

- 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。

对白色念珠菌抑菌活性的消除方法,进而建立此药的微生物限度检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

微生物限度检验仪(杭州泰林生物技术设备有限公司,型号 HTY-302G);电热恒温水温箱(上海新苗医疗器械制造有限公司,型号 H·SWX-600BS);电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司,型号 TD);生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司,型号 SHP-160E);隔水式培养箱(上海跃进医疗器械厂,型号 PYX-DHS-40×50);电热恒温培养箱(德国美墨尔特公司,型号 INE500)。

1.2 菌种

白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98 001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98 003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10 104]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26 003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63 501]为传代不超过 5 代的菌种,均由中国食品药品检定研究院提供。

1.3 试剂

卵磷脂:青岛高科园海博生物技术有限公司(批号:20170302);聚山梨酯-80:天津市富宇精细化工有限公司(批号:20151014)。

1.4 培养基

pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号 3104420);胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号 3105660);胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号 3105589);沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号 3104045);沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号 3104833);甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 3104674);溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号 3105130)均由广东环凯微生物科技有限公司提供,以上培养基均符合 2015 年版《中国药典》培养基适用性检查的规定。

1.5 药品

制霉菌素搽剂,规格 10 mL:50 万单位,批号 20170203、20170411、20170502,青岛市妇女儿童医院自制。

2 方法和结果

2.1 菌液制备

按照 2015 年版《中国药典》四部通则 1105、1106 要求制备。

2.2 供试液制备

(1)取本品 10 mL,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,混匀,制成 1:10 供试液(不含中和剂)。(2)取本品 10 mL,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(含 3% 聚山梨酯-80、0.3% 卵磷脂,以下简称中和剂)至 100 mL,混匀,制成 1:10 供试液(含中和剂)。(3)取本品 10 mL,加入预热至 45℃ 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋

白胨缓冲液(含中和剂)至 100 mL,混匀,制成 1:10 供试液(含中和剂,加热)。

2.3 微生物限度检查方法适用性实验

2.3.1 实验组 (1)平皿法:取 2.2 项下 1:10 供试液(不含中和剂)9.9 mL 置于无菌试管中,在试管中加入 2.1 项下白色念珠菌菌液 0.1 mL,混匀,使每 1 mL 供试液中含菌量 ≤ 100 cfu,取上述含有菌液的供试液 1 mL 注入平皿中,立即倾注 15~20 mL 熔化的琼脂培养基(温度不超过 45℃)。(2)平皿法(含中和剂):取 2.2 项下 1:10 供试液(含中和剂)9.9 mL 置于无菌试管中,在试管中加入 2.1 项下白色念珠菌菌液 0.1 mL,混匀,使每 1 mL 供试液中含菌量 ≤ 100 cfu,取上述含有菌液的供试液 1 mL 注入平皿中,立即倾注 15~20 mL 熔化的琼脂培养基(温度不超过 45℃)。(3)薄膜过滤法(含中和剂):取 2.2 项下 1:10 供试液(含中和剂)1 mL,按薄膜过滤法过滤后,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(含中和剂)冲洗,每膜每次冲洗 100 mL,共冲洗 3 次,在最后一次冲洗液中加入 2.1 项下的白色念珠菌菌液,使每张滤膜的含菌量 ≤ 100 cfu,将过滤后的薄膜菌面向上置于琼脂培养基上。(4)薄膜过滤法(含中和剂,加热):取 2.2 项下 1:10 供试液(含中和剂,加热)1 mL,按薄膜过滤法过滤后,用预热至 45℃ 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(含中和剂)冲洗,每膜每次冲洗 100 mL,共冲洗 3 次,在最后一次冲洗液中分别加入 2.1 项下的 5 种菌液,使每张滤膜的含菌量 ≤ 100 cfu,将过滤后的薄膜菌面向上置于琼脂培养基上。

2.3.2 菌液对照组 取不含中和剂的相应稀释液替代供试液及冲洗液,按实验组操作加入实验菌进行实验。

2.3.3 供试品对照组 取相应的供试液,用相应稀释液代替菌液,按照实验组进行实验。

2.3.4 稀释剂对照组(含中和剂) 取相应的含中和剂的稀释液,或预热至 45℃ 的含中和剂的稀释液代替供试品及冲洗液,按照实验组进行实验。

以上各组,每组平行制备 2 个平皿或滤膜,用于需氧菌计数的平皿或滤膜使用胰酪大豆胨琼脂培养基,在 30~35℃ 培养;用于霉菌和酵母菌计数的平皿或滤膜使用沙氏葡萄糖琼脂培养基,在 20~25℃ 培养。

2.4 结果

供试品实验组的回收结果=(实验组的平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数)/菌液对照组的平均菌落数;稀释剂对照组的回收结果=稀释剂对照组的平均菌落数/菌液对照组的平均菌落数。结果见表 1、表 2。

2.5 控制菌检查方法适用性实验

实验组:取 2.2 项下 1:10 供试液(不含中和剂)10 mL 和菌数 ≤ 100 cfu 的金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

阳性对照实验组:取菌数 ≤ 100 cfu 的金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

供试品对照组:取 2.2 项下 1:10 供试液(不含中和剂)10 mL 至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

阴性对照实验组:取 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL 接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。

以上各组在 30~35℃ 培养 24 h 后,取相应的培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板(用于检验金黄色葡萄球菌)或溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板(用于检验铜绿假单胞菌)上,30~35℃ 培养 72 h。结果见表 3。

表 1 制霉菌素搽剂白色念珠菌不同检查方法适用性试验结果

菌株回收的方法	白色念珠菌回收结果		稀释剂对照组回收结果	
	TSA	SDA	TSA	SDA
平皿法	0	0	/	/
平皿法(含中和剂)	0	0	0.95	0.91
薄膜过滤法(含中和剂)	0	0	1.01	0.98
薄膜过滤法(含中和剂,加热)	1.20	1.05	1.13	1.22

表 2 制霉菌素搽剂薄膜过滤法适用性试验结果

项目	菌株	供试品实验组回收结果	稀释剂对照组回收结果
需氧菌总数	枯草芽孢杆菌	1.06	0.95
	金黄色葡萄球菌	0.92	1.01
	铜绿假单胞菌	0.88	0.90
	白色念珠菌	1.20	1.13
	黑曲霉	0.91	0.98
霉菌和酵母菌总数	白色念珠菌	1.05	1.22
	黑曲霉	0.99	0.93

表 3 控制菌检查方法适用性实验结果

控制菌	实验组	阳性对照实验组	供试品对照组	阴性对照实验组
金黄色葡萄球菌	+	+	-	-
铜绿假单胞菌	+	+	-	-

2.6 样品微生物限度检查

采用上述确定的检验方法对 3 批样品进行微生物限度检查,结果见表 4。3 批样品的需氧菌总数均小于 10^2 cfu/mL,霉菌和酵母菌总数均小于 10^1 cfu/mL,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌均未检出,结果均符合 2015 年版《中国药典》的规定。

表 4 样品的微生物限度检查结果(cfu/ml)

批号	需氧菌总数	霉菌和酵母菌总数	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	结果
20170203	<10	<10	-	-	符合规定
20170411	<10	<10	-	-	符合规定
20170502	<10	<10	-	-	符合规定

注:“-”代表未检出

3 讨论

药品的微生物限度检查是控制药品质量和安全的重要指标之一^[5]。由于一些药品具有抑菌性,采用常规

法检测,会导致检验结果不能完全反映产品的污染情况,影响检查结果的准确性。我国从 2005 年版《中国药典》开始要求进行微生物限度检查方法验证,按验证的方法进行检测,2015 年版《中国药典》将微生物限度方法验证名称改为方法适用性实验,除了名称改变,内容也发生了很大变化,例如以前对有抑菌性样品可以采用离心法除去样品抑菌性,由于这种方式可能造成检出率降低,在新版药典中不再使用。未执行 2015 版药典前,有文献报道^[6]采用先沉淀再过滤的方法是符合要求的,但是按现行版药典就不合适。本研究对制霉菌素搽剂进行微生物限度方法适用性实验严格按照现行版药典要求进行。因为制霉菌素搽剂对白色念珠菌有较强的抑菌活性,因此首先考察其对白色念珠菌的回收率。当采用常规平皿法时,其回收率为 0。根据聚山梨酯-80 和卵磷脂联用可降低化学药品的抑菌作用^[7],选用 3% 聚山梨酯-80 和 0.3% 卵磷脂作为中和剂,采用平皿法和薄膜过滤法分别进行试验,结果依旧没有消除样品对白色念珠菌的抑制作用。有文献^[8,9]报道,对抑菌作用强的药品,用经 45℃ 预热的含中和剂的稀释液/冲洗液进行薄膜过滤法,能消除其抑菌活性,分析采用 45℃ 预热的方式不但能提高中和剂的活性也能提高抑菌成分的溶解度使其容易通过滤膜除掉,因此尝试用此法实验,白色念珠菌的回收比(表 1)可达到 0.5~2.0 之间,依据稀释剂对照组回收结果,此方法不影响阳性菌的回收。用此方法对其他试验菌进行计数方法适用性实验,结果均符合药典要求。因此,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。

参考文献:

- [1] 山东省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准[S]. SDPR-2015-0500020.
- [2] 吴娇娇,吴国民,胡信,等. 制霉菌素搽剂治疗外耳道真菌病 212 例[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2011, 11(2): 100-102.
- [3] 雷璇. 杀念菌素生物合成中糖基转移酶的研究[D]. 上海交通大学博士学位论文, 2013.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第四部)[M]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 140-149
- [5] 熊雯,程龙,毛腾霄. 复方去煤液微生物限度检查及方法学验证[J]. 儿科药学杂志, 2016, 22(7): 46-48.
- [6] 严佳,檀巧婷,钟桂香,等. 盐酸普萘洛尔凝胶的微生物限度检查方法学验证[J]. 儿科药学杂志, 2015, 21(5): 43-46.
- [7] 张光华,余立. 聚山梨酯 80 和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1127-1130.
- [8] 田洪根,陈芳. 西他沙星微粒微生物限度检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(6): 429-432.
- [9] 李芳,刘冬玲,刘浩,等. 氟罗沙星胶囊微生物检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 445-447.

(编辑:曾敏莉)

(收稿日期:2018-03-25 修回日期:2018-07-25)