

出。从整个实验来看,中国药典编号为 1、2、3 号的稀释剂以及美国药典编号为 8 号的稀释剂对本文中的 4 种实验菌相对较为稳定。而英国药典编号为 6 号和 7 号的稀释剂及中国药典编号为 4 号和 5 号的稀释剂则对本文中的实验菌影响较大。

综上所述,稀释剂间的差异对各种微生物的检出均存在着不同程度的影响。这一现象的存在告诫我们在微生物限度检验工作中,特别是在样品复查

时,务必要考虑到这些影响因素的存在。为确保检验结果的一致性和准确性。实验条件应尽可能地保持一致,消除差异,方可得到正确结果。

参考文献

- [1]《中国药典》,2000 年版(二部)附录 XU: 97
- [2]《英国药典》,2000 年版(卷 IV)附录 XVI: 283
- [3]《欧洲药典》,2001 年版,增补(卷 1): 70
- [4]《美国药典》,23 版附录(61): 1681
- [5]《药品微生物学检验手册》(第一版),科学出版社: 73

色谱分析中面积归一化法测定有关物质的弊与利

张启明 李慧义(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

Zhang Q i m i n g L i H u i y i (N ational Institute for the Control of P h a m a c e u t i c a l a n d B i o l o g i c a l P r o d u c t s, B e i j i n g 100050)

测定药物中的有关物质,主要有外标法、加校正因子的主成分自身对照法、不加校正因子的主成分自身对照法和面积归一化法等,尽管采用杂质对照品外标的方法越来越普遍,加校正因子的主成分自身对照是我们的倡导,但目前使用最多的还是不加校正因子的主成分自身对照法和面积归一化法。

面积归一化法具有与称样量及进样量基本不相关的特点,因此重现性良好。需强调的是面积归一化法是在假设所有成分均出峰,所有杂质均与主成分分离并且所有杂质均与主成分响应因子相同的前提下,其结果可完全真实地表明为该物质的纯度,可毕竟只是假设,实际情况可能并非如此。另外当杂质是微量时,需增加方法的灵敏度,就要增加进样量,此时主成分可能超出仪器检测范围,或虽然在仪器检测范围内,理论上讲此时可能与主成分不在同一线性范围内,为防止此种情况的出现,才引入了“不加校正因子的主成分自身对照法”;理论上讲不加校正因子的主成分自身对照法只是改善了可能存在的不在同一线性范围的问题,面积归一化法其他的假设和局限完全相同。

事实上我们关注的药物中的杂质一般为百分之几到千分之几,与主成分相差几十至几百倍,随着现代液相色谱仪性能的提高,仪器的线性范围一般达 3 个数量级以上,实际检测时,多数情况下不会超出线性范围,所以归一化法和不加校正因子的主成分自身对照法所得结果往往是基本一致的。如前所述,如果不一致,往往是归一化法不在线性范围引起,因此常常是杂质的高估(为高浓度主峰面积的负误差

引起)。由于不加校正因子的主成分自身对照法存在稀释步骤、进样针和进样阀残留、进样误差等影响因素,特别是进样针和进样阀残留,往往使得杂质低估(为自身对照峰面积的正误差引起),如果出现相反情况,应怀疑实验中可能有失误的地方,这种验证往往是有价值的,也是很方便的,因为并未增加实际工作量,只是在主成分自身对照法完成的同时充分利用了归一化法的信息,从而更好保障结果的可靠性。目前,有一种观点,认为面积归一化法有弊端,不能用,只有不加校正因子的主成分自身对照法才行,这种观点是片面的,如上所述,不加校正因子的主成分自身对照法的优点在于解决可能出现的线性问题。另外,设计面积归一化法时,为防止主成分峰面积太大,进样量不能太多,杂质峰可能较小,其峰面积测定值的相对误差就会较大,理论上讲可能造成面积归一化法误差偏大,而不加校正因子的主成分自身对照法在不影响分离的前提下进样量可适当加大,对小峰面积的准确测量有利,除了上述二点,别的就不一定是优点了,相反是弊端了。

有文献报道^[1],发现面积归一化法会因保留时间差异引起杂质测定结果的差异,我们认为文中出现的问题很可能是主成分超出了检测器的响应范围,俗称的“撞死了”,从而引起主峰的峰面积不真实,当调整流动相后主峰出峰往后,峰变宽,峰高降低,主峰“撞”的不太死了,主峰面积增加了,故而归一化法的杂质测定值相对降低了,而不是“由于出峰加快,该杂质峰面积变小,而主峰由于峰形拉宽,峰面积有所增加”。理论上讲,浓度型检测器的峰面积

与出峰快慢无关,只与物质的浓度有关。文中出现的两法的差异,很可能是主成分太浓了,超出了检测器的响应。因此在有关物质检查的方法建立时,进样量应注意优化,不是为充分检出杂质,越浓越好,而是应适可而止,我们重点关注的是千分之一左右以及千分之一以上的杂质(最低关注限度为 0.03%^[2]),因此只要满足 0.03% 杂质能定量检出(信噪比大于 10 或满足准确积分要求^[3])即可。

当然,采用已知杂质对照品法检测杂质含量,可避免上述问题,特别是杂质与主成分响应不一致的时候。另一方面,由于杂质对照品的获得和供应比较困难,在国家药品标准中是否引入杂质对照品应权衡并慎重,采用杂质对照品应该是今后努力的方向。下列情况,宜在国家药品标准中规定采用杂质对照品:

1. 规定色谱系统适用性试验需要。可弥补只规定理论板数的不足,既可以是结构已知的杂质,也可

以是与主成分或已知杂质结构相近的指示性物质。

2. 该杂质与主成分的相对响应因子差异较大(超出 0.9~1.1)时,自身对照法不能准确反映杂质的真实含量。特别是响应因子较小的杂质,因易低估其含量。

3. 该杂质的毒性较大,需要专门严格控制。

另外,如果该杂质不够稳定,将来供应会有困难,可采用提供含有该杂质的药品粗品或纯度不高的杂质对照品进行杂质定位,然后在质量标准中采用加校正因子或不加校正因子的主成分自身对照法为好。

参考文献

- [1] 陈悦,陈镇生 HPLC 面积归一化法测定有关物质的弊端 中国药品标准, 2003 3: 29
- [2] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Impurities In New Drug Products, Q3B (R), 5Feb, 2003
- [3] 中华人民共和国药典 2005 年版附录增修订内容汇编, 国家药典委员会

药品中微生物污染检测方法验证的必要性

许华玉(国家药典委员会 北京 100061) 杜鹃(云南省药品检验所 昆明 650011) 汤杨(贵州省药品检验所 贵阳 550001)

Necessity of Validation for Contamination Determination of Microorganism in Drugs

Xu Huayu (Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061), Du Juan (Yunnan Institute for Drug Control, Kunming 650011) and Tang Yang (Guizhou Institute for Drug Control, Guiyang 550001)

微生物的生长受许多因素的影响,特别是药品中污染的微生物。由于药品本身的特性,可能含有具有抑菌作用的组成成分及防腐剂等,一般认为,这些组分在一定浓度下对微生物具有抑制或杀灭作用。被抑制的微生物将受到不同程度的损伤。因此在检查药品中污染的微生物时,污染的微生物的抗性、样品的处理方法、测定样品的浓度、测定方法、培养基培养条件等,将直接影响检查结果。只有在各检测条件均适合微生物的生存和生长时,才能保证样品中污染的微生物的充分回收。因此,同其它分析方法一样,药品微生物限度检查也应通过证明所采用的方法是适宜的,以保证检查方法的完整性和准确性。

美国药典、欧洲药典、日本药局方及国际协调会议(ICH)的意见中,无菌检查法和微生物限度检查法(包括污染菌数测定和控制菌检查)均要求进行方法验证,其中详细规定了验证的方法、验证的菌株及

判断标准,并指出了应采取哪些方法消除样品的抑菌活性。

中国药典收载的微生物限度检查法没有规定所用的方法应进行验证。在控制菌检查中的阳性对照试验基本上可以起到部分验证试验的作用,但是,在污染菌数测定时,除了高稀释级的菌数等于或高于低稀释级的菌数(计数结果相差 10 倍或 10 倍以上)时,需要改用培养基稀释法进行样品的菌数测定,其它均按“菌数报告规则”确定计数结果。这意味着两点,一是按不同稀释级菌数计算的结果要相差不小于 10 倍,才需要改用培养基稀释法以消除抑菌作用;二是样品抑菌作用再强,采用培养基稀释法测定即可,也不考虑培养基稀释法是否能消除样品的抑菌活性。显然,现有的药典方法无法确认药品中污染微生物的回收程度,造成检验结果无法体现样品污染的真实情况。另外,由于微生物限度标准和方法的