

乙腈-甲醇-水或乙腈-0.1%三乙胺, 保留时间为10~43 min^[9-10]。加入氨水、三乙胺等改性剂目的是改善其峰形, 提高其灵敏度和准确度。本课题组前期对氨水、三乙胺和正丁胺 3 种改性剂进行对比, 发现在流动相中加入氨水和三乙胺, 基线不平稳, 不利于钩吻素子的测定, 而正丁胺则不存在上述问题。因此本次实验采用乙腈-0.2%正丁胺水溶液进行钩吻素子含量测定。

UPLC 具有灵敏度高、特异性强等优点, 目前广泛应用于样品的分析。本实验建立钩吻素子含量测定的 UPLC, 并对方法进行系统的方法学验证。在流动相为乙腈-0.2%正丁胺水溶液(30:70)、流速为 0.5 mL·min⁻¹、25 °C、pH 为 11.77, 256 nm 检测波长条件下, 钩吻素子与相邻杂质达到理想分离效果(分离度>1.5), 保留时间为 1.99 min, 缩短样品的分析时间, 同时也提高样品分析效率。该方法灵敏度高, 专属性和重复性良好, 精密度和准确度也符合中国药典 2010 年版的要求。

耐用性试验主要考察方法本身对于可变试验因素的抗干扰能力。本实验在主峰的拖尾因子<2.0, 主峰与杂质峰必须达到基线分离的前提下(分离度>1.5), 分别考察同一批溶液在流动相配比变化±5%、流动相 pH 为 11.77±0.2、流速(0.5±0.1)mL·min⁻¹、色谱柱温度(25±5)°C 的含量, 结果表明流动相比例、pH 值、流速、柱温对测定无显著影响, 确保含量测定时色谱条件的适应性、准确性、重复性和可信性。

该方法简单易行、专属性强, 准确可靠, 为钩吻素子深入开展毒理、药效和临床研究提供科学依据。本实验研究提示一定浓度钩吻素子生理盐水溶液的稳定性, 为后续钩吻素子深入开展毒

理、药效和临床研究时制剂配制提供参考。至于更高浓度和其他温度条件是否也会有类似规律, 还有待更深一步的研究。

REFERENCES

- [1] XIE Z W. Chinese herbal medicine compilation(全国中草药汇编)[M]. Vol 2. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 834-834.
- [2] ZHANG L L, WANG R Z, HUANG C Q, et al. Extraction and separation of koumine from *Gelsemium alkaloids* [J]. J First Mil Med Univ(第一军医大学学报), 2004, 24(9): 1006-1008.
- [3] SU Y P, SHI D M, FANG Z D, et al. Studies on physicochemical properties of koumine and stability of koumine solution [J]. J Fujian Med Univ(福建医科大学学报), 2013, 47(4): 195-198.
- [4] FANG Z D, SHI D M, SU Y P, et al. Studies on formulation optimization and *in vitro* drug release of koumine hydrophilic matrix sustained-release tablets [J]. J Fujian Med Univ(福建医科大学学报), 2013, 47(4): 214-217.
- [5] QUE H Q, XU Y, YANG J, et al. The expression effect of koumine in sciatic nerve chronic injury model of rat spinal cord 3 α -hydroxy steroid dehydrogenase [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2012, 26(3): 443-443.
- [6] WANGW, LIU Y S, QIAO T, et al. Simultaneous determination of carbamazepine, lamotrigine, clonazepam, diazepam and oxazepam in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1215-1220.
- [7] LUO J W, WU Y Y, LI Y Y, et al. Determination of aristolochic acid in health food by UHPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 186-189.
- [8] TIAN M, LI W, SUN H Y, et al. High-performance liquid chromatography determination of conditions for the durability test study [J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报), 2010, 38(3): 77-80.
- [9] ZHOU X L, YUAN J Q, FAN X Y, et al. Establishment of the quality standard of rheumatism ostalgia spray III [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2013, 22(3): 364-372.
- [10] YANG Y, CHEN J Z, WU S S, et al. Metabolic characterization of koumine in pig and rat liver microsome [J]. J Fujian Univ Trad Chin Med(福建中医药大学学报), 2013, 22(2): 47-79.

收稿日期: 2014-06-16

BacTALERT[®]3D 微生物检测系统作为无菌检查替代方法可行性的探讨

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 评价 BacTALERT[®]3D 微生物检测系统在特定注射剂产品中作为替代方法开展无菌检查的可行性。方法 收集 3 种不同类型的无菌制剂, 参照中国药典 2010 年版附录药品微生物检验替代方法验证指导原则的有关内容, 考察在专属性、检测限、重复性以及耐用性这 4 个方面与现行版中国药典无菌检查法是否存在差异。结果 对于单一品种门冬氨酸钾镁注射液, BacTALERT[®]3D 微生物检测系统与药典方法基本相当, 而专属性试验结果表明该检测系统不适用于其余

基金项目: 浙江省省级重点实验室工程技术研究中心建设计划项目(2014E10006)

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

2 种无菌制剂的无菌检查。结论 BacTALERT®3D 微生物检测系统在逐一验证的前提下, 对特定注射剂产品可用于生产过程的无菌质量控制。

关键词: 替代方法; BacTALERT®3D; 无菌检查

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0474-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.022

Discussion on Feasibility of Alternative Sterility Test of BacTALERT®3D Microbial Detection System

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

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the feasibility of BacTALERT®3D Microbial Detection System carrying out as an alternative method of sterility test in particular injection. **METHODS** According to the alternative method validation guiding principle in Appendix of Chinese Pharmacopoeia 2010, collecting three different types of injections to validate the specificity, limit of detection, reproducibility and durability which were experimental researched and statistical compared with the pharmacopoeia method. **RESULTS** No statistically substantial difference in test result was found between using the BacTALERT®3D Microbial Detection System and the pharmacopoeia method in testing Potassium Aspartate and Magnesium Aspartate injection. But specificity test results showed that BacTALERT®3D Detection System did not apply to other two injections. **CONCLUSION** For a specific product, BacTALERT®3D Microbial Detection System can be used to the production process control after validation.

KEY WORDS: alternative method; BacTALERT®3D; sterility test

药品无菌检查是药品质量中对微生物限量的最高要求, 任何微生物的存活对于用药者而言都可能是致命的。近年来屡屡曝出的药害事件也使无菌制剂的无菌保障问题成为公众关注的焦点。新中国第一部药典(1953 年版)就收载了无菌检查法, 在以后的历次药典改版中, 对培养基种类及质量要求、样品的分类及检验量、检验方法等均进行了不断改进。目前, 无菌检查法仍采用逐日观察, 培养 14 d。根据培养管浑浊产生的情况判定样品是否合格, 在执行过程中存在一些问题, 如逐日观察的规定会导致无法及时发现阳性结果, 无菌检查的检验结果均为实验人员手工记录, 实验结果缺乏一定的可追溯性等。当前, 商品化的快速微生物检查法(RMM)^[1]以其快速、操作简便、准确和检测结果的可追溯等优点, 充分满足了质量保证所提出的更高要求, 同时, 也为过程分析技术(PAT)^[2]的实现提供了技术上的支撑。为了适应技术发展的需要, 中国药典^[3]也于 2010 年版首次在指导原则中收载了替代方法验证的有关内容。相关的规范性文件的出台为快速微生物检查法的评价提供了理论依据和指南支持。

BacTALERT®3D 微生物检测系统的工作原理: 首先将待检样品用无菌注射器注入相应的培养瓶中, 当培养瓶内有微生物生长时, 释放出的二氧化碳信号会被该系统的 LES 感应器捕获, 并将信号进行转换和放大, 发现阳性后立即报警。

目前, BacTALERT®3D 微生物检测系统已经被 FDA 批准用于细胞治疗药物以及基因治疗药物。在国内, 该系统也被用于是否为商业无菌产品的检验, 全血及成分血的无菌试验^[4], 以及临床血液、无菌体液的病原学诊断^[5]。

本实验收集了 3 种不同类型的无菌制剂, 参照中国药典 2010 版附录药品微生物检验替代方法验证指导原则的有关内容, 分别考察专属性、检测限、重复性以及耐用性这 4 个方面与现行版中国药典无菌检查法相比是否存在差异。评价对于单一品种无菌检查采用 BacTALERT®3D 微生物检测系统替代药典无菌检查法的可行性, 为该方法作为产品放行检验和过程控制的技术手段提供依据。

1 仪器与材料

试验样品: 门冬氨酸钾镁注射液(专属性预试验, 批号: 1303111; 替代方法验证试验, 批号: 1311211); 丹参注射液(批号: 1301153); 鸦胆子油乳注射液(批号: 20121209), 以上 3 种试验样品规格均为 10 mL。

试验菌株: 金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希菌 CMCC(B)44102、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104、生孢梭菌 CMCC(B)64941、枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501、白色念珠菌 CMCC(F)98001、黑曲霉 CMCC(F)98003 均由中国食品药品检定研究院提供。

BacTALERT®3D 微生物检测系统(法国生物梅

里埃公司)。

培养基: 硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基和胰酪胨大豆肉汤培养基均来自广东环凯微生物科技有限公司。

2 预试验

2.1 3个试验样品无菌检查方法验证

按照中国药典 2010 年版附录无菌检查法中方法验证试验的规定, 对 3 个试验样品逐一进行验证。

试验结果表明, 3 个试验样品在该检验量以及检验条件下无抑菌作用。无菌检查方法为薄膜过滤法, 无需冲洗液冲洗。

2.2 3个试验样品的专属性预试验

2.2.1 试验方法 药典组: 3 个试验样品按照无菌检查方法验证结果进行试验; BacTALERT®3D 微生物检测系统组(3D 组): 采用无菌注射器将 3 个品种的试验样品分别接种至 3D 瓶中, 混匀。然

后将制备好的菌悬液 0.1 mL(含菌量<100 cfu)平行接种至药典组和 3D 组的样品管(瓶)中, 混匀, 每个品种每种菌平行 3 次独立试验。药典组细菌管于 32.5 °C, 真菌管于 25.5 °C 培养 7 d, 每天观察结果, 3D 组上机测定, 同药典组温度培养, 机器自动观测, 发现阳性后立即报警。

2.2.2 试验结果 3 个试验样品的预试验结果表明, 2 组的促生长能力基本相当, 说明样品存在不会对检验结果造成影响; 鸦胆子油乳注射液 3D 组 7 株试验菌的促生长能力普遍快于药典组, 尤其表现在对白色念珠菌的促生长能力上, 需要进一步试验, 排除假阳性的可能; 丹参注射液 3D 组 5 株细菌培养至 7 d 仍为阴性, 肉眼观察 3D 瓶中的培养基也为澄清状态, 表明在该样品存在下, 3D 检测系统对 5 株试验菌无法恢复生长, 替代方法不适用于该品种的无菌检查。3 个试验样品的预试验结果见表 1。

表 1 预试验结果

Tab. 1 Pre-test results

菌名	报阳性时间																	
	门冬氨酸钾镁注射液						丹参注射液						鸦胆子油乳注射液					
	药典组/d			3D 组/h			药典组/d			3D 组/h			药典组/d			3D 组/h		
金黄色葡萄球菌	1	1	1	14	14	14	1	1	1	—	—	—	1	1	1	14	14	14
大肠埃希菌	1	1	1	13	14	15	1	1	1	—	—	—	1	1	1	14	14	14
枯草芽孢杆菌	1	1	1	16	16	17	1	1	1	—	—	—	1	1	1	14	15	16
铜绿假单胞菌	1	1	1	20	20	20	1	1	1	—	—	—	1	1	1	18	18	19
生孢梭菌	1	1	1	19	19	19	1	1	1	—	—	—	1	1	1	17	17	16
黑曲霉	2	2	2	50	50	50	2	2	2	64	65	137	2	2	2	33	37	42
白色念珠菌	2	2	2	34	34	34	2	2	2	49	48	49	2	2	2	19	20	23

注: “—”表示培养至第 7 天仍未报阳性结果。

Note: “—” no positive reports until the seventh day.

2.2.3 鸦胆子油乳注射液 3D 组微生物生长确认试验 鸦胆子油乳注射液为乳白色的乳状液体, 接种至 3D 瓶后培养基表现为浑浊状态, 无法直接从外观上判断是否有微生物生长。需要转种进行确认试验。试验发现, 仅接种样品鸦胆子油乳注射液不加菌液, 检测系统在 1 d 之内阳性报警, 取报阳性的 3D 培养瓶中的培养液 1 mL 转种至胰酪胨大豆肉汤培养基中, 培养 3 d, 观察培养基是否再出现浑浊。经试验确认结果为无菌生长, 说明鸦胆子油乳注射液采用 BacTALERT®3D 微生物检测系统进行检测会出现假阳性的结果, 替代方法不适用于该品种的无菌检查。

3 门冬氨酸钾镁注射液替代方法的验证

3.1 专属性试验

3.1.1 专属性试验方法 专属性试验应分别考察

替代方法培养体系的促生长试验以及样品对检测结果的影响。试验方法同专属性预试验。

3.1.2 专属性试验结果及结果分析 比较观察时间末的生长率, 细菌 48 h, 真菌 72 h, 在规定时间内药典组和 3D 组的 7 株试验菌生长率均为 100%, 可以认为 2 种方法的专属性没有差异。

3.2 检测限

3.2.1 检测限试验方法 药典组和 3D 组样品接种方法与专属性相同, 加菌量每管(瓶)<5 cfu, 每种试验菌重复进行 10 次。

3.2.2 检测限试验结果及结果分析 采用 SPSS V13.0 fisher 确切概率法, 对上述 7 株试验菌的检测限试验结果分别进行统计分析, 3D 组与药典组均无显著性差异。检测限试验结果见表 2。

表 2 检测限试验结果

Tab. 2 Limit of detection results

实验 平行	报阳性时间													
	金黄色葡萄球菌		大肠埃希菌		枯草芽孢杆菌		铜绿假单胞菌		生孢梭菌		黑曲霉		白色念珠菌	
	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h	药典组/d	3D 组/h
1	2	24	1	18	1	32	1	24	2	25	2	74	2	39
2	2	24	1	18	—	40	1	24	2	24	2	84	2	40
3	2	24	1	17	—	47	1	25	2	32	2	73	2	39
4	2	25	1	17	—	—	1	25	2	32	2	74	2	41
5	2	—	1	19	—	—	1	25	2	26	2	66	2	39
6	2	—	1	17	—	—	—	—	2	42	2	75	2	43
7	—	—	1	18	—	—	—	—	2	—	2	75	2	40
8	—	—	1	—	—	—	—	—	3	—	2	74	2	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	89	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—

注：“—”表示培养至第 5 天仍未报阳性结果。

Note: “—” no positive reported until the fifth day.

3.3 重复性

3.3.1 方法 于不同的实验时间、由不同的实验人员进行重复性试验，考察方法的精密度。试验方法同样品存在专属性试验方法。

3.3.2 结果分析 比较观察时间末的生长率，细菌 48 h，真菌 72 h，在规定时间内药典组和 3D 组的 7 株试验菌生长率均为 100%，结果表明替代方法的重复性与药典方法相当。

3.4 耐用性

3.4.1 方法 改变培养温度(±5 °C)，其他试验方法同样品专属性试验方法，对替代方法的耐用性进行考察。

3.4.2 结果分析 比较观察时间末的生长率，只有黑曲霉在 20.5 °C 的培养温度下无法在规定时间内(真菌 72 h)生长，但适当延长培养时间，仍能给出阳性结果。结果表明替代方法在培养温度发生变化的情况下，检验结果可以基本不受影响，方法可正常使用。

4 讨论

预试验结果表明，BacTALERT®3D 微生物检测系统在替代目前药典规定的无菌检查方法时，有其局限性，并非适用于所有品种，即便是制剂规格满足 3D 系统的检验量并且样品本身经过无菌检查方法验证确认无抑菌性，也可能无法通过替代方法验证试验。样品本身的特性对于 BacTALERT®3D 微生物检测系统的影响是显而易见的。因此，在考察替代方法的可行性时，需要逐一样品进行验证，而不能简单的用几个品种的验证结果证明替代方法可以等同于药典方法。

BacTALERT®3D 微生物检测系统使用的 3D

培养瓶内容物标称为大豆酪蛋白消化物肉汤培养基(TSB)，实验发现，当平行参照中国药典直接接种法将 10 mL 丹参注射液接种至干粉配制的 40 mL(装量与 3D 培养瓶保持一致)TSB 培养基中，同时接种<100 cfu 的金黄色葡萄球菌菌液 0.1 mL，于 32.5 °C 培养 24 h，生长旺盛。丹参注射液预试验结果却是培养至 7 d 仍为阴性，认为 3D 培养瓶中的培养基成分与市售的干粉 TSB 培养基在配方上并不完全一致，其中的某些组分可能存在抑制微生物生长的情况。

鸦胆子油乳注射液采用 BacTALERT®3D 微生物检测系统进行预试验出现假阳性的结果，从该系统的工作原理来看，它并不是基于浊度原理，因此判读错误的原因并不是样品本身的乳白色性状引起的，而可能是由于样品的加入使得培养瓶内的氢离子(H⁺)发生变化，出现假阳性的结果。

药典方法和替代方法实现严格厌氧环境的原理是不同的，前者是通过化学手段，而后者是物理手段。因此，在实验过程中发现，对于严格厌氧菌的检查，替代方法在操作过程中需要保证操作环境的严格厌氧。实验考察了替代方法在 2 种操作环境下(普通生物安全环境和严格厌氧环境)，生孢梭菌的专属性试验结果，结果见表 3。试验结果表明，就培养体系促生长试验来看，操作环境是否严格厌氧对于测定结果没有影响，但对于样品存在的专属性试验结果影响则十分显著。分析原因，由于样品存在的专属性试验需要接种 10 mL 的样品，在普通操作环境下导入的氧气量会明显增多，由于操作环境没有隔绝氧气，对试验结果的影响就会凸显出来，而当接种量较少时，比如

培养体系促生长试验,这种影响就会被弱化。因此,在进行样品检测时,需在厌氧的环境下接种样品至 3D 厌氧瓶,保证严格厌氧菌能被有效检出。

表 3 不同操作环境对生孢梭菌试验结果的影响
Tab. 3 Influence of different operating environment on results of *Clostridium sporogenes*

环境条件	报阳性时间/h					
	培养体系促生长			样品存在专属性		
普通	19	19	20	64	52	57
严格厌氧	19	18	19	19	19	19

本实验从专属性、检测限、重复性、耐用性 4 个方面对单一品种门冬氨酸钾镁注射液无菌检查替代方法和药典方法进行了验证试验。验证结果表明,替代方法与药典方法基本相当。但是验证试验不可能覆盖所有的微生物,由于 2 种方法的培养基体系不完全相同,因此不能排除对于某些微生物的促生长能力 2 种方法可能不相当。在下一步研究中,需要增加试验菌株的种类。

BacTALERT®3D 微生物检测系统采用简单转接、连续震荡孵育以及专利的颜色敏感检测技术,降低了无菌操作污染的风险,实现了检测结果及时反馈,区别于传统无菌检查的繁琐操作、静态

培养以及人为的浊度判读法,有其结果报告的实时性、可追溯性以及避免人员干扰的优势。

替代方法和药典方法无菌检查都是基于培养的,因此实验结果是否为“无菌生长”在一定程度上是基于标准规定的培养天数,也就是说 14 d “无菌生长”并不一定意味着 15 d 仍是“无菌生长”。因此,缩短无菌检查的培养天数是有风险的。通过替代方法的验证试验,可以认为 BacTALERT®3D 微生物检测系统作为某一具体品种用于过程控制是可行的。

REFERENCES

[1] XU H Y, ZHANG Z F, WANG P. The role of rapid microbiological methods within the process analytical technology initiative [J]. Drug Standard China(中国药品标准), 2005, 6(3): 79-82.

[2] DONG Q, ZANG H C, LIU A H, et al. Application and enlightenment of process analytical technology in the pharmaceutical industry [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2010, 45(12): 881-884.

[3] 中国药典. 二部[S]. 2010: Appendix 216.

[4] 朱立军, 徐健, 黄伯里. 血小板成分细菌污染和预防[J]. 国际输血及血液学杂志, 2006, 29(3): 270-272.

[5] JIANG Y Q, WEI G, NI Y X. Application of automated blood culture system for raise the positive rate [J]. Chin J Lab Med(中华医学检验杂志), 1999, 22(2): 71-73.

收稿日期: 2014-05-26

固相萃取-HPLC 测定人血清万古霉素、去甲万古霉素浓度及其与荧光偏振免疫法测定结果的比较

郭志磊, 范捷*, 于洋(江汉大学附属医院, 武汉 430015)

摘要: 目的 建立固相萃取-高效液相色谱法(SPE-HPLC)测定人血清中万古霉素和去甲万古霉素浓度,并与荧光偏振免疫法(FPIA)测定结果进行相关性分析。方法 血清样品经 C₁₈ 固相萃取小柱净化后进样。色谱柱为 HyperSil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-乙腈(91:9),柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 236 nm,进样量 30 μL;28 例患者的血浆分别用 SPE-HPLC 和 FPIA 测定,考察 2 种方法的相关程度。结果 万古霉素、去甲万古霉素的标准曲线范围分别为 0.4~80 mg·L⁻¹ 和 1~50 mg·L⁻¹,回收率分别为 87.2%和 89.8%,日内、日间精密度均<7%;SPE-HPLC 和 FPIA 2 种方法的测定值差异无统计学意义。结论 SPE-HPLC 法快速简便,准确,灵敏度高,适用于万古霉素和去甲万古霉素血药浓度检测;2 种测定方法有良好的相关性。

关键词: 高效液相色谱法; 固相萃取; 荧光偏振免疫法; 万古霉素; 去甲万古霉素

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2015)04-0478-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.023

作者简介: 郭志磊,男,硕士,主管药师 Tel: (027)82429232 E-mail: noble007@163.com *通信作者: 范捷,男,副主任药师 Tel: (027)82431642 E-mail: fanjie2006@163.com