

- children; Meta-analysis of individual patient data [J]. J Pediatr, 2011, 159(4): 644-651.
- [10] WHITING P, WESTWOOD M, BOJKE L, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of tests for the diagnosis and investigation of urinary tract infection in children: a systematic review and economic model [J]. Health Technol Assess, 2006, 10(36): 1-154.
- [11] HAMID MOHAMMAD-JAFARI, MOHAMMED JAFAR SAFFAR, IBRAHIM NEMATE, et al. Increasing antibiotic resistance among uropathogens isolated during years 2006-2009: Impact on the empirical management [J], Int Braz J Urol, 2012, 38(1): 25-32.
- [12] 杨茜, 王墨. 365 例尿路感染住院患儿临床及感染菌耐药性分析[J]. 儿科药理学杂志, 2011, 17(3): 36-41.
- [13] 师志云, 赵志军, 李刚, 等. 临床分离肠球菌属耐药性及耐药基因的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(5): 442-444.
- [14] 周玲, 肖曙芳, 张泉, 等. 昆明地区 116 例小儿尿路感染病原菌分布及耐药分析[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(4): 337-339.
- [15] 张交生, 董意妹, 郑跃杰, 等. 不同年龄发热患儿血培养阳性菌株分布及其耐药性分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(3): 215-218.
- [16] 胡红兵, 夏维. 儿童尿路感染常见病原菌的分布及耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1263-1264.
- [17] 谢泉琨, 刘书真. 头孢美唑治疗急性尿路感染的疗效观察[J]. 中国药房, 2011, 22(28): 2644-2646.
- (编辑: 杨丹)
- (收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-10-26)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2018.11.015

• 论 著 •

小儿呋麻滴鼻液微生物限度检查方法适用性研究

田怀平, 林志燕, 王冉冉, 王玲, 杜毅 (上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092)

[摘要] 目的: 建立小儿呋麻滴鼻液的微生物限度检查方法。方法: 参照《中国药典》2015 年版的方法, 制备 1:10 供试液, 薄膜过滤法进行样品前处理, 分别进行微生物计数检查和控制菌检查的方法适用性实验。结果: 薄膜过滤法可有效消除小儿呋麻滴鼻液供试品的抗菌活性。微生物计数检查的 5 种实验菌的回收比值均在 0.5~2.0 之间。控制菌检查中铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌都能够检出。结论: 采用 1:10 稀释法和薄膜过滤法的检查方法和检验条件, 方法适用性实验已确认可以进行小儿呋麻滴鼻液的微生物限度检查。

[关键词] 小儿呋麻滴鼻液; 微生物限度检查; 微生物计数检查; 控制菌检查; 薄膜过滤法

[中图分类号] R926

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2018)11-0045-04

Applicability Study on Microbial Limit Test for Ephedrine and Furacillin Nasal Drops for Infants

Tian Huaiping, Lin Zhiyan, Wang Ranran, Wang Ling, Du Yi (Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for microbial limit test on ephedrine and furacillin nasal drops for infants. **Methods:** By reference to Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition), the 1:10 test solution was prepared, and the sample pretreatment was carried out under membrane-filter procedure, the applicability experiments of microbial count test and control bacteria test were conducted respectively. **Results:** The membrane-filter procedure could effectively eliminate the antibacterial active of ephedrine and furacillin nasal drops. The recovery ratios of the five experimental bacteria examined by microbial count were within 0.5~2.0. And *seudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* can be detected in control bacteria. **Conclusion:** With the inspection method and test conditions of 1:10 dilution method and membrane-filter procedure, the applicability experiments has confirmed that microbial limit test of ephedrine and furacillin nasal drops for infants can be performed.

[Keywords] ephedrine and furacillin nasal drops for infants; microbial limit test; microbial count test; controlled bacteria test; membrane-filter procedure

小儿呋麻滴鼻液在我院临床应用多年, 为儿科和耳鼻喉科常用的医院制剂, 其主要成分是盐酸麻黄碱和呋喃西林, 辅料有氯化钠和羟苯乙酯等, 性状呈淡黄色澄明液体, 味苦, 微咸, 有消炎和收缩血管作用, 用于鼻炎、

鼻黏膜肿胀等疾病的治疗^[1]。该制剂由本院制剂室生产, 年产量约 1.4 万支, 质量控制检查包括鉴别、装量、含量测定和微生物检查等^[2]。随着我国药品质量逐步实施国际最高技术标准, 2015 年版《中华人民共和国药

典》接轨国际标准,在微生物检查方面有重大改变^[3]。现有制剂的微生物检查方法,应进行更新,但此类研究报道较少。本研究拟建立小儿呋麻滴鼻液的微生物检查法并进行方法适用性研究,希望为药品质量控制部门提供参考。

1 实验材料

1.1 仪器

HTY-APL01 集菌仪、薄膜过滤器、KSF330 集菌培养器(杭州泰林生物技术设备有限公司);PYX-DHS 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂);MJ-250I 霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司);Microflex LT 质谱仪(德国布鲁克道尔顿公司);CLG-32L 高压蒸汽灭菌锅(日本 ALPCO, Ltd 公司);M017 生物安全柜(Thermo Fisher Scientific);SW-CJ 医用型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 试剂

小儿呋麻滴鼻液(医院制剂室自制,每支 5 mL,批号 161219、170410、170509)。胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号 161104),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号 161227),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号 170114),溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号 160218),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 160607),麦康凯液体培养基(Mac B,批号 160902),麦康凯琼脂培养基(Mac A,批号 160926)。培养基配制后 121 °C 高压蒸汽灭菌。培养基产自上海中科昆虫生物技术开发有限公司。稀释液和冲洗液为 0.9% 无菌氯化钠溶液(上海交通大学医学院附属新华医院制剂室自制)。

1.3 实验菌种

大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、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]和黑曲霉[CMCC(F)98003]。实验菌种为中国食品药品检定研究院提供的 0 代菌种,实验前传代至第 4 代。

2 方法

2.1 实验菌液的制备

参照 2015 版《中华人民共和国药典》方法,制备第 4 代各菌种的菌液^[3]。稀释液为无菌的 0.9% 氯化钠溶液,最终菌液浓度为每毫升含菌 50~100 cfu。菌液室温放置在 2 h 内即用,若放置在 2~8 °C 冰箱,可在 24 h 内使用。

2.2 1:10 供试液制备和样品前处理

取小儿呋麻滴鼻液样品 2 支,每支量取 5 mL,共 10 mL 加入无菌具塞锥形瓶,用无菌的 0.9% 氯化钠溶液稀释至 100 mL,混匀,制备成 1:10 的供试液,制备后 1 h 内完成接种。

2.3 微生物计数检查方法的适用性实验

计数检查分为需氧菌、霉菌和酵母菌的总数检查。每个菌种的验证实验分别分为以下 4 组。加菌实验组:取 1:10 供试液 10 mL,经薄膜过滤器过滤,无菌的 0.9% 氯化钠溶液冲洗 3 次,每次 100 mL,在最后一轮的冲洗液中加入 50~100 cfu 的实验菌。供试品对照组:操作同加菌实验组,最后一次冲洗液不加菌。菌液对照组:用无菌的 0.9% 氯化钠溶液替代供试液,操作同加菌实验组,最后一次冲洗液加入 50~100 cfu 的实验菌。稀释液对照组:用无菌的 0.9% 氯化钠溶液替代供试液,操作同加菌实验组,最后一次冲洗液中不加菌。

将各菌种的 4 组滤膜分别取出,菌面朝上贴于 TSA 或 SDA 培养基平板上,根据培养基的不同和菌种的不同选择相应的培养条件进行培养。需氧菌总数检查:金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌接种于 TSA 平板,33 °C 培养不超过 3 d;白色念珠菌和黑曲霉接种于 TSA 平板,33 °C 培养不超过 5 d。霉菌和酵母菌总数检查:SDA 平板接种白色念珠菌和黑曲霉,23 °C 培养不超过 5 d。3 个批号的菌种分别进行独立平行实验,每个菌种平行操作 2 个平皿,取 2 个平皿的平均菌落数作为计数结果。

实验菌的计数检查回收比=(加菌实验组菌落数-供试品对照组菌落数)/对照组菌落数。该比值若在 0.5~2.0 范围内,认为该检查方法和实验条件适合于小儿呋麻滴鼻液的微生物限度检查。

2.4 微生物控制菌检查的方法适用性实验

小儿呋麻滴鼻液作为鼻用制剂,控制菌不得检出铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌^[3]。使用 KSF330 三联集菌培养器分 3 组进行薄膜过滤法,3 种菌液分别进行适用性实验。加菌实验组:取 1:10 供试液 10 mL,集菌器过滤,0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗 3 次,每次 100 mL,最后一次冲洗液中加入 50~100 cfu 实验菌,集菌器泵入 100 mL TSB 培养基。供试品对照组:最后一次冲洗液不加菌,其余同加菌实验组。稀释液对照组:用无菌的 0.9% 氯化钠溶液替代供试液,最后一次冲洗液不加菌,其余同加菌实验组。泵入 TSB 培养基的三联集菌器在 33 °C 培养 18~24 h,进行以下操作。

铜绿假单胞菌检查:取 TSB 培养物划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上,33 °C 培养 18~72 h。金黄色葡萄球菌检查:取 TSB 培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上,33 °C 培养 18~72 h。大肠埃希菌检查:取 TSB 培养物 1 mL,接种至 100 mL Mac B 培养基中,42 °C 培养 24~48 h,取 Mac B 培养物划线接种于 Mac A 平板上,33 °C 培养 18~72 h。

上述三种平板若有菌落生长,使用 Microflex LT 质谱仪进行分离纯化鉴定,判断是否检出控制菌。若经质谱仪鉴定,加菌实验组检出控制菌,供试品对照组和稀释液对照组均未检出,可以确认小儿呋麻滴鼻液的控制

菌检查方法适用^[3]。

3 结果

3.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数检查的方法适用性检查结果

3 个批次样品的微生物计数培养结果见表 1,回收率比值见表 2。3 个批次的独立平行实验,所有实验菌种的回收比值均在 0.5 ~ 2.0 的范围,认为本检查方法和检验条件,能够消除抑菌成分的影响,适用于小儿呋麻滴鼻液的微生物计数检查。

表 1 小儿呋麻滴鼻液微生物计数方法的适用性实验结果

cfu

组别	批号	需氧菌总数(TSA)					霉菌和酵母菌总数(SDA)	
		金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	黑曲霉	白色念珠菌	黑曲霉	白色念珠菌
加菌实验组	161219	41	53	61	35	32	29	44
	170410	45	44	52	43	44	40	36
	170509	52	39	57	33	51	35	31
供试品对照组	161219	0	0	0	0	0	0	0
	170410	0	0	0	0	0	0	0
	170509	0	0	0	0	0	0	0
菌液对照组	-	59	52	82	49	47	45	41
稀释液对照组	-	0	0	0	0	0	0	0

3.2 控制菌检查的方法验证结果

3 个批次的小儿呋麻滴鼻液的加菌实验组均有菌落生长,经过 Microflex LT 质谱仪鉴定确认为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌。供试品对照组和稀释液对照组均未见菌落生长。因此,本文采用 1 : 10 稀释和薄膜过滤的检查方法和培养条件,适用于小儿呋麻滴鼻液的微生物限度检查。见表 3。

表 2 小儿呋麻滴鼻液微生物计数方法的适用性实验回收比值

批号	需氧菌总数(TSA)					霉菌和酵母菌总数(SDA)	
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	黑曲霉	白色念珠菌	黑曲霉	白色念珠菌
161219	0.69	1.02	0.74	0.71	0.68	0.64	1.07
170410	0.76	0.85	0.63	0.88	0.94	0.89	0.88
170509	0.88	0.75	0.70	0.67	1.09	0.78	0.76
均值	0.78	0.87	0.69	0.75	0.90	0.77	0.90

表 3 小儿呋麻滴鼻液控制菌检查方法验证结果

批号	加菌实验组			供试品对照组	稀释液对照组
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌		
161219	+	+	+	-	-
170410	+	+	+	-	-
170509	+	+	+	-	-

4 讨论

4.1 药品微生物检查的进展

近 20 年以来,《中国药典》的每次新版出台都对药品微生物检查的要求有大的更新^[4]。2017 年 6 月,中国国家食品药品监督管理总局以成员身份加入国际人用药品注册技术协调会(ICH)^[5]。这意味着我国药品监管部门、制药行业和研发机构将逐步实施国际最高技术标准和指南。2015 版《中国药典》关于微生物检查的重大变化,接轨了 ICH 以及美国、欧盟和日本药典的要求,旨在提升国内制药产业的国际竞争力。医院制剂应严格

遵循药典要求,对微生物检查方法及时更新并验证,以更好地为患者服务,获得良好的生存与发展机会^[6]。

4.2 实验菌种和培养基的选择

根据 2015 版《中国药典》要求,需氧菌计数检查的验证菌种用铜绿假单胞菌替代了 2010 版的大肠埃希菌,菌落形态更为稳定,更适合方法验证性研究^[7]。需氧菌总数检查采用 TSA 培养基替代了营养琼脂培养基;霉菌和酵母菌总数检查采用 SDA 培养基替代了玫瑰红钠琼脂培养基,适合样品中微生物复苏生长,提高了检测灵敏度^[7]。控制菌检查选用 TSB 培养基替代营养肉汤进行预增菌,对受伤菌种有复壮培养作用,可以提高检出率^[8]。

4.3 样品的预处理

小儿呋麻滴鼻液中呋喃西林含量 0.02%,辅料羟苯乙酯含量为 0.03%,这两个组分对微生物检查均有较大影响,常规稀释法和培养基稀释法不能完全去除干扰,因此首选薄膜过滤法消除抗菌活性^[9-10]。控制菌检查使用了一次性集菌器,操作简便但耗材成本略高。如考虑经济学因素,这一步骤可以用多次薄膜过滤器取代,或在下一步研究中进行耗材费用的比对。本研究稀释液和冲洗液采用了 2015 版《中国药典》许可的 0.9% 氯化钠灭菌溶液,与 2010 版药典建议的蛋白胨溶液比较,获取便利,成本降低。

综上所述,经过方法适用性实验确认,小儿呋麻滴鼻液经过供试液稀释和薄膜过滤法,有效消除了呋喃西林和羟苯乙酯的抗菌活性,可用作微生物限度检查的常规方法。

参考文献:

[1] 小儿呋麻滴鼻液成品质量标准[S]. 批准文号:沪药制字 Z04180745. 执行标准 SYZ-ZF-017-2004.
[2] 朱鹏程,吴敏,唐跃年,等. 小儿呋麻滴鼻液的定性及定量质

- 量控制标准研究[J]. 中国医药导报, 2016, 13(12): 520-527.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 136-151.
- [4] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1747-1751.
- [5] 我国正式加入国际药品监管体系[J]. 中华医学信息导报, 2017, 32(12): 6.
- [6] 龙荣, 彭芳玲, 胡勤, 等. 在实践中体会医院制剂的生存与发展[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(5): 36-37.
- [7] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1101-1107.
- [8] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 《中国药典》2015 年版非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法解读与对策[J]. 中国药师, 2016, 19(4): 748-752.
- [9] 李俨, 姜丽. 呋喃西林片 2015 年版微生物限度检查标准及探索性研究[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(15): 121-123.
- [10] 杜建红, 袁涛, 张国庆, 等. 羟苯乙酯醇溶液微生物限度检查方法验证[J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3513-3515.
- (编辑:刘雄志)
(收稿日期:2017-11-21 修回日期:2018-02-02)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2018.11.016

· 论著 ·

制霉菌素搽剂微生物限度检查方法探讨

李毅¹, 王尊文¹, 姬俊², 刘琳¹ (1. 青岛市妇女儿童医院, 山东青岛 266034; 2. 青岛市食品药品检验研究院, 山东青岛 266071)

[摘要] 目的: 建立制霉菌素搽剂的微生物限度检查方法。方法: 根据 2015 年版《中国药典》方法, 采用平皿法、薄膜过滤法联合中和剂对制霉菌素搽剂进行微生物限度检查方法探讨。结果: 利用预热至 45℃ 的聚山梨酯-80 和卵磷脂的中和作用, 制霉菌素搽剂需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数采用薄膜过滤法联合中和剂的方法进行检查, 控制菌的检查采用常规法, 结果均符合 2015 年版《中国药典》的规定。结论: 制霉菌素搽剂微生物限度计数方法综合采用薄膜过滤法、中和剂法(预热 45℃)消除其对白色念珠菌的抗菌活性, 使需氧菌、霉菌和酵母菌的回收结果符合药典要求。按 2015 年版《中国药典》方法对控制菌进行实验, 控制菌检查可采用常规法进行。

[关键词] 制霉菌素搽剂; 方法适用性试验; 微生物限度检查; 薄膜过滤法

[中图分类号] R725.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2018)11-0048-03

Discussion on Microbial Limit Test of Nystatin Liniment

Li Yi¹, Wang Zunwen¹, Ji Jun², Liu Lin¹ (1. Qingdao Women and Children's Hospital, Shandong Qingdao 266034, China; 2. Qingdao Institute for Food and Drug Control, Shandong Qingdao 266071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for microbial limit test of nystatin liniment. **Methods:** According to the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition), the plate count method, membrane-filter method combined with neutralizing agent were adopted to conduct the microbial limit test on nystatin liniment. **Results:** The neutralization of polysorbate-80 and lecithin preheated at 45℃ were used, the total aerobic bacteria, mold and yeast of the nystatin liniment were examined by membrane-filter procedure combined with a neutralizer, the controlled bacteria were examined by conventional methods. All results of examinations were in line with the specifications of the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition). **Conclusion:** The microbial limit counting method of nystatin tincture has combined membrane-filtration method with neutralizer method (with preheating at 45℃) to eliminate the antibacterial activity against *Candida albicans*, so that the recovery results of aerobic bacteria, mold and yeast can meet the specifications of pharmacopoeia. According to the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition), the control bacteria can be examined by conventional methods.

[Keywords] nystatin liniment; employment and suitability test; microbial limit test; membrane-filter procedure

制霉菌素搽剂由制霉菌素(5 000 万单位)和甘油组成, 临床适用于口腔黏膜真菌感染、外耳道真菌病等^[1-2]。制霉菌素为多烯类抗真菌药, 对念珠菌属具较强活性^[3], 它通过与真菌细胞膜上的甾醇结合, 改变细胞膜的通透性, 使细胞内重要内容物流失从而起到杀灭

真菌的作用。由于制霉菌素的抗真菌活性有较强的抗念珠菌活性, 在进行制霉菌素搽剂微生物限度检测时, 采用常规检测方法回收率达不到药典要求。本文按照 2015 年版《中国药典》四部通则 1105、1106 要求^[4], 对我院制剂制霉菌素搽剂进行方法适用性实验, 重点考察其

作者简介: 李毅(1962. 10-), 男, 大学本科, 副主任药师, 主要从事医院制剂及管理工作, E-mail: qdli1962@sina.com。

通讯作者: 王尊文(1971. 1-), 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事药品质量控制工作, E-mail: xiaolinw118@163.com。