

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.04

双葛止泻口服液微生物限度检查方法学验证

桑卡娜,李焕娟,杨绒娟,周德刚*

(洛阳惠中兽药有限公司,国家兽用药品工程技术研究中心,河南洛阳 471003)

[收稿日期] 2020-06-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 02-0019-07 [中图分类号] S859.796

[摘要] 建立了双葛止泻口服液的微生物限度检查方法。根据 2015 年版《中华人民共和国兽药典(二部)》通则 1102 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法,以及通则 1103 非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法和通则 1104 非无菌兽药微生物限度标准进行方法适用性试验。结果表明,采用薄膜过滤法对样品进行需氧菌总数、霉菌和酵母菌计数方法适用性试验,试验组与菌液对照组的比值为 0.5~2,采用常规法进行控制菌检查方法适用性试验,试验组检出阳性试验菌。所建立的方法可作为双葛止泻口服液微生物限度的检查方法。

[关键词] 双葛止泻口服液;微生物限度检查;方法学适用性试验

Methodological Validation of Microbial Limit Test of Shuangge Anti-diarrhea Oral Liquid

SANG Ka-na, LI Huan-juan, YANG Rong-juan, ZHOU De-gang*

(Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd, National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471003, China)

Corresponding author: ZHOU De-gang, E-mail: zdegang_621@126.com

Abstract: To establish a microbial limit test method of Shuangge anti-diarrhea oral liquid, according to the general rule 1102 (microbial counting method for microbial limit test of non-sterile products), the general rule 1103 (the control bacteria examination method for microbial limit test of non-sterile products), the general rule 1104 (the test method for suitability of microbiological limits for non-sterile drugs) of Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015 edition, volume II), the applicability of the method was tested. Results showed that the applicability of the membrane filtration method to count the total number of aerobic bacteria, molds and yeasts in the samples was tested. The ratio between test group and microorganism solution group were between 0.5 and 2. In the control bacteria tests, the control bacteria was found in the test group. The established method can be used for the microbial limit test of Shuangge anti-diarrhea oral liquid.

Key words: Shuangge anti-diarrhea oral liquid; microbial limit test; methodological applicability test

基金项目: 洛阳市科技重大专项——绿色高效新兽药关键技术的研究与产业化(1901024A)

作者简介: 桑卡娜, 兽医师, 硕士, 从事新兽药研发、药理毒理研究。

通讯作者: 周德刚。E-mail: zdegang_621@126.com

双葛止泻口服液是由洛阳惠中兽药有限公司、普莱柯生物工程股份有限公司和河南新正好生物工程股份有限公司联合研制的三类新兽药。双葛止泻口服液由金银花、葛根、黄芩、黄连、白芍和炙甘草组成,来源于《伤寒论》中的“葛根芩连汤”。方中金银花具有解热、抗炎、抗病毒等药理作用^[1-2],葛根芩连汤对感染性腹泻具有一定的治疗作用^[3-4]。由于中药复方成分复杂,中药制剂中的不同成分对微生物有一定的抑制和杀灭作用,常规法进行微生物限度检测,不能真实反应样品中的微生物情况,需采用适当的方法,例如薄膜过滤法、中和剂、培养基稀释法等,去除其抑菌作用,并对方法进行验证来确定所采用的微生物限度检查方法的可行性和有效性^[5-7]。依据 2015 年版《中华人民共和国兽药典(二部)》通则 1102 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法,以及通则 1103 非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法和通则 1104 非无菌兽药微生物限度标准进行方法适用性试验,建立适合双葛止泻口服液的微生物限度检查方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器 集菌仪,型号 HTY-602,浙江泰林生物技术股份有限公司;电子天平,型号 JA2003,上海上平仪器有限公司;电热恒温培养箱,型号 DNP-9272BS-III,上海新苗医疗器械制造有限公司;生化培养箱,型号 SPX-150BSH-II,上海新苗医疗器械制造有限公司;生物安全柜,型号 Nu-425-400S,美国 Nuair 公司;全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅,型号 YXQ-LS-100A,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;微量移液器,规格 100 μL 、1000 μL 、5 mL,德国 Eppendorf 公司;电动移液枪,型号 E4XLS,规格 20~200 μL ,美国 Rainin 公司。

1.1.2 供试品 双葛止泻口服液;批号:20170201;规格:每 1 mL 相当于原生药 0.45 g;包装:口服液体药用聚丙烯瓶;生产厂家:洛阳惠中兽药有限公司。

1.1.3 菌株、试剂及材料 金黄色葡萄球菌

[CMCC(B) 26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B) 10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B) 63501]、大肠埃希菌[CMCC(B) 44102]、白色念珠菌[CMCC(F) 98001]、黑曲霉菌[CMCC(F) 98003],购自中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心。

胰酪大豆蛋白胨液体培养基,批号 20170116;胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基,批号 20161018;沙氏葡萄糖琼脂培养基,批号 20160924;沙氏葡萄糖液体培养基,批号 20160224;麦康凯琼脂培养基,批号 20170113;麦康凯液体培养基,批号 20161222;麦康凯琼脂培养基,批号 20161021;pH 值 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,批号 20160321;Kovacs 氏靛基质,批号 20161117;甲基红试剂盒,批号 20161208;V-P 试剂盒批号,20170214,均购自青岛高科园海博生物技术有限公司。量筒、EP 管、一次性无菌平皿、涂布棒、试管架、酒精灯、镊子。无菌薄膜过滤器,型号 FC752,浙江泰林生物技术股份有限公司。

1.2 试验方法 依照 2015 版《中华人民共和国兽药典(二部)》通则 1102、1103、1104^[8]有关非无菌产品微生物限度检查方法进行验证。

1.2.1 菌液制备 取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌第二代甘油保存物 100 μL 加到 10 mL 胰酪大豆蛋白胨液体培养基中,置 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌培养物 1 mL 加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液中,10 倍稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ,取稀释液各 0.1 mL 加入制备好的胰酪大豆蛋白胨琼脂平皿,涂布棒涂匀后置 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,每个稀释度 3 个重复,计菌落数。

取白色念珠菌的第二代甘油保存物 100 μL 加到 10 mL 沙氏葡萄糖液体培养基中,置 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。取培养物 1 mL,加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液中,10 倍稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,取稀释液各 0.1 mL 加入制备好的沙氏葡萄糖琼脂平皿,涂布棒涂匀后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,每个稀释度 3 个重复,计菌落数。

取黑曲霉冻干粉,溶于 0.9% 氯化钠溶液中,混

匀,用接种环蘸取,划线接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上,置 25 ℃ 培养 5 d。取沙氏葡萄糖琼脂斜面培养物,加 0.9% 氯化钠溶液 5 mL,洗下孢子,转移至另一空管,取 1 mL 加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液中,10 倍稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,取稀释液各 0.1 mL 加入制备好的沙氏葡萄糖琼脂平皿,涂布棒涂匀后置 25 ℃ 培养 5 d,每个稀释度 3 个重复,计菌落数。

1.2.2 计数方法适用性试验

1.2.2.1 常规法(培养基平皿倾注) 试验组:无菌取供试液 1 mL 和稀释至不大于 100 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌 1 mL 注入无菌培养皿后,倾注 20 mL 胰酪大豆胨琼脂培养基于平皿中,混匀,制备 2 份平行样本的平皿放入培养箱中,35 ℃ 培养 48 h,计数后取平均值。供试品对照组:参照试验组的方法,不加菌液,测供试品的菌数。菌液对照组:参照试验组的方法,不加供试品,测供菌液的菌数。结果判定:菌液回收比值 = (试验组菌数 - 供试品对照组菌数)/菌液对照组菌数。

1.2.2.2 薄膜过滤法 制备供试液:无菌操作取 2 瓶双葛止泻口服液混合均匀后,取出 10 mL 至无菌玻璃瓶中,加入 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液至 100 mL,混匀,作为 1:10 的供试液。分别按以下方法对 5 种试验菌株进行计数方法适用性试验。试验组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),取供试液 10 mL 加入 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中混匀,加入薄膜过滤器的滤筒中过滤,用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL,最后一次冲洗时,冲洗液中加入不大于 100 CFU/mL 的试验菌 1 mL,摇匀后,滤过滤膜。

供试品对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),取供试液 10 mL 加入 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中混匀,加入薄膜过滤器的滤筒中过滤,用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL。

菌液对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),用 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液代替供试液过滤,再用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL,最后一次冲洗时,冲洗液中加入不大于 100 CFU/mL 的试验菌 1 mL,摇匀后,滤过滤膜。

阴性对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL。

过滤完成后将滤膜取出,将滤膜的菌面朝上贴于琼脂平板上。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌制备的滤膜贴于胰酪大豆胨琼脂培养基,35 ℃ 培养 3 d,计数。白色念珠菌和黑曲霉平行制备 2 份滤膜,一份贴于胰酪大豆胨琼脂培养基,35 ℃ 培养 5 d,计数;另一份贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,25 ℃ 培养 5 d,计数。

1.2.3 控制菌检查(常规法) 无菌操作取 2 瓶双葛止泻口服液混合均匀后,取出 10 mL 至无菌玻璃瓶中,加入 pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液至 100 mL,混匀,作为 1:10 的供试液。

取 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基 3 瓶,试验组加入 10 mL 供试液及不大于 100 CFU/mL 的大肠埃希菌 1 mL;菌液对照组加入 10 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液及不大于 100 CFU/mL 的大肠埃希菌 1 mL;供试品对照组加入 10 mL 供试液。同时设阴性对照组。混匀后置于 35 ℃ 培养 24 h。

取上述培养物 1 mL 接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中,42 ℃ 培养 24 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基上,35 ℃ 培养 24 h。麦康凯琼脂培养基上若有菌落生长,挑取符合大肠埃希菌菌落特征(鲜桃红色,圆形,边缘整齐、表面光滑)的菌落在麦康凯琼脂培养基上划线培养,挑取符合大肠埃希菌菌落特征的菌落进行靛基质试验、MR - VP 试验和柠檬酸盐利用实验。大肠埃希菌与非大肠埃希菌的生化鉴别见表 1(GB 4789.38 - 2012)。

表 1 大肠埃希菌与非大肠埃希菌的生化鉴别

Tab 1 Biochemical identification of *Escherichia coli* and non-*E. coli*

靛基质 (I)	甲基红 (MR)	VP 试验	柠檬酸盐 (C)	鉴定(型别)
+	+	-	-	典型大肠埃希菌
-	+	-	-	非典型大肠埃希菌
+	+	-	+	典型中间型
-	+	-	+	非典型中间型
-	-	+	+	典型产气肠杆菌
+	-	+	+	非典型产气肠杆菌

1:如出现表 1 以外的生化反应类型,表明培养物可能不纯,应重新划线分离,必要时做重复试验。
2:IMViC 生化试验为“+ + - -”或“- + - -”判定为大肠埃希菌。

判定依据:试验组检出大肠埃希菌,阴性对照组无菌生长,则试验成立。反之,则判断试验无效。试验组若未检出试验菌,应消除供试品的抑菌活性,并重新进行方法适用性试验。

试验成立时,供试品组麦康凯琼脂培养基平板上无菌生长,或者虽有菌生长但鉴定结果为阴性,判定未检出大肠埃希菌。

2 结果与分析

2.1 菌液计数 各菌株菌落计数结果如表 2 所示,根据计数结果用 0.9% 氯化钠溶液将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌 10 倍稀释至 10^{-7} ,白色念珠菌 10 倍稀释至 10^{-6} ,黑曲霉菌 10 倍稀释至 10^{-5} ,约为不大于 100 CFU/mL 的菌悬液备用。

表 2 细菌计数结果(CFU/mL)

Tab 2 Results of bacterial count (CFU/mL)

稀释倍数	10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}		
试验次数	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
金黄色葡萄球菌	/	/	/	P	P	P	42	38	40	6	4	5
铜绿假单胞菌	/	/	/	142	128	135	16	11	15	1	1	3
枯草芽孢杆菌	/	/	/	192	213	202	21	23	22	1	<1	2
白色念珠菌	219	234	208	31	12	18	1	4	3	/	/	/
黑曲霉	P	P	P	4	3	3	<1	<1	<1	/	/	/

“P”表示菌数多不可数,无法计数;“<1”表示无菌生长。“/”表示该稀释度未进行计数。

2.2 计数方法适用性试验结果

2.2.1 常规法(培养基平皿倾注) 采用常规平皿法培养基倾注进行样品中需氧菌总数的方法验证,具体结果见表 3 所示。

表 3 常规法进行方法适用性检查

Tab 3 Routine method for method suitability inspection

组别	试验组	供试品对照组	菌液对照组	菌液回收比值
	28	2	59	
	23	1	55	
平均值	25.5	1.5	57	0.421

结果分析:选用计数方法适用性试验中较常见的金黄色葡萄球菌作为添加菌株,由计数方法适用性试验结果可知,菌液回收比值为 0.421,未在药典规定的 0.5~2 之间,菌液回收率较低,表明本试验供试品双葛止泻口服液具有一定的抑菌作用,需要采用一定的方法消除其抑菌作用,保证菌液回收率在 0.5~2 范围内再进行微生物计数检测。

2.2.2 薄膜过滤法 采用薄膜过滤法,每个样品冲洗 3 次,100 mL/次,并重复进行 3 次独立平行薄膜过滤法试验验证,计数验证结果见表 4 和表 5。

表 4 需氧菌总数计数方法验证结果 (CFU/皿)

Tab 4 Validation results of aerobic bacteria count method (CFU/dish)						
菌株	组别	试验组	菌液组	供试液对照组	阴性对照组	(试验组 - 供试液对照组)/菌液组
金黄色葡萄球菌	1	50	58	2	<1	0.83
	2	64	62	1	<1	1.02
	3	71	79	3	<1	0.86
铜绿假单胞菌	1	63	68	2	<1	0.89
	2	46	52	1	<1	0.86
	3	60	71	1	<1	0.83
枯草芽孢杆菌	1	42	34	<1	<1	1.23
	2	38	46	<1	<1	0.82
	3	49	37	1	<1	1.29
白色念珠菌	1	34	38	6	<1	0.74
	2	40	33	2	<1	1.15
	3	37	42	3	<1	0.81
黑曲霉	1	3	4	<1	<1	0.75
	2	3	3	<1	<1	1.00
	3	2	3	<1	<1	0.66

表 5 霉菌和酵母菌总数计数方法验证结果 (CFU/皿)

Tab 5 Validation results of the method for counting the total number of molds and yeasts (CFU/dish)						
菌株	组别	试验组	菌液组	供试液对照组	阴性对照组	(试验组 - 供试液对照组)/菌液组
白色念珠菌	1	62	59	<1	<1	1.05
	2	70	76	<1	<1	0.92
	3	66	68	<1	<1	0.97
黑曲霉	1	4	5	<1	<1	0.80
	2	3	4	<1	<1	0.75
	3	3	4	<1	<1	0.75

结果分析:由常规法可知,双葛止泻口服液具有一定的抑菌作用,需要采用一定的方法消除供试品的抑菌活性。由于本产品为中药口服溶液,水溶性好,可顺利通过滤膜,故采用较常用且去除抑菌作用效果好的薄膜过滤法进行方法验证。

结果可知,各试验菌试验组菌落数减去供试液对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均在 0.5~2 范围内,符合《中华人民共和国兽药典》适用性试验要求规定。且阴性对照均无菌生长,本

方法可用于双葛止泻口服液需氧菌和霉菌及酵母菌的总数测定。

2.3 控制菌检查结果 依据《中华人民共和国兽药典》2015 版二部 1103 非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法和 1104 非无菌产品微生物限度标准,本产品双葛止泻口服液,应检测的控制菌为大肠埃希菌。采用常规法进行控制菌方法验证,结果如表 6 所示。

表 6 控制菌方法验证结果

Tab 6 Verification results of control bacteria method					
组别	麦康凯琼脂	靛基质 (I)	甲基红 (MR)	VP 试验	枸橼酸盐 (C)
试验组	有菌落生长	+	+	-	-
供试品组	无菌生长	/	/	/	/
菌液对照组	有菌落生长	+	+	-	-
阴性对照组	无菌生长	/	/	/	/

IMViC 生化试验为 + + - - 或 - + - - 判定为大肠埃希菌。

结果分析: 试验组与菌液对照组麦康凯平板上有菌落生长, IMViC 生化试验鉴定结果均为“+ + - -”, 供试品对照组和阴性对照组无菌生长。证实了常规法可用于双葛止泻口服液大肠埃希菌控制菌检查, 此方法成立。

3 讨论与结论

3.1 方法验证的必要性 中药制剂成分复杂, 其中任何成分具有抑菌性均可影响微生物限度检查的准确性。2015 版《中华人民共和国兽药典》规定, 中药制剂进行微生物限度检查时, 对可能具有抑菌作用的产品, 必须首先采用合适的方法消除其抑菌作用, 再进行对应供试品的检查。因此, 微生物检测方法必须经过方法的适用性试验验证^[9-10], 才可确保微生物检查方法的可靠性和检查结果的准确性。

3.2 微生物计数法 双葛止泻口服液由金银花、葛根、黄芩、黄连、白芍和炙甘草组成, 其组分中金银花、黄芩对金黄色葡萄球菌等菌株均有一定的抑制作用^[11], 由本试验结果可知, 常规法进行需氧菌总数的测定时, 菌液回收比值较低(0.421), 未能达到试验要求(菌液回收比值 0.5 ~ 2)。故采取薄膜过滤法消除其抑菌作用后, 再次进行微生物计数方法学考察, 薄膜过滤法采用一次性无菌过滤器, 将外界影响和操作者的主观因素减少到最低, 是检验各种成分剂型的首选方法^[12]。双葛止泻口服液采用薄膜过滤法可消除其抑菌作用, 各菌回收率均在规定范围内。

3.3 控制菌检查法 依照《中华人民共和国兽药典》2015 版规定^[8], 双葛止泻口服液应对大肠埃希菌进行控制菌检查, 本研究采用常规法进行控制菌检查, 方法成立。供试品双葛止泻口服液在微生物计数法验证时, 常规法菌落回收比值(0.4), 低于 0.5, 表明本产品具有一定的抑菌作用, 但抑菌作用较轻微。在进行控制菌检查时, 常规法方法验证合格。分析原因为控制菌检查时所用培养基体积较多, 有培养基稀释去除抑菌作用的原因。故本供试

品检查时, 微生物计数法需采用薄膜过滤法, 控制菌检查法可采用常规法。

供试品双葛止泻口服液的细菌、霉菌和酵母菌计数方法采用薄膜过滤法, 控制菌检查方法可采用常规方法进行。

参考文献:

- [1] 路俊仙, 梁瑞雪, 林慧彬. 金银花抗流感病毒作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(5): 77-81.
Lu Jun-xian, Liang Rui-xue, Lin Hui-bin, *et al.* Research Progress on Anti-influenza Virus Activity of Flos Lonicerae Japonicae[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2018, 32(5): 77-81.
- [2] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2015, (4): 490-495.
Song Ya-ling, Wang Hong-meil, Ni Fu-yong, *et al.* Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from Lonicerae Japonicae Flos[J]. Chinese Tdinal and Herhal Drugs, 2015, (4): 490-495.
- [3] 张培培, 周欢欢. 葛根苓连汤为主治疗小儿腹泻 55 例临床观察[J]. 浙江中医杂志, 2019, (7): 513.
Zhang Peipei, Zhou Huanhuan. Clinical Observation on the Treatment of 55 Cases of Infantile Diarrhea with Gegen Qinlian Decoction[J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, (7): 513.
- [4] 刘容, 司晓莉. 葛根苓连汤对脾胃湿热证大鼠的治疗作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2014, (3): 287-290.
Liu Rong, Si Xiaoli. Study on Therapeutic Effects of Gegen Qinlian Decoction on Rats with Spleenr stomachDamp heat Syndrome[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2014, (3): 287-290.
- [5] Ijzerman-Boon, P. C. & Van, d. H. E. R. Validation of qualitative microbiological test methods. [J]. Pharmaceutical statistics, 2015, 14(2).
- [6] 陈克玲, 李晓强, 吴玉兰, 等. 药品微生物检验结果的相关影响因素分析[J]. 中国医药指南, 2017, (12): 290-291.
Chen Keling, Li Xiaoqiang, Wu Yulan, *et al.* Analysis of relevant factors affecting drug microbiological test results[J]. Guide of China Medicine, 2017, (12): 290-291.
- [7] 李玉芹. 浅谈目前无菌检查和微生物限度检查存在的问题[J]. 中国药事, 2007, (12): 1011-1012.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.05

高效液相色谱法测定烯丙孕素微囊中烯丙孕素的含量

王 忠,鲍光明,王小莺,刘宝生,陈文婷,黄小晴,彭剑玲,王立琦*

(江西农业大学动物科学技术学院,南昌 330045)

[收稿日期] 2020-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 02-0025-07 [中图分类号] S859.3

[摘 要] 建立了烯丙孕素微囊中烯丙孕素的高效液相色谱含量测定方法,采用 Kromasil 100-5 C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以流动相水-乙腈 (30:70, V/V)、检测波长 236 nm、流速 1.0 mL/min、柱温 30 ℃、进样量 20 μL 为色谱条件,无水乙醇为溶剂对微囊进行加热超声提取。结果表明,在烯丙孕素保留时间无干扰峰出现,在 5~30 μg/mL 的浓度范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9993$),回归方程为 $A = 21468C - 10887$;总平均回收率为 $(100.96 \pm 1.14)\%$, RSD 为 1.13%;三个浓度水平下 RSD 分别为 0.83%、1.16% 和 1.8%。该方法准确可靠、选择性好、简便、快速,可用于烯丙孕素微囊含量测定及质量评价。

[关键词] 烯丙孕素;微囊;高效液相色谱法;含量测定

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目一般项目 (GJJ180184);国家自然科学基金项目 (31760750);江西省重点研发计划项目 (20171BBF60054)

作者简介: 王 忠,博士研究生,从事兽药与动物繁殖育种研究。

通讯作者: 王立琦。E-mail: wangliqi86@126.com

(上接 24 页)

Li Yuqin. Discussion on the Problem Existed in Sterility Test and Microbial Limit Test [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2007, (12): 1011-1012.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 (二部) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part 2) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.

[9] 宋 勤, 杜平华. 中成药微生物限度检查方法的探讨 [J]. 中国药事, 2006, (1): 46-48.

Song Qin, Du Pinghua. Study on Microbial Limit Test Method for Chinese Traditional Patent Medicine [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2006, (1): 46-48.

[10] 莫小林, 伍小燕, 韦振源, 等. 10 种中药制剂微生物限度检查方法的验证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, (13): 56-59.

Mo Xiaolin, Wu Xiaoyan, Wei Zhenyuan, et al. Verification of Microbial Limit Test Method for 10 Kinds of Traditional Chinese Medicine Preparations [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, (13): 56-59.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 中药饮片卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 184.

National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia Guidelines for Clinical Drug Use: Traditional Chinese Medicine Pieces Volume [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 184.

[12] 王亚婷. 薄膜过滤法在药品微生物限度检查中的应用 [J]. 河北化工, 2013, (4): 8-9.

Wang Yating. Application of Membrane Filtration in the Microbial Limit Test of Drugs [J]. Hebei Huagong, 2013, (4): 8-9.

(编辑: 侯向辉)