

8种医院制剂微生物限度检查法的适用性试验

严筱楠*, 高霞, 高娟, 杨芊钰, 武丽梅

(榆林市药品检验所, 榆林 719000)

摘要: 目的 探究八项医院制剂微生物限量检测技术的适用性。**方法** 研究方法依据《中国药典》2020年版(四部)通则1105至1107章节的指导原则, 采用平板培养法与薄膜过滤技术, 对选定的八种医院制剂进行了微生物限量检测技术的适用性验证实验。**结果** 研究结果显示, 在采用经过优化筛选的检测手段进行微生物限量验证测试时, 对于微生物数量测定部分, 所有试验组中添加的五种测试菌株的回收率均保持在0.5至2.0的合格范围内; 而在控制菌种检测环节, 所有试验组均能准确识别并呈现出所添加测试菌种的特定反应特征, 同时, 阴性对照组中则未检测到任何控制菌种的存在。**结论** 研究结论表明, 本研究开发的检测流程不仅操作简便快捷, 而且检测结果精确度高、可靠性强, 完全能够满足上述八种医院制剂在质量控制方面的需求。

关键词: 医院制剂, 微生物限度检查, 适用性试验

0 引言

医疗自制品, 也常被称为医院内部制剂或临床特制药剂, 指的是医疗机构依据自身临床实际需求, 在获得相关批准后, 专门制备的不在市场上流通且具有独特配方的自用药物。这些医院制剂凭借其确切的治疗效果及独特作用机制, 在临床治疗中扮演着补充角色, 对于维护民众健康及新药研发均展现出了积极的贡献与价值。本研究涵盖了八种医院自制品, 具体涉及三类口服制剂: 氯化钾口服溶液、氯化铵混合液、颠茄混合液; 三类皮肤用药: 维生素E乳膏、炉甘石洗剂、爽身粉; 一种耳部用药——碳酸氢钠耳用滴剂; 以及一种兼具口服与直肠给药功能的制剂——水合氯醛溶液。在药品质量控制体系中, 微生物限度检测是衡量药品安全性的关键指标之一。通过实施微生物限度测试, 可以评估药品是否被污染、污染的程度如何, 追溯污染源, 并采取有效措施加以控制, 从而确保药品质量, 保障用药的安全性和有效性。根据《中华人民共和国药典》2020年版第四部的相关规定(具体条目1105、1106、1107), 在执行微生物限度测试之际, 必须对供试品的微生物数量统计手段及特定菌种检验流程实施适用性校验, 旨在验证所构建的方法能否精确契合该药品所需的菌落统计与控制菌种鉴别标准^[1]。本研究通过一系列的适用性验证试验, 为上述八种医院自制品建立了科学的微生物限度检查方法, 为提升这些制剂的质量控制水平提供了坚实的技术支撑^[2]。

1 材料与方法

1.1 仪器

生物安全柜(BSC-1500IIA2-X, 济南鑫贝西生物技术有限公司); 霉菌培养箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); 生化培养箱(SPX-250, 上海冉绘实业有限公司); 立式灭菌器(LMQ.C80EP, MOST-L85, 山东新华医疗器械股份有限公司); 电热恒温水箱(天津市泰斯特仪器有限公司); 电子天平(YP601N, 上海精密科学仪器有限公司); 集菌仪(Htysteritest601, 浙江泰林生物技术股份有限公司); 一次性薄膜过滤器(FC752, 批号: 2022072101); 显微镜(CX31RTSF, 日本奥林巴斯)^[3]。

1.2 菌种

从中国食品药品检定研究院引入了以下菌种: 金黄色葡萄球菌[编号为CMCC(B)26003]; 铜绿假单胞菌[编号为CMCC(B)10104]; 枯草芽孢杆菌[编号为CMCC(B)63501]; 白色念珠菌[编号为CMCC(F)98001]; 黑曲霉[编号为CMCC(F)98003], 以及大肠埃希菌[编号为CMCC(B)44102]。这些菌种均来自权威机构, 确保了实验材料的高质量和可靠性^[4]。

1.3 样品

维生素E霜(批号: 220712), 碳酸氢钠滴耳液(批号: 230701), 扑粉(批号: 220830), 炉甘石洗剂(批号: 220703),

* 通信作者: 严筱楠, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品、化妆品检验。E-mail: wuzhiji031@163.com

氯化钾溶液(批号: 220924), 氯化铵合剂(批号: 230611), 颠茄合剂(批号: 230723), 水合氯醛溶液(批号: 230301)均为西安交通大学第一附属医院榆林医院自制^[5]。

1.4 培养基、试剂及稀释液

采购的微生物培养基及缓冲液包括: 批号 116241 的胰蛋白胍大豆琼脂培养基(改良型 TSA)、批号 221011A10 的胰蛋白胍大豆肉汤(TSB 液体版)、批号 1115451 的沙堡氏葡萄糖琼脂(SDA)、批号 1101401 的麦康凯氏琼脂平板(MA)、批号 1110651 的麦康凯氏液体培养基(MB 液体型)、批号 1110051 的肠道菌富集培养基(EE 型)、批号 1091351 的十六烷基三甲基溴化铵琼脂(CTAB 琼脂)、批号 1105362 的甘露醇-氯化钠琼脂培养基, 以及批号 1110631 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胍缓冲溶液, 以上所有产品均源自广东环凯公司, 以上培养基均经过适用性试验, 符合中华人民共和国药典规定^[6]。聚山梨酯-80(吐温-80, 天津科密欧试剂有限公司, 批号: 20220117); 0.9% 氯化钠溶液(天津科密欧试剂有限公司, 批号: 20210618)。

1.5 菌液制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌的新鲜培养体接种至胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)环境中, 并于 35°C 条件下培育 24 小时。随后, 采用 0.9% 浓度的无菌氯化钠溶液对上述培养物进行稀释, 直至达到 5000 至 10000 菌落形成单位每毫升(CFU/mL)的菌悬液浓度。对于白色念珠菌, 其新鲜培养体则被接种至沙堡氏葡萄糖肉汤(SDB)中, 于 25°C 条件下培养 3 天, 并以同样浓度的无菌氯化钠溶液稀释, 制备成 5000 至 10000 CFU/mL 的菌悬液, 以备后续使用^[7]。

至于黑曲霉的新鲜培养体, 则被接种至沙堡氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基上, 并在 25°C 条件下培养 7 天。为了获取孢子悬液, 向培养好的 SDA 中加入含有 0.05%(g/mL)吐温 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 以洗脱孢子。随后, 将洗脱得到的孢子悬液转移至无菌试管中, 通过适当稀释, 最终制备成含有 5000 至 10000 CFU/mL 的孢子悬液。

1.6 供试液的制备

随机抽取 2 个最小包装的供试品混匀。(1)碳酸氢钠滴耳液、水合氯醛溶液、氯化钾溶液、氯化铵合剂、颠茄合剂: 分别取供试品 10 mL, 加 TSB 90 mL, 混匀, 作为 1:10 供试液, 根据需要, 按递增法稀释^[8]。(2)维生素 E 霜: 称取样品 10 g, 加 TSB 90 mL, 40°C 恒温振摇 15 分钟使其分散均匀, 制得 1:10 供试液。(3)扑粉、炉甘石洗剂: ①取供试品 10 g(mL), 加 TSB 90 mL, 混匀, 制得 1:10 供试液, 根据需要, 按递增法稀释; ②薄膜过滤法, 取上述 1:10 供试液 1 mL, 以薄膜过滤, 用稀释液冲洗滤膜数次, 每次 100 mL, 在最后一次冲洗液中分别加入菌悬液 0.1 mL, 混匀, 过滤, 取出滤膜, 加至 TSA 或 SDA 中培养计数; ③称取样品 10 g, 加入含吐温-80(0.1%)

的 TSB 90 mL, 分散均匀, 500 r/min 离心 3 min 后, 取上清液, 作为 1:10 供试液, 根据需要, 按递增法稀释。制备后 1h 内完成接种^[9]。

2 结果与分析

2.1 计数方法适用性试验

①实验组设置: 将预先准备好的测试溶液分别注入五个无菌试管内, 每管容量为 9.9 mL。随后, 向每个试管中分别加入 0.1 mL 已制备好的、菌浓度介于 5000 至 10000 菌落形成单位(CFU)之间的五种试验菌液, 具体包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌以及黑曲霉。②对照组配置: 取制备完成的测试溶液 9.9 mL, 并向其中加入 0.1 mL 胰蛋白胍大豆肉汤(TSB), 以此作为供试品的对照组。③菌液对照组设计: 将胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)分别分配至五个无菌试管, 每管容量同样为 9.9 mL。随后, 按照实验组的操作步骤, 向每个试管中分别加入 0.1 mL 已制备好的、菌浓度在 5000~10000 CFU 范围内的五种试验菌液, 包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉, 以此作为菌液的对照组。

每种菌测试 3 次, 取供试品溶液 1 mL, 置直径 90 cm 的无菌平皿中, 进行需氧菌计数时, 倾注温度不超过 45°C 熔化的 TSA 约 20 mL, 混匀, 凝固, 30~35°C 培养 3 d, 逐日观察计数; 进行霉菌和酵母菌计数时, 注入温度不超过 45°C 熔化的 SDA 约 20 mL, 混匀, 凝固, 待样品凝固之后, 需在 20~25°C 环境中进行为期 5 天的培养, 期间需每日进行观察并记录菌落数量。针对每一种试验菌株, 研究人员都准备了两个平行的培养皿来进行菌落数的测定, 这构成了试验组的数据基础。为了得出菌株的回收效率, 研究人员采用了一个特定的计算公式。这个公式将试验组的平均菌落数减去供试品对照组的平均菌落数, 然后再除以菌液对照组的平均菌落数。通过这个计算, 研究人员可以得到每个菌株的回收值^[10]。

需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数适用性验证试验结果见表 1~2, 维生素 E 霜、碳酸氢钠滴耳液、水合氯醛溶液、氯化钾溶液、氯化铵合剂、颠茄合剂 6 种医院制剂, 采用平皿法, 1:10 的供试液, 各试验菌的回收比值均在 0.5~2 范围内, 表明方法可行。

扑粉使用常规平皿法(1:10), 5 种菌的回收率均低于 0.5, 进一步稀释后使用平皿法(1:50)进行试验时, 枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的需氧菌总数计数方法回收率值小于 0.5, 可能与该制剂含有氧化锌, 具有一定抑菌作用有关^[6]。薄膜过滤法试验结果表明, 枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的回收率仍低于 0.5, 且难以过滤, 供试液中大量不溶于水的氧化锌粉末依然残留在滤膜上, 抑菌性并未完全消除。因此实验采用 1:10 供试液

低速(500 r/min)离心 3 min 后取上清液, 各菌株的回收比值均在 0.5~2.0 之间, 满足药典要求。炉甘石洗剂, 采用平皿法, 1:10 稀释级别供试液, 铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉的回收率符合要求, 但是枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的回收率低于 0.5, 亦采用 1:10 供试液低速(500 r/min)离心 3 min 后取上清液进行回收率试验, 5 种菌的回收率均满足要求。

表 1 需氧菌总数计数方法适用性试验回收率

样品名称	方法	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
维生素 E 霜	平皿法	0.93	0.85	0.97	0.92	0.87	0.95	0.91	1.06	0.85	0.88	0.86	0.80	0.88	0.88	0.96
碳酸氢钠滴耳液	平皿法	0.96	0.95	0.91	0.89	0.99	0.91	0.91	1.01	0.97	0.93	0.93	0.88	0.89	0.93	0.92
扑粉	平皿法(1:10)	0.28	0.21	0.25	0.30	0.24	0.20	0.18	0.21	0.28	0.16	0.10	0.21	0.20	0.27	0.24
	平皿法(1:50)	0.62	0.58	0.70	0.61	0.66	0.59	0.31	0.30	0.34	0.26	0.31	0.40	0.52	0.58	0.60
	薄膜过滤法	0.58	0.55	0.60	0.69	0.63	0.62	0.33	0.28	0.30	0.44	0.35	0.36	0.51	0.71	0.56
	平皿法(离心过滤 1:10)	0.71	0.77	0.72	0.62	0.72	0.60	0.67	0.72	0.65	0.59	0.66	0.60	0.76	0.67	0.61
炉甘石洗剂	平皿法(1:10)	0.66	0.65	0.70	0.62	0.60	0.67	0.38	0.40	0.51	0.42	0.40	0.48	0.70	0.69	0.64
	平皿法(离心过滤 1:10)	0.82	0.93	0.81	0.89	0.71	0.74	0.89	0.75	0.79	0.89	0.84	0.85	0.85	0.91	0.82
水合氯醛溶液	平皿法	0.84	0.81	0.78	0.78	0.80	0.81	0.87	0.89	0.90	0.71	0.75	0.78	0.64	0.68	0.60
氯化钾溶液	平皿法	0.99	1.08	0.96	0.82	0.81	0.74	1.07	0.89	0.92	0.92	0.66	0.95	0.72	0.86	0.95
氯化铵合剂	平皿法	0.88	1.00	0.98	0.87	1.00	0.98	0.84	0.77	0.88	0.96	0.99	0.86	1.10	0.95	0.94
颠茄合剂	平皿法	0.95	0.84	0.98	0.92	0.94	0.97	0.93	1.11	1.06	0.87	1.02	0.94	0.89	0.98	0.94

表 2 霉菌和酵母菌计数方法适用性试验回收率

样品名称	方法	白色念珠菌			黑曲霉		
		1	2	3	1	2	3
维生素 E 霜	平皿法	0.91	0.86	0.82	0.83	0.86	0.79
碳酸氢钠滴耳液	平皿法	0.92	0.88	0.86	0.97	0.86	0.71
扑粉	平皿法(1:10)	0.32	0.35	0.30	0.28	0.25	0.31
	平皿法(1:50)	0.35	0.30	0.34	0.39	0.40	0.36
	薄膜过滤法	0.41	0.45	0.36	0.51	0.47	0.41
	平皿法(离心过滤)	0.80	0.76	0.70	0.73	0.82	0.81
炉甘石洗剂	平皿法(1:10)	0.39	0.45	0.48	0.70	0.65	0.78
	平皿法(离心过滤)	0.97	0.95	0.86	0.99	1.02	0.85
水合氯醛溶液	平皿法	0.88	0.88	0.98	1.03	0.89	0.94
氯化钾溶液	平皿法	0.94	0.58	0.88	0.84	0.90	0.99
氯化铵合剂	平皿法	0.76	0.88	0.90	0.88	0.90	1.01
颠茄合剂	平皿法	0.78	0.90	0.91	0.90	0.91	0.84

2.2 控制菌检查法适用性试验

①大肠杆菌验证流程: 各制剂按 1:10 比例制备供试液, 与大肠杆菌试验菌株悬液混合后, 在 33℃ 培养 18 至 24 小时, 再接种至麦康凯液体培养基培养, 最后划线接种于麦康凯琼脂平板观察结果。

②金黄色葡萄球菌验证流程: 同样按 1:10 比例制备供试液, 混合金黄色葡萄球菌试验菌株悬液后, 在 33℃ 培养, 随后划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板观察^[11]。

③铜绿假单胞菌验证流程: 供试液与铜绿假单胞菌试验菌株悬液混合培养后, 接种至麦康凯液体培养基, 再划线接种于麦康凯琼脂平板观察。

④对照组设置: 阳性对照组用 TSB 稀释液替换样品液; 供

试品对照组用 TSB 稀释液替换菌种悬液; 阴性对照组同时替换样品液和菌种悬液^[12]。

表格 3 详尽地呈现了控制菌种适用性试验的各项结果数据。特别地, 该验证过程涵盖了针对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌三种菌种的适用性测试, 确保了所用方法的准确性和可靠性。试验组均成功识别并呈现出各自独特的反应特征。具体而言, 对于大肠埃希菌的检测, 采用麦康凯琼脂培养基进行平板培养后, 观察到了鲜明的桃红色圆形菌落, 且菌落中心呈现出更深的桃红色调^[13]。进一步通过革兰染色法进行显微镜观察, 确认其为 G⁻ 杆菌。这一结果不仅验证了检测方法的准确性, 也确保了后续试验的有效性和可靠性。金黄色葡萄球菌甘露醇氯化钠琼脂平板显示金黄色, 圆形凸起, 外围

有黄色环, 革兰氏染色镜检为 G⁺ 球菌。铜绿假单胞菌溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板显示灰白色, 表面湿润, 周围有蓝色色素扩散, 革兰染色镜检为 G⁻ 芽孢杆菌。阴性对照均无菌生长, 说明方法可行^[14]。

表 3 控制菌检查

控制菌	试验组								阳性对照组	供试品对照组	阴性对照组
	维生素 E 霜	碳酸氢钠滴耳液	扑粉	炉甘石洗剂	水合氯醛溶液	氯化钾溶液	氯化铵合剂	颠茄合剂			
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	/	/	/	+	-	-
铜绿假单胞菌	+	+	+	+	+	/	/	/	+	-	-
大肠埃希菌	/	/	/	/	+	+	+	+	+	-	-

注: 表中“-”代表无菌落生长; “+”表示典型菌落生长; “/”表示无需进行实验

3 讨论与结论

在控制菌检查法适用性试验中, 对八种医院制剂分别进行了大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌的适用性测试。按 1:10 比例制备各制剂的供试液, 随后将其与相应试验菌株悬液混合, 在特定温度下进行初步培养。对于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌, 初步培养后还需接种至麦康凯液体培养基中继续培养, 最后划线接种于麦康凯琼脂平板上观察结果。金黄色葡萄球菌则直接划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板^[15]。

设立阳性对照组、供试品对照组和阴性对照组。阳性对照组用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)稀释液替换样品液, 以验证培养基和菌株的活性; 供试品对照组用 TSB 稀释液替换菌种悬液, 以检查供试液本身是否有抑菌作用; 阴性替换对照组则同时样品液和菌种悬液, 作为无菌生长的对照。结果显示, 试验组均成功识别并呈现出各自菌种的特定反应特征^[16]。大肠埃希菌在麦康凯琼脂平板上形成鲜明的桃红色圆形菌落, 金黄色葡萄球菌在甘露醇氯化钠琼脂平板上呈现金黄色圆形凸起菌落, 铜绿假单胞菌则在麦康凯琼脂平板上显示为灰白色湿润菌落, 并伴有蓝色色素扩散。阴性对照组均未检测到菌落生长, 证明实验方法的有效性和可靠性。针对不同制剂的特性, 如炉甘石洗剂和扑粉, 由于其含有的成分可能具有抑菌作用, 采用了低速离心后取上清液的方法进行处理, 显著提高了测试菌株的回收率, 满足了药典要求^[17]。

综上所述, 本研究通过一系列适用性试验, 为八种医院制剂建立了科学有效的控制菌检查方法, 不仅操作简便快捷, 而且检测结果准确可靠, 为提升这些制剂的质量控制水平提供了坚实的技术支撑。

参考文献

[1] 张文婷, 张春华, 章瑛, 等. 2020 年版《中华人民共和国药典》中黄芩配方颗粒微生物限度检查方法适用性试验[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(08): 1418-1422.
[2] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局令第 20

号《医疗机构制剂注册管理办法(试行)》[EB/OL]. [2005-08-01]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/bmgz/201105/495fb571781e49839c67563db8c4e43d.shtml> [201512-02].
[3] 许玲玲. 医疗机构制剂的发展状况与对策分析[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(17): 120-122.
[4] 邓莉, 陈勇川, 胡斌, 等. 3 种医院外用制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药业, 2020, 29(17): 68-71.
[5] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1747.
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 160-170.
[7] 张心悦, 武海萍, 朱逍遥, 等. 3 种医院糊剂微生物限度检查方法学研究[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2198-2200.
[8] 雷质文, 姜英辉, 梁成珠, 等. 食源微生物检验用样品的抽取和制备手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1065.
[9] 曹晓云, 郭艳娟. 药品微生物限度检查方法学验证试验及其相关的技术问题[J]. 天津药学, 2006, 18(6): 49-51.
[10] 金涛. 炉甘石洗剂微生物限度检查方法[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(06): 480-481.
[11] 钟国庆, 刘大伟, 刘华. 26 种医院外用制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药品标准, 2011, 12(04): 307-310.
[12] 李辽闽, 曾庆莉. 含酚炉甘石洗剂微生物限度检查方法学的验证[J]. 中国医药指南, 2011, 9(33): 285-286.
[13] 雷柳冰, 廖瑜. 炉甘石薄荷脑洗剂微生物限度检查方法的建立与验证[J]. 中国社区医师(综合版), 2007, (15): 15.
[14] 李锦妹, 林颖苹, 陈文静, 等. 炉甘石氧化锌洗剂微生物限度检查法的建立[J]. 药品评价, 2022, 19(01): 14-17.
[15] 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(05): 877-882.
[16] 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.
[17] 田冬梅, 史春辉, 姜志红, 等. 药品微生物计数方法及方法适用性探讨[J]. 中国药物评价, 2017, 34(02): 97-99, 103.