

羟苯乙酯醇溶液微生物限度检查方法验证

杜建红^{1*},袁涛²,张国庆¹,方晨¹,祝辉¹,刘徽¹(1.成都军区联勤部药品仪器检验所,成都 610017;2.成都市食品药品检测中心,成都 610045)

中图分类号 R466.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)37-3513-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.37.19

摘要 目的:建立羟苯乙酯醇溶液的微生物限度检查法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录微生物限度检查法分别采用常规法、培养基稀释法进行羟苯乙酯醇溶液的微生物限度检查验证试验。结果:采用常规法对5种菌进行测定,其中金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的回收率小于70%;采用培养基稀释法,样品对5种菌的人工染菌回收率均高于70%;控制菌(大肠埃希菌)采用常规法验证检出阳性菌,阴性菌未检出。结论:本品微生物限度检查中,细菌、霉菌和酵母菌计数可采用培养基稀释法,控制菌可采用常规法。

关键词 羟苯乙酯醇溶液;微生物限度检查;培养基稀释法;常规法;验证

Validation of Microbial Limit Test Method of Ethylparaben Alcoholic Solution

DU Jian-hong¹, YUAN Tao², ZHANG Guo-qing¹, FANG Chen¹, ZHU Hui¹, LIU Hui¹(1. Institute for Drug and Instrument Control, Joint Logistics Department, Chengdu Military Region, Chengdu 610017, China; 2. Chengdu Center for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the microbial limit test of Ethylparaben alcoholic solution. METHODS: The microbial limit test of Ethylparaben alcoholic solution was validated by routine method and medium dilution method in accordance with the appendix II of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). RESULTS: The recoveries of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* by routine method were less than 70%; by medium dilution method, the recoveries of artificial contamination of 5 kinds of bacteria were more than 70%. The positive bacteria were detected in the control bacteria (*Escherichia coli*) test by routine method and negative bacterial were not detected. CONCLUSIONS: For microbial limit test, medium dilution method is suitable for bacteria, mould and saccharomycetes, and routine method is suitable for control bacteria.

KEYWORDS Ethylparaben alcoholic solution; Microbial limit tests; Medium dilution method; Routine method; Validation

微生物限度检查是药品制剂安全性检查的重要组成部分,微生物限度检查法是检查非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的方法^[1]。《中国药典》从2005年版开始执行起就有以下规定^[2]:“当进行药品无菌检查或微生物限度检查时,应进行方法验证,否则不能出具符合2005年版《中国药典》的规定的结论”,且“含抑菌成分的药品进行无菌检查、微生物限度检查时,必须消除供试品的抑菌作用或使其抑菌作用可以忽略不计,才能根据中国药典规定的方法进行检查”。2010年版《中国药典》依然遵循这一原则。羟苯乙酯醇溶液载于《中国人民解放军医疗机构制剂规范》2002年版中^[3],是一种具有防腐作用并用于口服液体制剂防腐的溶液。笔者按2010年版《中国药典》(二部)附录要求,通过查阅相关文献^[4-6],对羟苯乙酯醇溶液微生物限度检查法进行了方法验证。由于羟苯乙酯对微生物具有抑菌作用,应消除抑菌性后再依法检查,故笔者采用培养基稀释法与常规法进行羟苯乙酯醇溶液的微生物限度检查,以消除供试品中羟苯乙酯的抑菌活性。

1 材料

1.1 仪器

洁净工作台(苏净集团安泰公司);电热恒温水浴箱(上海医疗器械七厂);隔水式恒温培养箱、LRH 250 生化培养箱(上

海齐欣科学仪器有限公司)。

1.2 样品

羟苯乙酯醇溶液(成都军区某医院,批号:130809、130816、130819,规格:每瓶100 ml,含羟苯乙酯5 g)。

1.3 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](均来源于中国食品药品检定研究院,均为第4代培养物)。

1.4 培养基

营养肉汤培养基(批号:111207)、改良马丁培养基(批号:111214)、营养琼脂培养基(批号:111222)、改良马丁琼脂培养基(批号:111214)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1303262)、胆盐乳糖培养基(批号:111109)均由北京三药科技开发公司生产,按标签说明进行配制。

1.5 稀释液

0.9%无菌氯化钠溶液(成都市科龙化工试剂厂,批号:20120411);pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(以下简称缓冲液,北京三药科技开发公司,批号:1303112)。

2 方法与结果

2.1 细菌数、霉菌及酵母菌计数方法的验证

2.1.1 常规法。

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:028-86748203。E-mail: yjsdjh@163.com

(1)菌液制备。①取经35℃培养22h的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的营养肉汤培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的菌悬液,作活菌计数备用;②取经25℃培养24h的白色念珠菌改良马丁培养基培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的菌悬液,作活菌计数备用;③取经25℃培养7d的黑曲霉改良马丁琼脂培养基斜面培养物,加5 ml生理氯化钠溶液洗下孢子,吸出孢子悬液(用管口带有薄纱布的无菌毛细吸管吸出孢子悬液)至无菌试管中,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的孢子悬液,作活菌计数备用。

(2)供试液制备。取本品10 ml,加缓冲液至100 ml,45℃水浴20 min,混匀得1:10供试液。

(3)回收率测定。①供试品对照组。A:取1:10供试液1 ml,平行制备2个平板,测定供试品本底细菌数;B:取1:10供试液1 ml,平行制备2个平板,测定供试品本底霉菌和酵母菌数。②菌液组。分别取上述5种试验菌悬液1 ml,注入平皿,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注琼脂培养基,待凝固后,置于规定温度条件下培养,测定所加的试验菌数。③试验组。A:取1:10供试液1 ml和大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌试验菌悬液1 ml,分别注入平皿中,倾注营养琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平板,待凝固后,35℃培养3 d,菌落计数;B:取1:10供试液1 ml和白色念珠菌、黑曲霉菌悬液1 ml,倾注玫瑰红钠琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平板,待凝固后,25℃培养5 d,菌落计数。

(4)结果。试验组菌回收率=(试验组菌数-供试品本底菌数)/菌液组菌数×100%。批号为130809的样品采用常规法试验大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收率分别为89%、48%、46%、101%、58%(n=3)。结果表明,本品采用常规法检查,供试品对大肠埃希菌的人工染菌回收率高于70%,但对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的人工染菌回收率均低于70%;另外,对白色念珠菌的人工染菌回收率高于70%,但对黑曲霉的人工染菌回收率低于70%。因此,本品细菌和霉菌及酵母菌的计数均应重新选择适当的方法,消除其抑菌活性后再进行验证。

2.1.2 培养基稀释法(每皿0.2 ml)。

(1)菌液制备。同“2.1.1项(1)”。

(2)供试品制备。同“2.1.1项(2)”。

(3)回收率测定。①供试品对照组。采用培养基稀释法测定供试品本底细菌数。A:取1:10供试液1 ml,等量分注至5个平皿(每皿0.2 ml),倾注营养琼脂培养基,待凝固后,置于35℃培养3 d,测定供试品本底细菌数;B:取1:10供试液1 ml,等量分注至5个平皿(每皿0.2 ml),倾注玫瑰红钠琼脂培养基,待凝固后,置于25℃培养5 d,测定供试品本底霉菌和酵母菌数。②分别取上述5种菌悬液1 ml,注入平皿,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注琼脂培养基,待凝固后,置于规定温度培养,测定所加的试验菌数。③试验组。A:分别取1:10供试液0.4 ml,等量分注至2个平皿(每皿0.2 ml),每个平皿分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌试验菌悬液1 ml,倾注营养琼脂培养基,待凝固后,置于35℃培养3 d,计数;B:分别取1:10供试液0.4 ml,等量分注至2个平皿(每皿0.2 ml),每个平皿分别加入白色念珠菌、黑曲霉菌悬液1 ml倾注玫瑰红钠琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平板,待凝

固后,25℃培养5 d,菌落计数。

(4)结果。批号为130809的样品采用培养基稀释法(每皿0.2 ml,n=3)测定大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收率分别为90%、102%、99%、105%、95%。结果表明,本品采用培养基稀释法对菌数进行测定,供试品对各菌的人工染菌回收率均高于70%。因此,本品细菌、霉菌和酵母菌计数均可用培养基稀释法(每皿0.2 ml)。

2.2 控制菌检查方法的验证

采用常规法检查大肠埃希菌。

2.2.1 供试液制备。取本品10 ml,加缓冲液至100 ml,45℃水浴,混匀得1:10供试液。

2.2.2 菌液制备。同“2.1.1”项(1)中方法。

2.2.3 试验组。取1:10供试液10 ml及制备好的大肠埃希菌悬液1 ml加至100 ml的胆盐乳糖培养基中,35℃培养22 h。吸取0.2 ml培养物接种至5 ml的4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基中,35℃培养。于5、24 h在366 nm波长紫外线下观察,同时用未接种的MUG培养基作本底对照。观察后,沿培养管的管壁加入数滴靛基质试液,观察颜色变化。

2.2.4 阴性菌对照组。取1:10供试液10 ml及制备好的金黄色葡萄球菌悬液1 ml分别加至100 ml胆盐乳糖培养基中,35℃培养;其他操作同“2.2.3”项。

2.2.5 供试品对照组。取1:10供试液10 ml加至100 ml胆盐乳糖培养基中,35℃培养;其他操作同“2.2.3”项。

2.2.6 结果。批号为130809的样品控制菌验证检查结果见表1。

表1 大肠埃希菌验证试验结果(n=3)

Tab 1 Results of validation tests for *E. coli*(n=3)

组别	MUG	靛基质	检查结果
试验组	+	+	检出
阴性菌对照组	-	-	未检出
供试品对照组	-	-	未检出

由表1可知,阴性菌对照组加入金黄色葡萄球菌培养后,MUG和靛基质均呈阴性反应,而试验组检出大肠埃希菌,表明本品大肠埃希菌可采用常规法(培养基:100 ml)进行检查。

2.3 3批样品检查结果

样品检查:采用培养基稀释法进行细菌、霉菌和酵母菌计数,采用常规法进行控制菌的检查。详细操作方法:取本品10 ml,加缓冲液至100 ml,45℃水浴20 min,混匀得1:10供试液。细菌、霉菌和酵母菌计数均采用培养基稀释法(每皿0.2 ml)进行检查,控制菌采用常规法(培养基:100 ml)进行检查^[1]。对3批样品进行检验,结果表明建立的方法可用于本品的微生物限度检查,详见表2。

表2 样品微生物限度检查结果(CFU/ml)

Tab 2 Results of microbial limit test for samples(CFU/ml)

批号	细菌数	霉菌和酵母菌数	大肠埃希菌
130809	<10	<10	未检出
130816	<10	<10	未检出
130819	<10	<10	未检出

3 讨论

试验全过程应严格控制时间^[1],供试液从制备至加入培养基,不得超过1 h,否则可能导致微生物繁殖或死亡而影响计数结果。同时培养基保温及供试品制备时需控制温度,培养基

RP-HPLC法同时测定复方美托洛尔尼群地平胶囊中3种组分含量

王 慧*(洛阳市食品药品检验所,河南 洛阳 471023)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)37-3515-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.37.20

摘要 目的:建立同时测定复方美托洛尔尼群地平胶囊中3种组分(氢氯噻嗪、酒石酸美托洛尔、尼群地平)含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈,流动相为醋酸盐缓冲液-乙腈,梯度洗脱,流速为2.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为275 nm。结果:氢氯噻嗪、酒石酸美托洛尔、尼群地平检测质量浓度线性范围分别为45.8~687、92.4~1 386、46.1~692 μg/ml(*r*均为0.999 9);平均加样回收率分别为100.27%、100.51%、99.42%,RSD分别为0.69%、1.06%、0.90%(*n*=6)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可为复方美托洛尔尼群地平胶囊质量标准的改进提供参考。

关键词 氢氯噻嗪;酒石酸美托洛尔;尼群地平;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 3 Components in Compound Metoprolol Nitrendipine Capsules by RP-HPLC

WANG Hui(Luoyang Institute for Food and Drug Control, Henan Luoyang 471023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of hydrochlorothiazide, metoprolol tartrate and nitrendipine in Compound metoprolol nitrendipine capsules. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetate buffer-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 2.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 275 nm. RESULTS: The linear ranges of hydrochlorothiazide, metoprolol tartrate and nitrendipine were 45.8-687 μg/ml (*r*=0.999 9), 92.4-1 386 μg/ml (*r*=0.999 9) and 46.1-692 μg/ml (*r*=0.999 9), respectively. The average recoveries were 100.27% (RSD=0.69%, *n*=6), 100.51% (RSD=1.06%, *n*=6) and 99.42% (RSD=0.90%, *n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and reproducible for the improvement of quality standard of Compound metoprolol nitrendipine capsules.

KEYWORDS Hydrochlorothiazide; Metoprolol tartrate; Nitrendipine; HPLC; Content determination

复方美托洛尔尼群地平胶囊是由氢氯噻嗪、尼群地平、酒石酸美托洛尔3种组分及辅料淀粉组成的复方制剂。氢氯噻嗪为常用降压药、中效利尿剂,主要用于治疗肾病综合征、急性肾小球肾炎、慢性肾功能衰竭以及肾上腺皮质激素与雌激素过多引起的水肿、高血压、尿崩症等;尼群地平为二氢吡啶类钙拮抗药,系钙通道阻滞药,具有显著而持久的降压及血管扩张作用;酒石酸美托洛尔为β受体阻滞药,有较弱的膜稳定作用,对心脏的β受体有较大的选择性作用,具有减慢房室传导、使窦性心率减慢的作用^[1-3]。本文报道的复方美托洛尔尼

群地平胶囊是由河南科技大学第二附属医院(原第四人民医院)制剂室自制的复方制剂,含氢氯噻嗪、尼群地平和酒石酸美托洛尔。本制剂将3种作用机制不同的药物联合使用,可减少各自单用时的用药剂量,用于治疗高血压合并心率快及不适用血管紧张素转换酶抑制剂的患者,并可减少不良反应^[4-5]。相关文献^[6]仅对制剂中酒石酸美托洛尔进行了质量控制,未控制所有组分质量,本文则建立了采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定氢氯噻嗪、酒石酸美托洛尔和尼群地平3种组分含量的方法。结果表明,建立的方法简便、准确、快

保温温度应不超过45 ℃,供试液的制备若需用水浴加温时,不应超过45 ℃,30 min。

羟苯乙酯醇溶液中的羟苯乙酯和乙醇对微生物有抑菌作用,本文验证结果表明,采用常规法不能消除细菌、霉菌和酵母菌的抑菌性,而采用培养基稀释法回收率均高于70%,可消除其抑菌活性。同时,控制菌采用常规法验证检出阳性菌,阴性菌未检出。本试验结果证实,可采用培养基稀释法与常规法相结合进行羟苯乙酯醇溶液的微生物限度检查。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年

*药师。研究方向:药物分析。电话:0379-63935767。E-mail:wang.hui83@163.com

版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XIJ。

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2005年版.北京:化学工业出版社,2005:附录XIJ。

[3] 总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范[S].2002年版.北京:人民军医出版社,2002:12。

[4] 刘春栋,李惠梅.清露酞微生物限度检查方法的建立与方法验证[J].天津药学,2010,22(6):7。

[5] 钟长鸣,陈希,吴燕红.微生物限度和无菌检查方法验证中存在的问题[J].中国药品标准,2011,12(1):12。

[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:2013-12-02 修回日期:2014-05-04)