

水合氯醛糖浆微生物限度检查方法的验证

区洁雯^{1*}, 吕锦俊²(1.佛山市顺德区第一人民医院, 广东佛山 528300; 2.广东医学院药理学系, 广东东莞 523800)

中图分类号 R927.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1998-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.26

摘要 目的:建立水合氯醛糖浆微生物限度检查方法。方法:采用2010年版《中国药典》(二部)微生物限度检查法对水合氯醛糖浆进行微生物限度检查方法验证。结果:采用常规法进行水合氯醛糖浆细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证时,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收率<70%,改用培养基稀释法后菌回收率均>70%,符合要求;控制菌(大肠埃希菌)采用常规法可检出。结论:水合氯醛糖浆微生物限度检查可采用培养基稀释法检查细菌及霉菌,常规法检查控制菌。

关键词 水合氯醛糖浆;微生物限度检查;回收率;培养基稀释法

Validation of Microbial Limit Test of Chloral Hydrate Syrup

OU Jie-wen¹, LYU Jin-jun²(1.Foshan Shunde District First People's Hospital, Guangdong Foshan 528300, China; 2.Dept. of Pharmacy, Guangdong Medical College, Guangdong Dongguan 523800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the microbial limit test for Chloral hydrate syrup. METHODS: According to the method of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition, II), microbial limit test of Chloral hydrate syrup was studied. RESULTS: When bacteria, mycete and saccharomycetes of Chloral hydrate syrup were counted by using routine method, recoveries of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were less than 70%; those of above bacteria were more than 70% and in line with the regulations when using culture medium dilution method. The control bacterias (*Escherichia coli*) could be detected by routine test method. CONCLUSIONS: In microbial limit test of Chloral hydrate syrup, the amount of bacteria and molds can be determined by culture medium dilution method, and control bacteria can be determined by routine method.

KEYWORDS Chloral hydrate syrup; Microbial limit test; Recovery rate; Culture medium dilution method

水合氯醛糖浆是现行《广东省医院制剂规范》(1985年版)下册记载的品种^[1],其具有镇静、催眠及抗惊厥作用,临床用于失眠、烦躁不安及惊厥的治疗。据文献报道,水合氯醛具有抑菌和杀菌作用^[2],其溶液也具有杀菌作用,不易霉败,可不加防腐剂^[3]。由于水合氯醛糖浆含有杀菌活性成分,微生物限度检查时采用常规法,结果的准确性可能会受到影响,不能准确反映产品受微生物污染的情况。为了有效地控制产品的质量,本文建立了该产品的微生物限度检查方法并按照《中国药典》^[4](2010年版)进行验证,确认了该检查方法的可靠性。

1 材料

1.1 仪器

SW-CJ-1FD 洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);DRH-9082 电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);LRH-150B 生化培养箱(广东省医疗器械厂);XFS-280B 立式电热压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司)。

1.2 菌种

大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均由广东省佛山市顺德区药品检验所提供,均为第2代。

1.3 样品

水合氯醛糖浆(自制,批号:20130906、20130918、20131010,规格:500 ml:50 g,批准文号:粤药制字H20060136)。

1.4 培养基

营养琼脂培养基(批号:121011)、改良马丁培养基(批号:120523)、改良马丁琼脂培养基(批号:1060426)、营养肉汤培养基(批号:110124)、玫瑰红钠营养琼脂培养基(批号:111031)、胆盐乳糖(BL)培养基(批号:110414)、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基(批号:121023)均购自北京三药科技开发公司。

1.5 稀释液

pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.9% 无菌氯化钠溶液均为自制。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备

接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养琼脂培养基中,在30~35℃下培养18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,在23~28℃下培养24~48 h后,将上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含菌数为50~100 CFU的菌悬液;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中,培养5~7 d,加入3~5 ml 0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱后吸出孢子悬液至无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含孢子数50~100 CFU的孢子悬液。

2.2 供试液的制备

称取样品10 ml,加入pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 ml,混匀,备用。

2.3 细菌、霉菌和酵母菌计数的验证

2.3.1 试验组。(1)常规法:取供试液1 ml和含50~100 CFU

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0757-22318955。E-mail:1607975221@qq.com

试验菌的菌悬液至平皿后,分别倾注相应的培养基(细菌注入营养琼脂培养基、霉菌注入玫瑰红钠营养琼脂培养基)中,细菌培养24~48 h,霉菌培养48~72 h。每株菌平行制备3个平皿,点计菌落数。(2)培养基稀释法(每皿0.5 ml):取供试液1 ml,等量分注于2个平皿中,每个平皿加入试验菌50~100 CFU,立即倾注相应培养基,采用平皿法进行培养,每株菌平行制备3组数据,最后进行菌落计数。

2.3.2 菌液组。取各试验菌50~100 CFU 分别注入平皿中,加相应培养基,培养,每株菌平行制备3个平皿,点计菌落数。

2.3.3 供试品对照组。取供试液1 ml注入平皿中,注入相应培养基中进行培养,每株菌平行制备3个平皿。按菌落计数方法测定供试品本底菌数。

2.3.4 回收率计算。试验组菌回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数×100%。

2.3.5 结果。试验结果见表1。

表1 细菌、霉菌和酵母菌菌落计数及回收率测定

Tab 1 Count and recovery of bacteria, mould and saccharomycete

菌种	样品批号	平均菌落数,CFU/ml				回收率,%	
		试验组(1)	试验组(2)	菌液组	供试品对照组	试验组(1)	试验组(2)
大肠埃希菌	20130906	55	62	67	0	82.1	92.5
	20130918	66	77	81	0	81.5	95.1
	20131010	64	70	77	0	83.1	90.9
金黄色葡萄球菌	20130906	59	76	86	0	68.6	88.4
	20130918	62	77	90	0	68.9	85.6
	20131010	53	72	76	0	69.7	94.7
枯草芽孢杆菌	20130906	26	52	54	0	48.1	96.3
	20130918	26	50	51	0	51.0	98.0
	20131010	30	55	56	0	53.6	98.2
白色念珠菌	20130906	62	80	89	0	69.7	89.9
	20130918	52	68	76	0	68.4	89.5
	20131010	69	84	100	0	69.0	84.0
黑曲霉	20130906	52	78	84	0	65.5	94.0
	20130918	53	71	77	0	68.8	92.2
	20131010	65	82	96	0	67.7	85.4

由表1可见,使用培养基稀释法(每皿0.5 ml)进行各菌回收率测定,其回收率均达70%以上,说明水合氯醛糖浆的细菌、霉菌及酵母菌计数均可采用培养基稀释法。

2.4 控制菌检查方法验证

2.4.1 菌液制备。取大肠埃希菌斜面培养物少许,接种至5 ml 营养肉汤培养基内,置于30~35 °C培养24 h。取均匀培养物1 ml,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释制成每1 ml 含菌数为10~100 CFU的菌悬液,置于2~8 °C保存,备用。

2.4.2 验证方法。(1)试验组。取供试液10 ml和上述含10~100 CFU大肠埃希菌试验菌1 ml,加入盛有100 ml BL培养基的三角瓶中,培养24 h。取上述培养物0.2 ml,接种至含5 ml MUG培养基的试管内,置于30~35 °C培养,于5、24 h在365 nm紫外线下观察,同时用未接种的MUG培养基作本底对照,呈现荧光为MUG阳性,不呈现荧光为MUG阴性。观察后,沿培养管的管壁加入5滴靛基质试液,观察液面颜色,呈玫瑰红色为靛基质阳性,呈试剂本色为靛基质阴性。(2)阴性对照组。取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml加入盛有100 ml胆盐乳糖培养基的三角瓶中,自培养24 h起,方法同“2.4.2(1)”项操作。

2.4.3 结果。试验结果见表2。

表2 大肠埃希菌验证结果

Tab 2 Validation results of *Escherichia coli*

项目	样品批号	试验组	阴性对照组
BL培养基	20130906	+	-
	20130918	+	-
	20131010	+	-
MUG培养基	20130906	+	-
	20130918	+	-
	20131010	+	-
靛基质试液	20130906	+	-
	20130918	+	-
	20131010	+	-

注:“+”表示反应呈阳性,“-”表示反应呈阴性

note:“+”represents positive response;“-”represents negative response

由表2可见,试验组检出了大肠埃希菌而阴性对照组未检出,表明可采用常规法对本品进行控制菌(大肠埃希菌)检查。

3 讨论

(1)药品微生物限度检查主要是检查药品中具有繁殖能力的活细菌,由于某些药品含有抑菌成分,其在一定浓度下对微生物具有抑制作用,从而影响微生物限度检查结果的可靠性。消除抑菌成分的影响有培养基稀释法、薄膜过滤法、中和法等^[4],其中培养基稀释法是将供试液1 ml分成若干个平皿,使平皿中抑菌成分的浓度变低,从而减少对微生物繁殖的影响,较其他方法简便、经济。

(2)水合氯醛具有杀菌作用,有实验报道其对大肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)为 3.125×10^{-3} g/ml,最低杀菌浓度(MBC)为 6.25×10^{-3} g/ml;对金黄色葡萄球菌的MIC为 6.25×10^{-3} g/ml, MBC为 6.25×10^{-3} g/ml^[2]。在本试验中,用常规法进行细菌、霉菌及酵母菌验证时,结果显示大肠埃希菌的回收率大于70%,金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉菌接近70%,而枯草芽孢杆菌回收率远低于70%,因此除大肠埃希菌外其他均不符合2010年版《中国药典》(二部)要求。MIC是在特定环境下孵育24 h时可抑制某种微生物出现明显增长的最低药物浓度^[5]。尽管水合氯醛在平皿中的浓度只有 6.67×10^{-4} g/ml,但对多种细菌生长已有一定的抑制作用,除大肠埃希菌外其他4种菌回收率均已超过30%,加样回收率低于70%。采用培养基稀释法,平皿中水合氯醛浓度约为 3.33×10^{-4} g/ml,5种菌的回收率均>70%,消除了供试液的抑菌活性,达到方法要求。

(3)试验中为避免出现供试品与菌液分散不均致回收率计数重现性不高的现象,加供试品和菌液至平皿时应尽可能点散开,即用点注法^[6]。

(4)水合氯醛糖浆含量为0.1 g/ml,虽是医院常用制剂,但其微生物限度检查方法验证未见文献报道。本文通过试验为该品种的微生物限度检查提供了可靠的方法。《中国医院制剂规范》第二版载有“水合氯醛溶液”,含量也为0.1 g/ml。虽然单糖浆有抑菌作用,但是在本法平皿中的蔗糖浓度很低,不具有抑菌作用。因此,本法对水合氯醛溶液的微生物限度检查也具有参考意义。

参考文献

[1] 广东省卫生厅.广东省医院制剂规范[S].1985年版.1985:

HPLC法检查腺苷注射液的有关物质

阚微娜*, 杨宏伟(辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-2000-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.27

摘要 目的:建立腺苷注射液中有物质的检查方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC C₁₈,流动相为乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH 5.8)(12:88),流速为1.0 ml/min,检测波长为260 nm。已知杂质按外标法以峰面积计算含量;总杂质及其他单个杂质以自身对照法计算。结果:在该色谱条件下,腺苷与各杂质分离良好,腺苷检测质量浓度线性范围为0.3~30 μg/ml,特定杂质尿苷、鸟苷、肌苷及腺嘌呤检测质量浓度线性范围均为0.03~3.0 μg/ml($r=0.999\ 8\sim 1.000$),检测限为0.03、0.21、1.20、0.21、0.03 ng。结论:该方法操作简单、灵敏度高,为更好地控制产品的质量提供了有效的检查方法。

关键词 腺苷注射液;高效液相色谱法;有关物质检查;腺嘌呤;尿苷;鸟苷;肌苷

Determination of Related Substances in Adenosine Injection by HPLC

KAN Wei-na, YANG Hong-wei(Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method to determine the related substances in Adenosine injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent TC C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 5.8, 12:88) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 260 nm. The contents of known impurities were calculated by peak area using external standard; the contents of total impurities and single impurity were calculated by self-control method. RESULTS: The adenosine can be separated from impurities well. The linear relationships of adenosine and impurities (uridine, guanosine, inosine and adenine) were good at the range of 0.3-30 μg/ml and 0.03-3.0 μg/ml ($r=0.999\ 8\sim 1.000$), and the detection limits were 0.03, 0.21, 1.20, 0.21 and 0.03 ng. CONCLUSIONS: The method is simple and sensitive. It can be used to control the quality of the products.

KEYWORDS Adenosine injection; HPLC; Related substance; Adenine; Uridine; Guanosine; Inosine

腺苷(Adenosine)是一种内源性嘌呤核苷。在美国,腺苷是经FDA批准的用于治疗转复阵发性室上性心动过速的一线药物,也是经FDA批准的用于心脏药物负荷试验的两种药物之一^[1],我国批准上市的制剂为注射剂。2010年版《中国药典》未收载腺苷及腺苷注射液,新药注册标准采用高效液相色谱(HPLC)法仅对单个杂质及总杂质进行检查,并未对已知杂质进行控制^[2]。

腺苷的合成可分为生物合成法和化学合成法,在合成过程中易产生其他核苷类的杂质,已确认的核苷类杂质包括鸟苷、尿苷、肌苷和腺嘌呤等^[3-5]。本文参照文献^[6],建立了HPLC法检查腺苷注射液中有物质的方法,并对已知核苷类杂质进行了定量测定,该法操作简单、灵敏度高,能很好地分离腺苷及其他包括核苷类在内的杂质,定量准确、无干扰,为更好地控制产品的质量提供了有效的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A HPLC仪,包括在线真空脱气机、二元泵、自动进

样系统及二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

腺苷对照品(批号:110879-200202,纯度:100%)、腺嘌呤对照品(批号:110886-200001,纯度:99.4%)均来源于中国食品药品检定研究院;尿苷对照品(批号:S46221-328,纯度:≥98%)、鸟苷对照品(批号:027k1610,纯度:≥99.0%)、肌苷对照品(批号:112k7033,纯度:≥99.8%)均来源于美国Sigma公司;腺苷注射液样品(批号:20121224、20121225、20121226,规格:2 ml:6 mg)为辽宁某公司提供;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品贮备液及对照品溶液。取腺嘌呤、尿苷、鸟苷和肌苷对照品约15 mg,精密称定,分别置于50 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为各杂质对照品贮备液;取腺苷对照品约15 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,再精密加入上述各杂质对照品贮备液5 ml,使腺苷溶解,并加水稀释至刻度,作

20.

[2] 初晓,刘爱明,李伟.水合氯醛对大肠杆菌金黄色葡萄球菌抗菌效能的测定[J].中国药师,2003,6(7):415.

[3] 卫生部药政局.中国医院制剂规范:西药制剂[S].2版.北京:中国医药科技出版社,1996:6-7.

[4] 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107-116.

[5] 杜敏.药学微生物实用技术[M].北京:中国医药科技出版社,2009:129.

[6] 张婷,郑绍忠,刘全芳.复方呋喃西林滴鼻液微生物限度检查的验证[J].中国药房,2011,22(45):4 275.

(收稿日期:2013-10-18 修回日期:2013-12-31)

* 主管药师,硕士。研究方向:生化药物分析。电话:024-25425029。E-mail:kanweina@126.com