

• 临床经验 •

3 种医院外用口腔膜剂的微生物限度检查方法研究

张心悦, 武海萍, 朱逍遥, 侯晶晶, 卜莹

【摘要】 目的 建立复方维 A 酸膜、复方硫酸庆大霉素膜和甲硝唑膜 3 种医院外用口腔膜剂微生物限度检查方法。方法 按《中国药典》2010 年版二部微生物限度检查法进行验证。**结果** 复方维 A 酸膜细菌、霉菌及酵母菌计数和验证菌检查均采用常规法; 复方硫酸庆大霉素膜和甲硝唑膜的细菌、霉菌及酵母菌计数检查及验证菌检查均采用薄膜过滤法。**结论** 确立的 3 种医院外用口腔膜剂微生物限度检查方法, 可有效控制其质量。

【关键词】 微生物限度; 口腔膜剂; 医院制剂; 方法验证

【中图分类号】 R927.11 **【文献标志码】** B doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.04.029

复方维 A 酸膜、复方硫酸庆大霉素膜和甲硝唑膜是《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002) 版^[1] 载的医院常用外用口腔制剂。其中, 复方维 A 酸膜无抑菌性, 有促进表皮细胞增生分化作用, 用于口腔白斑及扁平苔藓等治疗^[2]; 复方硫酸庆大霉素膜有抑菌性, 能够消炎、止痛, 促进黏膜创面, 多用于口腔溃疡治疗; 甲硝唑膜是抗厌氧菌药膜, 用于治疗厌氧菌感染引起的牙周炎等口腔炎症^[3]。经过文献查新, 目前尚未见这 3 种制剂微生物限度检查方法的报道, 为有效控制医院制剂质量, 本文按《中国药典》2010 年版二部^[4] 规定进行微生物限度方法学验证, 并建立了这 3 种医院外用口腔膜剂的微生物限度检查方法。

1 试药与仪器

1.1 供试品 复方维 A 酸膜(第四军医大学提供, 批号:130801、130811、130820); 复方硫酸庆大霉素膜(第四军医大学提供, 批号:130814、130819、130803); 甲硝唑膜(第四军医大学提供, 批号:20131016、20130824、20131102)。

1.2 仪器设备 JY10001 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); HP 型电热恒温培养箱(沈阳利港净化设备有限公司); SP-150A 生化培养箱(南京恒裕仪器设备制造有限公司); SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司); SX-500 高压蒸汽灭菌器(日本 Tomy Digital Biology 公司); HH2 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); HTY-300

微生物过滤支架、一次性无菌过滤器(杭州泰林生物技术有限公司)等。

1.3 验证菌株 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]; 白色念珠菌[CMCC(F)98001]; 枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]; 黑曲霉菌[CMCC(F)98003]; 大肠埃希菌[CMCC(B)44102]; 铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104], 均由中国食品药品检定研究院提供, 传代次数均不超过 5 代。

1.4 培养基和稀释剂 营养琼脂培养基(批号:121226); 玫瑰红钠琼脂培养基(批号:130105); 改良马丁琼脂培养基(批号:121123); 改良马丁培养基(批号:130118); 营养肉汤培养基(批号:121213); 胆盐乳糖培养基(批号:130106); 甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:121030); 溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号:1109282); pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:130426), 均由北京三药科技开发公司生产。

2 验证方法

2.1 菌液制备 取 35 ℃ 培养 24 h 的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌与枯草芽孢杆菌的肉汤培养物 1 mL, 加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液中, 稀释制成含菌数为 50 ~ 100 cfu/mL 的菌悬液。取 25 ℃ 培养 48 h 的白色念珠菌液体培养物 1 mL, 加入 9 mL 0.9% 氯化钠溶液中, 稀释制成含酵母菌数为 50 ~ 100 cfu/mL 的菌悬液。取 25 ℃ 培养 1 周的黑曲霉真菌斜面培养物, 用 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液将孢子洗脱, 并稀释制成为 50 ~ 100 cfu/mL 的孢子液。

2.2 供试液制备 取供试品各 100 cm², 加 45 ℃ pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 浸泡、

基金项目: 全军医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目(13ZJZ21)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区联勤部药品仪器检验所

通讯作者: 卜莹, E-mail: buyouyou@126.com

振摇,使充分分散均匀,作为 1:10 供试液。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌计数验证^[5]

2.3.1 试验组 常规法:复方维 A 酸膜,无抑菌性可采用常规法。取 1 mL 1:10 供试液和 1 mL 含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌液注入一个平皿中,培养基浇碟、培养。每个试验菌株制备 2 个平皿,培养完毕后计菌落数,取平均值。薄膜过滤法:复方硫酸庆大霉素膜^[6],取 10 mL 1:10 供试液薄膜过滤,冲洗液选择 0.1% 无菌蛋白胨水溶液 300 mL、600 mL 和 1000 mL 三个梯度冲洗,在最后一次冲洗液中加入 1 mL 含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌液,摇匀过滤,取膜贴于琼脂培养基,培养,计数。甲硝唑膜^[7],取 10 mL 1:10 供试液薄膜过滤,冲洗液选择 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液 100 mL、300 mL 和 500 mL 三个梯度冲洗,在最后一次冲洗液中加入 1 mL 含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌液,摇匀过滤,取膜贴于琼脂培养基,培养,计数。

2.3.2 菌液组 取与试验组中相同稀释浓度的各菌株悬液 1 mL,测定其菌落数。每个菌株平行制备 2 个平皿,计算平均菌落数。

2.3.3 供试液对照组 取与试验组同一供试品溶液,按 2.3.1 方法,不加菌液,测定供试液本底菌落数。

2.3.4 稀释剂对照组 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液,按 2.3.1 方法测定菌落数。

2.3.5 计算公式 试验组菌落数回收率(%)=(试验组平均菌落数-供试液对照组平均菌落数)/

菌液组平均菌落数×100%,稀释剂对照组菌数回收率(%)=稀释剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数×100%

2.4 验证菌检查法

2.4.1 试验组 常规法 复方维 A 酸膜,取 10 mL 1:10 供试液和 1 mL 含菌数为 50~100 cfu/mL 的菌液加至 100 mL 培养基中培养。薄膜过滤法:复方庆大霉素膜和维 A 酸膜博膜过滤冲洗方法同 2.3.1。

2.4.2 阴性对照组 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液,按 2.4.1 方法操作。

3 结果

3.1 细菌、霉菌及酵母菌计数 分别测定 3 种供试品的回收率,进行 3 次平行试验,稀释剂对照组回收率均高于 70%。由表 1 可知,复方维 A 酸膜无抑菌作用,可采用常规法检查;复方硫酸庆大霉素膜对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌有较强的抑制作用,采用薄膜过滤法,0.1% 无菌蛋白胨缓冲液冲洗(1000 mL/膜)各验证菌回收率能达到 70% 以上;甲硝唑膜为抗厌氧菌制剂,采用薄膜过滤法,pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗(500 mL/膜),各验证菌回收率能达到 70% 以上。

3.2 验证菌检查 由表 2 可知,复方维 A 酸膜可采用常规法检查验证菌,复方庆大霉素膜和甲硝唑膜由于抑菌的作用较强,只能采用薄膜过滤法检查,冲洗液与冲洗量与细菌、霉菌及酵母菌计数相同。

表 1 细菌、霉菌及酵母菌的验证回收率(%,n=3)

样品	验证方法	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	白色念珠菌	黑曲霉
复方维 A 酸膜	常规法	92.0	91.7	94.1	86.9	94.8
复方庆大霉素膜	薄膜过滤法(300 mL/膜)	0	0	75.3	17.9	70.9
	薄膜过滤法(600 mL/膜)	0	0	85.7	47.8	79.9
	薄膜过滤法(1000 mL/膜)	76.6	86.6	96.2	88.5	84.0
甲硝唑膜	薄膜过滤法(100 mL/膜)	0	0	0	37.8	50.2
	薄膜过滤法(300 mL/膜)	44.5	60.7	66.2	67.9	79.5
	薄膜过滤法(500 mL/膜)	93.0	95.4	93.7	93.9	88.2

表 2 验证菌检查方法的验证结果

样品	验证方法	金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌	
		试验组	对照组	试验组	对照组
复方维 A 酸膜	常规法	+	-	+	-
复方庆大霉素膜	薄膜过滤法(300 mL/膜)	-	-	-	-
	薄膜过滤法(600 mL/膜)	-	-	-	-
	薄膜过滤法(1000 mL/膜)	+	-	+	-
甲硝唑膜	薄膜过滤法(100 mL/膜)	-	-	-	-
	薄膜过滤法(300 mL/膜)	-	-	-	-
	薄膜过滤法(500 mL/膜)	+	-	+	-

注:“+”表示验证菌株能正常生长,“-”表示验证菌株未检出

4 讨 论

膜剂是药物与适宜的成膜材料经加工制成的膜状制剂^[8]。复方维 A 酸膜、复方庆大霉素膜和甲硝唑膜所使用的成膜材料均为聚乙烯醇 17-88,都是水溶性膜^[9],可直接用 45 ℃ pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液溶解。

甲硝唑膜对厌氧菌有较强的抑菌作用,采用梯度设置冲洗液冲洗量,当冲洗剂的冲洗量达到 500 mL/膜时,验证菌株的回收率能达到 70%。复方庆大霉素膜使用薄膜过滤冲洗时,pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液的冲洗量达到 1000 mL/膜仍无法消除其抑菌性,改用 0.1% 蛋白胨缓冲液,冲洗量达到 1000 mL/膜后,验证菌株的回收率能达到 70%。

【参考文献】

[1] 人民军医出版社. 中国人民解放军医疗机构制剂规范(2002 年

版)[M]. 北京:人民军医出版社,2003;2.

- [2] 钟 燕,孙永瀛. 维 A 酸联合塞来昔布治疗口腔白斑的临床研究[J]. 中国临床研究,2015,28(2):230-232.
- [3] 杨再永. 我军陆军口腔健康和卫生勤务保障现状及对策[J]. 东南国防医药,2013,15(6):612-614.
- [4] 中国医药科技出版社. 中华人民共和国药典(2010 年版)二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010;1.
- [5] 杨宗学,陈 丽,姚 青,等. 复方地恩酚软膏的微生物方法验证[J]. 东南国防医药,2011,13(4):302-304.
- [6] 刘 英,王立萍. 庆大霉素组分和有关物质对效价的影响[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(2):127-131.
- [7] 余晓霞,邱凯锋,刘春霞. 新唑漱口水微生物限度检查方法的验证[J]. 海峡药学,2014,26(10):51-53.
- [8] 邱小玲,林 绥,阙慧卿. 涂膜剂的研究概述[J]. 海峡药学,2009,21(8):16-18.
- [9] 郑健鸿,林燕月. 治疗溃疡膜材料和载药膜材料的检测指标[J]. 中国组织工程研究,2013,17(3):536-543.

(收稿日期:2015-04-03;修回日期:2015-04-29)

(本文编辑:张仲书)

(上接第 426 页)

- [2] 匡昆仑. 系统规范的糖尿病教育对 2 型糖尿病患者控制目标的影响[J]. 中国医学工程,2012,20(1):142-143.
- [3] Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)[J]. Diabetes Care, 2012, 35(10):1364-1379.
- [4] Bennett WL, Odelola OA, Wilson LM, et al. Evaluation of guideline recommendations on oral medications for type 2 diabetes mellitus: a systematic review[J]. Ann Intern Med, 2012, 156(1):27-36.
- [5] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2012[J]. Diabetes Care, 2012, 35(Suppl 1):11-63.
- [6] 高 揆,杨秋萍. 2 型糖尿病血糖控制目标的变迁[J]. 实用糖尿病杂志,2014,10(4):62-64.
- [7] Aschmet PJ, Ruiz AJ. Metabolic memory for vascular disease in diabetes[J]. Diabetes Technol Ther, 2012, 14(Suppl 1):68-74.
- [8] Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2012, 82(9):1010-1017.
- [9] Hemmingsen B, Lund SS, Gluud C, et al. Targeting intensive glycaemic control versus targeting conventional glycaemic control for type 2 diabetes mellitus[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 10(11):11-18.

- [10] Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)[J]. Diabetes Care, 2012, 35(6):1364-1379.
- [11] Zeitler P, Hirst K, Pyle L, et al. A clinical trial to maintain glycaemic control in youth with type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2012, 366(22):2247-2256.
- [12] 王增义,崔晓红. 老年 2 型糖尿病患者综合血糖控制目标管理进展[J]. 中国临床医生,2013,41(9):15-16.
- [13] 张晓梅,纪立农. 2 型糖尿病患者个体化血糖控制目标和药物治疗[J]. 中国糖尿病杂志,2014,2(10):870-878.
- [14] 陈潇潇,王良友,王 旭,等. 台州市社区 2 型糖尿病患者血糖控制的影响因素分析[J]. 中国慢性病预防与控制,2013,21(6):713-716.
- [15] 程千鹏,张星光,吕肖锋. 血糖控制达标的 2 型糖尿病患者血糖波动特征及其控制目标探讨[J]. 解放军医药杂志,2013,25(11):24-27.
- [16] 吴前胜,徐 蓉,汪 晖. 合作式目标设定在 2 型糖尿病自我管理教育中的实施策略[J]. 护理研究:下旬版,2014,28(1):279-281.
- [17] 王佳薇,李 冰,郑玲玉. 2 型糖尿病 158 例临床路径护理分析[J]. 东南国防医药,2012,14(2):168-169.

(收稿日期:2015-02-05;修回日期:2015-04-12)

(本文编辑:齐 名)