

表3 样品含量测定结果

Tab.3 The assay of sample content

批号	含量/mg·片 ⁻¹				
	栀子苷	大豆苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素
20111023	0.84	0.16	0.20	0.16	0.05
20111025	0.84	0.16	0.20	0.16	0.05
20111027	0.83	0.16	0.20	0.14	0.06

3.2 流动相的选择

中国药典2010年版栀子苷含量测定用流动相为乙腈-水(15:85),而大豆苷,染料木苷,大豆苷元,染料木素的测定方法常用甲醇-1.8%冰醋酸做流动相。本实验经过对乙腈-甲醇-1.8%冰醋酸不同比例的梯度洗脱考察,最终确定以乙腈-甲-1.8%冰醋酸溶液为流动相,梯度洗脱,同时测定栀子苷、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素5种成分,不但样品峰能得到很好的分离,而且不受杂质峰干扰。此方法具有快捷、简便、准确、重复性好的特点。

3.3 流速及柱温的选择

柱温影响豆豉片中5种有效成分的保留时间及分离度。柱温过高,分离度不好,影响色谱柱寿命;柱温过低,分析时间延长,灵敏度降低。通过试验,本方法确定柱温为30℃。

3.4 有效成分的确定

栀子和淡豆豉都是常用中药,历版中国药典都有收载,淡豆豉具有解表除烦,宣发郁热等功效;栀子性寒,味苦,具有清热利湿,凉血散瘀的功效,可用于镇静、安神。

中国药典2010年版规定了栀子中有效成分栀子苷的含量测定方法,但对于淡豆豉仅有形状和显微鉴别,其中有效成分大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素的含量并没有规定具体的测定方法。

本实验采用HPLC同时对豆豉片中5种有效成分进行定量分析,方法的灵敏度高,重复性好。经过阅读大量文献及多次试验,选出最适波长及流动相,在此条件下豆豉片中5种成分分离效果满意,分离度及峰形对称性较好。在上述实验条件下,仪器的精密度、指标成分的稳定性、方法的重复性和加样回收率均符合药物分析方法指导原则的有关规定。本方法操作简便,结果准确,可用于豆豉片的质量控制。

REFERENCES

- [1] MAO J Q, MI H M, LOU Z Y, et al. Detection of isoflavones contents in *Seme sojæ* preparation [J]. Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2000, 21(10): 955-957.
- [2] LIU Q, XU F H, LI Y S. Improvement of content determination of soy isoflavon from Semen Sojæ preparation [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2012, 30(1): 182-184.
- [3] ZENG C, LIANG B L, ZHOU J, et al. Determination of geniposide in dispensing granules of Carbinized Fructus Gardeniæ by HPLC [J]. Guangxi J Tradit Chin Med(广西中医药), 2013, 36(2): 60-63.
- [4] YANG J X, ZHANG H Y, SONG W, et al. Absorption characteristics of nasal drug delivery of gardenia iridoid glycoside [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(6): 624-627.
- [5] 中国药典.一部[S]. 2010: 231.

收稿日期: 2014-02-08

苯酚滴耳液微生物限度检查方法的建立与验证

曾婧婷, 崔蓉, 李全兴, 保维利(天津市第一中心医院药学部, 天津 300192)

摘要:目的 建立苯酚滴耳液微生物限度检查方法,并进行验证。方法 按中国药典2010年版,采用常规法、薄膜过滤法和中和法对苯酚滴耳液进行抑菌活性试验,计算每次试验的回收率。结果 采用薄膜过滤法联合中和剂,且冲洗量为500 mL时,可使大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的回收率均>70%;采用常规法联合中和剂,可使白色念珠菌和黑曲霉的回收率均>70%。结论 苯酚滴耳液具有抑菌活性,薄膜过滤法联合中和剂适用于苯酚滴耳液细菌计数检验;常规法联合中和剂适用于苯酚滴耳液霉菌和酵母菌计数检验以及控制菌检查。

关键词: 苯酚滴耳液;微生物限度检查;常规法;薄膜过滤法;中和剂;验证

Establishment and Validation of Microbial Limit Test of Phenol Ear Drops

ZENG Jingping, CUI Rong, LI Quanxing, BAO Weili(Pharmacy Department of Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for microbial limit test of Phenol Ear drops and to verify this method. **METHODS** The method for microbial limit examination in Chinese Pharmacopoeia (2010) was followed, involving conventional method and membrane filtration method. The validation had been tested by recovery. **RESULTS** Combination of membrane filtration and neutralization, recoveries of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were >70%. Combination of conventional method and neutralization, recoveries of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were >70%. **CONCLUSION** Combination of membrane filtration and neutralization can be applied to bacteria counting, while combination of conventional method and neutralization is used to moulds and yeasts counting as well as controlled bacterium.

KEY WORDS: Phenol Ear drops; microbial limit; conventional method; membrane filtration; neutralization; verification

苯酚滴耳液为耳吸入给药制剂, 消炎、止痛, 用于中耳及外耳道炎, 规格为 8 mL : 16 g, 按中国药典 2010 年版二部附录 XIJ 微生物限度检查法规定, 苯酚滴耳液微生物限度标准应为: 每 1 mL 供试品中, 细菌数 ≤ 100 cfu; 霉菌和酵母菌数 ≤ 10 cfu; 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌不得检出^[1-3]。本实验建立了苯酚滴耳液微生物限度检查方法, 并根据中国药典 2010 年版要求对选定方法进行了方法学验证。

1 仪器与材料

HFsafe-760s 型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); RH-150B 型生化培养箱(广东省医疗器械厂); B-102-1 型电热干燥箱(武汉市武昌实验仪器厂); DZX-40 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

营养肉汤培养基(NB)、胆盐乳糖培养基(BL)、玫瑰红钠琼脂培养基、亚硫酸钾肉汤培养基、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基和甘露醇氯化钠琼脂培养基, 均由北京三药科技开发公司生产, 中国药品生物制品检定所监制。

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]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]和铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]均由中国药品生物制品检定所提供。

苯酚滴耳液(天津市第一中心医院制剂室, 规格: 8 mL : 16 g, 批号: 20120519)。

2 方法

2.1 菌液制备

按照中国药典 2010 年版二部附录要求, 采用 10 倍稀释法将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉分别稀释至 $50 \sim 100$ cfu·mL⁻¹; 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌则稀释至 $10 \sim 100$ cfu·mL⁻¹。

2.2 细菌、霉菌及酵母菌检查方法验证

2.2.1 常规法联合中和剂 取苯酚滴耳液 10 mL, 加入 5 mL 无菌聚山梨酯 80, 混匀后, 加入 45 °C pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 振摇均匀, 制成 1 : 10 供试品溶液。取 1 : 10 供试品溶液 1 mL, 分别加入上述 5 种实验菌种 1 mL(约 $50 \sim 100$ cfu), 注入平皿中, 立即倾注相应琼脂培养基, 平行制备 2 个平皿, 待凝固后, 置规定温度培养, 细菌培养 3 d, 霉菌及酵母菌培养 5 d, 观察结果, 记录菌落数, 作为试验组。同法测定加入的试验菌种, 作为菌液组。同法测定供试品本底菌落数, 作为供试品对照组。分别记录菌落数, 并按中国药典 2010 年版二部附录 XIJ 微生物限度检查法计算试验组回收率。

稀释剂对照组: 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL, 加入 5 mL 无菌聚山梨酯 80, 混匀后, 加入 45 °C pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 振摇均匀, 制成稀释剂对照液代替 1 : 10 供试品对照组, 按试验组操作, 记录菌落数, 计算稀释剂对照组回收率。

2.2.2 薄膜过滤法联合中和剂 将“2.2.1”项下

1:10 供试品溶液 1 mL 过膜, 然后迅速用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗每片滤膜, 参照中国药典 2010 年版二部附录 XIJ 微生物限度检查法, 每张滤膜每次冲洗量 100 mL, 冲洗总量为 500 mL, 并在最后一次冲洗液中加入 1 mL 试验菌(约 50~100 cfu), 取滤膜贴于相应的培养基上, 作为试验组。取 1 mL 试验菌(约 50~100 cfu)注入平皿中, 立即倾注相应培养基, 测定所加菌数, 作为菌液组。取 1:10 供试品溶液 1 mL, 按“2.2.1”项下试验组方法操作, 在最后一次冲洗时不加试验菌, 测定供试品本底菌数, 作为供试品对照组。取 1 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替苯酚滴耳液, 按“2.2.1”项下试验组方法操作, 并在最后一次冲洗时加入相应试验菌, 以考察试验组制备过程中微生物受影响的程度, 作为稀释剂对照组。分别记录菌落数, 并按中国药典 2010 年版二部附录 XIJ 微生物限度检查法计算试验组回收率。

2.3 控制菌检查方法验证

2.3.1 试验组 取“2.2.1”项下 1:10 供试品溶液 10 mL 过膜, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 200 mL 分次冲洗, 并在最后一次冲洗液中加入 1 mL 金黄色葡萄球菌(约 10~100 cfu), 取滤膜加入到 100 mL 亚碲酸钾肉汤培养基中, 培养 24 h。取培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 培养 72 h, 观察结果, 作为对金黄色葡萄球菌检查方法的验证; 取培养物, 划线接种于溴化十六烷三甲胺琼脂培养基平板上, 培养 24 h, 观察结果, 作为对铜绿假单胞菌检查方法的验证。

2.3.2 阳性对照组 除不加入苯酚滴耳液外, 其余按“2.3.1”项下方法操作。

2.3.3 阴性菌对照组 按“2.3.1”项下方法操作, 且验证金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的阴性对照菌为大肠埃希菌。

2.3.4 阴性对照组 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL 代替苯酚滴耳液, 按“2.3.1”项下方法操作, 但不加试验菌。

3 结果

3.1 细菌、霉菌及酵母菌检查方法验证

不同测定方法验证所得的回收率实验结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab. 1 Results of recovery value

测定方法	回收率/%				
	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
稀释剂对照组	>70	>70	>70	>70	>70
常规法+中和剂	<70	<70	<70	>70	>70
薄膜过滤法+中和剂	>70	>70	>70	/	/

注: “/”表示未进行试验。

Note: “/” indicated untested.

由表 1 可知, 在细菌计数方法验证试验中发现: 苯酚滴耳液的抑菌活性较强, 单采用一种方法, 不能完全消除其抑菌活性对细菌计数试验的影响, 需采用 2 种方法联合应用。由实验结果可知: 常规法联合中和剂(无菌聚山梨酯 80)时, 白色念珠菌和黑曲霉的回收率均>70%, 满足霉菌和酵母菌计数试验要求; 但大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的回收率却均<70%, 不能满足细菌计数试验要求。所以对细菌计数方法进行进一步试验, 并发现: 当以无菌聚山梨酯 80 为中和剂, 且采用薄膜过滤法, 冲洗量为 500 mL 时, 大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的回收率均>70%, 说明苯酚滴耳液细菌计数可采用薄膜过滤法联合中和剂(无菌聚山梨酯 80), 并将冲洗量定为 500 mL。

3.2 控制菌检查方法验证

苯酚滴耳液的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检查方法验证结果分别见表 2 和表 3。

表 2 金黄色葡萄球菌检查验证结果

Tab. 2 Verification of *Staphylococcus aureus* methodology

方法	增菌	分离	结论
试验组	+	+	检出金黄色葡萄球菌
阳性对照组	+	+	检出金黄色葡萄球菌
阴性菌对照组	-	-	未检出大肠埃希菌
阴性对照组	-	-	未检出金黄色葡萄球菌

注: “+”表示有菌生长或阳性; “-”表示无菌生长或阴性。

Note: “+” indicated bacteria growth or positive; “-” indicated sterile growth or negative.

表 3 铜绿假单胞菌检查验证结果

Tab. 3 Verification of *Pseudomonas aeruginosa* methodology

方法	增菌	分离	结论
试验组	+	+	检出铜绿假单胞菌
阳性对照组	+	+	检出铜绿假单胞菌
阴性菌对照组	-	-	未检出大肠埃希菌
阴性对照组	-	-	未检出铜绿假单胞菌

注: “+”表示有菌生长或阳性; “-”表示无菌生长或阴性。

Note: “+” indicated bacteria growth or positive; “-” indicated sterile growth or negative.

由细菌、酵母菌和霉菌计数验证试验可知,在进行微生物限定检查时需加入中和剂,消除苯酚滴耳液自身的抑菌活性,因此在控制菌检查时先采用无菌聚山梨酯 80 制备 1:10 的供试品溶液,再进行其他试验。

由表 2 和表 3 可知,采用薄膜过滤法联合中和剂时,试验组和阳性对照组均能检出试验菌,说明薄膜过滤法联合中和剂能消除苯酚滴耳液的抑菌活性;且阴性菌对照组均未能检出大肠埃希菌,说明该方法专属性好。综上,苯酚滴耳液可采用薄膜过滤法联合中和剂进行控制菌检查。

4 讨论

微生物限度检查法是检查非最终灭菌制剂及原辅料受微生物污染程度的方法。检查项目包括细菌、霉菌、酵母菌计数及控制菌检查^[1-2,4]。

苯酚滴耳液本身具有较强抑菌活性,因此在苯酚滴耳液的细菌计数验证试验中,考察了多种方法对回收率的影响,试验结果表明薄膜过滤法(500 mL)联合中和剂适用于苯酚滴耳液细菌计数试验。在霉菌和酵母菌计数验证试验中发现,常规法联合中和剂可使白色念珠菌和黑曲霉的回收率均>70%,满足试验要求,说明苯酚滴耳液霉菌和酵母菌计数可采用常规法联合中和剂。

根据中国药典 2010 年版二部规定,苯酚滴耳液为耳吸入给药制剂,应对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌进行控制菌检查。金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌进行控制菌检查分别选择金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌作为试验用菌株,且均以大肠埃希菌作为阴性对照菌株。试验结果,薄膜过滤法联合中和剂中阳性菌生长良好,而阴性菌未检出,说明薄膜过滤法可用于苯酚滴耳液的控制菌检查方法,且专属性良好。

上述试验中所用的中和剂为无菌聚山梨酯 80,其具有较强的表面活性,分散能力强,对很小微粒都有作用,常用于清楚接合或吸附到菌体上的离子型消毒剂^[3-11]。

中国药典 2010 年版二部附录 XIJ 微生物限度检查法中规定:若供试液制备需要分散、乳化、中和、离心或薄膜过滤等特殊处理时,应增加稀释剂对照组,以考察供试品溶液制备过程中微生物受影响的程度^[1,4]。试验时,可用相应的稀释液替代供试品,加入试验菌,使最终菌浓度为每 1 mL 供试液含 50~100 cfu,按试验组的供试品溶液制备方法和菌落计数方法测定其菌数。因此在细菌、酵母菌和霉菌计数验证试验中,除了常规法未设稀释剂对照组外,其他 3 种方法均需测定稀释剂对照组回收率,且其值均>70%,说明供试品溶液制备过程对微生物活性没有影响。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 107-116.
- [2] WU L S, LIANG L J. Operation Specification for Drug Inspection (药品检验操作规范) [M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2012: 320-333.
- [3] Pharmaceutics Regulates of Hospitals in Tianjin (2008) (天津市医疗机构制剂规范 2008 年版) [S]. 2008: 505-506.
- [4] USP(36) [S]. 2012: 56-65.
- [5] ZHANG G H, YU L. Neutralization of antibacterial activity of drugs in microbial limit test by polysorbate 80 and lecithin [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(7): 1127-1130.
- [6] DU P H, ZHU S Z, ZHAO L Q. Rational application of diluent for microbiological test of disinfectant [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2002, 22(8): 509-510.
- [7] MIN H, HAN C J, YANG Q B. Verification of microbial limit and control bacteria tests for mefenamic acid in two kinds of dosage forms [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2012, 27(6): 576-578.
- [8] LU B, LING M, ZHAO J Y. The validation of microbial limit test on some suppositories [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2006, 21(3): 121-122.
- [9] QI J H, YUE L, SHEN W. Validation of microbial limit method of HQ841 hydrogel resin powder [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1226-1228.
- [10] HUO X, LIU B, LIU J H, et al. Establishment and validation of microbial limit method for Kangjunxiaoyan capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(12): 1121-1124.
- [11] ZHENG X L, LI Y, ZHANG L Z, et al. Establishment of microbial limit test of Sirolimus capsule [J]. China Pharm(中国药业), 2011, 20(21): 33-34.

收稿日期: 2014-03-13