

引用本文:孙乃霞,赵新霞.氯霉素氧化锌乳膏微生物限度检查方法验证[J].安徽医药,2023,27(2):255-258.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.02.010.



◇ 药物分析 ◇

氯霉素氧化锌乳膏微生物限度检查方法验证

孙乃霞¹, 赵新霞²

作者单位:¹濮阳市食品药品检验检测中心微生物室,河南 濮阳 457000;

²河南省食品药品检验所微生物室,河南 郑州 450018

摘要: **目的** 建立氯霉素氧化锌乳膏的微生物限度检验方法。**方法** 按照《中国药典》2020年版四部通则 1105、1106,分别采用常规法、增加稀释液、增加培养基体积、增加稀释液-增加培养基体积联合、薄膜过滤法进行方法适用性试验。**结果** 氯霉素氧化锌乳膏对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑制作用较强,需要用薄膜过滤法才能使回收率在0.5~2;控制菌适用性试验中,增加培养基体积可消除样品对金黄色葡萄球菌的抑制作用。**结论** 需氧菌总数测定采用薄膜过滤法;霉菌和酵母菌总数测定采用常规法;金黄色葡萄球菌检查采用增加培养基体积法;铜绿假单胞菌检查采用常规法。

关键词: 微生物限度检查; 氯霉素氧化锌乳膏; 薄膜过滤法; 增加培养基体积法; 常规法

Verification of microbial limit test method for chloramphenicol zinc oxide cream

SUN Naixia¹, ZHAO Xinxia²

Author Affiliations:¹Microbiology Laboratory of Puyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Puyang, Henan 457000, China; ²Microbiology Laboratory of Henan Food and Drug Inspection Institute, Zhengzhou, Henan 450018, China

Abstract: **Objective** To establish a microbial limit test method for chloramphenicol zinc oxide cream. **Methods** According to the four general rules 1105 and 1106 of Chinese Pharmacopoeia, Edition 2020, the applicability test of the method was carried out by routine method and such methods as increasing diluent, increasing medium volume, combination of increasing diluent and medium volume, and membrane filtration method. **Results** Since chloramphenicol zinc oxide cream had a strong inhibitory effect on *staphylococcus aureus* and *bacillus subtilis*, the membrane filtration method was required to make the recovery rate between 0.5 and 2. Moreover, increasing the medium volume could eliminate the inhibitory effect of sample on *staphylococcus aureus* in the applicability test of control bacteria. **Conclusion** The total number of aerobic bacteria is tested by membrane filtration method; the total number of molds and yeasts is tested by routine method; *staphylococcus aureus* is tested by the method for increasing medium volume; *pseudomonas aeruginosa* is tested by routine method.

Key words: Microbial limit test; Chloramphenicol zinc oxide cream; Membrane filtration method; Method for increasing medium volume; Routine method

医院制剂主要针对临床有需求、不适合工厂批量生产的品种,它弥补市场供应不足、保证临床用药,有不可取代的优势^[1]。氯霉素氧化锌乳膏的主要成分是氯霉素、氧化锌等。制备方法为:将融化的羊毛脂(200 g)加入花生油(500 g)中,搅拌均匀并不断加入氢氧化钙饱和溶液(485 mL),完全乳化后加入氧化锌细粉(300 g)、氯霉素(15 g),混匀。本制剂为油包水型外用制剂,临床用于治疗湿疹、皮炎、局部溃疡、黄水疮等皮肤病,疗效显著^[2]。但本制剂有效期短,生产和储存过程更容易受到微生物的污染。所以微生物限度检查是控制其质量的一个重要项目^[3-4]。本研究通过测定各试验菌回收率、控制菌适用性试验确立了氯霉素氧化锌乳膏的微生物

限度检验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 氯霉素氧化锌乳膏(濮阳市人民医院,规格 20 g,批次 20210508、20210531、20210623、20210714、20210729、20210815)。

1.1.2 仪器 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃公司);生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司, BSC-1300II A2型);立式灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂, YXQ-LS-50SII型);无菌均质器(宁波新芝生物科技股份有限公司, SCIENTZ-11L型);电热恒温培养箱(扬州慧科电子有限公司, GHP-9162型);生化培养箱(扬州慧科

电子有限公司, SPX-150型), 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海有限公司), ML204T/02型]。

1.1.3 培养基 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)(批次 200518)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(批次 200823)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)(批次 210115)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)(批次 200709)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批次 200412)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批次 201005)、pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(批次 200912), 生产厂家均为北京路桥技术股份有限公司, 且培养基的适用性检查结果符合《中国药典》2020年版的要求。

1.1.4 菌种 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉菌[CMCC(F)98003]。以上菌株均为第三代。购自中国食品药品检定研究院。

1.1.5 其他 滤膜(天津市津腾实验设备有限公司); 聚山梨酯 80, 由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备 取各试验菌, 按照《中国药典》2020年版四部 1105 中相关规定, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成白色念珠菌悬液、枯草芽孢杆菌悬液, 浓度为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL; 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成铜绿假单胞菌悬液, 浓度分别为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL、 $10 \sim 100$ CFU/mL; 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成金黄色葡萄球菌悬液, 浓度分别为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL、 $10 \sim 100$ CFU/mL、小于 50 CFU/mL、50 ~ 100 CFU/mL; 用含 0.05% (mL/mL) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成黑曲霉孢子悬液, 浓度为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL^[5-8]。

1.2.2 供试液的制备

1.2.2.1 乳化剂的用量 取本品 60 g, 分别置 6 个无菌均质袋中, 10 克/袋, 分别加入无菌聚山梨酯 80 6、7、8、9、10、11 mL, 均质 2 min, 再分别加入无菌含 5% 聚山梨酯 80 的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 均质 2 min, 成 1:10 溶液。加入无菌聚山梨酯 80 6 mL 及 7 mL 均立刻分层, 8 mL 2 min 后分层, 9 mL 7 min 后分层, 10 mL 及 11 mL 稳定。结果表明, 10 g 样品需要聚山梨酯 80 量为 10 mL。

1.2.2.2 制备供试液 取本品 30 g 置无菌均质袋中, 加入无菌聚山梨酯 80 30 mL, 均质 2 min, 再加无菌含 5% 聚山梨酯 80 的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 300 mL, 均质 2 min, 成 1:10 溶液; 取 1:10 供试液 50 mL, 加无菌含 5% 聚山梨酯 80 的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 制成 1:20 供试液; 取 1:10 供试液 20 mL, 加无菌含 5% 聚山梨酯 80 的 pH7.0 氯化

钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 制成 1:50 供试液。

1.2.3 五种实验方法中各菌试验回收率的比较

1.2.3.1 常规法 试验组: 取 1:10 的供试液 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 0.1 mL “1.2.1” 所述试验菌悬液^[7], 混匀, 即为试验组。取含有白色念珠菌的混合液 4 mL, 分别置 4 个直径为 90 mm 的无菌平皿中 (1 毫升/平皿), 2 个平皿注入 TSA, 混匀, 另外两个平皿注入 SDA, 混匀; 取含有黑曲霉孢子的混合液, 同法操作; 取含有铜绿假单胞菌悬液、金黄色葡萄球菌悬液、枯草芽孢杆菌悬液的试验液各 2 mL, 分别置直径为 90 mm 的无菌平皿中 (1 毫升/平皿), 注入 TSA, 混匀, 凝固后按规定条件培养 (直径 90 mm 的无菌平皿培养基用量约 20 毫升/平皿)。

供试品对照组: 等量稀释液代替菌液, 其余同试验组。菌液对照组: 等量稀释液代替供试液, 其余同试验组。乳化剂对照组: 等量含乳化剂的稀释液代替供试品, 其余同试验组。

1.2.3.2 增加稀释液法 取 1:20 供试液 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 0.1 mL “1.2.1” 所述试验菌液, 混匀, 即为试验组; 其余对照组同 “1.2.3.1”。取上述混合液分别置直径为 90 mm 的无菌平皿中, 1 毫升/平皿, 每种混合液平行制备 2 个平皿, 注入规定的培养基, 凝固后按规定条件培养。取 1:50 供试液同法试验。

1.2.3.3 增加培养基体积法 取 1:10 的供试液 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 0.1 mL “1.2.1” 所述试验菌液, 混匀, 即为试验组; 其余对照组同 “1.2.3.1”。取上述混合液分别置直径为 150 mm 的无菌平皿中, 1 毫升/平皿, 每种混合液平行制备 2 个平皿, 注入规定的培养基, 凝固后按规定条件培养 (直径 150 mm 的无菌平皿培养基用量约 60 毫升/平皿)。

1.2.3.4 增加稀释液-增加培养基体积联合法 取 1:20 供试液 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 0.1 mL “1.2.1” 所述试验菌液, 混匀, 即为试验组; 其余对照组同 “1.2.3.1”。取上述混合液分别置直径为 150 mm 的无菌平皿中, 1 毫升/平皿, 每种混合液平行制备 2 个平皿, 注入规定的培养基, 凝固后按规定条件培养。取 1:50 供试液同法试验。

1.2.3.5 薄膜过滤法 取 1:10 的供试液 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 0.1 mL “1.2.1” 所述试验菌液, 混匀, 即为试验组; 其余对照组同 “1.2.3.1”。取各混合液 1 mL 用于制膜, 用 500 mL pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 5 次, 每次 100 mL。将制成的膜贴于对应培养基上, 按规定培养。

1.2.4 控制菌的方法适用性试验

1.2.4.1 常规法 取 1:10 供试液 30 mL, 分别接种于 3 瓶 100 mL 的 TSB 中, 每瓶 10 mL。一瓶加入不

大于 100 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液 1 mL, 为金黄色葡萄球菌试验组; 一瓶加入不大于 100 CFU/mL 的铜绿假单胞菌悬液 1 mL, 为铜绿假单胞菌试验组。一瓶加入等菌液量的稀释液, 为供试品对照组; 按规定进行培养、试验。

菌液组: 等量稀释液代替供试液, 其余同试验组。

阴性对照: 等量稀释液代替供试液和菌液, 其余同试验组。

1.2.4.2 增加培养基体积法 取 TSB 两组, 两组中 TSB 体积均分别为 200、300、400、500 mL。取 1:10 供试液, 分别接种于两组 TSB 中, 10 毫升/份, 一组加入浓度小于 50 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液(1 毫升/份); 另一组加入浓度为 50~100 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌悬液(1 毫升/份), 作为试验组; 按规定培养、试验。供试品对照组、菌液组、阴性对照组同“1.2.4.1”。

2 结果

2.1 计数方法适用性试验结果 分别按照(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组平均菌落数、乳化剂对照组平均菌落数/菌液对照组平均菌落数, 计算试验组和乳化剂对照组的回收率。结果见表 1~4。

表 2 增加稀释液、增加培养基体积、增加稀释液-增加培养基体积联用三种方法中金黄色葡萄球菌的回收率($n=3$)

批次	增加稀释液		增加培养基 体积	增加稀释液-增加培养基 体积	
	1:20	1:50	1:10	1:20	1:50
20210508	0.23	0.32	0.35	0.42	0.48
20210714	0.19	0.41	0.34	0.51	0.63
20210815	0.24	0.23	0.21	0.38	0.52

表 3 增加稀释液、增加培养基体积、增加稀释液-增加培养基体积联用三种方法中枯草芽孢杆菌的回收率($n=3$)

批号	增加稀释液		增加培养基 体积	增加稀释液-增加培养基 体积	
	1:20	1:50	1:10	1:20	1:50
20210508	0.45	0.61	0.32	0.42	0.58
20210714	0.31	0.46	0.43	0.48	0.63
20210815	0.32	0.49	0.32	0.64	0.38

表 4 薄膜过滤法中金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率($n=3$)

批次	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
20210508	0.73	0.86
20210714	0.95	0.91
20210815	0.93	0.74

由表 1 可知, 常规法试验中铜绿假单胞菌(批次 20210531、20210623、20210729 的回收率分别为 0.63、0.59、0.60)、白色念珠菌、黑曲霉菌回收率均在 0.5~2.0 范围内, 而金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率均小于 0.5; 由表 2~4 可知, 随着稀释液和培养基的增加, 会在一定程度上消除供试品的抑菌作用, 但金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率没有全部在 0.5~2.0 范围内, 而薄膜过滤法中两种试验菌回收率均符合要求。故需氧菌总数计数用薄膜过滤法; 霉菌和酵母菌总数计数用常规法。

2.2 控制菌适用性试验结果 培养物经相应的生化鉴定和 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统确认, 结果: 铜绿假单胞菌用常规法即可检出; 金黄色葡萄球菌可通过增大培养基体积的方法检出。但随着加菌量的不同, 培养基需要增加的体积也不同: 加菌量小于 50 CFU/mL 时, 培养基体积增加至 500 mL, 金黄色葡萄球菌可被检出; 加菌量为 50~100 CFU/mL 时, 培养基体积增加至 400 mL 可被检出。

3 讨论

有抑菌作用的乳膏剂在微生物限度检查中, 如何有效消除抑菌作用、解决滤膜堵塞, 是试验的关键问题^[9]。乳膏剂由水相、油相乳化形成, 微生物在油相和水相分布不同^[10-12], 而选择适宜的前处理方式使样品分散均匀, 可有效解决上述问题^[13]。对于油脂类供试品, 中国药典提出可用十四烷酸异丙酯、聚山梨酯 80 或其他无抑菌性的无菌表面活性剂充分混匀^[5], 通过查阅资料, 十四烷酸异丙酯为羧酸酯类化合物, 能与植物油、有机溶剂任意互溶, 不溶于水^[14-15]; 聚山梨酯 80 在水和乙醇及多种有机溶剂中易溶, 增溶作用不受溶液 pH 影响^[16], 故试验选取聚山梨酯 80 为乳化剂。因其来源、浓度不同时, 也会对试验菌的生长造成不同的影响^[17], 所以在保证样品充分乳化的同时, 乳化剂的使用量还要尽可能

表 1 常规法各试验菌回收率($n=3$)

批次	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌	黑曲霉菌	白色念珠菌	黑曲霉菌
20210508	0.02	0.00	0.67	0.74	0.82	0.61	0.54
20210714	0.08	0.03	0.57	0.67	0.89	0.67	0.72
20210815	0.06	0.02	0.61	0.72	0.61	0.84	0.82
乳化剂对照组	0.96	0.87	1.04	1.02	0.92	1.03	0.95

最小。通过试验,确定本样品 10 g 需要聚山梨酯 80 的量为 10 mL。关于制备供试液时的混匀方式,本文作者也曾尝试用研磨、45℃水浴恒温震荡等方式,但过程繁琐,薄膜过滤时容易出现堵塞现象。而使用均质器,混匀快速、简单,样品分散更均匀,很大程度上减少了薄膜过滤时堵塞现象。

氯霉素对革兰阳性、阴性细菌均有抑制作用^[18-19],仅凭表 1 中 3 个样品试验结果,确定采用常规方法检验铜绿假单胞菌,结果可能存在误差。故本试验又增加了 3 批不同批号的样品,进行铜绿假单胞菌常规法中回收率的试验比较,以排除假阴性的可能性。

表 2, 3 中,采用了 1:20、1:50 的样品溶液,回收率有所不同,但规律不明显,尤其是表 3 中,批号为 20210815 的样品,在增加稀释液-增加培养基体积联用的方法中,稀释度从 1:20 增加到 1:50,回收率反而大幅下降(0.64 降至 0.38)。究其原因,一是可能与方法有关,说明只加大 1 倍多的体积并不一定能使方法可行;另外,还可能与样品中实际加菌量有关,虽然符合加菌量不大于 100 CFU/mL 的规定^[5],但加菌量太小会与方法灵敏度不匹配,所以出现这种情况。这也提示我们在试验时要注意加菌量的不同可能对实验造成的影响。

在控制菌适用性试验中,金黄色葡萄球菌用常规法不能检出,尝试使用增加培养基体积的方法。而在一定浓度下,氯霉素的抑菌效果和加菌量有关,虽然都是加入“不大于 100 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌”,但实际加菌量的多少,对应需要增加的培养基体积可能有所不同。故在增加培养基体积的方法中,试验考察了不同加菌量对应不同培养基体积出现的结果,即方法的灵敏度,以增加可靠性。

氯霉素为广谱抗菌药物,有较强的抑菌性^[20],微生物限度检查方法选择不当会造成假阴性、漏检等现象。本文查阅了有关含氯霉素外用制剂的微生物限度检查方法的文献资料^[21-24],结合本样品试验结果,建立氯霉素氧化锌乳膏的微生物限度检查方法:霉菌和酵母菌总数的计数、铜绿假单胞菌的检查采用常规法;需氧菌总数计数采用薄膜过滤法;金黄色葡萄球菌的检查采用增加培养基体积法。该法为真实反映样品染菌情况提供了检验依据,也为其他同类样品的检验提供参考依据。

参考文献

[1] 李惠英,秦利芬,李聘,等.医院制剂紫黄软膏微生物限度检查法的建立[J].儿科药学杂志,2020,26(9):53-55.
[2] 郭社民,宋发祥.氯霉素氧化锌乳膏的制备及质量标准[J].中国药业,2014,23(21):54-55.

[3] 施敏,管敏,周琴妹.三种具有抑菌成分的外用制剂的微生物限度检查方法验证[J].安徽医药,2015,19(12):2314-2316.
[4] 庞云娟,樊文研,刘康连,等.药品微生物限度检查方法学验证的研究进展[J].中成药,2017,39(10):2137-2140.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版 四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:160-171.
[6] 马仕洪,刘鹏,杨利红,等.药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J].药物分析杂志,2018,38(5):877-882.
[7] 方燕玲,朱欢敏,林铁豪.《中国药典》2015年版微生物限度检查方法适用性中常见问题及分析[J].中国药品标准,2020,21(6):531-534.
[8] 刘冬玲,李芳,冯震,等.林可霉素利多卡因凝胶微生物限度检查方法的探究[J].药物分析杂志,2018,38(5):838-843.
[9] 李辉,杨晓莉,刘立科,等.3种咪唑类抗真菌乳膏剂微生物限度检查方法学研究[J].药物评价研究,2021,44(4):721-727.
[10] LIANG B, ZHANG K, WANG LY, et al. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 841. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00841.
[11] LI XX, MBADINGA SM, LIU JF, et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2017, 120: 170-185.
[12] WANG LY, KE WJ, SUN XB, et al. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(9): 4209-4221.
[13] 李辉,杨晓莉,梁泽梅,等.不同剂型硝酸咪康唑微生物限度检查方法适用性研究与评价[J].中国抗生素杂志,2018,43(1):80-84.
[14] 江志杰,张光华,牛振东,等.十四烷酸异丙酯在疏水性化妆品微生物检验中的应用[J].日用化学工业,2012,42(4):274-276.
[15] 李辉,李翠,杨晓莉,等.油脂类乳膏药品萃取后微生物在油相与水相中的分布状况研究[J].药物分析杂志,2019,39(3):496-501.
[16] 毕殿洲.药剂学[M].4版.北京:人民卫生出版社,1999:42.
[17] 赵新霞,杨淑先,王海波,等.聚山梨酯 80 对药品微生物限度检查的影响[J].中国药品标准,2019,20(3):224-230.
[18] 李端.药理学[M].4版.北京:人民卫生出版社,1999:327.
[19] 张宏波,王元银.0.25%氯霉素灭菌溶液在阻生下颌第三磨牙拔除术中的应用[J].安徽医药,2018,22(5):932-934.
[20] OLAJUYIGBE OO, R MCOOPOOSAMY, AFOLAYAN AJ. Effects and time-kill assessment of amoxicillin used in combination with chloramphenicol against bacteria of clinical importance [J]. Acta Biochim Pol, 2017, 64(4): 609-613.
[21] 余鹏,吴磊明,刘丹,等.复方氯霉素酊微生物限度检查方法适用性研究[J].今日药学,2018,28(8):523-525.
[22] 陈静,严佳,钟桂香,等.6种医院制剂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(6):527-531.
[23] 李翔,黎春彤,王晶,等.4种医院液体制剂微生物限度检验方法的建立[J].中国药师,2019,22(6):1183-1185.
[24] 李敏,龚亚,曹健,等.6种医院抑菌制剂的微生物限度检查方法适用性研究[J].中国医院用药评价与分析,2021,21(8):951-954.

(收稿日期:2021-12-01,修回日期:2022-01-20)