

论 著
(药学研究)

10%水杨酸软膏微生物限度检查方法的适用性试验

沈秋莲, 叶财发, 倪晓霞, 陈锦珊

【摘要】 目的 建立医院制剂 10%水杨酸软膏的微生物限度检查方法。**方法** 根据《中国药典》2015 年版四部通则 1105、1106 及 1107 检测规则,对 10%水杨酸软膏微生物限度检查的稀释剂种类、稀释级及 pH 值等进行考察,并对需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数及控制菌检查方法进行适用性验证。**结果** 以 0.9%氯化钠注射液作为供试液稀释剂时,1:10~1:100 稀释级供试液 pH 值在 2.30~2.81 之间,采用常规法、培养基稀释法时 5 种试验菌种的回收率均低于 0.5,且该制剂有抑菌作用,表明选用的稀释剂及方法不适用。以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为供试液稀释剂时,1:10~1:100 稀释级供试液 pH 在 5.53~6.88 之间,采用常规法时 5 种试验菌种的回收率均在 0.5~2.0 范围内,且该制剂无抑菌作用,表明选用的稀释剂及方法适用。**结论** 10%水杨酸软膏微生物限度检查宜选用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液作为供试液的稀释剂,检查方法为常规法。

【关键词】 水杨酸软膏;微生物限度检查;常规法;培养基稀释法;适用性试验

【中图分类号】 R927 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)02-0159-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.02.011

The validation of microbial limit test for 10% salicylic acid ointment

SHEN Qiu-lian, YE Cai-fa, NI Xiao-xia, CHEN Jin-shan

(Department of Pharmacy, the 909th Hospital of the Joint Logistics Support Force of PLA/the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian, China)

【Abstract】 Objective To establish a microbial limit test method for 10% salicylic acid ointment which is hospital preparation.

Methods The test was carried out according to the requirements of provision 1105, 1106 and 1107 of rules of preparation in volume IV of Chinese Pharmacopoeia of 2015 edition. The dilution type, dilution grade and pH of microbial limit test for 10% salicylic acid ointment were investigated, and the total number of aerobic bacteria, molds and yeasts and the control bacteria inspecting methods were validated for applicability. **Results** When 0.9% Sodium Chloride Injection was used as the diluent of the test solution, the pH of the test solutions at 1:10~1:100 dilution level were between 2.30~2.81. And the recovery ration of five test bacteria was ranged under 0.5 using the routine method and culture medium dilution method. Moreover, the preparation had antimicrobial activities. These results showed that the selected diluent and method were not suitable for this preparation. When pH7.0 sodium chloride-peptone buffer was used as the diluent of the test solution, the pH of the test solutions at 1:10~1:100 dilution level were between 5.53~6.88. And the recovery ration of five test bacteria was ranged from 0.5 to 2.0 using the routine method. Moreover, the preparation had no antimicrobial activities. These results showed that the diluent and method were suitable for this preparation. **Conclusion** The microbial limit test of 10% salicylic acid ointment should choose pH7.0 sodium chloride-peptone buffer as the diluent of the test solution and the inspection method should use routine method.

【Key words】 salicylic acid ointment; microbial limit test; routine method; culture medium dilution method; validation

作者单位:363000 漳州,解放军联勤保障部队第九〇九医院(厦门大学附属东南医院)药剂科(沈秋莲、叶财发、倪晓霞、陈锦珊)

通信作者:陈锦珊, E-mail: cjs18659341758@163.com

0 引 言

10%水杨酸软膏为《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(以下简称《军队制剂规范》)2015 年版(第

一册) 载的标准制剂^[1], 临床用于治疗皮脂溢出、脂溢性皮炎、银屑病、浅部真菌病、趾疣、鸡眼及局部角质增生。《中国药典》2015 年版仅收载 2%、5% 水杨酸软膏,《军队制剂规范》虽然收载有 10% 水杨酸软膏,但未明确其微生物限度检查的具体方法,经文献查新亦未见相关报道。鉴于 10% 水杨酸软膏配制过程中容易引入微生物等污染源,因此加强质量控制至关重要。为此,笔者以《中国药典》2015 年版四部通则 1105、1106 及 1107 检测规则为依据,通过考察供试液的稀释剂、稀释级及 pH 等因素,同时对 10% 水杨酸软膏进行处理以消除其抗菌性^[2-3],最终建立微生物限度检查方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 HH-W21-420 电热恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂)、KQ-500B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)、LDZH-150KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)、LRHS-400-III 恒温恒湿培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)、HWS-400 型恒温恒湿培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、电子天平(上海浦春计量仪器有限公司)、78-1 磁力加热搅拌器(金坛市科析仪器有限公司)、PHS-3C 酸度计(杭州雷磁有限公司)。

1.1.2 试药 水杨酸软膏(批号:201903211、201903212、201903213,规格 20 g:2 g,联勤保障部队第 909 医院自制)。

1.1.3 稀释液与试剂 0.9% 氯化钠注射液(批号:20191113,联勤保障部队第 909 医院自制),pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:1071461,广东环凯微生物科技有限公司),肉豆蔻酸异丙酯(批号:201908071,成都艾科达化学试剂有限公司)、二甲基亚砜(批号:180728,浙江杭州双林化工试剂厂),均为分析纯。

1.1.4 培养基 胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:1082461)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:1081801)、胰酪大豆胨液体培养基(批号:1082451)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号:3106032)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:1082132)、溴代十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号:1073801),以上均来源于广东环凯微生物科技

有限公司。

1.1.5 菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26 003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10 104]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63 501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98 001] 及黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98 003] (以上均来源于中国食品药品检定研究院,且均为 3 代)。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备 取经 30~35 °C 培养 18~24 h 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌胰酪大豆胨液体培养基各 1 mL 和经 20~25 °C 培养 2~3 d 的白色念珠菌沙氏葡萄糖液体培养基 1 mL,分别用两种稀释剂(0.9% 氯化钠注射液和无菌的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液)制成每 1 mL 含菌数不大于 100 cfu 的菌悬液^[3-6]。

取经 20~25 °C 培养 5~7 d 的黑曲霉沙氏葡萄糖琼脂斜面培养物,分别加入 3~5 mL 含 0.05% (mL/mL) 聚山梨酯 80 的两种稀释剂。将孢子洗脱,再用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,分别用含 0.05% (mL/mL) 聚山梨酯 80 的两种稀释剂制成每 1 mL 含菌数不大于 100 cfu 的菌悬液^[3-6]。

1.2.2 供试液制备 称取供试品 20 g,加至含 20 mL 肉豆蔻酸异丙酯、20 mL 二甲基亚砜和玻璃珠的无菌三角烧瓶中,再分别加入 0.9% 氯化钠注射液和无菌的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 200 mL,振摇,45 °C 水浴超声 30 min 充分混匀后静置,取水层作为 1:10 供试液。从 1:10 供试液中取 50 mL、20 mL、10 mL,分别加入 0.9% 氯化钠注射液和无菌的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,充分混匀,作为 1:20、1:50、1:100 供试液。

1.2.3 微生物计数方法适用性试验 (1) 以 0.9% 氯化钠注射液为稀释剂,采用常规法^[7-8] 进行微生物计数适用性试验:① 试验组:取制备好的供试液 9.9 mL,加入试验菌菌液 0.1 mL,混匀,使每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 cfu,取含菌量不大于 100 cfu 的供试液 1 mL,注入平皿中,立即倾注培养基(需氧菌总数测定用胰酪大豆胨琼脂培养基,

霉菌和酵母菌总数测定用沙氏葡萄糖琼脂培养基),置规定温度培养 3~5 d,每个菌株平行制备 2 个平皿,点计菌落数。②菌液组:用稀释剂代替供试液,按“试验组”的操作加入试验菌液,点计菌落数。③供试品对照组:吸取上述制备好的供试液 1 mL,用稀释剂代替菌液,其余操作同“试验组”,测定供试品的本底菌数。④阴性对照组:用稀释剂代替供试液和菌液,其余操作同“试验组”,以测定稀释剂的本底菌数。(2)以 0.9%氯化钠注射液为稀释剂,采用培养基稀释法^[9-10]进行微生物计数适用性试验:试验组:取制备好的供试液 9.9 mL,加入试验菌液 0.1 mL,混匀,使每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 cfu,取含菌量不大于 100 cfu 的供试液 0.2 mL,注入平皿中,立即倾注胰酪大豆胨琼脂培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基,置规定温度培养 3~5 d,每个菌株平行制备 10 个平皿,点计菌落数。供试品对照组、菌液组及阴性对照组同“常规法”操作,测定菌落数,计算回收率。(3)以 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂,采用常规法进行微生物计数适用性试验:用 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替 0.9%氯化钠注射液,试验组、供试品对照组、菌液组及阴性对照组同“常规法”操作。

1.2.4 肉豆蔻酸异丙酯和二甲基亚砜的抗菌性考察 按“1.2.2”项下要求制备供试液,分别在含有 80 mL0.9%氯化钠注射液和 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液的无菌三角烧瓶中加入 10 mL10%肉豆蔻酸异丙酯和 10 mL10%二甲基亚砜,振摇混匀,即得 1:10供试液。用上述供试液,采用常规法进行微生物计数方法试验,以 5 种常用菌作为试验菌用常规法考察肉豆蔻酸异丙酯和二甲基亚砜对抗菌活性的影响。

1.2.5 控制菌方法适用性试验 分别取“1.2.2”项下制备好的 1:10 供试液 10 mL 和“1.2.1”项下制备好的金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌菌悬液 1 mL(含菌量≤100 cfu),按《中国药典》2015 年版四部金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌检查项下进行试验。

2 结 果

2.1 供试液酸碱度测定结果 以 0.9%氯化钠注

射液为稀释剂时,1:10~1:100 各稀释级供试液 pH 值在 2.30~2.81 之间。以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂时,1:10~1:100 各稀释级供试液 pH 值在 5.53~6.88 之间。见表 1。

表 1 两种稀释剂下各稀释级供试液的 pH 值

稀释剂	稀释级			
	1:10	1:20	1:50	1:100
0.9%氯化钠注射液	2.30	2.50	2.70	2.81
pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液	5.53	6.35	6.51	6.88

2.2 微生物计数方法适用性试验结果 以 0.9%氯化钠注射液为稀释剂时,分别取 1:10~1:100 供试液,采用常规法和培养基稀释法对水杨酸软膏进行微生物计数方法试验显示,5 种试验菌种的回收率均低于 0.5,不符合《中国药典》2015 年版四部通则要求,见表 2、表 3。pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂常规法试验显示,5 种试验菌种的回收率均在 0.5~2.0 范围内,符合《中国药典》2015 年版四部通则的要求,见表 4。故以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂,取 1:10 供试液 1 mL,采用常规法可作为水杨酸软膏的微生物计数方法。

表 2 0.9%氯化钠注射液为稀释剂常规法试验回收率(n=3)

菌株类型	稀释级			
	1:10	1:20	1:50	1:100
需氧菌总数				
金黄色葡萄球菌	—	—	—	0.16
铜绿假单胞菌	—	—	—	0.08
枯草芽孢杆菌	—	—	—	0.05
白色念珠菌	—	0.03	0.11	0.17
黑曲霉	—	0.03	0.09	0.21
霉菌和酵母菌总数				
白色念珠菌	—	0.03	0.15	0.22
黑曲霉	—	0.05	0.13	0.25

“—”表示试验组、供试品对照组及阴性对照组无菌落生长,菌液组有典型菌落生长

2.3 肉豆蔻酸异丙酯和二甲基亚砜的抗菌性考察结果 5 种试验菌种的回收率均在 0.5~2.0 范围内,符合《中国药典》2015 年版四部通则的要求。故可以用 10%肉豆蔻酸异丙酯和 10%二甲基亚砜作为增溶剂。见表 5。

表 3 0.9%氯化钠注射液为稀释剂培养基稀释法试验回收率($n=3$)

菌株类型	稀释级			
	1 : 10	1 : 20	1 : 50	1 : 100
需氧菌总数				
金黄色葡萄球菌	-	-	0.12	0.26
铜绿假单胞菌	-	-	0.09	0.13
枯草芽孢杆菌	-	-	-	0.16
白色念珠菌	-	0.09	0.16	0.21
黑曲霉	-	0.07	0.25	0.39
霉菌和酵母菌总数				
白色念珠菌	-	0.07	0.35	0.51
黑曲霉	-	0.05	0.12	0.37

“-”表示试验组、供试品对照组及阴性对照组无菌落生长,菌液组有典型菌落生长

表 4 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂常规法试验结果(1 : 10 供试液, $n=3$)

菌株类型	菌落数(cfu)				回收率
	试验组	菌液组	供试品 对照组	阴性 对照组	
需氧菌总数					
金黄色葡萄球菌	105	112	0	0	0.94
铜绿假单胞菌	92	101	0	0	0.91
枯草芽孢杆菌	86	90	0	0	0.95
白色念珠菌	88	92	0	0	0.96
黑曲霉	110	119	0	0	0.92
霉菌和酵母菌总数					
白色念珠菌	85	95	0	0	0.89
黑曲霉	106	115	0	0	0.92

表 5 肉豆蔻酸异丙酯和二甲基亚砜在两种稀释剂下的试验回收率($n=3$)

菌株类型	稀释剂	
	0.9%氯化钠注射液	pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液
需氧菌总数		
金黄色葡萄球菌	0.89	0.91
铜绿假单胞菌	0.90	0.95
枯草芽孢杆菌	0.93	0.90
白色念珠菌	0.95	0.89
黑曲霉	0.92	0.96
霉菌和酵母菌总数		
白色念珠菌	0.89	0.92
黑曲霉	0.95	0.88

2.4 控制菌方法适用性试验结果 以 0.9%氯化钠

注射液为稀释剂时,试验组、供试品对照组及阴性对照组无菌落生长,菌液组有典型菌落生长,表明供试液对控制菌生长有抑制作用。以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂时,试验组、菌液组有典型菌落生长,供试品对照组及阴性对照组无菌落生长,表明供试液对控制菌生长无抑制作用。因此,根据《中国药典》2015 年版四部通则 1106 控制菌检查要求,宜选用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂,并采用常规法用于控制菌检查。见表 6。

表 6 控制菌验证结果($n=3$)

稀释剂	菌种	试验组	菌液组	供试品对照组	阴性对照组
0.9%氯化钠注射液	金黄色葡萄球菌	-	+	-	-
	铜绿假单胞菌	-	+	-	-
pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液	金黄色葡萄球菌	+	+	-	-
	铜绿假单胞菌	+	+	-	-

“-”表示无菌落生长;“+”表示有典型菌落生长

3 讨 论

3.1 开展本试验研究的必要性 现行的《中国药典》和《军队制剂规范》均无 10%水杨酸软膏微生物限度检查方法,亦未见相关研究报道,因此进行试验研究及方法学验证对保证其质量具有重要意义。

3.2 供试液制备增溶剂的选择 水杨酸软膏由水杨酸、羊毛脂、黄凡士林等配制而成^[1]。水杨酸是一种脂溶性的有机酸^[11],具有部分酸的通性,在水中的溶解性较差,而黄凡士林的熔点为 45 ~ 60 ℃^[12],具有一定的拉丝性,因此供试液制备时必须遴选适宜的增溶剂。经试验,我们采取加入 10%肉豆蔻酸异丙酯和 10%二甲基亚砜置于 45 ℃水浴超声 30 min,发现其不但没有影响微生物生长繁殖,还明显提高了水杨酸软膏的溶解性。其中,肉豆蔻酸异丙酯具有良好的溶解、润滑、促透作用,还具有一定的自乳化作用,而二甲基亚砜具有强极性、脂水双亲性及其在液态所处温度范围广等特性,是兼容有机物和无机物的万能溶剂,两者对难溶性或脂溶性药物具有增溶作用^[13-14]。

3.3 供试液 pH 值对抗菌活性的影响 pH 值与微生物生长代谢密切相关,不同微生物有不同的适宜 pH 值,可根据需要调节 pH 值以适应不同微生物

生长需求^[15]。对好氧微生物而言, pH 值维持在 5~9 最优。前期我们选用 0.9% 氯化钠注射液为稀释剂时, 制备所得 1:10~1:100 供试液 pH 值在 2.30~2.81 之间, 采用常规法、培养基稀释法 5 种试验菌株的回收率均低于 0.5, 推测强酸环境是导致试验菌株不生长的主要原因。后期我们改用具有 pH 缓冲作用的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂, 制备所得 1:10~1:100 供试液 pH 值在 5.53~6.88 之间, 采用常规法 5 种试验菌株的回收率均在 0.5~2 的标准范围内, 而且很好地去除了水杨酸软膏的抑菌性。

综上所述, 经验证, 以 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂, 采用常规法可作为 10% 水杨酸软膏的微生物限度检查方法。

【参考文献】

- [1] 中央军委后勤保障部卫生局. 中国人民解放军医疗机构制剂规范(2015 年版第一册)[S]. 北京: 人民军医出版社, 2015: 120-121.
- [2] 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.
- [3] 陈 静, 严 佳, 钟桂香, 等. 复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法适用性试验研究[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(4): 357-369.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版) 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 136-151.
- [5] 张心悦, 武海萍, 朱逍遥, 等. 3 种医院外用口腔膜剂的微生物限度检查方法研究[J]. 东南国防医药, 2015, 17(4): 427-429.
- [6] 杨宗学, 陈 丽, 姚 青, 等. 复方地蒎酚软膏的微生物限度检查方法验证[J]. 东南国防医药, 2011, 13(4): 302-304.
- [7] 杨育儒, 沈秋莲, 王庆芬. 六种中药制剂微生物限度检查方法验证[J]. 西部中医药, 2017, 30(11): 59-61.
- [8] 张 荔, 伤科黄药微生物限度检查法的适用性考察分析[J]. 中国继续医学教育, 2019, 11(29): 150-152.
- [9] 何晓军, 郭朝辉, 何小英. 4 种医院制剂的微生物限度检查及适用性研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36(5): 35-38.
- [10] 刘素玲, 李郑林, 贺延新. 熟地强筋丸微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药师, 2013, 16(3): 470-471.
- [11] 彭 柔, 田兰馨, 慈 雪, 等. 超分子水杨酸在皮肤美容中的应用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(14): 2154-2156.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版) 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 557.
- [13] 杨 明, 宋民宪. 中药辅料全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 781-783, 560-562.
- [14] Ocampo PS, Lázár V, Papp B, *et al.* Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4573-4582.
- [15] 雷 宁. pH 值、碱度对化工污水脱氮工艺的影响[J]. 甘肃科技, 2011, 27(1): 27-31.

(收稿日期:2020-05-08; 修回日期:2020-07-22)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)