

3 讨论

合适的内标是准确进行生物样品含量测定的关键,有文献报道以茶碱^[5]、头孢唑啉^[7]、头孢匹罗^[8]、甲硝唑^[9]作为头孢噻利生物样品检测的内标,本实验选用茶碱作为内标,色谱行为与头孢噻利相近,不干扰头孢噻利的测定,能从生物样品中与头孢噻利同时获得较好的提取物,也能较好的校正由于样品提取对目标化合物造成的损失,获得满意的测定结果。

本实验研究硫酸头孢噻利小鼠血浆以及脑组织内的分布情况,选取小鼠为实验动物,无法在同一实验个体身上实现采集所有时间点的生物样品,为了消除实验动物个体间的差异,同一生物样品取 6 只实验动物($n=6$),测定结果取平均值,分别计算血浆中以及脑组织内的药动学参数。

血脑屏障是血液和脑组织之间的屏障,对脑内环境稳定和防止有害物质进入等方面起到重要作用,它能阻止大约 95% 的药物进入脑组织^[10]。文献报道,头孢噻利血脑屏障透过性良好,大鼠体内血脑屏障透过率为 10%~20%^[7]。本实验测定小鼠血浆以及脑组织内的药动学参数,两者 AUC 浓度差值较大, $AUC_{\text{脑}}$ 与 $AUC_{\text{血}}$ 比值约为 1:98,与文献报道有差异,原因可能是实验动物的种属差异,也可能是药物透过血脑屏障后,在脑内血管,脑脊液中的残留,导致分布至脑组织的药物偏低。

REFERENCES

- [1] HOEFEL J, KROENER C, BERWECK S, et al. Haemophilus paraphrophilus, a rare cause of intracerebral abscess in children [J]. Eur J Pediatr, 2008, 167(6): 629-632.
- [2] BRANDT C T. Experimental studies of pneumococcal meningitis [J]. Dan Med Bull, 2010, 57(1): B4119.
- [3] MINE Y, WATANABE Y, SAKAMOTO H, et al. Excellent activity of FK037, a novel parenteral broad-spectrum cephalosporin, against methicillin-resistant staphylococci [J]. J Antibiot(Tokyo), 1993, 46(1): 99-119.
- [4] LEI H, HUA J Y, TIAN W Q, et al. Compatible stability of cefoselis sulstate with metronidazole injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(3): 274-276.
- [5] FWNG Q, LIMEI Z, YEXIN S, et al. Pharmacokinetics of cefoselis injection after a single dose in Chinese healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2009, 25(3): 207-210.
- [6] HUI X, XU K, DOU J J, et al. Studies on transdermal pharmacokinetic and pharmacodynamics of sinomenine transfersomes [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2011, 46(5): 374-377.
- [7] OHTAKIL K, MATSUBARAL K, FUJIMARUL S, et al. Cefoselis, a β -lactam antibiotic, easily penetrates the blood-brain barrier and causes seizure independently by glutamate release [J]. J Neural Transm, 2004, 111(12): 1523-1535.
- [8] NAGATA M, YASUHAR M. Effect of experimental renal failure on the pharmacodynamics of cefoselis-induced seizures in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(9): 1049-1052.
- [9] HUA J Y, ZHU Y Y, TIAN W Q, et al. Determination of cefoselis in human plasma by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 548-550.
- [10] PARDRIDGE W M. Drug targeting to the brain [J]. Pharm Res, 2007, 24(9): 1733-1734.

收稿日期: 2013-08-12

制药用水微生物检验方法合理性的探讨

李珏, 王知坚, 郑小玲(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 比较各国药典制药用水微生物检验方法的规定,通过实验研究,探讨各种方法的合理性。方法 在分析比较国内外药典异同点的基础上,分别采用中国药典、欧洲药典和美国药典的方法对浙江省内 5 家制药企业的水系统进行测定。结果 国内外药典在制药用水污染菌的检出效率上存在差异,特别是对生长缓慢的寡养菌差异显著。结论 欧洲药典的方法有利于水系统中污染菌的回收,尤其是对一些寡营养和缓慢生长菌的回收。

关键词: 制药用水;微生物;检验方法;中国药典;美国药典;欧洲药典;比较

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)06-0735-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.024

Discussion of Rationality of Pharmaceutical Water Microbiological Testing Methods

LI Jue, WANG Zhijian, ZHENG Xiaoling(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

作者简介: 李珏,女,硕士,主管药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: lj811005@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare pharmaceutical water microbiological testing methods of national pharmacopoeia and explore rationalities of various methods. **METHODS** The water system of five pharmaceutical companies in Zhejiang province were tested with Chinese Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia and United States Pharmacopoeia methods on the basis of analysis and comparison of their similarities and differences. **RESULTS** There were significant differences in the detection efficiency of pharmaceutical water pollution bacteria among domestic and international pharmacopoeia, especially for slow-growing oligonucleotide bacteria. **CONCLUSION** European Pharmacopoeia methods are conducive to recycling of contaminated bacteria in the water system, especially oligotrophic and slow-growing bacteria. **KEY WORDS:** pharmaceutical water; microbiological; testing methods; Chinese Pharmacopoeia; USP; European Pharmacopoeia; comparison

药品生产用水的质量直接影响药品的质量。因此, 制药用水的质量控制, 特别是微生物指标的控制是极其重要的。适宜的制药用水微生物检验方法需要考虑标准的灵敏度、污染菌的检出率、培养时间、费用以及技术的复杂性。本实验通过对国内外药典标准的比较, 并结合水样微生物污染测定实验来探讨方法的合理性。

1 国内外药典比较

查阅了国内外药典, 分别为中国药典 2010 年版^[1](Ch.P 2010)、欧洲药典 7.0 版^[2](EP 7.0 版)以及美国药典 35 版^[3](USP35 版), 3 国药典的制药用水微生物检验方法存在较大区别, 主要体现在编制的体例、培养体系和检测方法上。

1.1 编排体例的比较

美国药典在附录〈1231〉制药用水中对制药用水制备过程中微生物的控制、数据的监测以及微生物计数方法进行了大篇幅的阐述, 最终给出的是推荐的计数方法; 与美国药典不同, 欧洲药典则是在制药用水的各论项下规定了明确的检验方法、标准限度以及培养基适用性检查方法; 我国药典与欧洲药典相同, 也是将制药用水的微生物限度检查方法及标准限度收载在正文品种项下, 在制药用水附录中仅对制药用水分类及制备方法进行了规定。

1.2 培养体系的比较

中国药典采用的培养体系与药品的微生物限度检查法相同, 采用方法是将营养琼脂(nutrient agar medium, NA)培养基和玫瑰红钠琼脂(rose bengal agar medium, RA)培养基上的培养结果进行合并计数作为最终的报告值。而国外药典则是采用一种培养基, 仅是将这一种培养基上的培养结果进行计数。在培养体系的选择上, 欧洲药典与美国药典也存在差异。欧洲药典明确规定了一种培养基为 R2A 琼脂培养基, 而美国药典首先对所采用的方法不做强制性规定, 即便是在推荐的方法中也不明确规定某一种培养基。3 国药典培养体系的比较见表 1。

法中也不明确规定某一种培养基。3 国药典培养体系的比较见表 1。

表 1 3 国药典培养体系的比较
Tab 1 Water culture systems in different pharmacopoeia

培养体系	3 国药典		
	USP 35 版推荐方法	EP 7.0 版	ChP 2010 年版
培养基	平板计数琼脂, TGYA 或其他用于标准方法中的培养基	R2A	NA 和 RA
培养温度	30~35 ℃	30~35 ℃	NA 为 30~35 ℃ RA 为 23~28 ℃
培养时间	至少 48~72 h	至少 5 d	NA 至少 3 d RA 至少 5 d

1.3 检测方法的比较

中国药典与欧洲药典规定薄膜过滤法为检测方法, 美国药典在推荐方法中同时列举了平皿法和薄膜过滤法 2 种方法, 在纯化水检验时可以进行选择。注射用水的检测方法 3 国药典一致, 均为薄膜过滤法。

1.4 标准限度规定的比较

3 国药典对制药用水微生物限度标准的规定是一致的, 为纯化水每 1 mL 不得过 100 cfu。

2 水样中微生物污染的定量测定

培养体系的不同是 3 国药典之间的一个最主要的区别, 本次实验目的是考察不同的培养体系在污染菌的检出率上是否存在差异。

2.1 水样来源

实验共收集了浙江省内 5 家制药企业纯化水系统的 50 份水样。5 家制药企业涵盖了国内制药企业、中外合资制药企业以及医院制剂室。50 份水样的采集方式为: 每家单位分别在相同的 5 个取水时间点各取 2 份水样, 取样时间间隔为一周, 同一次取样每份样品均来自于不同的取水点。

2.2 培养基来源

NA 培养基、RA 培养基(北京三药科技开发公

司); 胰蛋白胍大豆琼脂培养基(Tryptic soy agar medium, TSA)、R2A 琼脂培养基均购自美国 BD 公司。

2.3 方法

本次实验的检测方法为平皿法, 分别按照 Ch.P 2010 年版、EP 7.0 版以及 USP 35 版确定培养基和培养条件。其中 USP35 的培养基和培养条件确定为: TSA 培养基, 培养 72 h。

2.4 测定结果

以 3 国药典标准规定的纯化水每 1 mL 不得过 100 cfu 为判定依据, 测定结果为: 参照 Ch.P 2010 年版和 USP35 版推荐的方法测定, 结果 5 家制药企业提供的 50 份水样均符合标准限度规定; 而参照 EP7.0 版的方法测定, 50 份水样中有 14 份超过标准限度的规定, 不符合率为 28%, 这 14 份水样分别来自于 4 家制药企业。

3 水样中特定微生物的定性鉴定

在水样微生物污染测定中, 从一个微生物污染水平较低的水系统当中分离得到了一株生长缓慢的细菌, 这株菌是在 R2A 培养基, 33 °C 的培养温度, 第 5 天(EP7.0 版的方法)才被计数到, 平行操作的其他 2 种培养基和培养条件均未发现有该菌生长。采用传统生化鉴定手段(VITEK 2 Compact 鉴定)与 16S rDNA 基因序列分析技术相结合的方法对其进行了鉴定。

3.1 仪器

VITEK 2 compact 型全自动微生物鉴定系统、全自动革兰氏染色仪(法国生物梅里埃公司); 3500 MicroSeq 全自动微生物基因分型鉴定系统(美国 LT 公司)。

3.2 方法

3.2.1 分离和纯化 挑取平板上单个菌落划线至 R2A 琼脂培养基, 置于 33 °C 培养 48 h, 再同上述步骤分离纯化一次, 备用。

3.2.2 生化反应鉴定方法 分离的微生物经革兰氏染色镜检涂片, 初步判断菌株类型, 采用 VITEK 2 Compact 系统相应的板卡对其进行生化反应的鉴定。

3.2.3 16S rDNA 基因序列分析方法 采用仪器配套的试剂盒依次对分离的微生物进行 DNA 抽提、PCR 扩增、PCR 纯化、标记反应以及标记反应产物纯化, 最后进行毛细管测序。

3.3 鉴定结果

该菌菌落为橙红色, 革兰氏阴性短杆菌, 生化鉴定结果为 *Methylobacterium spp*(甲基杆菌属), 分子生物学 16S rDNA 鉴定结果为耐辐射甲基杆菌 *Methylobacterium radiotolerans** (ATCC=27329), 匹配度 99.99%。

4 讨论

从水样微生物污染测定结果来看, 采用欧洲药典的测定方法, 结果 5 家制药企业中有 4 家出现了超过标准限度规定的情况。另外, 采用美国药典推荐的方法测定结果与中国药典基本一致, 5 家制药企业均符合标准限度规定。由上述结果可以推论, 中国药典与欧洲药典的检测方法在污染菌的检出率上存在明显的差异。结合上述国内外药典比较来看, 导致差异的原因主要来自于培养体系。欧洲药典规定的 R2A 琼脂培养基, 30~35 °C 的培养温度, 至少培养 5 d 的培养条件最有利于水系统中污染菌的检出。

从实验结果来看, 美国药典的检测方法在污染菌的检出率上与中国药典相当。但这里所指的美国药典方法仅是其在附录〈1231〉制药用水中给出的推荐方法, 因此不能简单的拿推荐方法对其整体进行评价。就美国药典对制药用水微生物污染控制的思路来讲, 它在附录〈1231〉经典的培养方法章节中, 讨论了不同检测方法、培养基类型、培养温度以及培养时间的各自适用范围。因此, 美国药典是开放的、弹性的, 它认为检测不同水系统的微生物数量应选择适合该水系统微生物稳态的培养条件, 也就是说, 一个水系统是使用较高还是较低的培养温度, 高营养培养基还是低营养培养基, 取决于该水系统微生物稳态的建立, 即该水系统主要存在的是异养菌还是生长缓慢的寡营养菌。高营养培养基, 如美国药典推荐方法中的胰蛋白胍大豆琼脂培养基, 适用于异养菌的计数, 而低营养培养基, 如欧洲药典采用的 R2A 琼脂培养基则更有利于分离生长缓慢的寡营养细菌和某些更适于在低营养环境生长的细菌。

从微生物污染控制较好的水系统中分离得到的缓慢生长菌, 提示我们, 在日常维护、消毒较好的水系统中, 容易存在某些较难杀灭的菌, 为回收这类生长十分缓慢的菌或者是受到消毒剂等损伤的菌, 有必要延长培养时间。在实验过程中也发现, 部分水样在 R2A 琼脂培养基上培养至 72,

96 h, 菌体个头很小, 难准确计数, 如不在伞棚灯下观察, 极易漏检。这种情况甚至会出现培养的第 5 天, 延长培养至第 7 天才可清楚分辨疑似菌, 并且随着培养时间的延长, 菌落数量会有大幅度的增加。这也说明, 低营养的培养基需要较长的培养时间才能得到更多的菌落数量, 但是延长培养时间带来的好处应与方法的时效性平衡。

在纯化水检测方法的选择上, 3 国药典中只有美国药典允许采用平皿法。分析 2 种检测方法的优缺点: 薄膜过滤法相比平皿法的优势在于可通过冲洗来去除样本中的抑菌成分, 但这个作用在制药用水微生物控制中可被忽略, 另外更重要的是薄膜过滤法可以检测更大的样本量, 以保证所得到的数据更具有统计学意义; 而平皿法也有其费用低, 检测方法简便的优势。因此, 在微生物

污染水平较高的水系统采用平皿法即可得到准确数据, 而低污染水平的水系统则更适合选择样本量大的薄膜过滤法。当前, 制药企业 GMP 规定, 企业应根据长期监测数据制订微生物污染的警戒限和行动限水平。因此, 在监控水系统时, 可根据预期微生物的数量来决定检测样品的取样量, 应在可准确计数的范围内尽量选择大样本量上膜, 持续跟踪水系统的微生物状态。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 411-412.
- [2] EP 7.0 Vol 2 (欧洲药典 7.0 版. 二卷) [S]. 2011: 2319-3226.
- [3] USP 35/NF 30 Vol 1 (美国药典 35 版. 一卷) [S]. 2012: 886-907.

收稿日期: 2013-04-23

HPLC 测定人血清中甲氨蝶呤浓度

康斯丹, 黄巧玲* (杭州市第三人民医院, 杭州 310009)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定人血清中甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)浓度的方法。方法 以茶碱为内标, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液(pH 6.6)-甲醇(82:18), 检测波长为 MTX 306 nm 和茶碱 254 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃。结果 MTX 浓度分别在 0.03~1.65 μmol·L⁻¹($r=0.999\ 9$)和 1.65~66.08 μmol·L⁻¹($r=0.995\ 8$)内线性关系良好, 平均方法回收率 97.6%。平均萃取回收率 68.5%, 日内、日间 RSD 均<5%, 血清最低检测浓度为 0.03 μmol·L⁻¹。结论 该方法灵敏、准确, 线性范围宽, 适用于临床甲氨蝶呤的血药浓度监测。

关键词: 甲氨蝶呤; 高效液相色谱法; 血药浓度; 骨肉瘤

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)06-0738-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.025

Determination of Methotrexate Concentration in Human Plasma by HPLC

KANG Sidan, HUANG Qiaoling* (The Third Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method to determine the concentration of methotrexate(MTX) in human plasma. **METHODS** Theophylline was used as the internal standard. The analytical column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was phosphate buffer solution with pH 6.6-methanol(82:18). The UV determine wavelength of MTX was 306 nm and theophylline was 254 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The calibration curves of MTX were linear at a concentration range from 0.03 to 1.65 μmol·L⁻¹($r=0.999\ 9$) and 1.65 to 66.08 μmol·L⁻¹($r=0.995\ 8$). The intra-day and inter-day precision were both less than 5%. The average method recovery was 97.6% and the average extraction recovery was 68.5%, with a lowest limit of 0.03 μmol·L⁻¹. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, wide linear range, suitable for plasma concentration monitoring of MTX.

KEY WORDS: methotrexate; HPLC; plasma concentration; osteosarcoma