

# 四磨汤合剂中抑菌剂的抑菌效力评价

刘广桢, 张媛媛, 冷佳蔚, 许嘉平, 林林\* (山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

**摘要:** 目的 对四磨汤合剂中抑菌剂的抑菌效力进行评价。方法 采用 HPLC 对四磨汤合剂中抑菌剂对羟基苯甲酸乙酯的含量进行测定, 并以金黄色葡萄球菌、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, 分别加入四磨汤合剂中进行微生物试验, 考察在不同时间点样品中微生物的存活情况。结果 四磨汤合剂中对羟基苯甲酸乙酯的含量为 0.04%, 四磨汤合剂中抑菌剂对细菌的抑制能力较强, 而对真菌的抑制能力较弱。结论 四磨汤合剂中抑菌剂的抑菌效力符合中国药典 2010 年版的要求, 不符合中国药典 2015 年版的要求, 现有的抑菌剂处方需进一步优化。

**关键词:** 四磨汤合剂; 对羟基苯甲酸乙酯; 高效液相色谱法; 抑菌效力

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)02-0232-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.017

## Evaluation on Antimicrobial Effectiveness of Preservative in Simotang Mixture

LIU Guangzhen, ZHANG Yuanyuan, LENG Jiawei, XU Jiaping, LIN Lin\* (Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To evaluate antimicrobial effectiveness of preservative in simotang mixture. **METHODS** HPLC was adopted to determinate preservative ethylparaben content of simotang mixture. Using *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. niger* and *C. albicans* as test strains, the antimicrobial effectiveness test was carried out to evaluate the survival of microorganisms at the different time. **RESULTS** The concentration of ethylparaben in the sample was 0.04%. Simotang mixture had the strong bacteriostasis and poor fungistasis. **CONCLUSION** The antimicrobial effectiveness of preservative in simotang mixture meets the requirements of the Ch.P (2010), but does not meet the requirements of the Ch.P (2015). The existing antimicrobial formulations need to be optimized.

**KEY WORDS:** Simotang mixture; ethylparaben; HPLC; antimicrobial effectiveness

国内长期以来在药物制剂研发过程中, 对抑菌剂的合理使用和质量控制缺少相关法规的强制要求。直到中国药典 2010 年版才收载“抑菌剂效力检查法”指导原则<sup>[1]</sup>, 中国药典 2015 年版又将“抑菌效力检查法指导原则”上升为“抑菌效力检查法”<sup>[2]</sup>, 同时在制剂通则合剂项下规定“除另有规定外, 在制剂确定处方时, 该处方的抑菌效力应符合抑菌效力检查法的规定”<sup>[2]</sup>。由原来的指导性要求上升为强制性规定, 可见国家对药品抑菌剂使用规范性的重视。

四磨汤合剂由枳实、香附、沉香、木香等 6 味药材加工制成, 具有行气止痛的功效, 用于术后肠胀气<sup>[3]</sup>。由于四磨汤合剂为多剂量包装的口服制剂, 在使用过程中需要反复打开包装, 而其主要成分没有明显的抑菌活性, 这就需要加入抑菌剂, 建立良好的防腐体系, 保证产品的微生物安全性, 消除使用过程中的安全隐患。现有的四磨汤合剂处方中的抑菌剂用量依据使用经验确定,

并未对抑菌剂的使用进行系统的科学评估。本研究采用 HPLC 测定四磨汤合剂中的抑菌剂对羟基苯甲酸乙酯的含量, 并对该制剂的抑菌效力进行测定, 以评价四磨汤合剂中抑菌剂添加量的合理性<sup>[4-8]</sup>。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

MS105DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 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); GHP-9270 型隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); MJ-250I 型霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司)。

### 1.2 试剂

四磨汤合剂(新泰市中医院, 规格: 100 mL, 包装为玻璃瓶, 批号: 150816); 对羟基苯甲酸甲酯对照品(批号: 100278-201404, 含量: 100%)和对羟基苯甲酸乙酯对照品(批号: 100847-201203,

**作者简介:** 刘广桢, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0531)81216552  
副主任药师 Tel: (0531)81216523 E-mail: linlinsfda@163.com

E-mail: l\_guangzhen@sina.com \*通信作者: 林林, 女, 硕士,

含量: 100%)均购于中国食品药品检定研究院;胰酪胨大豆琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基和 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。甲醇为色谱纯,乙酸为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 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]均购于中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心。

## 2 方法

### 2.1 抑菌剂含量测定

色谱条件:色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm),以 1%乙酸溶液-甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 254 nm,柱温为 35 ℃;流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>;进样体积:20 μL。

精密称取对羟基苯甲酸乙酯对照品 9.40 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。取对照品储备液加水制成每 1 mL 含对羟基苯甲酸乙酯 47.0, 23.5, 9.40, 4.70, 2.35 μg 的溶液,按上述色谱条件进行试验,记录色谱图。取供试品 5 mL,置 200 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件进行试验,记录色谱图,采用标准曲线法计算供试品中抑菌剂的含量。

### 2.2 抑菌效力测定

**2.2.1 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胨大豆琼脂培养基,35 ℃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 ℃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<sup>8</sup> 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 ℃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<sup>7</sup> cfu 的孢子悬液。取上述 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> 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。

**2.2.2 计数方法适用性确认** 取四磨汤合剂 1 mL,分别置于无菌试管中,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。取 1:10 的供试液 9.9 mL,加入上述制备好的大肠埃希菌 0.1 mL,混匀,分别取此溶液 2 份,每份 1 mL 注入平皿中,倾注胰酪胨大豆琼脂培养基,待凝固后置 35 ℃培养 3 d,金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌同法操作;另取 1:10 的供试液 9.9 mL,加入上述制备好的白色念珠菌 0.1 mL,混匀,分别取此溶液 2 份,每份 1 mL 注入平皿中,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,待凝固后置 25 ℃培养 5 d,黑曲霉同法操作,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。取稀释液替代供试液同试验组操作,作为菌液对照组。

**2.2.3 存活菌数测定** 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 1.0 mL,使接种后供试液染菌量为 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,充分混匀,使供试品中的试验菌均匀分布,然后置 25 ℃避光贮存。贮存过程中,分别在 14 d 和 28 d 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、霉菌和酵母菌均采用“2.2.2”项下方法计数。

## 3 结果

### 3.1 抑菌剂含量测定结果

根据记录的对照品色谱图,以对照品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程  $y=116.89x+0.7091$ ,相关系数  $r=1.0000$ ,表明线性关系良好。根据记录的样品色谱图,样品中对羟基苯甲酸乙酯的含量为 0.04%。四磨汤合剂处方中对羟基苯甲酸乙酯的添加量为 0.05%,测定结果在处方添加量的 80%~120%内,符合要求。

### 3.2 抑菌效力试验结果

采用 1:10 的供试液进行计数方法适用性确认,按照下式计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{试验组菌落数} - \text{供试液对照组菌落数}}{\text{菌液对照组菌落数}}$$

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收率分别为 0.83, 0.86, 0.83, 0.93 和 0.96,均在 0.7~1.4 内,方法适用性试验结果符合要求,说明 1:10 的供试液

可采用平皿法对细菌和真菌进行计数。而 1:100、1:1 000 等稀释级的供试液中供试品的浓度均低于 1:10 的供试液,因此 1:100、1:1 000 等稀释级的供试液均可采用平皿法对细菌和真菌进行计数。结果见表 1。

存活菌数测定结果显示,四磨汤合剂对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的抑制结果为 14 d 和 28 d 与初始值比较菌数下降>5.0lg;对金黄色葡萄球菌的抑制结果为 14 d 和 28 d 与初始值比较菌数下降>4.9lg;对白色念珠菌的抑制结果为 14 d 和 28 d 与初始值比较菌数下降 0.1lg;对黑曲霉的抑制结

果为 14 d 和 28 d 与初始值比较菌数下降 0.2lg。结果见表 2。

表 1 计数方法适用性试验结果

Tab. 1 Recovery results of counts

| 组别  | 大肠埃希菌 | 金黄色葡萄球菌 | 铜绿假单胞菌 | 白色念珠菌 | 黑曲霉  |
|-----|-------|---------|--------|-------|------|
| 菌液组 | 54    | 87      | 80     | 75    | 68   |
|     | 48    | 90      | 86     | 80    | 70   |
| 供试品 | 0     | 0       | 0      | 0     | 0    |
| 对照组 | 0     | 0       | 0      | 0     | 0    |
| 试验组 | 41    | 75      | 67     | 70    | 64   |
|     | 44    | 77      | 70     | 74    | 68   |
| 回收率 | 0.83  | 0.86    | 0.83   | 0.93  | 0.96 |

表 2 抑菌效力试验结果

Tab. 2 Results of antimicrobial effectiveness

| 菌种      | 0 h     |      | 14 d    |      |      | 28 d    |      |      |
|---------|---------|------|---------|------|------|---------|------|------|
|         | 菌数      | lg 值 | 菌数      | lg 值 | lg 降 | 菌数      | lg 值 | lg 降 |
| 铜绿假单胞菌  | 890 000 | 5.95 | <10     | <1   | >5.0 | <10     | <1   | >5.0 |
| 金黄色葡萄球菌 | 730 000 | 5.86 | <10     | <1   | >4.9 | <10     | <1   | >4.9 |
| 大肠埃希菌   | 910 000 | 5.96 | <10     | <1   | >5.0 | <10     | <1   | >5.0 |
| 白色念珠菌   | 224 000 | 5.35 | 200 000 | 5.30 | 0.1  | 180 000 | 5.26 | 0.1  |
| 黑曲霉     | 195 000 | 5.29 | 130 000 | 5.11 | 0.2  | 125 000 | 5.10 | 0.2  |

#### 4 讨论

目前医疗机构制剂中,常用的抑菌剂有对羟基苯甲酸酯类,该类抑菌剂随碳链的增加,亲水性降低,抗菌效力增加,作用机制为其未解离的分子亲油性强,易透过细胞膜进入细胞内,与病原微生物酶系统结合影响或阻断其新陈代谢,从而起到抑菌作用。目前该类最常用的品种为对羟基苯甲酸乙酯,普遍应用于医疗机构制剂的液体制剂处方中。为考察四磨汤合剂中抑菌剂使用情况,参考有关文献建立了四磨汤合剂中对羟基苯甲酸乙酯含量的测定方法,结果四磨汤合剂中对羟基苯甲酸乙酯含量为 0.04%,在处方中对羟基苯甲酸乙酯的添加量(0.05%)的 80%~120%,符合要求。

中国药典 2010 年版二部抑菌效力检查法指导原则中口服制剂的抑菌效力标准“对细菌的抑制结果为与初始值比较,14 天菌数下降不少于 1.0lg,14 天到 28 天菌数不增加;对真菌的抑制结果为与初始值比较,14、28 天菌数不增加”<sup>[1]</sup>。中国药典 2015 年版四部抑菌效力检查法中口服制剂的抑菌效力标准“对细菌的抑制结果为与初始值比较,14 天菌数下降不少于 3lg,14 天到 28 天菌数不增加;对真菌的抑制结果为与初始值比较,14 天菌数下降不少于 1lg,14 天到 28 天菌数不增加”<sup>[2]</sup>。可见四磨汤合剂抑菌效力符合中国药典 2010 年版的要求,不符合 2015 年版的要求。

由于四磨汤合剂中对羟基苯甲酸乙酯的添加量已经达到中国药典 2015 年版中口服液体制剂中对羟基苯甲酸乙酯添加量的上限,因此建议四磨汤合剂中选用比对羟基苯甲酸乙酯抗真菌能力更强的抑菌剂。

#### REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[M].2010:附录 134-135.
- [2] 中国药典.四部[M].2015:通则 151-153,通则 26.
- [3] 山东省食品药品监督管理局.山东省医疗机构制剂规范[M].第一版第一册,济南:山东科学技术出版社,2013:87-88.
- [4] FU R, WANG C, ZHAO X D, et al. 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.
- [5] JIANG Z J, LI Y L, LIU W J, et al. Study on the preservatives-effectiveness of pirenoxine ophthalmic solution [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(6): 704-708.
- [6] LIU Y, WANG Z H, QU J Y, et al. Studies on antimicrobial effectiveness of antimicrobial preservatives for acetylcysteine oral solution [J]. J Pharm Res(药学研究), 2015, 34(3): 152-155.
- [7] XIA Z L, ZHOU B. Screening concentration of antimicrobial preservative for ibuprofen suspension and its antimicrobial effectiveness [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2016, 36(3): 154-156.
- [8] WANG Y H, ZHANG W T, WANG Z N, et al. Study on the antimicrobial and antimicrobial effectiveness of jianer xiaoshi oral liquids [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 637-642.

收稿日期: 2016-07-31