

复方硫磺洗剂微生物限度检查方法的建立

王海华*(南宁食品药品检验所, 南宁 530001)

中图分类号 R927.11;R986 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2770-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.30

摘要 目的:建立复方硫磺洗剂微生物限度检查方法。方法:采用平皿法、培养基稀释法及薄膜过滤法并在冲洗液中加入增溶剂聚山梨酯80,通过比较回收率来确定适宜的检查方法。结果:采用平皿法、培养基稀释法、薄膜过滤法(冲洗液中不含增溶剂),枯草芽孢杆菌的回收率均低于70%;采用薄膜过滤法(在冲洗液中加入增溶剂),回收率达85%以上。控制菌采用培养基稀释法可检出试验菌。结论:建立的方法可考虑作为复方硫磺洗剂的常规微生物限度检查方法。
关键词 复方硫磺洗剂;微生物限度检查;薄膜过滤法;增溶剂

Establishment of Method for Microbial Limit Test of Compound Sulfur Lotion

WANG Hai-hua(Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for microbial limit test of Compound sulfur lotion. METHODS: The plating method, media dilution method and membrane filtration method were used and the solubilizer polysorbate-80 was added into the solution. The optimal test method was obtained by comparing the recovery rates of test organisms. RESULTS: By plating method, media dilution method and membrane filtration method (solubilizer wasn't added into the solution), the recovery rate of *Bacillus subtilis* was less than 70%; however, by membrane filtration method (the solubilizer was added into the solution), the recovery rate was more than 85%. The test organisms were successfully detected in the control bacteria test by media dilution method. CONCLUSIONS: The method can be considered for microbial limit test of Compound sulfur lotion.

KEY WORDS Compound sulfur lotion; Microbial limit test; Membrane filtration method; Solubilizer

复方硫磺洗剂处方由升华硫、硫酸锌、樟脑酯、甘油、甲基纤维素等组成,制剂中硫磺与皮肤分泌物作用生成硫化物,能使表皮软化,并有脱脂、杀菌、止痒以及抑制角质形成作用;硫酸锌具有轻度杀菌以及收敛作用;樟脑具有局部止痛、止痒的效果。该洗剂可用于治疗疥疮、体癣、手足癣、脚气等,为外用药。

在对具有抗菌活性的药品进行微生物限度检查时,应首先消除其抗菌活性,并通过试验验证是否彻底去除抗菌活性,以保证检验结果的有效性。薄膜过滤法是消除药品中抗菌活性的最有效方法,但由于复方硫磺洗剂处方中升华硫不溶于

水,使得无法简单地采用水溶液作为冲洗剂去除抗菌活性。笔者在试验中发现,在薄膜过滤法中以聚山梨酯80作为增溶剂,可有效去除复方硫磺洗剂的抑菌作用。据此,笔者建立了通过薄膜过滤结合在冲洗液中加入聚山梨酯80的方法,对复方硫磺洗剂进行了微生物限度检查;并按2010年版《中国药典》(二部)规定的方法^[1]对复方硫磺洗剂微生物限度检查方法进行了验证,以确定该制剂所用微生物限度检查方法的有效可行。

1 材料

1.1 仪器

了无挥发性的硫酸溶液为介质(顶空进样中不能使用挥发性的酸,对色谱柱有损害);并且对硫酸溶液的浓度进行筛选,确定最低浓度为0.25 mol/L。

3.3 色谱柱的选择

笔者先后考察了HP-5、FFAP、DB-624等不同极性的色谱柱,结果以在DB-624色谱柱上的峰形和分离度最佳,因此最终选择DB-624色谱柱作为本次试验的色谱柱。

3.4 顶空温度的选择

参照2010年版《中国药典》(二部)附录ⅧP残留溶剂测定法项下内容^[2],并参考ICH指导原则,考察了不同的顶空平衡温度对样品测定的影响,结果详见表3。

表3结果表明,随着温度的升高,苯和甲苯的峰面积减少,甲醇、乙醇、丁醇峰面积则增大。为了提高检测灵敏度,同时考虑到甲苯的响应值过大也会影响检测的准确性,因此选择85℃作为顶空平衡温度。

表3 平衡温度考察结果

Tab 3 Results of equilibrium temperature inspection

平衡温度,℃	峰面积				
	甲醇	乙醇	苯	丁醇	甲苯
80	425.955	1 327.676	34.008	3 528.580	13 533.997
85	519.118	1 627.355	33.183	4 336.247	13 227.914
90	730.876	2 274.542	31.940	5 837.678	12 637.909

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].17版.北京:人民卫生出版社,2007:427.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:1 092、附录61-65.
- [3] 周海钧.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2007:126.
- [4] 陈宁,陈朝艳.顶空气相色谱法测定头孢替坦二钠中的残留溶剂[J].中国抗生素杂志,2010,36(11):849.

(收稿日期:2012-10-10 修回日期:2012-12-05)

*副主任中药师。研究方向:药品检验。电话:0771-3132340

LRH-250-G型光照培养箱、LRH-250-A型生化培养箱(广东省医疗器械厂);HR-8753GM微波炉(青岛海尔微波制品有限公司);II级生物安全柜(上海振梓创空气净化设备有限公司)。

1.2 药品

复方硫磺洗剂(广西中医学院瑞康医院制剂室,批号:090218、090303、090316,规格:每瓶200 ml,含硫磺0.03 g/ml)。

1.3 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B)10104]、白色念珠菌(*Candida albicans*)[CMCC(F)98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)[CMCC(F)98003]均来自中国医学细菌保藏管理中心。

1.4 培养基及稀释剂、增溶剂

营养琼脂培养基(批号:090226)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:090318)、胆盐乳糖培养基(BL,批号:090529)、蛋白胨(批号:090617)均来源于广西食品药品检验所;营养肉汤培养基(批号:090518)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号:090601)均来源于北京三药科技开发公司;改良马丁培养基(批号:090302)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:090311)均来源于北京陆桥技术有限责任公司;适用性检查符合2010年版《中国药典》的相关规定。pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.1%蛋白胨水溶液、含0.1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液、0.9%无菌氯化钠溶液等为自制。

2 方法与结果

参照2010年版《中国药典》(二部)微生物限度检查法^[1]进行试验,简述如下:

2.1 菌液的制备

接种金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,30~35℃培养18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,23~28℃培养24~48 h。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含菌数为50~100 CFU的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中,23~28℃培养5~7 d,加入3~5 ml 0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。吸出孢子悬液至无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含孢子数为50~100 CFU的孢子悬液。

2.2 供试液制备

取供试品10 ml,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释至100 ml,制备成均匀的1:10的供试液,静置5 min,取上清液备用。

2.3 微生物限度检查方法

2.3.1 平皿法:取1:10的供试液1 ml注入平皿。

2.3.2 培养基稀释法:取1:10的供试液1 ml,注入5个平皿,每个平皿0.2 ml。

2.3.3 薄膜过滤法:取1:10的供试液10 ml,采用薄膜过滤法,分别以0.1%蛋白胨水溶液(A)及含0.1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液(B)为冲洗液。冲洗量:A 100、200、300、400、500、600、700、800 ml,B 100、200 ml。

2.4 细菌、霉菌和酵母菌检查方法学验证试验

2.4.1 试验组:按“2.3”项下方法操作后,分别将50~100 CFU/ml的试验菌1 ml,注入同一平皿中($n=3$),立即倾注琼脂培养基,待凝固后置于规定温度,细菌培养24~48 h,白色念珠菌和

黑曲霉培养48~72 h,测定其菌数;薄膜过滤法时,取供试液过滤、冲洗,在最后一次冲洗液中加入试验菌1 ml,过滤,按薄膜过滤法测定其菌数。

2.4.2 菌液组:取试验菌1 ml注入平皿中($n=3$),立即倾注琼脂培养基,待凝固后置于规定温度,细菌培养24~48 h,白色念珠菌和黑曲霉培养48~72 h,测定所加入的试验菌数;薄膜过滤法时,取供试液过滤,冲洗,在最后一次冲洗液中加入试验菌1 ml,过滤,按薄膜过滤法测定其菌数。

2.4.3 供试品对照组:按“2.3”项下相应方法操作后,立即倾注琼脂培养基,待凝固后置于规定温度,细菌培养24~48 h,白色念珠菌和黑曲霉培养48~72 h,测定供试品本底菌数;薄膜过滤法时,取供试液过滤,冲洗,按薄膜过滤法测定其菌数。

2.4.4 回收率的计算:试验组的加菌回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/(菌液组的平均菌落数)×100%。

试验结果表明,本品采用平皿法、培养基稀释法、薄膜过滤法[A,即以0.1%蛋白胨水溶液为冲洗液(冲洗量100、200、300、400、500、600、700、800 ml)进行检验,枯草芽孢杆菌的回收率均小于70.0%];采用薄膜过滤法[B,即以含0.1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液为冲洗液(冲洗量为每膜200 ml)]进行检验,枯草芽孢杆菌的回收率均>85.0%。而大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉采用培养基稀释法(每皿0.2 ml)测定,回收率均>80.0%,结果详见表1。3批样品5种试验菌采用薄膜过滤法(B),回收率均>85.0%,结果见表2。

表1 不同方法回收率结果($n=3$)

方法	回收率, %				
	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
平皿法	0	0	0	0	0
培养基稀释法	91.0	4.0	87.0	84.0	92.0
薄膜过滤法(A)					
冲洗量, ml					
100		0			
200		0			
300		0.5			
400		10.3			
500		24.0			
600		28.4			
700		27.9			
800		30.4			
薄膜过滤法(B)					
冲洗量, ml					
100		52.6			
200		100			

表2 3批样品薄膜过滤法(B)回收率结果($n=3$)

批号	回收率, %				
	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
090218	97.0	100.0	96.0	87.0	97.0
090303	86.0	95.0	94.0	89.0	91.0
090316	93.0	90.0	98.0	85.0	98.0

2.5 控制菌检查验证试验

2.5.1 金黄色葡萄球菌:取上述1:10的供试液10 ml加入至相应100、200、300 ml的营养肉汤培养基中(共2组),同时一组接种金黄色葡萄球菌10~100 CFU作为试验组,另一组接种大肠埃希菌10~100 CFU作为阴性菌对照组,35℃培养24 h。结

果, 试验组、阴性菌对照组的营养肉汤均呈现浑浊。分别取培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 35℃培养 24~72 h, 结果阴性菌对照组 100、200、300 ml 及试验组 100、200 ml 在平板上均未见菌落生长, 试验组 300 ml 在平板上有金黄色葡萄球菌典型菌落生长, 结果见表 3。

表 3 金黄色葡萄球菌验证试验结果

Tab 3 Results of validation tests for *Staphylococcus aureus*

培养基	培养基体积, ml					
	100		200		300	
	试验组	阴性菌对照组	试验组	阴性菌对照组	试验组	阴性菌对照组
营养肉汤培养基	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊
甘露醇氯化钠琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长	典型菌落生长	无菌落生长

从表 3 可得出, 采用培养基稀释法(培养基 300 ml), 阴性菌对照组未检出阴性对照菌, 试验组检出试验菌。表明金黄色葡萄球菌可采用此法进行控制。

2.5.2 铜绿假单胞菌: 取上述 1:10 的供试液 10 ml 加入至 100 ml BL 培养基中(共 2 组), 同时一组接种铜绿假单胞菌 10~100 CFU 作为试验组, 另一组接种大肠埃希菌 10~100 CFU 作为阴性菌对照组, 35℃培养 18~24 h。结果, 试验组、阴性菌对照组的 BL 均呈现浑浊。分别取培养物划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上, 35℃培养 18~24 h, 结果阴性菌对照组在平板上未见菌落生长, 试验组在平板上有铜绿假单胞菌典型菌落生长, 结果表明铜绿假单胞菌可采用常规法进行控制, 详见表 4。

表 4 铜绿假单胞菌验证试验结果

Tab 4 Results of validation tests for *Pseudomonas aeruginosa*

培养基	试验组样品批号			阴性菌对照组样品批号		
	090218	090303	090316	090218	090303	090316
BL	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊	浑浊
溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长

2.6 验证试验结果

按上述建立的复方硫磺洗剂微生物限度检查法, 细菌数采用薄膜过滤法(B), 即以含 0.1% 聚山梨酯 80 的 0.1% 蛋白胨水溶液为冲洗液(冲洗量为每膜 200 ml)进行测定, 霉菌、酵母菌数采用培养基稀释法(每皿 0.2 ml)测定, 对控制菌金黄色葡萄球菌采用培养基稀释法(培养基 300 ml), 铜绿假单胞菌采用常规法。对 3 批样品进行检验, 结果可确定上述方法为本品的微生物限度检查方法, 详见表 5。

表 5 3 批样品微生物限度检查方法验证试验结果

Tab 5 Results of validation tests of microbial limit test for 3 batches of samples

批号	细菌数	霉菌、酵母菌数	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
090218	<10 CFU/ml	<10 CFU/ml	未检出	未检出
090303	<10 CFU/ml	<10 CFU/ml	未检出	未检出
090316	<10 CFU/ml	<10 CFU/ml	未检出	未检出

3 讨论

(1) 增溶剂对试验结果的影响: 复方硫磺洗剂处方中主要抑菌成分为升华硫, 不溶于水, 微溶于乙醇、醚, 易溶于二硫化碳。最直接、有效的去除抑菌活性的方法当属薄膜过滤法。试验中, 薄膜过滤采用以 0.1% 蛋白胨水溶液为冲洗液从 100 ml 至 800 ml 进行冲洗, 但枯草芽孢杆菌的回收率仍无法达到《中国药典》70.0% 的要求; 且试验菌生长缓慢、弱小, 往往需要

延长 2 d 培养时间。聚山梨酯 80 是非离子型的表面活性剂, 具有乳化、扩散、增溶和稳定的作用, 还可作为中和剂(灭活剂), 即其使用不但增加药品的溶解性, 还对药品抑菌性具有中和作用^[2], 故选择聚山梨酯 80 作为增溶剂。其增溶机制是表面活性剂在水中形成“胶束”的结果, 由于胶束的内部与周围溶剂的介电常数不同, 难溶性药物根据自身的化学性质, 以不同方式与胶束相互作用, 使药物分子分散在胶束中。对增溶剂的加入量进行选择, 结果显示, 加入量过小, 不能完全分散药物; 加入量过大, 会出现过量的泡沫, 影响冲洗效果。故最后以 0.1% 的聚山梨酯 80 作为增溶剂, 可满足试验需要。

(2) 不同医院生产的复方硫磺洗剂在微生物限度检查方法有所不同, 有使用薄膜过滤法^[3], 也有采用离心沉淀法结合薄膜过滤法^[4]。原因有可能是不同医院同一制剂在处方原料和制备方法上有所不同, 由于制剂稳定性的问题, 有的医院可能对该制剂作一些改进; 也可能有的医院用升华硫, 有的用沉降硫; 还有可能硫磺的质量不同等。因此, 在药品监督检验工作中, 经常遇到同一制剂不同生产厂家提供的微生物限度检查资料所采用的方法不同的情况, 比如有常规法、培养基稀释法、离心沉淀法、薄膜过滤法等。

微生物限度检查目前在国内外越来越受到重视, 每版药典收载的品种也越来越多, 如《美国药典》(USP) 24 版收载微生物限度品种(217 个)较 23 版(150 个)增加 67 个^[5]。从发展趋势来看, 国家药品标准对不同单位生产的同一剂型同一品种的药品应制订统一的检验方法, 以促进我国由以剂型制订微生物限度标准向以品种制订微生物限度标准过渡工作的进行。从本试验结果得出, 为了制订科学合理的复方硫磺洗剂微生物限度检查方法, 建议统一采用在冲洗液中加入 0.1% 聚山梨酯 80 的薄膜过滤法较为稳妥。该方法具有简便、实用的特点。

(3) 《中国药典》规定^[1], 若药品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时, 对检查方法应重新验证。由于进行再验证时, 药品中的活性成分未发生改变, 故其抗菌谱也未改变, 因此笔者认为再验证工作仅需针对《中国药典》规定的全部验证菌株中的最敏感菌株即可, 而不必对全部菌株进行再验证。即对复方硫磺洗剂进行再验证时, 仅需证明试验中最敏感菌株(枯草芽孢杆菌)的回收率大于 70.0%, 即可说明检查方法有效, 无需再逐一验证大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率。采用这种方法, 既可保证检验方法的有效性, 又节省了大量人力、物力, 使得验证工作有可能成为日常检验的一部分。建议《中国药典》逐步收载各抗菌药物的最敏感验证菌株作为质控菌株, 以方便日常检验工作。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 107-116.
- [2] 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.
- [3] 夏巧凤, 王晓梅. 复方硫磺洗剂微生物限度检查方法研究[J]. 临床合理用药, 2012, 5(2B): 32.
- [4] 马晓璇, 李汶, 温玉莹. 2 种含硫磺制剂的微生物限度检查方法验证[J]. 今日药学, 2009, 19(2): 50.
- [5] 周剑, 李霞. 药品微生物限度检查法中几种样品前处理方法的可行性研究[J]. 中国药房, 2012, 23(33): 3136.

(收稿日期: 2012-10-09 修回日期: 2012-12-25)