

四季抗病毒合剂中抑菌剂的抑菌效力观察

高飞¹,李秋菲²,余凡³

(1. 榆林市药品检验所,陕西 榆林 719000;2. 陕西省食品药品检验所,陕西 西安 710061;
3. 杨凌示范区药品检验监测评价中心,陕西 杨凌 712100)

摘要:目的 探索四季抗病毒合剂中抑菌剂的合理加入量。**方法** 对3种抑菌剂(苯甲酸钠0.3%、苯甲酸钠0.3%+尼泊金乙酯0.04%、苯甲酸钠0.3%+尼泊金乙酯0.05%)的抑菌效果进行考察,筛选出抑菌剂的合理加入量。选择有代表性的微生物加入供试品中进行抑菌效力试验,测试微生物在不同时间段的存活情况。**结果** 0.3%苯甲酸钠对铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉5种代表试验菌均有良好的抑制作用,为最低有效剂量。**结论** 0.3%苯甲酸钠可作为四季抗病毒合剂的抑菌剂,且抑菌效力安全有效。

关键词:四季抗病毒合剂;抑菌效力;苯甲酸钠

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.12.013

Studies on the antibacterial efficacy of season antiviral mixture

GAO Fei¹, LI Qiufei², SHE Fan³

(1. Yulin Institute for Drug Control, Yulin, Shaanxi 719000, China;

2. Shaanxi Province Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710061, China;

3. Yangling Demonstration Area Drug Testing and Evaluation Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Objective To investigate the optimal concentration of antimicrobial preservative that are added to Sijikangbingdu mixture.

Methods The antimicrobial effectiveness of antimicrobial preservatives at different ratio were evaluated. The concentration of test

通信作者:李秋菲,女,副主任医师,研究方向为微生物学,E-mail:liqiufei66@126.com

- [10] INBERG A, LINIALM. Protection of pancreatic beta-cells from various stress condition is mediated by DJ-1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285:25686-25698.
- [11] ALEYASIN H, ROUSSEAU MW, PHILLIPS M, et al. The Parkinson's disease gene DJ-1 is also a key regulator of stroke-induced damage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104:18748-18753.
- [12] FRAZZITTA G, MAESTRI R, BERTOTTI G, et al. Intensive rehabilitation treatment in early Parkinson's disease: a randomized pilot study with a 2-year follow-up [J]. Neurorehabil Neural Repair, 2015, 29(2):123-131.
- [13] 黄觉斌. 帕金森病的危险因素及其预防[J]. 现代康复, 2000, 4(2):163-165.
- [14] 荣娟, 陈生弟. 帕金森病的遗传因素[J]. 现代康复, 2000, 4(2):171-173.
- [15] BOLNER A, MICCIOLO R, BOSELLO O, et al. A Panel of Oxidative Stress Markers in Parkinson's Disease [J]. Clin Lab, 2016, 62(1/2):105-112.
- [16] JIANG D, SHI S, ZHANG L, et al. Inhibition of the Fe(III)-catalyzed dopamine oxidation by ATP and its relevance to oxidative stress in Parkinson's disease [J]. ACS Chem Neurosci, 2013, 4(9):1305-1313.
- [17] GAO L, SHE H, LI W, et al. Oxidation of survival factor MEF2D in neuronal death and Parkinson's disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(18):2936-2948.
- [18] LV E, DENG J, YU Y, et al. Nrf2-ARE signals mediated the anti-oxidative action of electroacupuncture in an MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Free Radic Res, 2015, 49(11):1296-1307.
- [19] OFFEN D, ZIV I, GORODIN S, et al. Dopamine induced programmed cell death in mouse thymocytes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1268(2):171-177.
- [20] BURKE WJ, LI SW, CHUNG HD, et al. Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases [J]. Neurotoxicology, 2004, 25(1/2):101-115.
- [21] RABINOVIC AD, LEWIS DA, HASTINGS TG, et al. Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine [J]. Neuroscience, 2000, 101(1):67-76.
- [22] PEREZ RG, WAYMIRE JC, LIN E, et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis [J]. Journal of the Society for Neuroscience, 2002, 22(8):3090-3099.
- [23] SHERER TB, KIM JH, BETARBET R, et al. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation [J]. Experimental Neurology, 2003, 179(1):9-16.
- [24] VASSEUR S, AFZAL S, TARDIVEL-LACOMBE J, et al. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106:1111-1116.
- [25] ROBERT G, PUISSANT A, DUFIES M, et al. The caspase 6 derived N-terminal fragment of DJ-1 promotes apoptosis via increased ROS production [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(11):1769-1778.
- [26] CAO J, YING M, XIE N, et al. The oxidation states of DJ-1 dictate the cell fate in response to oxidative stress triggered by 4-hpr: autophagy or apoptosis [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(10):1443-1459.

(收稿日期:2016-12-23,修回日期:2017-05-11)

microorganisms were inoculated,after which the survival rate were estimated in different times. **Results** The growth of test microorgan-isms are inhibited effectively by Sijikangbingdu mixture possess of 0.3% sodium benzoate which is also the minimum effective dosage. **Conclusion** 0.3% sodium benzoate can be used as antimicrobial preservative for Sijikangbingdu mixture which is safe and effective. **Key words**;Sijikangbingdu mixture;Antibacterial effectiveness;Sodium benzoate

四季抗病毒合剂是由鱼腥草、桔梗、苦杏仁、菊花等 11 味中药组成,清热解毒、消炎退热。主要用于上呼吸道感染、病毒性感冒、流感等病毒性感染疾患。四季抗病毒合剂为多剂量口服制剂,由于其在使用过程中存在多次打开包装而被污染的风险,需要添加一定量的抑菌剂保证产品的正常储存和使用,避免微生物生长与繁殖^[1-3]。如果药物本身不具有充分的抗菌效力,那么应根据制剂特性(如水溶液制剂)添加适宜的抑菌剂,以防止制剂在正常贮藏或使用过程中可能发生的微生物污染和繁殖使药物变质而对使用者造成危害,尤其是多剂量包装的制剂。

抑菌剂(也称防腐剂)是一类防止或限制微生物生长与繁殖的化学药品,其主要作用是保证药品品质,防止药剂被微生物污染。所有的抑菌剂都有一定的毒性,制剂中抑菌剂的量应为最低有效量。本试验自 2016 年 6 月至 2017 年 1 月采用适宜的方法对该产品进行了 3 种配比浓度的抑菌剂效力进行测试,筛选处方中所添加的抑菌剂是否安全有效。测试方法为《中国药典》^[4] 2015 版 1121 抑菌效力检查法,接种 5 种代表微生物,分别在 d14、d28 测试微生物存活情况,综合评判所添加抑菌剂的抑菌效力。

1 仪器与试药

1.1 仪器 MJ-系列真菌培养箱培养箱(上海一恒科技有限公司);SPX-250 生化培养箱(上海佳胜实验设备有限公司);超净台(上海锦屏仪器仪表有限公司)。

1.2 培养基 胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)(生产批号 140505)、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)(生产批号 130222)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(生产批号 140312)、pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(生产批号 140424)均购于北京陆桥技术有限责任公司。培养基适用性检查实验结果均符合中国药典 2015 年版要求。

1.3 菌种 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌[CM-CC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均源自中国医学细菌保藏中心,验证试验所用的菌株均为第 3 代。

1.4 供试品 四季抗病毒合剂,陕西海天制药,生

产批号 20150925。

2 方法与结果

2.1 菌种制备 接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至胰酪胨大豆琼脂斜面上,30~35℃培养 18~24 h;接种白色念珠菌至沙氏葡萄糖琼脂斜面,20~25℃培养 24~48 h;接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面,23~28℃培养 5~7 d 加入含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱后制成每 1 mL 含孢子数 10⁷~10⁸cfu 的菌悬液。

2.2 抑菌剂浓度筛选 该中药产品成分主要为鱼腥草、桔梗、苦杏仁、菊花、桑叶、荆芥、薄荷、芦根、甘草、连翘、紫苏叶。根据《药用辅料手册》收载^[5]本品成分及包装与所选抑菌剂无配伍禁忌。设定此口服液的防腐剂使用浓度分别为 1#(苯甲酸钠 0.3%);2#(苯甲酸钠 0.3%+尼泊金乙酯 0.04%);3#(苯甲酸钠 0.3%+尼泊金乙酯 0.05%)。产品组分及防腐剂添加情况见表 1。

表 1 产品组分及防腐剂添加情况

组别	防腐剂添加量	产品组分
1#	苯甲酸钠 0.3%	鱼腥草、桔梗、苦杏仁、菊花
2#	苯甲酸钠 0.3%+尼泊金乙酯 0.04%	桑叶、荆芥、薄荷
3#	苯甲酸钠 0.3%+尼泊金乙酯 0.05%	芦根、甘草、连翘、紫苏叶

2.3 方法适用性试验及结果判断 进行抑菌效力检查前,需对供试品的计数方法进行验证,以确定该方法在防腐剂效力检查时是否能有效检测出供试品中所有试验菌。选取抑菌浓度最高 3#进行方法适用性试验。

2.3.1 供试液制备 取 3#供试品 10 mL,加 TSB 至 100 mL,制备成 1:10 供试液。

2.3.2 平皿计数方法 试验组:吸取 1:10 供试液 9.9 mL 共 5 份,每份加入 0.1 mL 的试验菌悬液摇匀后,使加入后每 1 mL 供试液含菌量不大于 100 cfu,分别从所有试验菌管中吸取 1 mL 注入直径为 90 mm 的平皿中,细菌平皿中加入 TSA,真菌平皿中加入 SDA。供试品对照组:吸取 4 份 1:10 供试液 1 mL 注入直径为 90 mm 的平皿中,平行,其中两个平

板中注入 TSA 培养基中,另两个注入 SDA 培养基,摇匀,测定供试品的本底菌数。菌液组:分别吸取 5 份 9.9 mL pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液,每份中加入与试验组相同的菌悬液后摇匀。从各菌液试管中吸取 1 mL 注入直径为 90 mm 的平皿中测定。阴性对照组:以稀释液替代供试品,同供试品对照组进行试验。TSA 平皿放入 30~35℃ 培养 3 d,SDA 平皿放入 20~25℃ 培养 3~5 d。方法适用性结果见表 2。

表 2 3#样品方法适用性回收率

组别	第一次试验	第二次试验	第三次试验
试验组/%			
金黄色葡萄球菌	78	80	76
大肠埃希菌	94	89	92
铜绿假单胞菌	82	78	84
白色念珠菌	90	91	93
黑曲霉	84	87	86
供试品对照组/cfu·mL ⁻¹	0	0	0
阴性对照组/cfu·mL ⁻¹	0	0	0

结果表明,3#样试验组金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉回收率均高于 70%,满足 2015 版药典要求。最终建立的方法为平皿法取 1:10 的供试液,每皿 1 mL 进行计数,细菌计数采用 TSA 培养基,真菌计数采用 SDA 培养基。

2.4 未添加抑菌剂样品抑菌效力测试 考察在未添加抑菌剂的情况下四季抗病毒合剂本身对微生物抑制或杀灭能力,根据结果,评估本品中加入抑菌剂的必要性^[5]。

2.4.1 方法 取未添加抑菌剂的样品 5 瓶,分别接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉,使接种后供试液染菌量未 10⁵~10⁶cfu·mL⁻¹,充分混匀,模拟正常的使用条件20~25℃ 避光培养箱培养过程中,分别在 d14、d28 对供试品中存活的微生物进行计数,同时取与样品量相同的 0.9% 无菌氯化钠溶液 5 瓶,加入与上述样品组相同的试验菌液,通过梯度稀释,用平皿计数法进行计数,细菌于 30~35℃ 培养 3~5 d,真菌于 20~25℃ 培养 5~7 d 后计算样品中所加试验菌菌数即初始

(0 时)菌液浓度。并换算成 Log 值见表 3。

为准确计数 d14、d28 样品所含微生物,应按方法适用性试验进行测试,3#方法适用性也适合未添加抑菌剂的本品,最低稀释级为 1:10 的供试液进一步稀释成 1:10²、1:10³、1:10⁴ 等稀释级,测试结果见表 3。

2.4.2 结果分析 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌 d14 与初始值即 0 时比较下降的 log 值均 <3.0;白色念珠菌、黑曲霉 14 d 与初始值比较下降的 log 值均 <1.0。细菌和真菌不符合中国药典 2015 版抑菌剂效力检查的要求。四季抗病毒合剂本身并不具备充分的抗菌活性,为保证用药安全,应添加适宜抑菌剂。

2.5 抑菌效力测定

2.5.1 样品组 无菌条件下吸取的供试品 20 mL 至原包装瓶中,按照目标菌的个数平行制备 5 份,将菌悬液各吸取 0.1 mL 加入其中,使其最终浓度细菌为 10⁶cfu·mL⁻¹,真菌和酵母菌为 10⁵cfu·mL⁻¹于旋涡振荡仪上振荡均匀。加菌量不得超过容器中样品量的 1%。将制备好的样品置于 20~25℃ 的培养箱中储存,分别在 d14 和 d28 对供试品中存活的微生物进行计数。

2.5.2 菌液组 无菌条件吸取 20 mL 0.9% 氯化钠溶液加入无菌玻璃瓶中,平行制备 5 份,将与样品组相同量的目标菌悬液加入其中,通过梯度稀释,用平皿计数法进行计数,细菌于 30~35℃ 培养 3~5 d,真菌于 20~25℃ 培养 5~7 d 后,计算样品中所加试验菌菌数即初始菌液浓度。并换算成 log 值见表 4。

2.5.3 存活菌数测定 分别在 d14、d28 将样品于旋涡振荡仪上振荡均匀,无菌量取样品 1 mL 用 TSB 通过梯度稀释稀释成 1:10 的供试液,进一步稀释成 1:10²、1:10³、1:10⁴ 等稀释级进行测定,置规定温度规定时间培养,逐日观察结果。根据菌落测定结果,计算 1 mL 样品组各间隔时间的菌数,并换算成 log 值见表 4。

分别计算 1#、2#、3#样品 d14、d28 与初始值比较减少 log 值及判断标准,结果见表 5。

表 3 四季抗病毒合剂本身抑菌效力检查结果

时间	金黄色葡萄球菌		大肠埃希菌		铜绿假单胞菌		白色念珠菌		黑曲霉	
	含菌量/ CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/ CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/ CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/ CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/ CFU·mL ⁻¹	log 值
0 时	4.02×10 ⁶	6.6	2.82×10 ⁶	6.5	5.3×10 ⁶	6.7	5.6×10 ⁵	5.7	2.4×10 ⁵	5.4
d14	1.07×10 ⁶	6.0	1.56×10 ⁶	6.2	2.45×10 ⁶	6.4	5.85×10 ⁵	5.8	1.95×10 ⁵	5.3
d28	4.85×10 ⁵	5.7	2.78×10 ⁶	6.4	2.15×10 ⁶	6.3	3.78×10 ⁵	5.6	2.06×10 ⁵	5.3

表 4 1#、2#、3#抑菌效力测试结果

组别	菌种	初始值(菌液组)		试验菌接种 14 d(样品组)		试验菌接种 28 d(样品组)	
		含菌量/CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/CFU·mL ⁻¹	log 值	含菌量/CFU·mL ⁻¹	log 值
1#	金黄色葡萄球菌	3.95×10 ⁶	6.6	<10	<1	<10	<1
	大肠埃希菌	4.75×10 ⁶	6.7	<10	<1	<10	<1
	铜绿假单胞菌	5.8×10 ⁶	6.8	<10	<1	<10	<1
	白色念珠菌	4.35×10 ⁵	5.6	<10	<1	<10	<1
	黑曲霉	1.3×10 ⁵	5.1	<10	<1	<10	<1
2#	金黄色葡萄球菌	3.95×10 ⁶	6.6	<10	<1	<10	<1
	大肠埃希菌	4.75×10 ⁶	6.7	<10	<1	<10	<1
	铜绿假单胞菌	5.8×10 ⁶	6.8	<10	<1	<10	<1
	白色念珠菌	4.35×10 ⁵	5.6	<10	<1	<10	<1
	黑曲霉	1.3×10 ⁵	5.1	<10	<1	<10	<1
3#	金黄色葡萄球菌	3.95×10 ⁶	6.6	<10	<1	<10	<1
	大肠埃希菌	4.75×10 ⁶	6.7	<10	<1	<10	<1
	铜绿假单胞菌	5.8×10 ⁶	6.8	<10	<1	<10	<1
	白色念珠菌	4.35×10 ⁵	5.6	<10	<1	<10	<1
	黑曲霉	1.3×10 ⁵	5.1	<10	<1	<10	<1

表 5 1#样、2#样、3#样品 d14、d28 与初始值比较减少 Log 值及判断标准

菌种	1#样品减少 log 值		2#样品减少 log 值		3#样品减少 log 值		口服制剂抑菌效力判断标准	
	d14	d28	d14	d28	d14	d28	d14	d28
细菌								
金黄色葡萄球菌	>5.6	NI	>5.6	NI	>5.6	NI	3	NI
大肠埃希菌	>5.7	NI	>5.7	NI	>5.7	NI		NI
铜绿假单胞菌	>5.8	NI	>5.8	NI	>5.8	NI		NI
真菌								
白色念珠菌	>4.6	NI	>4.6	NI	>4.6	NI	1	NI
黑曲霉	>4.1	NI	>4.1	NI	>4.1	NI		NI

注:NI 为未增加,是指对前一个测定时间,试验菌增加的数量不超过 0.5log

2.5.4 结果分析 1#样、2#样、3#样 d14 存活的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌菌数与接种的细菌菌数初始值的 log 值相比下降均 >3.0; d14 存活的白色念珠菌、黑曲真菌数与接种真菌菌数初始值的 log 值比较下降均 >1.0; d28 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌细菌菌数 log 值与 d14 细菌菌数 log 值比较未增加, d28 白色念珠菌、黑曲真菌数的 log 值与 d14 真菌菌数 log 值比较未增加。由此可以看出 3 个样品的抑菌剂效力检查符合中国药典 2015 版的要求。

3 讨论

抑菌剂效力测试至关重要,抑菌剂的量添加过少,会使微生物繁殖而引起污染,抑菌剂(尼泊金乙酯)^[6]的量过大,会引起许多不适或过敏等变态反应,因此,适量的添加抑菌剂显得尤为重要,按照《中国药典》2015 年版四部 1121(抑菌剂效力检查法)口服制剂抑菌剂效力判断标准,三个样品均能满足抑菌剂效能试验要求,但根据最小有效量添加的原则^[7],最终选择 1#样品,抑菌剂苯甲酸钠浓度 0.3%,为合理添加量。

四季抗病毒合剂根据需要加入适宜的防腐剂,不

得影响成品的稳定性,并避免对检验产生干扰。苯甲酸属于低级脂肪酸,在水溶液中很少电离,大部分保持分子态,对微生物的抑制主要是分子态,此种防腐剂在酸性条件下为佳。四季抗病毒合剂 PH 值 4~6,属于偏酸环境,添加苯甲酸能更好发挥抑菌效力。

参考文献

[1] 胡小华.阿奇霉素滴眼液的抑菌效力测定[J].中国药师,2013,16(5):780-781.

[2] ZHANG SL,BAI RW,LI J,et al.Determination of preservative effect on naphazoline hydrochloride and chlorphenamine maleate and vitamin B12 eye drop[J].Food Drug ,2011,13(1):42-44.

[3] JIANG ZJ,GAO C.Study on the bacteriostatic effect of sodium hyaluronate eye drop[J].Chin J Mod Appl Pharm,2013,30(7):788-792.

[4] 国家药典委员会.中国药典(四部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:152-153.

[5] 刘艳.牟卫伟.王丽英,等.硝酸毛果芸香碱滴眼液抑菌剂浓度筛选与抑菌效力研究[J].中国药事,2014,28(12):1313-1317.

[6] 肖磺,林吉恒,陈万胜.氯霉素滴眼液中尼泊乙酯含量合理性的探讨[J].中国药师,2014,17(5):785.

[7] 贺聪莹,王卫卫,杨晓莉,等.复方角菜酸酯乳膏抑菌效力测试[J].药物分析杂志,2015,35(5):934.

(收稿日期:2017-04-19,修回日期:2017-08-12)