

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.017

3种医院外用制剂微生物限度检查方法的建立*

邓莉,陈勇川,胡斌,马攀,胡婧[△]

(中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038)

摘要:目的 建立尿素软膏、维生素E乳膏、复方苯甲酸软膏3种医院外用制剂的微生物限度检查方法。方法 根据2015年版《中国药典(四部)》通则1105,1106,1107项下方法进行试验,分别对样品进行5种试验菌回收率试验及控制菌检查方法验证。结果 在适宜的供试品配制条件下,需氧菌总数检查,尿素软膏采用常规法,维生素E乳膏采用培养基稀释法,复方苯甲酸软膏采用中和法和培养基稀释法联用;霉菌及酵母菌总数检查,尿素软膏、维生素E乳膏可采用常规法,复方苯甲酸软膏可采用中和法和培养基稀释法联用;金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌检查,尿素软膏、维生素E乳膏采用常规法,复方苯甲酸软膏采用中和法和培养基稀释法联用。结论 该方法适用于3种医院制剂的微生物限度检查。

关键词:尿素软膏;维生素E乳膏;复方苯甲酸软膏;微生物限度检查;方法适用性试验

中图分类号:R917;R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0068-04

Establishment of Microbial Limit Test Method for 3 Kinds of Hospital External Use Preparations

DENG Li, CHEN Yongchuan, HU Bin, MA Pan, HU Jing

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing, China 400038)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method for Urea Ointment, Vitamin E Cream and Compound Benzoic Acid Ointment. **Methods** The experiment was conducted according to items 1105, 1106 and 1107 of the four general principles of the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia. Five kinds of test bacteria recovery rate tests and control bacteria inspection methods were carried out on the samples respectively. **Results** Under suitable preparation conditions, the total number of aerobic bacteria was checked, and Urea Ointment was checked by conventional method, Vitamin E Cream was diluted by culture medium, Compound Benzoic Acid Ointment was checked by neutralization method and culture medium dilution method. For total number of mold and yeast, Urea Ointment and Vitamin E Cream could be tested by conventional method, Compound Benzoic Acid Ointment could be tested by combination of neutralization method and culture medium dilution method. For examination of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa, Urea Ointment and Vitamin E Cream were examined by routine method, Compound Benzoic Acid Ointment was examined by neutralization method and culture medium dilution method. **Conclusion** This method is suitable to be used in the microbial limit test for the 3 kinds of hospital preparations.

Key words: Urea Ointment; Compound Vitamin E Cream; Compound Benzoic Acid Ointment; microbial limit test; methodology verification

医院制剂主要是针对本院临床需要且需求量小、不适合工厂批量生产的品种,控制其质量是保证临床安全用药的前提。对药品的微生物进行控制是控制药品质量的一项重要检查项目^[1],也是保障制剂安全性的重要组成部分。尿素软膏、维生素E乳膏、复方苯甲酸软膏均为我院院内制剂,疗效确切,临床应用广泛。为控制其质量,保证检测方法的可靠性和准确性,确保其微生物限度达到要求^[2],本研究中参考文献[3-8],按2015年版《中国药典(四部)》通则1105,1106,1107项下要求^[9],通过试验验证,建立了3种外用制剂微生物限度的检查方法。现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific-1381 A2型生物安全柜(美国Thermo公司);TB124S型分析天平(梅特勒托利多仪器

<上海>有限公司,精度为百分之一);LRH-150F型生化培养箱(重庆四达实验仪器公司);MJ-180-II型霉菌培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);LDZF-30KB-II型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 材料

试药:复方苯甲酸软膏(批号为180226,规格为每盒18g),维生素E乳膏(批号为180130,规格为每支50g),尿素软膏(批号为180108,规格为每盒18g),均由陆军军医大学第一附属医院药剂科提供。

培养基:胰酪大豆胨液体培养基(批号为1703022),胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为1706262),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为1702134),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号为170104),溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号为170103),均由北京三药科技开发公司提供。

菌种:铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104],枯草芽孢

*基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题[13ZJZ11-2]。

第一作者:邓莉,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)2217796811@qq.com。

[△]通信作者:胡婧,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物制剂与分析,(电子信箱)18219797@qq.com。

杆菌[CMCC(B)63501],金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003],黑曲霉[CMCC(F)98003],白色念珠菌[CMCC(F)98001],大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 菌液制备

按2015年版《中国药典(四部)》通则1105项下方法制备菌液。

2.1.2 供试液制备

尿素软膏供试液:取尿素软膏10g,加入含无菌十四烷酸异丙酯20mL和无菌玻璃珠的三角瓶中,振摇,混匀,再加入pH7.0的45℃无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL,振摇,混匀,静置,待油水明显分层,取水层,作为1:10的供试液。

维生素E乳膏供试液^[10]:取维生素E乳膏10g,加入pH7.0的45℃无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL,振摇,混匀,作为1:10的供试液。取20mL1:10的供试液,加入pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL,摇匀,制成1:50的供试液。

复方苯甲酸软膏供试液:方法一,取复方苯甲酸软膏10g,加入含20mL无菌十四烷酸异丙酯和无菌玻璃珠的三角瓶中,振摇,混匀,加入pH7.0的45℃无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL,振摇,混匀,静置,待油水分层,取水层,作为1:10的供试液;取1:10的供试液10mL,加入pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL,摇匀,制成1:100的供试液。方法二,取复方苯甲酸软膏10g,加入含无菌十四烷酸异丙酯20mL和无菌玻璃珠的三角瓶中,充分振摇,混匀,加入11mL的1mol/L无菌氢氧化钠溶液,再加45℃的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液89mL,振摇,混匀,静置,待油水分层明显,取水层,作为1:10的供试液;进一步稀释为1:100的供试液。

2.2 需氧菌、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

试验组^[11-12]:取2.1.2项下尿素软膏1:10供试液、维生素E乳膏1:10供试液和1:50供试液各9.9mL,2.1.2项下复方苯甲酸软膏方法一中1:100供试液和方法二中1:100供试液9.9mL,各5份,每份

分别加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉菌悬液各0.1mL,使供试液每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,吸取各染菌供试液1mL,注入平皿,每份平行制备2个平皿,倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,置35℃培养3d,测定需氧菌总数。取2.1.2项下尿素软膏、维生素E乳膏1:10供试液9.9mL,复方苯甲酸软膏方法一中1:100供试液和方法二中1:100供试液9.9mL,各2份,分别加入白色念珠菌和黑曲霉菌悬液各0.1mL,使供试液每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,吸取各染菌供试液1mL注入平皿,平行制备2个平皿,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,置25℃培养5d,测定霉菌及酵母菌总数。

菌液对照组:用稀释液代替供试液,同试验组操作。

供试品组:用稀释液代替菌液,同试验组操作。

稀释剂组:用稀释液代替供试液、菌液,同试验组操作。

回收率:试验组菌比值=(试验组平均菌落数-供试品组的平均菌落数)/菌液对照组的平均菌落数。霉菌和酵母菌总数见表1,需氧菌总数验证试验结果见表2。

验证结果:按2015年版《中国药典(四部)》通则1105微生物计数法进行验证,做3次平行试验。需氧菌总数检查,尿素软膏采用常规法,维生素E乳膏采用培养基稀释法,复方苯甲酸软膏采用中和法和培养基稀释法联用,5种试验菌回收率比值均在0.5~2.0范围内;霉菌及酵母菌总数检查,尿素软膏、维生素E乳膏采用常规法、复方苯甲酸软膏可用中和法和培养基稀释法联用,2种试验菌回收率比值均在0.5~2.0范围内。结果均符合药典规定。

2.3 控制菌检查方法适用性试验

2.3.1 金黄色葡萄球菌

试验组:取2.1.2项下1:10尿素软膏、维生素E

表1 霉菌和酵母菌回收率比值

样品	验证方法	白色念珠菌			黑曲霉		
		I	II	III	I	II	III
尿素软膏	常规法	0.96	0.97	1.01	0.98	0.97	0.92
维生素E乳膏	常规法	1.01	0.98	1.05	1.03	1.09	0.99
复方苯甲酸软膏	稀释法	0	0	0	0	0	0
	中和法+稀释法	1.02	0.98	1.05	0.92	0.95	0.99

表2 需氧菌总数回收率比值

样品	验证方法	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
尿素软膏	常规法	0.98	1.03	1.10	0.74	0.69	0.72	1.07	1.08	1.10	0.98	0.89	0.95	0.89	0.91	0.96
维生素E乳膏	常规法	0.42	0.39	0.43	0.78	0.76	0.79	0.31	0.42	0.43	0.71	0.69	0.67	0.73	0.76	0.70
	稀释法	0.75	0.78	0.80	1.19	1.18	1.16	0.76	0.78	0.80	0.87	0.85	0.90	0.98	0.90	0.97
	稀释法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
复方苯甲酸软膏	中和法+稀释法	0.78	0.87	0.76	1.12	1.08	1.13	0.75	0.70	0.78	1.04	0.98	0.90	0.99	1.03	1.00

表3 控制菌检查结果

样品	测定方法	金黄色葡萄球菌				铜绿假单胞菌			
		试验组	菌液对照组	供试品组	阴性对照组	试验组	菌液对照组	供试品组	阴性对照组
尿素软膏	常规法	+(24 h)	+(24 h)	-(24 h)	-	+(2 h)	+(2 h)	-(24 h)	-
维生素E乳膏	常规法	+(24 h)	+(24 h)	-(24 h)	-	+(2 h)	+(24 h)	-(24 h)	-
复方苯甲酸软膏	中和法+稀释法	+(24 h)	+(24 h)	-(24 h)	-	+(2 h)	+(24 h)	-(24 h)	-

注:“-”表示无菌生长;“+”表示试验菌生长良好。

乳膏供试液各10 mL及含菌量不大于100 cfu的金黄色葡萄球菌,同时分别接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀;取2.1.2项下复方苯甲酸软膏方法二中1:10供试液10 mL及含菌量不大于100 cfu的金黄色葡萄球菌,同时接种至200 mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,35℃培养24 h,观察结果。

菌液对照组:用稀释液代替供试液,同试验组操作。

供试品组:用稀释液代替菌液,同试验组操作。

稀释剂组:用稀释液代替供试液、菌液,同试验组操作。

验证结果:结果见表3。

2.3.2 铜绿假单胞菌

试验组:取2.1.2项下1:10尿素软膏、维生素E乳膏供试液各10 mL及含菌量不大于100 cfu的铜绿假单胞菌菌悬液,同时分别接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀;取2.1.2项下复方苯甲酸软膏方法二中1:10供试液10 mL及含菌量不大于100 cfu的铜绿假单胞菌菌悬液,同时接种至200 mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,35℃培养24 h,观察结果。

菌液对照组:用稀释液代替供试液,同试验组操作。

供试品组:用稀释液代替菌液,同试验组操作。

稀释剂组:用稀释液代替供试液、菌液,同试验组操作。

验证结果:结果见表3。可见,控制菌检查中,尿素软膏、维生素E乳膏采用常规法,试验组相应阳性菌能正常检出。复方苯甲酸软膏采用中和法加稀释法,试验组相应阳性菌均能正常检出。

3 讨论

不同医院配制的制剂,即使名称相同,由于采用的工艺和辅料等不同,制剂仍可能表现出不同的抑菌特性,故微生物限度检查方法不能简单复制^[13],需经各单位针对各制剂进行方法学验证。在对医院制剂的方法验证活动中应遵从“就简不就繁”,尽量按常规法、培养基稀释法,或考虑培养基稀释法与中和法联用,最后采取薄膜过滤法的顺序进行。

本研究结果显示,尿素软膏的微生物限度检查方法为需氧菌总数检查、霉菌和酵母菌总数检查、控制菌检查,均可采用常规法;维生素E乳膏的微生物限度检查方法为需氧菌总数检查,可采用稀释法(1:50),霉菌和酵母菌总数检查可采用常规法,控制菌检查均可采用常规法;复方苯甲酸软膏的微生物限度检查方法为需氧

菌总数检查、霉菌和酵母菌总数检查,可采用中和法加稀释法(2.1.2项下复方苯甲酸软膏方法二1:100),控制菌检查均可采用中和法加稀释法,取2.1.2项下复方苯甲酸软膏方法二1:10供试液加入不少于200 mL胰酪大豆胨液体培养基中。

在建立这3个制剂的方法验证时,开始都采用无菌十四烷酸异丙酯萃取,结果软膏较理想,油相和水相分层较清晰。而乳膏萃取时不能很好地分散,经比较,最终确定的样品分散方法为:样品10 g,加恒温45℃的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL。

3个制剂中,尿素软膏具有抗菌、止痒等作用,在验证中采用常规法,回收率比值为0.5~2.0,方法准确、可靠;维生素E为维生素类药物,其并无抑菌作用,由于配方中加入了布罗波尔防腐剂,用常规法无法消除其抑菌性,采用1:50的稀释法能使回收率比值为0.5~2.0,消除了其抑菌成分;在对复方苯甲酸软膏的验证时,最初采用了1:10和1:100的稀释法,5种菌株均未见生长。苯甲酸、水杨酸均有抗菌、真菌作用。苯甲酸在酸性环境中抑菌作用强,在碱性环境下作用减弱,两者配伍应用可增强抗菌作用^[14]。测得1:10供试液pH为3.5,后考虑酸碱中和法,改变溶液pH来排除苯甲酸和水杨酸对微生物限度检查结果的干扰。经试验得出中和剂的量为11 mL的1 mol/L无菌氢氧化钠溶液,可调节1:10供试液的pH至6~8,同时采用测试菌株对中和剂进行了回收试验,回收率比值均为0.5~2.0。表明此中和剂和中和产物的有效性及对微生物的无毒性可满足试验的要求,可消除该制剂中抑菌成分的干扰,可确保方法的科学性和检查结果的准确性。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 杨静,李晓翠,徐逸飞,四种医院制剂微生物限度检查法验证试验[J]. 中国医药科学,2015,19(5):51-53.
- [3] 方李,张心悦,吴晶晶,等. 13种软膏剂微生物限度检查的方法验证探讨[J]. 中国药师,2014,17(9):1580-1583.
- [4] 钟国庆,刘大伟. 21种医院外用制剂微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药品标准,2010,11(6):461-463.
- [5] 章隽,卢映霞,谢巧娥,等. 5种医院制剂稳定性考察[J]. 北方药学,2018,5(5):179.