

菌总数采用常规法, 大肠埃希菌检查、耐胆盐革兰阴性菌检查和沙门菌检查(针对八珍胶囊)都采用直接接种法。3 个企业 23 批次八珍胶囊和 3 个企业 8 批次八珍片样品微生物限度检查结果均符合规定, 结果较为满意。污染的微生物主要为药材原料和环境中常见的细菌和酵母菌, 不同厂家的八珍胶囊和八珍片样品污染的微生物种类较为相似。

## REFERENCES

- [1] USP35-NF30 [S]. 2012: Appendix 61.
- [2] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 1105-1107.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 VIII C.
- [4] MEI Q X. The new usage of Bazhen pills (granules) [J]. *Family Tradit China Med(家庭中医药)*, 2003, 10(2): 53-54.
- [5] SU D M, MA X R, XU H Y, et al. *Examine Technique of Pharmaceutical Microbiology* [M]. Beijing: Hualing Publishing House, 2007.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2005: 附录 VIII C.
- [7] CHEN Z Y, XIA J, XI S D. Establishment of microbial limit

- test for Bazhen preparations and the analysis of the test results [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2016, 36(4): 758-766.
- [8] YOU Y N, CHEN X Q, ZHOU Z Y, et al. Comparison the colony counting method between the 2005 version Chinese Pharmacopoeia and the mainly overseas pharmacopoeia [J]. *Chin Pharm Aff(中国药事)*, 2010, 24(6): 587-589.
- [9] 朱文娟. 大肠菌群检查与胆汁耐受革兰阴性菌检查比较研究[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(34): 109-111.
- [10] ZHENG X L, WANG Z N, WANG Z J, et al. Establishment of the environmentally microbial library in the drug sterility testing laboratory [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(7): 847-850.
- [11] KANG Y J, SHEN M, WANG H L, et al. Diversity, microbial ecology and isolated methods of plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) [J]. *Hubei Agricult Sci(湖北农业科学)*, 2012, 51(24): 5553-5558.
- [12] SOTIRIOS T, SOTIRIOS P, JOSEPH M, et al. *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: a subacute entity with high mortality. Case report and review [J]. *Med Mycol Case Report*, 2014(6): 46-50.
- [13] DINIZ P L J, JANAINA V R S A, EVELIN R M, et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries[J]. *J Occup Med Toxicol*, 2012, 7(1): 11-17.

收稿日期: 2015-07-07

## 瑞他莫林软膏的微生物限度检查适用性试验

郑小玲, 王征南, 李珏(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

**摘要:** 目的 建立瑞他莫林软膏的微生物限度检查方法, 并进行适用性实验。方法 用十四烷酸异丙酯溶解后, 按照中国药典 2015 年版第四部通则 1105 和 1106 对瑞他莫林软膏进行微生物限度检查适用性实验。需氧菌总数计数、真菌和酵母菌总数计数采用降低取样量后薄膜过滤, 并在水相冲洗液中加入乳化剂聚山梨酯 80, 控制菌检查采用培养基稀释法。结果 需氧菌总数计数、真菌和酵母菌总数计数适用性实验中的回收率比值均在 0.5~2 内; 控制菌检查适用性实验中未检出金黄色葡萄球菌, 检出铜绿假单胞菌。结论 瑞他莫林软膏具有较强的抑菌性且基质特殊, 按照中国药典 2015 年版规定, 本试验建立的方法可作为瑞他莫林软膏的微生物限度检查方法。

**关键词:** 瑞他莫林; 微生物限度检查; 适用性试验; 薄膜过滤法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0634-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.028

## Applicability Test of Microbial Limit Test for Retapamulin Ointment

ZHENG Xiaoling, WANG Zhengnan, LI Jue(*Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish and verify a method for the microbial limit test of Retapamulin ointment. **METHODS** The applicability test for Retapamulin ointment was conducted according to the microbial limit test in the general rules 1105 and 1106 of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) Vol V. Retapamulin ointment was dissolved with isopropyl myristate, and then filtrated by membran. After filtration, total count of aerobic bacteria, total count of molds and yeasts with reducing the amount of sample and adding Tween-80 in aqueous washing solution, the culture medium dilution method was used for control microorganisms test. **RESULTS** The recovery ratios of applicability test of total count of aerobic bacteria and total count of molds were in the range of 0.5~2. *Staphylococcus aureus* was not detected and *Pseudomonas aeruginosa* was detected

作者简介: 郑小玲, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: 88920169@qq.com

in the applicability test of control microorganisms test. **CONCLUSION** In accordance with the provisions of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition), this method can be applied for the microbial limit test of Retapamulin ointment control.

**KEY WORDS:** retapamulin; microbial limit test; applicability test; membrane filtration

瑞他莫林是一种半合成的短截北风菌素类抗菌药物,其软膏主要用于治疗金黄色葡萄球菌和化脓链球菌感染的疱疹病<sup>[1]</sup>。该软膏具有较强的抑菌性,且由较特殊的辅料基质组成,目前尚无确切的微生物限度检查方法。本研究根据该品种的特殊性质建立了微生物限度检查方法,并按照中国药典2015年版四部通则1105和1106的要求进行了方法适用性试验。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂

HTY-2000B型集菌仪(杭州高得泰林医疗器械有限公司);一次性薄膜过滤器(杭州高得泰林医疗器械有限公司,批号:201500208,规格:FC502,孔径:0.45 μm;材质:混合纤维素);GWP-9160型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);SHP-250型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);MLS-3780高压蒸气灭菌器(日本三洋公司);HTY-智能匀浆仪(杭州高得泰林医疗器械有限公司)。

瑞他莫林软膏(浙江得恩德制药有限公司,批号:141201、141202、141203,规格:1%:10g);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:3103691)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:3102307)和溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号:3102669)由广东环凯微生物科技有限公司生产,沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:20140220)和胰酪大豆胨液体培养基(批号:20140329)由北京奥博星生物技术有限责任公司生产,以上培养基均按使用说明书配制,适用性检查结果均符合中国药典2015年版规定<sup>[2]</sup>;pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司,批号:1403242);十四烷酸异丙酯(西格玛奥德里奇公司,批号:101269154);聚山梨酯80(国药集团化学试剂有限公司,批号:20131016)。

### 1.2 菌株

枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]和白色念珠菌[CMCC(F)98001]均由中国医学细菌保藏中心提供,黑曲霉[CMCC(F)98003]由中国药品生物制品检定所提供,用于菌液制备的工作菌株均为第3代。

## 2 方法

### 2.1 菌液的制备

按照中国药典2015年版要求,接种金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中,33℃培养18h;接种枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨琼脂培养基,33℃培养24h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中,23℃培养48h。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含菌数≤100cfu的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基,23℃培养120h,用5mL含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液将孢子洗脱,再用无菌毛细吸管吸出孢子悬液至无菌试管内,用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含孢子数≤100cfu的孢子悬液。

### 2.2 计数方法适用性试验

**2.2.1 供试液的制备** 取本品10g,用保温至45℃的十四烷酸异丙酯加至100mL,7500r·min<sup>-1</sup>匀浆2min,制成1:10供试液。

**2.2.2 试验组** 取“2.2.1”项下供试液0.1mL,加入100mL保温至45℃含有0.5%聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,同时加入1mL“2.1”项下制备的菌液,摇匀后薄膜过滤,每膜用上述缓冲液800mL分次冲洗过滤,取出滤膜贴至相应的琼脂平皿,按中国药典2015年版规定培养。需氧菌总数计数的试验菌株为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉,对应的试验培养基为胰酪大豆胨琼脂培养基。真菌和酵母菌总数计数的试验菌株为白色念珠菌和黑曲霉,对应的试验培养基为沙氏葡萄糖琼脂培养基。每种试验菌株的试验组同法操作2次。

**2.2.3 供试品对照组** 取“2.2.1”项下供试液0.1mL,不加菌液,按试验组的计数方法,测定供试品本底菌数。每种试验菌株的供试品对照组同法操作2次。

**2.2.4 菌液对照组** 用pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液替代供试液,在100mL稀释液中加入1mL试验菌液,按试验组的计数方法测定其菌数。

### 2.3 控制菌检查方法适用性试验

**2.3.1 供试液的制备** 按“2.2.1”项下方法制备供试液。

**2.3.2 金黄色葡萄球菌检查适用性试验** 取“2.3.1”项下供试液 10 mL, 接种至 500 mL 胰酪大豆胨液体培养基, 加入“2.1”项下制备的金黄色葡萄球菌菌悬液 1 mL, 33 °C 培养 18 h; 取上述培养物划线接种至甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 33 °C 培养 24 h。

**2.3.3 铜绿假单胞菌检查适用性试验** 取“2.3.1”项下供试液 10 mL, 接种至 200 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 再加入“2.1”项下制备的铜绿假单胞菌菌悬液 1 mL, 33 °C 培养 18 h; 取上述培养物划线接种至溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上, 33 °C 培养 24 h。

## 3 结果

### 3.1 计数方法适用性试验

按以下方法计算回收率: 试验组菌回收率比值=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数, 结果见表 1~2。试验组菌回收率比值均在中国药典 2015 年版规定的 0.5~2 内, 表明本品的计数方法可采用薄膜过滤法。

表 1 需氧菌总数计数适用性试验结果

Tab. 1 Results of applicability test of total count of aerobic bacteria

试验菌株	需氧菌总数计数/cfu·mL <sup>-1</sup>			
	试验组	供试品对照组	菌液对照组	回收率比值
金黄色葡萄球菌	84	0	116	0.7
铜绿假单胞菌	52	0	44	1.2
枯草芽孢杆菌	45	0	65	0.7
白色念珠菌	53	0	63	0.8
黑曲霉	37	0	45	0.8

表 2 真菌和酵母菌总数计数适用性试验结果

Tab. 2 Results of applicability test of total count of molds and yeasts

试验菌株	真菌和酵母菌总数计数/cfu·mL <sup>-1</sup>			
	试验组	供试品对照组	菌液对照组	回收率比值
白色念珠菌	80	0	72	1.1
黑曲霉	47	0	48	1.0

### 3.2 控制菌检查方法适用性试验

本试验未检出金黄色葡萄球菌, 检出铜绿假单胞菌。由于本品剂型的特殊性, 如按中国药典 2015 年版规定的控制菌取样量, 则供试液无法通

过滤膜过滤, 故不能采用薄膜过滤法消除供试品的抑菌活性; 且本品对金黄色葡萄球菌有极强的抑菌性, 经过试验确认采用培养基稀释法也无法消除供试品对该试验菌的抗菌作用。中国药典 2015 年版规定如果经过试验确证供试品对试验菌的抗菌作用无法消除, 可认为受抑制的微生物不易存在于该供试品中, 可选择抑菌成分消除相对彻底的方法进行供试品的检查<sup>[2]</sup>, 故最终选择培养基稀释法进行该品种的控制菌检查, 金黄色葡萄球菌控制菌检查培养基用量为 500 mL, 铜绿假单胞菌控制菌检查培养基用量为 200 mL。

## 4 讨论

软膏剂微生物限度检查中的供试液制备一直比较繁琐, 尤其是非水溶性又具抗菌作用的软膏制剂, 其微生物限度检查法的报道极少<sup>[3-4]</sup>。瑞他莫林具有强抗菌性<sup>[5]</sup>, 采用平皿法进行需氧菌总数计数适用性试验时, 发现本品对试验菌株具有较强的抑制能力, 除白色念珠菌外, 其余 4 种试验菌株的回收率比值均<0.5, 故另用薄膜过滤法消除供试品的抑菌活性。

本品为软膏剂, 辅料主要为脂溶性的白凡士林, 考虑到供试液以及后续冲洗液的膜过滤效果, 选择十四烷酸异丙酯进行 1:10 供试液的制备, 并在水相冲洗液中加入具有较强表面活性的乳化剂聚山梨酯 80<sup>[6]</sup>。因为白凡士林熔点较高, 采用 45 °C 保温后进行膜过滤效果不理想, 且该辅料在处方中比例较大, 取 1:10 供试液 1 mL 稀释后进行膜过滤, 发现白凡士林成分严重影响滤膜的通透性, 故尝试进一步稀释降低白凡士林含量以保证膜过滤效果。当选择十四烷酸异丙酯作为制备 1:100 供试液的稀释液时, 十四烷酸异丙酯会降低水相冲洗液(含 0.5% 聚山梨酯 80)过膜的通透性, 导致冲洗液无法过膜; 如另选择含有 0.5% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为 1:100 供试液的稀释剂时, 则供试液不能完全乳化分散形成均一的溶液, 导致取样不均匀, 影响计数结果的准确性。结合该品种微生物限度标准规定, 取 1:10 供试液 0.1 mL 加至 100 mL 45 °C 含 0.5% 聚山梨酯 80、pH 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 混匀后薄膜过滤。取样量少可能造成微生物取样代表性不均匀, 所以每种试验菌株的回收率试验至少同法操作 2 次。

中国药典 2015 年版已经取消离心法和萃取

法,对本品进行控制菌检查时,若按中国药典 2015 年版规定的供试液取样量取样则无法通过滤膜过滤,因此本研究参照一般的抑菌性非水溶性软膏剂控制菌检查采取的培养基稀释法进行控制菌检查试验<sup>[7]</sup>。瑞他莫林对金黄色葡萄球菌的抑制性极强<sup>[5]</sup>,培养基稀释法无法消除其对该试验菌的抑菌作用。类似情况在很多强抑菌性品种的控制菌检查中都存在,笔者曾经在建立对革兰氏阴性菌有强抗菌作用的甲磺酸帕珠沙星的控制菌检查法时,联合多种方法都无法消除其对大肠埃希菌的抑制作用。如果在进行计数方法适用性试验时,发现没有适宜消除供试品抑菌活性的方法,建立的方法对特定试验菌回收失败,表明供试品对该菌具有较强抗菌活性,同时也表明供试品不易被该类微生物污染。但是供试品也可能仅对特定试验菌株具有抑制作用,而对其他菌株没有抑制作用<sup>[2]</sup>,所以采用建立的方法进行微生物计数检查具有一定的意义。但是在控制菌检查中建立只针对某种致病菌的检查方法时,无法消除对该菌的抑

制作用,中国药典 2015 年版中也表明这种情况下受抑制的该种致病菌不易存在于供试品中<sup>[2]</sup>,笔者建议对该品种的控制菌检查项目应进行调整或者做进一步研究,使控制菌检查更具有意义。

## REFERENCES

- [1] 游然,叶卉,宋婉玲,等.截短侧耳素类衍生物及瑞他莫林的研究进展[J].中兽药,2009,7(11):844-850.
- [2] 中国药典.四部[S].2015:140-149.
- [3] 苏德模,张新妹,特玉香,等.眼膏软膏剂微生物限度检查法的研究[J].药物分析杂志,2003,23(4):335-338.
- [4] CHEN Y, WU M, LAN H M, et al. Methodological validation for microbial limit test of three kinds of hospital ointment preparation [J]. China Med Pharm(中国医药科学), 2014, 4(12): 105-107.
- [5] 叶立.治疗疱疹病毒的新药——瑞他莫林(retapamulin)[J].天津药学,2008,20(6):75-76.
- [6] ZENG J P, CUI R, LI Q X, et al. 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.
- [7] CAO P, LI J, YUAN H W. Examining microbiotic limitation of ointment insoluble in water [J]. Drug Stand China(中国药标准), 2003, 4(2): 41-44.

收稿日期:2016-02-26

## 健儿消食口服液中抑菌剂及抑菌效力研究

王银环, 张文婷, 王征南, 相露婷, 李珏\* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

**摘要:**目的 考察全国评价性抽验的 35 家企业 220 批市售健儿消食口服液中抑菌剂的使用情况,探索抑菌剂种类、浓度、货架期、pH 值等不同因素对抑菌剂抑菌效力的影响。方法 采用酸度计对全国抽验的 220 批健儿消食口服液的 pH 值进行检测;采用 HPLC-UV 对 220 批健儿消食口服液中山梨酸钾的含量进行测定,色谱条件:以乙腈-0.02 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵(5:95)为流动相;检测波长为 254 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。参照中国药典 2010 年版一部附录 X VIII D 抑菌剂效力检查法指导原则和中国药典 2015 年版四部通则 1121 抑菌效力检查法进行抑菌效力测定。结果 35 家企业 220 批健儿消食口服液的 pH 值均为 3.5~4.7。91.43%(32/35)的企业使用的抑菌剂种类与标准一致,2.86%(1/35)的企业更改抑菌剂种类,5.71%(2/35)的企业添加其他种类抑菌剂。17.14%(6/35)的企业使用的山梨酸钾含量为 0.6~0.7 mg·mL<sup>-1</sup>,42.86%(15/35)使用的山梨酸钾含量为 0.5~0.6 mg·mL<sup>-1</sup>,8.57%(3/35)使用的山梨酸钾含量<0.3 mg·mL<sup>-1</sup>,其中 2.86%(1/35)未使用山梨酸钾,14.28%(5/35)使用的山梨酸钾含量>0.7 mg·mL<sup>-1</sup>,其中 2.86%(1/35)使用的山梨酸钾含量高达 2.3 mg·mL<sup>-1</sup>。抑菌剂浓度和 pH 值 2 个因素对抑菌效力的影响较大,而货架期对抑菌效力的影响不大。结论 健儿消食口服液中抑菌剂的使用种类和浓度存在违规现象,使该产品安全性存在一定风险。抑菌剂浓度一定时,pH 值越低,抑菌效力越强;pH 值一定时,抑菌剂浓度越高,抑菌效力越强,且抑菌效力对 pH 值的依赖性强于对一定范围内抑菌剂浓度的依赖性。

**关键词:** 健儿消食口服液; pH; 抑菌剂; 山梨酸钾; 抑菌效力

中图分类号: R921.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0637-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.029

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制重点实验室(2014E10006); 2014 年度国家药品计划抽验任务

作者简介: 王银环,女,硕士 Tel: (0571)86459427 E-mail: 779829255@qq.com \*通信作者: 李珏,女,硕士,副主任药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: lj811005@163.com