

虫草川贝膏微生物限度方法学验证

★ 刘艳 (江西国药有限责任公司 南昌 330029)

关键词:虫草川贝膏;微生物限度方法

1 试验材料

1.1 供试品 虫草川贝膏(批号:050501、050502、050503),规格:150 ml/瓶。

1.2 菌种 菌落计数用菌种:大肠埃希菌[CMCC(B)44 102],第五代;金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26 003],第五代;枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63 501],第四代;白色念珠菌[CMCC(F)98 001],第四代;黑曲霉[CMCC(F)98 003],第四代。

控制菌检查用菌种:大肠埃希菌[CMCC(B)44 102],第五代;金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26 003],第五代。以上菌种均由中国药品生物制品检定所提供,所用菌株传代次数均未超过第 5 代,符合验证试验要求。

1.3 培养基及稀释液 营养琼脂培养基(批号:20060105;生产单位:北京双旋微生物培养基制品厂);玫瑰红钠琼脂培养基(批号:20051009;生产单位:北京双旋微生物培养基制品厂);胆盐乳糖培养基(批号:20050308;生产单位:北京双旋微生物培养基制品厂);胆盐乳糖发酵培养基(批号:20050830;生产单位:北京双旋微生物培养基制品厂);MUG 培养基(批号:050314 生产单位:中国药品生物制品检定所);0.9% 无菌氯化钠溶液(自配)。

以上培养基及稀释液配置好后分装,经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 分钟。

1.4 仪器设备 生物安全柜:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,BHC-1300 II A / B 型。超净工作台:苏州净化设备厂,SW-CJ-1B 型。不锈钢立式灭菌器:上海博迅实业有限公司,YXQ-LS-50S II 型。生物培养箱:广东医疗器械厂,LRH-250A。隔水式电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂,PYX-DHS20-60℃ 型。电热鼓风干燥箱:上海县第二五金厂,101-1 型。

2 试验方法

2.1 细菌、霉菌及酵母菌计数的方法学验证 按照《中国药典》(2005 年版)微生物限度检查法进行细菌、霉菌及酵母菌计数的方法学验证。

2.1.1 菌液制备 (1)接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至 10 ml 营养肉汤中,37℃ 培养 24 小时,取此培养液 1 ml 加到 9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液中,采用 10 倍递增稀释法分别稀释至 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵,制成菌浓度为 50~100 cfu/ml 菌悬液。

(2)接种白色念珠菌的新鲜培养物至 10 ml 改良马丁液体培养基中,26℃ 培养 48 小时,取此培养液 1 ml 加到 9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液中,采用 10 倍递增稀释法,稀释至 10⁻⁵,制成菌浓度为 50~100 cfu/ml 菌悬液。

(3)接种黑曲霉的新鲜培养物至 10 ml 改良马丁琼脂培养基中,27℃ 培养 7 天,加 5 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液,洗下霉菌孢子,吸出菌液,取 1 ml 菌液加到 9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液中,采用 10 倍递增稀释法,稀释至 10⁻⁴,制成菌浓度为 50~100 cfu/ml 菌悬液。

2.1.2 供试液的制备 取本品 10 ml 置于无菌锥形瓶中,加入 pH 7.0 氯化钠——蛋白胨缓冲液 90 ml,摇匀,使溶解成 1:10 的供试液。

2.1.3 细菌数的验证方法: (1)菌液组:分别取菌液 1 ml,注入培养基培养。采用平皿计数法。(2)供试品对照组:取供试液 1 ml,注入培养基培养。采用平皿计数法。(3)试验组:取供试液 1 ml。每皿加入菌液 1 ml,注入培养基培养。采用平皿计数法。

2.1.4 霉菌及酵母菌的验证方法 (1)菌液组:分别取菌液 1 ml,注入培养基培养。采用平皿计数法。(2)供试品对照组:取供试液 1 ml,注入无菌平皿中,注入培养基培养。采用平皿计数法。(3)试验组:取供试液 1 ml,注入无菌平皿中,每皿加入菌液 1 ml,注入培养基培养。采用平皿计数法。

进行 3 次独立的平行试验,并分别计算各试验菌每次试验的回收率。结果见表 1。

试验组菌的回收率(%) = (试验组的平均菌落数 - 供试品对照组平均菌落数) / 菌液组的平均菌落数 × 100%。

表 1 虫草川贝膏微生物限度检查
回收率测定(试验菌的验证)

试验菌	批号	平均菌落计数结果/cfu · ml ⁻¹			回收率(%)
		试验组	菌液组	供试品对照组	
大肠埃希菌	050501	57	55	0	103.64
	050502	59	55	0	107.27
	050503	61	55	0	110.91
	050501	60	81	0	74.07
金黄色葡萄球菌	050502	62	81	0	76.54
	050503	59	81	0	72.84
	050501	105	114	0	92.11
	050502	108	114	0	94.74
枯草芽孢杆菌	050503	102	114	0	89.47
	050501	103	95	0	108.42
	050502	98	95	0	103.16
	050503	102	95	0	107.37
白色念珠菌	050501	81	99	0	81.82
	050502	84.5	99	0	85.35
	050503	79.5	99	0	80.30
	050501	81	99	0	81.82

2.1.5 结论 本品按中国药典 2005 年版一部附录 XⅢC 微生物限度检查法中细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证,采用常规法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率均不低于 70%。结果表明:虫草川贝膏的细菌数霉菌及酵母菌数检查均可采用常规法。

2.2 大肠埃希菌方法学验证 按照《中国药典》(2005 年版)微生物限度检查法进行控制菌的方法学验证试验。

2.2.1 菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的新鲜培养物至 10 ml 营养肉汤中,37℃ 培养 24 小时,取此培养液 1 ml 加 0.9% 无菌氯化钠溶液 9 ml,采用 10 倍递增稀释法,大肠埃希菌稀释至 10⁻⁷,金黄色葡萄球菌稀释至 10⁻⁶,制成含菌数为 50~100 cfu/ml 的菌悬液。

2.2.2 供试液的制备 取本品 10 ml 置于无菌锥形瓶中,加入 pH 7.0 氯化钠——蛋白胨缓冲液 90 ml,摇匀,使溶解成 1:10 的供试液。

2.2.3 大肠埃希菌验证方法 (1) 试验组,取供试液 10 ml,加入胆盐乳糖培养基 100 ml 中,加入大肠埃希菌作为阳性对照,37℃ 培养 24 小时,取上述培养物 0.2 ml,加入 5 ml 的 4-甲基伞形酮葡萄糖苷培养基(MUG)试管中,置 37℃ 培养 24 小时后,在 366 nm 紫外灯下观察。然后,沿培养管管壁滴入 2 滴靛基质指示液,观察液面颜色。液面呈玫瑰红色,为靛基质阳性;呈试剂本色,为靛基质阴性。结果见表 2。

(2) 阴性菌对照组,验证大肠埃希菌采用革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌,取胆盐乳糖培养基 100 ml,照试验组方法操作,加入金黄色葡萄球菌作为阴性对照,37℃ 培养 24 小时,取此增菌液 0.2 ml,加入含 5 ml 的 4-甲基伞形酮葡萄糖苷培养基(MUG)试管中,37℃ 培养 24 小时后,在 366 nm 紫外灯下观察。然后,沿培养管管壁滴入 2 滴靛基质指示液,观察液面颜色。应呈试剂本色,为靛基质阴性。结果见表 2。

表 2 虫草川贝膏大肠埃希菌验证结果

试验	批号	试验组	阴性菌对照组
MUG	050501	阳性	阴性
	050502	阳性	阴性
	050503	阳性	阴性
靛基质	050501	阳性	阴性
	050502	阳性	阴性
	050503	阳性	阴性
EMB 平板	—	—	—

2.2.4 结论 本品经按中国药典 2005 年版一部附录 XⅢC 微生物限度检查法中控制菌检查验证方法验证,结果表明可用常规法虫草川贝膏的大肠埃希菌。

3 小结

根据试验结果,本品按中国药典 2005 年版一部附录 XⅢC 微生物限度检查法中细菌、霉菌和酵母菌及控制菌检查进行方法学验证,结果表明:本品可采用常规法检验细菌、霉菌及酵母菌和控制菌。

本品经按中国药典 2005 年版一部附录 XⅢC 微生物限度检查法中方法检查,符合规定。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会编. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.

· 药学研究 ·

醋酸可的松滴眼液 pH 值下降原因分析

★ 文强 (江西珍视明药业有限公司 抚州 344000)

关键词: 醋酸可的松滴眼液; pH 值; 温度; 吐温-80

醋酸可的松滴眼液为微细颗粒的混悬液,静置后微细颗粒下沉,振摇后成均匀的乳白色混悬液。本品为糖皮质激素类药物,具有抗炎、抗过敏作用,适用于过敏性结膜炎。其主要辅料有羧甲基纤维素钠、吐温-80、硼酸、纯化水、防腐剂(醋酸苯汞)。但留样观察发现其成品在有效期内(有效期为两年)会出现 pH 下降到 4.5 以下(有效 pH 值范围 4.5-7.0)的质量问题。本实验采用不同的工艺和处方配制醋酸可的松滴眼液并通过常温和加速实验比较期 pH 值的变化,从而确定其 pH 值下降的原因。

1 仪器与试剂

pHS-3C 精密 pH 计(E-201C 型 pH 复合电极),TG328A 电光天平,S312 数显恒速搅拌机,SC-1513 数控超级恒温槽,RXZ 型智能人工气候箱;醋酸可的松微晶(天津市津津制药厂,批号 007769);羧甲基纤维素钠(上海赛璐璐厂,批号 071033);硼酸(上海云岭化工厂,批号 070610);吐温-80(上海大众药业有限公司,批号 20070711);醋酸苯汞(泰兴市化学试剂厂,批号 070803)

2 方法与结果

(1) 醋酸可的松滴眼液原处方为每 1 000 ml:醋酸可的松 5 g;硼酸 20 g;羧甲基纤维素钠 2 g;吐温-80 0.8 g;醋酸苯汞 0.02 g;纯化水适量。

(2) 将处方中羧甲基纤维素钠按处方量配制 1 000 ml 溶液,按工艺进行灌装,在常温和 40℃ 二种温度下进行常温和加速^[2]实验,并在不同时间段检测 pH 值,经过六个月的检测观察发现,该溶液初始 pH 值为 7.18,在二种温度条件下放置 6 个月后:常温条件的 pH 值为 7.14;40℃ 加速条件下的 pH 值为 7.10。

(3) 将处方中硼酸和羧甲基纤维素钠按处方量配制 1 000 ml 溶液,按工艺进行灌装,在常温和 40℃ 二种温度下进行常温和加速实验,并在不同时间段检测 pH 值,经过六个月的检测观察发现,该溶液初始 pH 值为 5.53,在二种温度条件下放置 6 个月后:常温条件的 pH 值为 5.58;40℃ 加速条件下的 pH 值为 5.56。

(4) 将处方中吐温-80 和羧甲基纤维素钠按处方量配制