

· 论 著 ·

复方地苊酚软膏的微生物限度检查方法验证

杨宗学¹, 陈 丽¹, 姚 青², 张道利², 马 晨²

[摘要] **目的** 建立一种复方地苊酚软膏制剂的微生物限度检查方法。**方法** 对本软膏的细菌、霉菌、酵母菌及控制菌微生物限度检查法方法进行验证,验证试验进行 3 次独立的平行验证试验,分别计算各试验菌每次试验的回收率。**结果** 平皿菌落计数法(常规法),大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率均达到 70% 以上;培养基稀释法,枯草芽孢杆菌的回收率达到 70% 以上。**结论** 细菌数测定采用培养基稀释法;霉菌及酵母菌数测定采用常规法;控制菌检查采用常规法。

[关键词] 复方地苊酚软膏;微生物;限度检查;验证

[中图分类号] R927.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)04-0302-03

Validation of methodology of microbial limit test for Compound Dithranol Ointment

YANG Zong-xue¹, CHEN Li¹, YAO Qing², ZHANG Dao-li², MA Chen². 1. The Pharmacy Department, 149 Clinical Branch of 82 Hospital of PLA, Lianyungang, Jiangsu 222042, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. Lianyungang, Jiangsu 222047, China

[Abstract] **Objective** To establish a method of microbial limit test for Compound Dithranol Ointment. **Methods** Three parallel tests were carried out for testing bacteria, fungi, yeast and control bacteria. And their recoveries were investigated. **Results** Plate method was used for testing escherichia coli, staphylococcus aureus, candida albicans and aspergillus niger and the recovery exceeded 70%. Culture medium dilution method was used for testing bacillus subtilis and the recovery exceeded 70%. **Conclusion** Culture medium dilution method was adopted for bacteria count, while routine method for fungi, yeast and control bacteria count. The Validation of methodology showed the method for microbial limit was accurate, reliable and specific.

[Key words] Compound Dithranol Ointment; microbial; limit test; validation

复方地苊酚软膏剂外用于局部治疗寻常型银屑病^[1-2]。该制剂前期进行了稳定性试验、质量控制及动物皮肤安全性评价实验^[3-4]等工作。《中国药典》2010 年版规定进行微生物限度检查法时应进行方法学验证,这一要求完善了微生物限度检查研究的内容,也保证实验的可靠性和准确性及检验结果的完整性。现参照文献,建立一种复方地苊酚软膏制剂的微生物限度检查方法,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基及试药 复方地苊酚软膏(规格:40g/瓶,本院制剂室提供);营养肉汤培养基、玫瑰

红钠琼脂培养基、胆盐乳糖培养基、MUG 培养基、靛基质试液(由北京三药科技开发有限公司生产);营养琼脂培养基、PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、亚碲酸钠肉汤(由宜兴市永信生物有限公司生产);聚山梨酯 80(由南京威尔化工有限公司生产);单硬脂酸甘油酯、司盘 80(由国药集团化学试剂有限公司生产)。

1.1.2 仪器设备 双人净化工作台、SW-CJ-2FD 超净台,均由苏净集团安泰公司生产;水浴锅由通州市沪通实验仪器厂生产;电热蒸汽压力消毒器由上海三申医疗器械有限公司生产;TC-15 套式恒温器由浙江新华医疗器械厂生产。

1.1.3 菌种 枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501(5 代);金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003(5 代);大肠埃希菌 CMCC(B)44102(5 代);白色念珠菌 CMCC(F)98001(5 代);黑曲霉 CMCC(F)98003(5 代);铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104(5 代)(均由江苏省药品检验所提供)。

1.2 方法

基金项目: 南京军区医学科技创新资助项目(09MB118)

作者简介: 杨宗学(1956-),男,山东曹县人,本科,副主任药师,从事药物制剂和药械管理

作者单位: 1. 222042 江苏连云港,解放军 82 医院 149 临床部药械科;2. 222047 江苏连云港,江苏康缘药业股份有限公司

1.2.1 菌液制备方法^[5] ①取经 37℃ 培养 18 ~ 24 h,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的新鲜肉汤培养物 1 ml,用 0.9% 氯化钠溶液稀释,制成含菌数为 50 ~ 100 CFU/ml 的菌悬液。②取经 25℃ 培养 18 ~ 24 h 的白色念珠菌的新鲜培养物 1ml,用 0.9% 氯化钠溶液稀释,制成含菌数为 50 ~ 100 CFU/ml 的菌悬液。③接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基上,培养 5 ~ 7 d,加入 3 ~ 5 ml 含 0.05 % (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9 % 氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后,采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用含 0.05 % 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液制成含孢子数 50 ~ 100 CFU/ml 的孢子悬液。

1.2.2 供试品溶液的制备 取 10 g 复方地萘酚软膏,加入含融化的无菌司盘 80 5 g、单硬脂酸甘油酯 3g、聚山梨酯 80 10 g 混合物的烧杯中,用无菌玻璃棒搅拌均匀后,慢慢加入 45℃ 左右的 0.9% 无菌氯化钠溶液约 80ml,充分乳化,以 500 转/min 速度离心 3 min (离心半径 15.8cm),取上层乳白液作为 1:10 供试液。用于细菌检查。

1.2.3 菌落计数方法的验证(常规法) ①试验组:取供试液 1 ml,分别注入 10 个平皿中,再依次加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种菌的菌悬液 1 ml (50 ~ 100 CFU/ml),每种菌平行制备 2 个平皿,立即倾注营养琼脂培养基和玫瑰红钠琼脂培养基,分别置 30 ~ 35℃ 培养 3d 和 23 ~ 28℃ 培养 5 d。②菌液组:分别取上述制备好的菌液 1 ml 注入平皿内,每种菌平行制备 2 个平皿,测定所加的试验菌数。③供试品对照组:取 1:10 的供试液 1 ml 分别注入 4 个平皿,立即倾注营养琼脂培养基和玫瑰红钠琼脂培养基,分别置 30 ~ 35℃ 培养 3 d 和 23 ~ 28℃ 培养 5 d。测定供试品本底菌数。④稀释剂对照组:取 PH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液替代供试品即可。

1.2.4 培养基稀释法^[6] ①试验组:取 1:10 的供试液 1 ml 分别注入 5 个平皿内,每皿 0.2 ml,将含 50 ~ 100 CFU 的大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的菌悬液 1 ml,分别注入上述平皿中,平行制备 2 组数据,立刻倾注 15 ~ 20 ml 营养琼脂培养基,培养并计数。②菌液组:分别取大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的菌悬液 1 ml 注入 2 个平皿,立刻倾注 15 ~ 20 ml 营养琼脂培养基,培养并计数。③供试品对照组:取 1 ml 供试液分别注入 5 个平皿内,每皿 0.2 ml,平行制备 2 组,立刻倾注 15 ~ 20 ml 营养琼脂培养基,培养并计数。上述方法平行实验 3 次。

1.2.5 控制菌检查方法的验证(常规法) 菌液制备方法:取经培养 18 ~ 24 h,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的新鲜肉汤培养物 1 ml,用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释,制成每 1 ml 含菌数为 10 ~ 100 CFU 的菌悬液。

1.2.5.1 铜绿假单胞菌检查方法的验证 ①制备供试液与增菌培养:取供试液 10 ml 分别接至 100 ml 胆盐乳糖培养基 3 瓶中,其中 1 瓶加验证菌株铜绿假单胞菌 1 ml (含菌数为 10 ~ 100 CFU,作为供试品验证组); 1 瓶加阴性菌对照验证菌株大肠埃希菌 1 ml (含菌数为 10 ~ 100 CFU,作为阴性菌对照组), 1 瓶加与供试液等量的稀释液作为阴性对照,将 3 瓶置 30 ~ 35℃ 培养 18 ~ 24 h,必要时可延至 48 h。②取上述培养物,划线接种于溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基的平板上,培养 18 ~ 24 h。铜绿假单胞菌典型菌落呈扁平、无定形、周边扩散、表面湿润,灰白色,周围时有蓝绿色素扩散。如平板上无菌落生长或生长的菌落与上述菌落特征不符,判供试品未检出铜绿假单胞菌。

1.2.5.2 金黄色葡萄球菌检查方法的验证 ①制备供试液与增菌培养 取供试液 10 ml 分别接至 100 ml 亚碲酸钠肉汤培养基 3 瓶中,其中 1 瓶加验证菌株金黄色葡萄球菌 1 ml (含菌数为 10 ~ 100 CFU,作为供试品验证组); 1 瓶加阴性菌对照验证菌株大肠埃希菌 1 ml (含菌数为 10 ~ 100 CFU,作为阴性菌对照组), 1 瓶加与供试液等量的稀释液作为阴性对照,将 3 瓶置 30 ~ 35℃ 培养 18 ~ 24 h,必要时可延至 48 h。②取上述培养物,划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上,培养 24 ~ 72 h。若平板上呈典型菌落金黄色,圆形凸起,边缘整齐,外围有黄色环,菌落直径 0.7 ~ 1 mm,为金黄色葡萄球菌。若平板上无菌落生长或生长的菌落不同于典型菌落特征,判供试品未检出金黄色葡萄球菌。

2 结果

2.1 常规法的验证结果 复方地萘酚软膏用平皿菌落计数法,三次独立的平行试验中大肠埃希菌,金黄色葡萄球菌,白色念珠菌和黑曲霉的回收率均达到了 70%,说明该方法用于大肠埃希菌,金黄色葡萄球菌,白色念珠菌和黑曲霉计数结果是准确的;但枯草芽孢杆菌平均回收率约为 16.4%,见表 1。

2.2 培养基稀释法的验证结果 复方地萘酚软膏用培养基稀释法进行枯草芽孢杆菌的回收率测定,枯草芽孢杆菌的回收率达到了 70%,说明用该方法测定复方地萘酚软膏的细菌数是有效的。

表 1 复方地蒎酚软膏细菌、霉菌和酵母菌回收率的测定(常规法)

菌种类型	试验次数	试验组 (CFU)	菌液组 (CFU)	供试品对照组 (CFU)	稀释剂对照组 (CFU)	回收率(%) 试验组/菌液组
大肠埃希菌	1	71	79	0	0	89.9
	2	54	63	0	0	85.7
	3	65	72	0	0	90.3
金黄色葡萄球菌	1	69	72	0	0	95.8
	2	65	81	0	0	80.1
	3	63	76	0	0	82.9
枯草芽孢杆菌	1	13	81	0	0	16.0
	2	10	61	0	0	16.4
	3	11	65	0	0	16.9
白色念珠菌	1	61	70	0	0	87.1
	2	79	83	0	0	95.2
	3	66	75	0	0	88.0
黑曲霉	1	55	61	0	0	91.2
	2	62	72	0	0	86.1
	3	58	67	0	0	86.6

2.3 控制菌检查方法的验证结果 铜绿假单胞菌之供试品验证组有菌生长;阴性菌对照组无菌生长;培养时间为 24 h,温度为 30~35℃。金黄色葡萄球菌之供试品验证组有菌生长;阴性菌对照组无菌生长;培养时间为 72 h,温度为 30~35℃。

2.4 控制菌验证结果分析 3 批供试品每次验证在供试品试验组、阴性对照组验证结果之间均无差异,所有结果一致,该法可检出供试品中的控制菌。证明常规法用于控制菌检查,方法准确、可行。

3 讨 论

中药制剂的微生物限度检查通常按常规的药品卫生检验方法进行细菌和霉菌计数。由于中成药是含有多种成分的复合制剂,其中任何成分具有抑菌作用均可影响微生物限度检查的准确性^[7]。经验证试验,复方地蒎酚软膏的细菌数测定宜采用培养基稀释法检测,霉菌及酵母菌数测定宜用常规法检测,控制菌检查宜常规法检测。

复方地蒎酚软膏为非水溶性供试品,为了得到符合检验要求的供试液,添加稀释剂和乳化剂,为了排除此类物品对微生物的检出的影响,还应建立稀释剂对照组,以确定加入的稀释剂对微生物的生存是否有影响,是否会影响供试品的检查。

在验证过程中,发现用常规法进行霉菌和酵母

菌计数是准确可靠的,但是对枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用,说明本品含有抑制枯草芽孢杆菌的成分,因此不能采用常规法进行细菌计数,要采用培养基稀释法对这种试验菌进一步验证。结果发现用培养基稀释法,枯草芽孢杆菌的回收率高于 70%,结果符合标准,因此可用培养基稀释法测定细菌数量,结果准确可靠,符合有关规定要求^[8]。

【参考文献】

[1] 赵 辨.临床皮肤病学[M].3 版.南京:江苏科学技术出版社,2001:759.

[2] 田洪青,杨宝琦,杜东红,等.地蒎酚蜡棒治疗寻常型银屑病[J].中国学术期刊文摘,2006,12(7):216.

[3] 杨宗学,陈 丽.复方地蒎酚软膏的质量控制[J].解放军药学报,2010,26(3):230.

[4] 杨宗学,陈 丽,韦颖梅,等.复方地蒎酚软膏的皮肤安全性评价[J].解放军药学报,2011,27(2):156-157.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录 107.

[6] 中国人民解放军总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范[S].北京:人民军医出版社,2002:附录 74.

[7] 卓小萍,洪美华.14 种中成药微生物限度检查方法验证[J].中国药师,2008,11(12):1473-1475.

[8] 陶 韬,潘明阳.浅谈医院制剂的现状与发展趋势[J].东南国防医药,2009,11(2):181-183.

(收稿日期:2011-04-04;修回日期:2011-05-31)
(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)