结果,将5批样品照干扰预试验稀释方法制成质量浓度为0.4 mg/ml的溶液,将CSE稀释至2 λ 、1 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 系列浓度,然后分别用 λ 为0.25 EU/ml的2个厂家的鲎试剂,按《中国药典》细菌内毒素检查法^[1]项下的规定进行正式干扰试验。结果显示,内毒素标准品水溶液反应终点浓度的几何平均值(E_s)为0.5 λ ~2.0 λ (包括0.5 λ 和2.0 λ),内毒素供试品溶液反应终点浓度的几何平均值(E_t)为0.5 E_s ~2.0 E_s (包括0.5 E_s 和2.0 E_s), E_s 均在0.5 λ ~2.0 λ 之间, E_t 均在0.5 E_s ~2.0 E_s 范围内^[1]。表明在此试验条件下,样品对鲎试剂与细菌内毒素的反应未见干扰,详见表4。

2.5 样品细菌内毒素检查

取5个批号样品,照干扰预试验稀释方法制成0.4 mg/ml溶液,用 λ 为0.25 EU/ml 2个厂家的鲎试剂,以 $L=10$ EU/mg为评定标准,按《中国药典》细菌内毒素检查法^[1]进行操作和结果判断,结果5个批号样品均符合规定,详见表5。

3 讨论

为提高药品质量标准,更有效地控制药品质量,遵循“同一原料药用于不同制剂时,需根据临床用药要求制订相应的

表4 干扰试验结果

Tab 4 Results of interference test

鲎试剂批号	样品批号	细菌内毒素浓度,EU/ml					E_s , EU/ml	E_t , EU/ml
		0.5	0.25	0.125	0.0625	NC/NPC		
1212242	BET用水	++++	++++	---+	----	--	0.21	
	1203002	++++	++++	+---	----	--		0.21
	1207003	++++	++++	----	----	--		0.25
	1207004	++++	++++	----	----	--		0.25
	120802	++++	++++	----	----	--		0.25
1201122	121101	++++	++++	+---	----	--	0.21	
	BET用水	++++	++++	----	----	--	0.25	
	1203002	++++	++++	----	----	--		0.25
	1207003	++++	++++	----	----	--		0.25
	1207004	++++	++++	----	----	--		0.25
120802	++++	++++	----	----	--	0.25		
121101	++++	++++	----	----	--	0.25		

表5 样品细菌内毒素检查结果

Tab 5 Results of bacterial endotoxin test of sample

鲎试剂批号	样品批号	细菌内毒素检查			
		NPC	PPC	PC	NC
1212242	1203002	--	++	++	--
	1207003	--	++	++	--
	1207004	--	++	++	--
	120802	--	++	++	--
	121101	--	++	++	--
1201122	1203002	--	++	++	--
	1207003	--	++	++	--
	1207004	--	++	++	--
	120802	--	++	++	--
	121101	--	++	++	--

质量控制项目”^[1]的指导原则,故制订甲氧氯普胺原料药的安全性检查项目是非常必要的。将甲氧氯普胺原料药细菌内毒素限值定为10.0 EU/mg,与其注射剂限值相同^[1],能保证临床用药安全。

采用2批不同厂家的鲎试剂对5批样品进行干扰试验和细菌内毒素检查试验,结果表明,当样品稀释至0.4 mg/ml质量浓度时对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用,试验方法也符合细菌内毒素检查法有效性的规定^[1]。因此,甲氧氯普胺原料药采用内毒素检查法(凝胶法)是可行的。建议医院制剂室和药品生产企业用此方法控制采购原料药质量,待积累更多数据后可上升为国家标准。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录99、147、凡例.
- [2] 王宗春,罗丽萍,黄砚青.马来酸桂哌齐特注射液细菌内毒素检查方法的建立[J].中国药房,2011,22(21):1998.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:化学药与生物制品卷[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:381.
- [4] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[S].北京:中国医药科技出版社,2010:322.
- [5] 刘雪莉,袁坤,张敏.注射用硫酸链霉素细菌内毒素检查限值的研究[J].中国药房,2012,23(1):65.
- [6] 祝清芬,国明,魏霞,等.米力农注射液细菌内毒素检查法标准修订[J].中国药事,2012,26(5):456.

(收稿日期:2013-06-08 修回日期:2013-08-26)