

苯酚滴耳液抑菌效力测定和评价

刘广桢, 沈振, 任丽宏, 孟晓丽(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要: 目的 按中国药典 2015 年版抑菌效力检查法测定苯酚滴耳液的抑菌效力。方法 以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、黑曲霉和白色念珠菌为试验菌株, 分别加入苯酚滴耳液中进行微生物的挑战试验, 在不同时间点检测样品中微生物的存活情况。结果 苯酚滴耳液的抑菌效力符合中国药典 2015 年版抑菌效力检查法的规定。结论 苯酚滴耳液本身已具备充分的抑菌效力, 可避免在贮藏和使用过程中发生微生物污染。

关键词: 苯酚滴耳液; 抑菌效力; 评价

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0645-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.031

Determination and Evaluation of Antimicrobial Effectiveness of Phenol Ear Drops

LIU Guangzhen, SHEN Zhen, REN Lihong, MENG Xiaoli(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study antimicrobial effectiveness of phenol ear drops by the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition). **METHODS** Using *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus* and *Candida albicans* as test strains, the antimicrobial effectiveness test was carried out, to evaluate the survival of microorganisms at the different time. **RESULTS** The antimicrobial effectiveness of phenol ear drops met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition). **CONCLUSION** Phenol ear drops possess an intrinsic antimicrobial activity, so as to protect them from growth of microorganisms inadvertently introduced during or subsequent to the manufacturing process.

KEY WORDS: phenol ear drops; antimicrobial preservatives; evaluation

耳用制剂系指原料药物与适宜辅料制成的直接用于耳部发挥局部治疗作用的制剂。对于多剂量包装的耳用制剂, 容易在贮藏和使用过程中发生微生物污染, 尤其是在治疗的过程中, 需要反复打开使用, 容易被微生物污染。如果没有足够的抑菌性能, 环境或治疗部位的微生物一旦大量侵入, 有可能破坏产品的品质, 甚至对人体造成直接的感染, 进而产生安全隐患。

中国药典 2010 年版附录中, 首次载收了抑菌剂效力检查法指导原则。中国药典 2015 年版将抑菌效力检查法指导原则调整为抑菌效力检查法。与 2010 版药典相比, 新版药典在存活菌数测定时间点设置和抑菌效力判定标准方面科学性更强, 且对各剂型分类要求不断细化, 测定方法可行性更强。

苯酚滴耳液为多剂量包装的耳用制剂, 具有消炎、止痛作用, 适用于中耳炎及外耳道炎的治疗。由于其为多剂量包装的制剂, 需要对其抑菌效力进行测定, 评价该产品是否具有充分的抗菌效力, 因此本实验按照中国药典 2015 年版抑菌效力

检查法对苯酚滴耳液的抑菌效力进行了考察^[1-13]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSC-1500 II A2-X 型生物洁净安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司); Equinox 集菌仪(默克化工技术有限公司); GHP-9270 型隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); MJ-250I 型真菌培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 菌种

铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、黑曲霉[CMCC(F)98003]和白色念珠菌[CMCC(F)98001]菌种 0 代均购于中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心, 工作使用第 3 代传代菌种。

1.3 样品

苯酚滴耳液(青岛大学附属医院, 规格: 10 mL: 0.2 g, 批号: 20150605)。

1.4 培养基

胰酪胨大豆琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培

作者简介: 刘广桢, 男, 硕士, 副主任药师

Tel: (0531)81216552

E-mail: l_guangzhen@sina.com

培养基和 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液均购于广东环凯微生物科技有限公司, 经培养基的适用性检查, 结果符合规定。

2 方法

2.1 菌液的制备

接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的第 3 代新鲜培养物至胰酪大豆胨琼脂培养基, 35 °C 培养 24 h; 接种白色念珠菌的第 3 代新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂培养基, 25 °C 培养 48 h。取上述培养物加适量的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将琼脂表面的培养物洗脱至无菌试管内, 加入适量 0.9% 无菌氯化钠溶液并采用比浊法制成每 1 mL 含菌数为 10^8 cfu 的菌悬液。接种黑曲霉第 3 代新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂培养基, 25 °C 培养 14 d 产生丰富的孢子, 加入 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱过滤至无菌试管内, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含孢子数为 10^7 cfu 的孢子悬液。取上述 $10^7 \sim 10^8$ cfu 菌(或孢子)悬液适量, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含菌(或孢子)量约为 100~1 000 cfu 的菌(或孢子)悬液。

2.2 存活菌数测定方法

抑菌效力检查实验过程中, 需要在规定的间隔时间测定每份供试品中存活菌数。由于苯酚滴耳液具有一定的抑菌活性, 对细菌和真菌均有抑菌作用, 尤其对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌作用。因此参考有关文献^[14-15], 细菌计数采用薄膜过滤法联合中和法, 真菌和酵母菌计数采用常规法联合中和法。为保证菌数测定结果能真实反映供试品中存活菌数的真实情况, 对选定的菌数测定方法进行方法适用性确认。

2.2.1 细菌计数方法适用性确认 薄膜过滤法联合中和法: 取苯酚滴耳液 1 mL, 分别置于无菌试管中, 加入含 0.5% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 9 mL, 混匀后, 制成 1:10 的供试液, 取 1:10 的供试液 1 mL 过滤, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 每次 100 mL·膜⁻¹, 共 5 次, 在最后一次冲洗液中加入上述制备好的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌菌悬液, 混匀, 使每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于 100 cfu, 取出滤膜, 菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上, 置 35 °C 培养 3 d, 观察并记录菌落数, 作为试验组。取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组

操作, 作为供试液对照组。取不含中和剂的相应稀释液替代供试液同试验组操作, 作为菌液对照组。取含中和剂的相应稀释液替代供试液同试验组操作, 作为中和剂对照组。

2.2.2 真菌和酵母菌计数方法适用性确认 常规法联合中和法: 取苯酚滴耳液 1 mL, 分别置于 2 支无菌试管中, 每管加入含 0.5% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 9 mL, 混匀后, 制成 1:10 的供试液, 分别加入上述制备好的白色念珠菌和黑曲真菌(或孢子)悬液, 混匀, 使每 1 mL 1:10 的供试液中含菌(或孢子)量 ≤ 100 cfu, 取此供试液 1 mL, 注入平皿中, 倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基, 平行制备 2 个平皿, 待凝固后, 置 25 °C 培养 5 d, 观察并记录菌落数, 作为试验组。取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组操作, 作为供试液对照组。取不含中和剂的相应稀释液替代供试液同试验组操作, 作为菌液对照组。取含中和剂的相应稀释液替代供试液同试验组操作, 作为中和剂对照组。

根据细菌、真菌和酵母菌计数方法适用性实验结果, 计算中和剂对照组菌落数与菌液对照组菌落数的比值, 计算试验组菌落数减去供试液对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值。

2.3 抑菌效力试验

取供试品 5 瓶, 分别直接接种铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉孢子悬液 0.1 mL, 使接种后供试液染菌量每 1 mL 约为 $10^5 \sim 10^6$ cfu, 充分混匀, 使供试品中的试验菌均匀分布, 然后置 25 °C 避光贮存。贮存过程中, 分别在 2, 7, 14 和 28 d 分别从供试品中取 1 mL, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 1:10, 1:100, 1:1 000 等稀释级的供试液, 细菌采用薄膜过滤法联合中和法计数, 真菌和酵母菌采用常规法联合中和法计数。根据菌落测定结果, 计算 1 mL 供试品各间隔时间的菌数, 并换算成 lg 值。

另取 5 个容器, 加入 0.9% 氯化钠溶液 10 mL, 然后与样品组同法操作分别直接接种铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉孢子悬液 0.1 mL, 充分混合, 然后用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 等稀释级的溶液, 细菌、真菌和酵母菌均采用常规法计数。

根据菌落测定结果,计算 1 mL 供试品中始浓度菌数,并换算成 lg 值。

3 结果

3.1 细菌、真菌和酵母菌计数方法适用性确认结果

细菌计数方法适用性实验结果:中和剂对照组菌落数与菌液对照组菌落数的比值,试验组菌落数减去供试液对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值,均在 0.7~1.4 范围内,方法适用性结果符合要求,说明可采用薄膜过滤法联合中和法对细菌进行计数。结果见表 1。

表 1 细菌计数方法适用性

Tab.1 Recovery results of bacteria count

薄膜过滤法联合中和法	回收率/%		
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
中和剂对照组	0.97	0.93	0.95
试验组	0.92	0.85	0.88

真菌和酵母菌方法适用性实验结果:中和剂对照组菌落数与菌液对照组菌落数的比值,试验组菌落数减去供试液对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值,均在 0.7~1.4 范围内,方法适用性实验结果符合要求,说明可采用常规法联合

表 3 抑菌效力试验结果

Tab.3 Results of antimicrobial preservatives

检查方法	0 h		2 d			7 d			14 d			28 d		
	菌数	lg 值	菌数	lg 值	lg 降	菌数	lg 值	lg 降	菌数	lg 值	lg 降	菌数	lg 值	lg 降
铜绿假单胞菌	470 000	5.67	<10	<1	>4.7	<10	<1	>4.7	<10	<1	>4.7	<10	<1	0
金黄色葡萄球菌	420 000	5.62	<10	<1	>4.6	<10	<1	>4.6	<10	<1	>4.6	<10	<1	0
大肠埃希菌	455 000	5.66	<10	<1	>4.7	<10	<1	>4.7	<10	<1	>4.7	<10	<1	0
白色念珠菌	123 500	5.09	<10	<1	>4.1	<10	<1	>4.1	<10	<1	>4.1	<10	<1	0
黑曲霉	125 000	5.10	<10	<1	>4.1	<10	<1	>4.1	<10	<1	>4.1	<10	<1	0

4 讨论

4.1 存活菌数的测定方法的确认

抑菌效力检查实验过程中,需要在规定的间隔时间测定每份供试品中存活菌数,因此存活菌数的测定方法的正确与否,直接关系能否真实反映药品抑菌效力的强弱。由于苯酚滴耳液具有一定的抑菌活性,对细菌和真菌均有抑菌作用,而聚山梨酯 80 能中和苯酚的抑菌作用,因此在存活菌数的测定方法中采用含 0.5%聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为稀释剂,该中和剂能中和该滴耳液中苯酚的抑菌作用,并且不影响微生物的生长。为保证菌数测定结果能真实反映供试品中存活菌数的真实情况,对选定的

中和法对真菌和酵母菌进行计数。结果见表 2。

表 2 真菌和酵母菌计数方法适用性

Tab.2 Recovery results of moulds and yeasts count

常规法联合中和法	回收率/%	
	黑曲霉	白色念珠菌
中和剂对照组	0.92	0.95
试验组	0.84	0.87

3.2 抑菌效力试验结果

苯酚滴耳液的抑菌效力试验结果显示,对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的抑制结果为与初始值比较,2, 7, 14 和 28 d 菌数下降均>4.7 lg;对金黄色葡萄球菌的抑制结果为与初始值比较,2, 7, 14 和 28 d 菌数下降均>4.6 lg;对白色念珠菌和黑曲霉的抑制结果为与初始值比较,2, 7, 14 和 28 d 菌数下降均>4.1 lg。苯酚滴耳液的抑菌效力试验结果均满足中国药典 2015 年版四部通则中抑菌效力检查法对耳用制剂抑菌效力最严格的 A 项规定,与初始值比较,2 d 细菌数下降均≥2 lg 值,7 d 细菌数下降均≥3 lg 值,14 d 真菌数下降均≥2 lg 值,28 d 细菌和真菌数对前一个测定时间增加的数量≤0.5 lg 值。结果见表 3。

菌数测定方法进行方法适用性确认,结果细菌计数可采用薄膜过滤法联合中和法,真菌和酵母菌计数可采用常规法联合中和法。

4.2 抑菌效力测定结果的分析

由于苯酚滴耳液为多剂量包装的耳用制剂,容易在贮藏和使用过程中发生微生物污染,尤其是在治疗的过程中,需要反复打开使用,容易被微生物污染;但苯酚滴耳液中的有效成分苯酚,本身具有一定的抑菌活性,对细菌和真菌均有抑菌作用,本实验按照中国药典 2015 年版抑菌效力检查法对其抑菌效力进行了测定,结果表明该产品具有充分的抗菌效力,可避免在贮藏和使用过程中发生微生物污染。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 1121.
- [2] GAO M, YANG M F, HUANG T. Study on the minimum effective bacteriostasis concentration of ethyl p-hydroxybenzoate in sodium cromoglicate eye drops [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(8): 1402-1406.
- [3] ZHANG C, SAI J Y, ZHANG X T, at el. Detection of bacteriostatic effect and evaluation of disposable of loxacin eyedrops [J]. J Jilin Univ(Med Ed)(吉林大学学报: 医学版), 2014, 40(1): 113-116.
- [4] XIAO X, TAN S, ZHENG D, at al. Study on preservative effect of compound aspartate dipotassium glycyrrhetate eye drops from 3 factories [J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23(13): 1213-1215.
- [5] FU R, WANG C, ZHAO X D, at el. Study on dosage screening of antimicrobial preservatives and antimicrobial effectiveness of levofloxacin eye drops [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(12): 2056-2060.
- [6] JIANG Z J, LI Y L, LIU W J, at el. Study on the preservatives-effectiveness of pirenixine ophthalmic solution [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(6): 704-708.
- [7] LI J, WANG Z J, XIANG L T. Evaluation and testing of antimicrobial preservatives in bendazac lysine eye drops [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(5): 884-888.
- [8] WANG H B, WEI C, ZHAO R Q, at el. Research of antibacterial effects of latanoprost eye drops [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24(1): 42-44.
- [9] XIA X J, DONG A M, ZHANG J Q. Studies on antimicrobial effectiveness of sodium hyaluronate eye drops(0.1%) [J]. J Pharm Res(药学研究), 2015, 34(8): 455-457.
- [10] DING B, XU X J, XIE Y C. Studies on antimicrobial effectiveness of hydrobromate galanthamine oral solution [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(12): 2312-2317.
- [11] WEN D M, XIA C S, FENG B K. Antiseptic selection of riavirin oral solution [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(45): 4251-4253.
- [12] LIU Y, WANG Z H, QU J Y, at el. Studies on antimicrobial effectiveness of antimicrobial preservatives for acetylcysteine oral solution [J]. J Pharm Res(药学研究), 2015, 34(3): 152-155.
- [13] HE C Y, WANG W W, YANG X L, at el. Test of antimicrobial effectiveness of compound carraghenates cream [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(5): 934-937.
- [14] ZENG J P, CUI R, LI Q X, at el. Establishment and validation of microbial limit test of phenol ear drops [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 78-81.

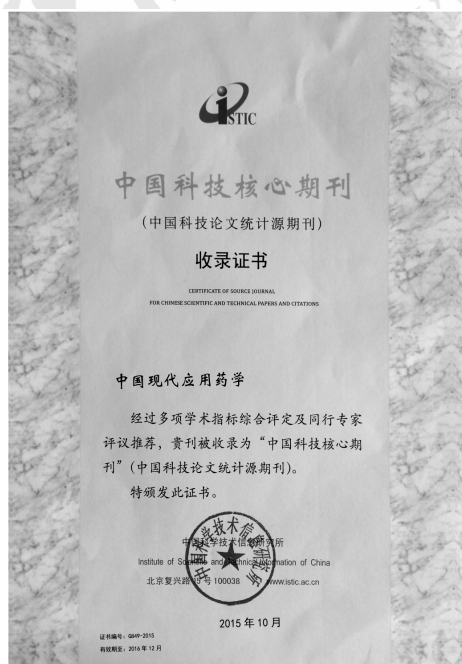
收稿日期: 2016-01-05

《中国现代应用药学》2015年期刊指标再创新高

2015年,《中国现代应用药学》期刊指标进一步提高,具体数据指标如下:

中国科学技术信息研究所(中信所)最新统计显示,《中国现代应用药学》的核心影响因子为0.951,在41种中国科技核心期刊中排名第2位。《中国学术期刊影响因子年报(2015版)》显示,《中国现代应用药学》影响因子为0.866,在69种药学期刊中排名第3位,在41种技术研究类药学期刊中排名第1位。

中国现代应用药学杂志社全体员工将与关心爱护本刊的编委、专家、作者、读者及广大药学工作者一起继续努力,不断提高刊物学术质量,打造药学科技期刊精品。




 中国知网
 中国知网数据库
 中国知网数据库

编号: GST-JJFR 2015 X0YD

中国学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术·2015版)

期刊名称: 中国现代应用药学

主办单位: 中国药学会

学科类别: 药学

研究层次: 技术研究

CN / ISSN: CN 33-1210/R ISSN 1007-7693

计量指标统计表

一、影响力指数(CI)									
本行数据				CI值				影响力指数(CI)学科排序	
1045	3111	58	0.509	0.915	0.046	297.272	7/69		
二、被引量、可被引文量(篇)									
2013年				2012年					
被引量	可被引文量	可被引文量比	被引量	可被引文量	可被引文量比	被引量	可被引文量	可被引文量比	被引量
426	391	0.92	386	356	0.92	299	308	0.86	
三、被引频次									
2014年度被引频次				2013年度被引频次					
总被引频次	学科被引频次	学科被引频次	学科被引频次	总被引频次	学科被引频次	学科被引频次	学科被引频次		
21	19	347	236	347	270	210	1478		
14	12	298	187	277	200	1478			
7	7	42	49	68	68	128			
1	1	1	1	1	1	1			
14	12	297	186	277	200	1466			
四、影响因子(JIF)									
影响因子类型	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子	影响因子
复合JIF	0.054	1.045	0.782	0.781	0.605	0.609	0.609		
学科JIF	0.056	0.964	0.983	0.949	0.423	0.423	0.423		
学科JIF	0.059	0.964	0.981	0.946	0.42	0.42	0.42		
五、其他参考指标									
复合JIF与学科JIF平均数(期刊平均影响因子)与期刊平均影响因子(期刊平均影响因子)之比(复合JIF与学科JIF平均数(期刊平均									