

· 研究报告 ·

复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法适用性试验研究

陈 静, 严 佳, 钟桂香, 宋洪涛 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350025)

[摘要] **目的** 建立复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法。**方法** 根据《中国药典》2015年版四部通则 1105、1106、1107 具体规则作为检测依据。对薄膜过滤冲洗液体积、供试液稀释级、中和剂的含量等进行考察。**结果** 该产品对 5 种试验菌株均有抑制作用。加入适量聚山梨酯 80 作为中和剂,同时采用薄膜过滤法可有效去除其抗菌性。需氧菌总数计数采用 1:100 稀释级供试液 10 ml, 冲洗量 300 ml。霉菌及酵母菌采用 1:20 稀释级供试液 10 ml, 冲洗量 800 ml。5 种试验菌株的回收比值均在 0.5~2.0 之间。控制菌中金黄色葡萄球菌采用 1:10 稀释级供试液 10 ml(冲洗量 1 000 ml/膜)合并培养基稀释法(600 ml)进行检测,铜绿假单胞菌采用 1:10 稀释级供试液 10 ml/膜(冲洗量 300 ml/膜)进行检测。**结论** 该方法可作为复方特比萘芬软膏微生物限度的检查方法。

[关键词] 复方特比萘芬软膏;微生物限度检查;薄膜过滤法;聚山梨酯 80

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)04-0357-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.014

Validation of microbial limit test for compound terbinafine gel

CHEN Jing, ZHONG Guixiang, YAN Jia, SONG Hongtao (Department of Pharmacy, Hospital 900 of the Joint Logistics Support Force of PLA, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish a microbial limit test method for compound terbinafine gel. **Methods** The test was carried out according to the requirements of provision 1105, 1106 and 1107 of rules of preparation in volume IV of Chinese pharmacopoeia 2015 edition. Experiments were made to observe the volume of rinsing solution, dilution ratio of the test solution and the content of the neutralizing agent. **Results** Compound terbinafine gel had antimicrobial activities on five tested strains. The method of neutralizing agent polysorbate 80 and film filtration could eliminate the bacteriostatic of the drug. The total number of aerobic bacteria was measured by 10 ml of 1:100 diluted solution and 300 ml washing solution. The total number of molds and yeasts were measured using 10 ml of 1:20 diluted solution and 800 ml washing solution. The recovery ratio of five test bacteria was within a range from 0.5 to 2.0. Staphylococcus aureus of the controlled bacteria was measured by 10 ml of 1:10 diluted solution and 1 000 ml washing solution, as well as using increased cultural volume (600 ml). Pseudomonas aeruginosa of the controlled bacteria was measured by 10 ml from 1:10 diluted solution and 300 ml washing solution. **Conclusion** The method was suitable for the microbial limit test of compound terbinafine gel.

[Key words] compound terbinafine gel; microbial limit test; membrane filtration; polysorbate 80

复方特比萘芬软膏是福州总医院自主研发制剂,适用于真菌性皮肤病。复方特比萘芬软膏的主药为特比萘芬和莫匹罗星。特比萘芬是一种广谱的烯丙胺类抗真菌药,对一些常见球形孢子丝菌、皮肤癣菌、裴氏着色真菌及某些酵母菌有抑制作用^[1]。莫匹罗星是广谱类的抗菌药物,对各种革兰阳性球菌和某些革兰阴性菌有良好的抗菌作用^[2]。特比萘

芬和莫匹罗星联用有助于治疗合并细菌感染的浅部真菌感染。本文根据《中国药典》2015年版四部规定,参照菌数报告规则和微生物限度标准,通过摸索中和剂含量、薄膜过滤冲洗液体积、供试液稀释级及培养基稀释体积等方法对复方特比萘芬软膏进行处理以消除其抗菌性^[4],建立复方特比萘芬软膏的微生物限度检查方法。结果表明,该方法科学、有效、可行。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AE240 精密电子天平(瑞士 METTLER 公司);HWS24 型电热恒温水浴锅、DHG-9145A 电热

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ17)

[作者简介] 陈 静, 硕士, 药师, 研究方向: 药品检验研究, Email: 327578727@qq.com

[通讯作者] 宋洪涛, 博士, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术研究, Email: sohoto@vip.163.com

恒温鼓风干燥箱、GHP-9160 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); YP3001ND 电子天平(上海精科有限公司); MJPS-150 型霉菌培养箱(上海精宏实验设备有限公司); WJ-6 无菌检查仪(天津市罗根科技有限公司); SW-CJ-1B 净化工作台(苏州太仓净化设备厂); LDZX-40KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 试药

复方特比萘芬软膏(批号: 170913、171012、171114, 规格: 20g, 联勤保障部队第 900 医院自制)。

1.3 培养基

胰酪大豆胨液体培养基(批号: 1612071)、胰酪大豆琼脂培养基(批号: 1610252)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号: 1609214)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号: 1511162)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号: 1703202)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号: 160309)均购自北京三药科技开发公司。

1.4 稀释液及冲洗液

pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号: 1709062, 北京三药科技开发公司); 0.9% 无菌氯化钠溶液(批号: 170331, 西陇科学股份有限公司)。均依照中国药典非无菌产品微生物限度检查 1106 项下稀释液配制方法配制。

1.5 试剂

聚山梨酯 80(批号: 20170925, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.6 菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10104]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003], 以上菌株均为第 3 代, 均购自福建省药检所。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

取经(30~35)°C 培养 18~24 h 的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的胰酪大豆胨液体培养物各 1ml 和经(20~25)°C 培养 24~48 h 的白色念珠菌的沙氏葡萄糖液体培养物 1ml, 加 9ml 0.9% 无菌氯化钠溶液, 10 倍递增稀释, 制成适宜浓度的菌悬液^[3]。

取经(20~25)°C 培养 7 d 的黑曲霉沙氏葡萄糖琼脂斜面培养物, 加 5ml 含 0.05% (ml/ml) 聚山梨

酯 80 的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 将孢子洗脱, 并将孢子过滤至无菌试管内, 取孢子液 1ml, 用含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍递增稀释, 制成适宜浓度的菌悬液^[3]。

2.2 供试液制备

从 2 两支供试品中各取 5 g, 共 10 g, 置于含熔化的 8 g 聚山梨酯 80 和玻璃珠的无菌锥形瓶中(温度≤45°C), 用无菌玻璃棒搅拌, 加预先在 40°C 水浴保温的 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml, 搅拌混匀, 作为 1:10 供试液。从 1:10 供试液中取 50 ml、20 ml、10 ml, 分别加入 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml, 充分混匀, 作为 1:20, 1:50, 1:100 供试液。

2.3 回收比值的计算

试验组的回收比值=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数^[4]

稀释剂对照组的回收比值=稀释剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数

2.4 微生物计数方法适用性试验

2.4.1 试验组

需氧菌总数计数: 取供试液 10ml(每膜), 经薄膜过滤后, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗, 每次冲洗 100 ml, 冲洗次数不大于 10 次, 在最后一次冲洗液中分别加入铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的菌悬液 1 ml, 每 1ml 的菌悬液含菌数不大于 100cfu(菌落形成单位), 混匀, 过滤。将滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆琼脂培养基平板上, 35°C 倒置培养 3 d, 计数。每株试验菌每种培养基平行制备两张滤膜。

霉菌、酵母菌总数计数: 取供试液 10 ml(每膜), 经薄膜过滤后, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗, 每次冲洗 100 ml, 冲洗次数不大于 10 次, 在最后一次冲洗液中分别加入白色念珠菌、黑曲霉的菌悬液 1 ml(含菌不大于 100 cfu/ml), 混匀, 过滤。将滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上, 25°C 倒置培养 5 d, 计数。每株试验菌每种培养基平行制备两张滤膜。

2.4.2 菌液组

取 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液, 按“2.4.1”项试验组操作加入试验菌液进行微生物回收试验。

2.4.3 供试品对照组

取制备好的供试液, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液, 其他操作同“2.4.1”项试验组。所用培养基及培养条件与试验组一致。

2.4.4 稀释剂对照组

取含8%聚山梨酯80的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液,按“2.4.1”项试验组操作加入试验菌液进行微生物回收试验。所用培养基及培养条件与试验组一致。

2.4.5 验证结果

首先选择1:10供试液采用薄膜过滤法(冲洗量1 000 ml)对需氧菌进行回收比值的测定,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉的回收比值低于0.5。接着,选择1:50供试液对需氧菌检查计数方法重新验证。1:50供试液采用薄膜过滤法(冲洗量1 000 ml)对需氧菌进行回收比值的测定,金黄色葡萄球菌的回收比值低于0.5,仍不符合要求。再后,进一步选择1:100供试液,采用薄膜过滤法(冲洗量300 ml)对需氧菌进行回收比值的测定,结果

见表1,5种试验菌种的回收比值均在0.5~2范围内,符合中国药典2015版四部通则1105微生物计数法的要求。取1:100供试液10 ml,采用薄膜过滤法(冲洗量300 ml)可作为复方特比萘芬软膏需氧菌的计数方法。

霉菌、酵母菌总数计数结果见表2。1:20供试液采用薄膜过滤法(冲洗量500 ml)对霉菌、酵母菌进行回收比值的测定,黑曲霉的回收比值低于0.5。因此,我们增大冲洗量,分别采用800 ml和1 000 ml进行冲洗,由表2可见,白色念珠菌和黑曲霉的回收比值均在0.5~2范围内,符合中国药典2015版四部通则1105微生物计数法的要求。从时间和经济成本考虑,取1:20供试液10 ml,采用薄膜过滤法(冲洗量800 ml)作为复方特比萘芬软膏霉菌、酵母菌的计数方法。

表1 需氧菌总数验证结果与回收比值(1:100供试液,300 ml冲洗,n=3)

菌株类型	试验组 (cfu)	菌液组 (cfu)	供试品对照组 (cfu)	稀释剂对照组 (cfu)	回收比值(%)	
					试验组	稀释剂对照组
铜绿假单胞菌	88.5	83.5	0	82	1.06	0.98
金黄色葡萄球菌	82	82.7	0	84	0.99	1.02
枯草芽孢杆菌	58.3	67.2	0	60	0.87	0.89
白色念珠菌	52	55.3	0	57.7	0.94	1.04
黑曲霉	47	50	0	52.3	0.94	1.05

表2 霉菌、酵母菌总数验证结果与回收比值(1:20供试液,n=3)

菌株类型	冲洗量 (ml)	试验组 (cfu)	菌液组 (cfu)	供试品对照组 (cfu)	稀释剂对照组 (cfu)	回收比值(%)	
						试验组	稀释剂对照组
白色念珠菌	500	52	50.3	0	49	1.03	0.97
	800	61	60	0	59.5	1.02	0.99
	1000	58.3	57.5	0	56	1.01	0.97
黑曲霉	500	0	43.5	0	46.3	0.00	1.06
	800	40.3	46.3	0	44	0.87	0.95
	1000	44	48.5	0	47	0.91	0.97

2.4.6 聚山梨酯80的含量考察

在微生物计数适用性试验中,以敏感菌金黄色葡萄球菌和黑曲霉作为试验菌考察不同浓度聚山梨酯80对抗菌活性的影响。按“2.2”项下要求制备供试液,分别加入4%、6%、8%和10%聚山梨酯80作为中和剂,需氧菌总数计数采用薄膜过滤法,取1:100稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为300 ml;霉菌及酵母菌计数采用薄膜过滤法,取1:20稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为800 ml。结果见表3,4%和6%聚山梨酯80未能达到药典规定(回收比值0.5~2),而8%和10%聚山

梨酯80均能达到药典规定,因此选择8%聚山梨酯80作为中和剂。

表3 聚山梨酯80的含量对金黄色葡萄球菌和黑曲霉回收比值的影响(n=3)

聚山梨酯 80 (%)	需氧菌		霉菌和酵母菌
	金黄色葡萄球菌	黑曲霉	黑曲霉
4	0.13	0.07	0.14
6	0.40	0.34	0.41
8	1.01	0.98	0.92
10	1.02	0.97	0.92

2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 铜绿假单胞菌检查方法的验证

试验组:取1:10供试液10 ml,经薄膜过滤后,用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,每次100 ml,冲洗3次,在最后一次冲洗液中加入铜绿假单胞菌的菌悬液1 ml(含菌 \leq 100 cfu/ml),混匀,过滤。取出滤膜,加至100 ml的胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,(30~35) $^{\circ}$ C培养24 h;取上述培养物划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基中,(30~35) $^{\circ}$ C培养72 h。

阴性对照组:用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml代替供试液,不加菌液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

菌液组:用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml代替供试液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

供试品组:取pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液1 ml代替菌液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

2.5.2 验证结果

由表4可知,试验组和菌液组正常检出,阴性对照组和供试品组未检出,符合中国药典2015版四部通则1106控制菌检查的要求。取1:10供试液10 ml,采用薄膜过滤法(冲洗量300 ml),100 ml的胰酪大豆胨液体培养基进行增菌培养,可作为复方特比萘芬软膏铜绿假单胞菌的控制菌检查。

表4 控制菌铜绿假单胞菌检查适用方法验证结果

培养基	试验组	供试品组	菌液组	阴性对照组
胰酪大豆胨液体培养基	浑浊	澄清	浑浊	澄清
溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基	+	-	+	-

注:“-”代表无菌落生长;“+”表示有典型菌落生长

2.5.3 金黄色葡萄球菌检查方法的验证

试验组:取1:10供试液10ml,经薄膜过滤后,用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,每次100 ml,冲洗10次,在最后一次冲洗液中加入金黄色葡萄球菌的菌悬液1 ml(含菌 \leq 100 cfu/ml),混匀,过滤。取出滤膜,加至不同体积的胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,(30~35) $^{\circ}$ C培养24 h;取上述培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基中,(30~35) $^{\circ}$ C培养72 h。

阴性对照组:取pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml代替供试液,不加菌液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

菌液组:取pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 ml代替供试液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

供试品组:取pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液1 ml代替菌液,其他操作同试验组,按规定的培养条件培养。

2.5.4 验证结果

由表5可知,培养基稀释体积为600 ml或以上时,试验组和菌液组正常检出,阴性对照和供试品组未检出,符合中国药典2015版四部通则1106控制菌检查的要求。取1:10供试液10 ml,采用薄膜过滤法(冲洗1000 ml),600 ml的胰酪大豆胨液体培养基进行增菌培养,可作为复方特比萘芬软膏金黄色葡萄球菌的控制菌检查。

表5 控制菌金黄色葡萄球菌检查适用方法验证结果(n=3)

培养基稀释体积(ml)	试验组	供试品组	菌液组	阴性对照组
400	-	-	+	-
500	-	-	+	-
600	+	-	+	-
700	+	-	+	-

注:“-”代表无菌落生长;“+”表示典型菌落生长

3 讨论

复方特比萘芬软膏为半固体外用制剂,在缓冲液中的分散性较差,呈乳白色浑浊状,若直接进行薄膜过滤,易堵塞滤膜。适量浓度的聚山梨酯80具有中和、乳化、增溶的作用^[5]。但浓度过高时,易堵塞滤膜,因此在稀释供试液时可将稀释液的温度升高至40 $^{\circ}$ C,分次加入稀释液搅拌,可提高其溶解性,增加供试液的滤过性。通过本试验发现8%的聚山梨酯80不影响微生物生长繁殖,有助于提高供试液分散性,利于供试液的滤过。

复方特比萘芬软膏处方中含有特比萘芬、莫匹罗星等抑菌成分,因此该药抗菌谱广,对真菌和细菌都有很强的抑制作用^[6-7]。通过试验可知,该药对5种试验菌株均有不同程度的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,对枯草芽孢杆菌和黑曲霉的抑制作用较强,对白色念珠菌和铜绿假单胞菌的抑制作用较弱。经过前期方法验证,单独使用平皿倾注法和薄膜过滤法均不能达到要求。通过试验证明,8%(g/ml)聚山梨酯80有效消除供试品的抑菌活性。聚山梨酯80可同时作为本供试品的乳

(下转第369页)

- genic liver abscesses of biliary origin [J]. Surgery, 2016; S0039606015009514.
- [16] 高文,陈敏华,严昆,等. 射频消融治疗非7术适应证小肝癌疗效分析[J]. 中国医学影H技术,2007,23(2):254-257.
- [17] 张列,郑,陆海,等. 天甘美治疗重型^z损伤后肝功能损害的临床研究[J]. 重庆医学,2015(28).
- [18] 程时,丁海勤. 谷胱甘肽及其抗氧化作用今日e [J]. 生理科学进展,2002,33(1):85-90.
- [19] 王能,Ñ国军,强,等. 经皮肝n刺射频治疗肝性肿瘤的严重并发症分析[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(3):186-188.
- [20] 白',W珊玲,王"辉,等. II型糖尿病合并肝脓肿32例临床分析[J]. q生"病与感染性疾病,2005,3(3):116-117.
- [21] 张ø荣,a健存,等. 依据《药品不良反应信息通报》探讨避免药品不良反应发生的+ f [J]. 中国医院药学杂志,2015,35(2):156-160.
- ! e f g h " 2018-05-23 ! i j g h " 2019-05-14
! k C I I " 陈盛新

上接第360页
化剂和中和剂,简化检查方法,提高效率^[8]。加入中和剂后,对冲液冲洗量和供试品稀释级进行进一步考察,以消除其抗菌活性为目的,最终筛选出最适合的方法^[9]。

复方特比[™]。软G对金黄色葡萄球菌的抑制作用强,因此在控制菌金黄色葡萄球菌检查中除了加入中和剂,还使用=膜过滤法合并培养基稀释法以达到抗菌的作用。培养基稀释法利用减少单位体积内的供试品浓度以消除供试品抑菌作用,操作简^Ö且不减少供试品检验量。培养基体积为600 ml或以上时,试验组显示金黄色葡萄球菌相应的反应特征。

《中国药S》2015版四部将加菌提前至供试液制备环节,更贴近药品在生产、b存和运输过程中微生物染的实际情况,提高试验的科学性^[10]。但是—Ñ罗^Ö和特比[™]。的抗菌活性强,在供试液制备环节加菌无法达到规定的回收比值,所以选择在=膜过滤冲洗后加菌。因此结合实际情况,对于抗菌活性强的药物,可以考虑经过中和、稀释或=膜过滤处理后再加入菌悬液。

4 a'

复方特比[™]。软G的微生物限度检查方法为:需氧菌总数计数采用=膜过滤法,取1:100稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为300 ml。霉菌和o母菌总数计数采用=膜过滤法,取1:20稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为800 ml。控制菌检查:采用=膜过滤法,取1:10稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为300 ml,接种至100 ml胰

Ü大' Ü液体培养基培养,按照假单胞菌检查法检查;采用=膜过滤法,取1:10稀释级供试液10 ml进行冲洗,冲洗量为1 000 ml,接种至600 ml胰Ü大' Ü液体培养基培养,按照金黄色葡萄球菌检查法检查。本方法科学准确,可为类似抗菌活性强的品种的微生物限度检查方法的设计提供参考。

\$c d C D %

- [1] 尹c,d玉平.1%特比[™]。乳G对常见皮¥'菌、球形r子T菌及Ô着色真菌的体外抑菌活性研究[J]. 皮¥病与性病,2015,37(3):130-132.
- [2] 周e.—Ñ罗^Ö乳G外用治疗细菌性皮¥病临床疗效观察[J]. 中华临床医师杂志,2016,10(4):235-236.
- [3] 国家药S委员会. 中华人民共和国药S(2015年版四部)[S]. 北京:化学工业出版社,2015:136~151.
- [4] 杨"莉,李辉,马英英,等. 中国药S 2015年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志,2016,36(6):1101-1107.
- [5] f œ,陈晨,李g,等. 聚山[˘]酯80在微生物限度检查中的应用[J]. 中国药师,2014,17(10):1776-1777.
- [6] Ñ文静,张h,i耀佐. 盐酸特比[™]酚凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):2135-2139.
- [7] 张力. 特比[™]。片与特比[™]。乳G治疗皮¥'菌病的疗效对比[J]. 中国药业,2013,22(9):69-70.
- [8] 李辉,杨"莉,y ü 5,等. 不同剂型硝酸^{*}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.
- [9] 汤x,李4莲. 盐酸—西沙^Ö片微生物限度方法适用性研究[J]. 国外医药抗生素分T,2016,37(4):172-176.
- [10] 马仕ì,刘鹏,胡昌勤,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):877-872.
- ! e f g h " 2018-12-27 ! i j g h " 2019-06-06
! k C I I " 陈盛新