

人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂抑菌剂筛选及抑菌效力研究\*

刘琳琳,董历子,崔越,朱秋媚,苏畅,张宇,刘景会\*\*

(长春生物制品研究所有限责任公司,长春 130012)

**摘要** **目的:**探索人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂制剂处方中抑菌剂及其最低有效抑菌浓度,确定抑菌剂的合理添加剂量。**方法:**应用生物学活性检测方法进行人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂制剂处方中抑菌剂的筛选,确定抑菌剂,然后按照 2020 年版《中华人民共和国药典》通则 1121 抑菌效力检查法测定抑菌效力确定抑菌剂的最低有效抑菌浓度。以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌株,进行菌落计数方法适用性试验。设计抑菌剂剂量筛选试验,对不同浓度的抑菌剂分别对 4 种试验菌的抑菌效果进行考察,筛选出抑菌剂的合理添加量。**结果:**筛选出人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂制剂处方中的抑菌剂为苯扎溴铵;苯扎溴铵浓度为  $0.05 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉的抑菌效力均符合 A 级。**结论:**确定了人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂制剂处方中抑菌剂苯扎溴铵的最低有效抑菌浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**关键词:**人干扰素  $\alpha 1b$ ;喷雾剂;抑菌剂;苯扎溴铵;抑菌效力;最低有效抑菌浓度

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)02 - 0359 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.02.20

Study on the screening and bacteriostatic efficacy of bacteriostatic agent in human interferon  $\alpha 1b$  spray\*LIU Lin - lin, DONG Li - zi, CUI Yue, ZHU Qiu - mei,  
SU Chang, ZHANG Yu, LIU Jing - hui\*\*

(Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Changchun 130012, China)

**Abstract Objective:** To explore the minimum effective inhibitory concentration of bacteriostatic agent in the prescription of human interferon  $\alpha 1b$  spray, and to determine the reasonable dosage of bacteriostatic agent. **Methods:** Biological activity detection method was used to screen bacteriostatic agents in the prescription of human interferon  $\alpha 1b$  spray preparation, determine bacteriostatic agents. The bacteriostatic efficacy was determined according to the bacteriostatic efficacy test method of general principles 1121 of the Chinese Pharmacopoeia 2020 edition to determine the minimum effective bacteriostatic concentration of bacteriostatic agents. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were used as test strains to test the applicability of colony counting method. The dose screening test of bacteriostatic agent was designed to investigate the bacteriostatic effect of bacteriostatic agent with different concentrations on four kinds of experimental bacteria,

\* 吉林省科技发展计划基金项目(20160307028YY)

\*\* 通信作者 Tel:15843016566;E-mail:752970348@qq.com

第一作者 Tel:13756946103;E-mail:1012471431@qq.com

and the reasonable dosage of bacteriostatic agent was selected. **Results:** Benzalkonium bromide was screened out as the bacteriostatic agent in the prescription of human interferon  $\alpha 1b$  spray. When the concentration of Benzalkonium bromide was  $0.05 - 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , its bacteriostatic efficacy against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* met the grade A criteria. **Conclusion:** The minimum effective bacteriostatic concentration of benzalkonium bromide in the prescription of human interferon  $\alpha 1b$  spray is determined to be  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

**Keywords:** human interferon  $\alpha 1b$ ; spray; bacteriostatic agent; benzalkonium bromide; bacteriostatic efficacy; minimum effective bacteriostatic concentration

人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂为多剂量包装的液体型喷雾剂,通过鼻腔给药,药物经鼻黏膜的吸收,发挥治疗上呼吸道感染的作用。按照 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)三部制剂通则 0106 鼻用制剂的规定<sup>[1]18</sup>,鼻用制剂溶液应澄清,不得有沉淀和异物,无刺激性,对鼻黏膜及其纤毛不应产生毒副作用,多剂量水性介质鼻用制剂应添加适宜浓度的抑菌剂。

鼻用制剂中常加入的抑菌剂种类:第一类为酸及盐类,如苯酚、间甲酚、苯甲醇、苯甲酸、山梨酸等;第二类为醇类,如三氯叔丁醇等;第三类为酯类,如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯;第四类为季铵盐类,如苯扎氯铵、苯扎溴铵<sup>[2]</sup>。

因本制剂为喷鼻剂,不能选择有特别刺激性气味的抑菌剂。因为苯酚、间甲酚有酚臭,山梨酸有微弱特异臭,三氯叔丁醇有陈腐、樟脑的特臭气味;苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丁酯对眼睛和粘膜有轻度刺激,不适宜用作鼻和眼用制剂;苯甲醇抑菌谱较窄,且不稳定,易被氧化成苯甲醛和苯甲醚<sup>[3]</sup>。因此,都不宜选作人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂的抑菌剂。

苯扎氯铵和苯扎溴铵是眼用制剂和鼻用制剂应用最广泛的抑菌剂,有轻微芬芳气臭味,极易溶于水,酸碱度 pH 为 5 ~ 8,对细菌、酵母菌和霉菌都有广泛的抑制作用,在 pH 4 ~ 10 之间均有抗菌活性,活性随 pH 升高而增强。综上所述,结合本制剂的自身特点并对比各种抑菌剂的性能,拟选择苯扎氯铵和苯扎溴铵进行人干扰素  $\alpha 1b$  喷雾剂的抑菌剂筛选。

对于生物制品而言,生物学活性是药品储存过程中的易变指标,同时,也是确保药品有效性的关

键指标,因此,评价制剂处方的优劣也应以制剂处方是否能保证药品生物学活性恒定或延缓生物学活性降低为衡量标准。且生物制品大多对温度敏感,一般存储温度为 2 ~ 8  $^{\circ}\text{C}$ ,高温可导致药品在较短的储存期内即产生生物学活性下降的现象,因此,根据 2020 年版《中国药典》三部通则 3523 干扰素生物学活性测定法(第二法报告基因法)和通则 9402 生物制品稳定性试验指导原则,通过 37  $^{\circ}\text{C}$  高温加速试验,对生物学活性进行不同时间点取样监测,即可在短期内初步对比出制剂中抑菌剂保护效果的优劣<sup>[1]354</sup>。

制剂处方中的抑菌剂抑菌效力应符合 2020 年版《中国药典》三部通则 1121 抑菌效力检查法的相应规定<sup>[1]176</sup>,对不同浓度的抑菌剂的抑菌效力进行测试,筛选出最低有效抑菌浓度,从而确定抑菌剂的合理添加剂量。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

ESJ200 - 4B 万分之一电子天平(沈阳亮衡天平仪器有限公司);BSC - 1300IIA2 生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);XDS - 1B 倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);SYNERGY/HTX 化学发光酶标仪(Biotek 公司);E1911R 二氧化碳培养箱(西蒙国际集团西蒙(北京)仪器有限公司);GF120DR 立式自动压力蒸汽灭菌器(致微(厦门)仪器有限公司);DHF - 9272 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

### 1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003](批号 9a4 - 1)、绿脓假单胞菌[CMCC(B)10104](批号 2a29 - 2)、白色念珠菌[CMCC(F)98001](批号 2a22 - 2)、黑曲霉[CMCC(F)98003](批号

0A1005)均购自中国食品药品检定研究院,为0代菌种。

### 1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)(批号200TSAII202114)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(批号200SDA202104)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)(批号100TSB202134)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)(批号100SDB202104)均来自长春生物制品研究所有限责任公司培养基室,依据2020年版《中国药典》三部通则1121抑菌效力检查法进行培养基适用性检查,结果符合规定。

胰酪大豆胨琼脂对照培养基(批号135025-202105)、沙氏葡萄糖琼脂对照培养基(批号135013-202104)购自中国食品药品检定研究院,均按使用说明书配制。

### 1.4 试药

苯扎氯铵(批号201103,纯度99.7%)购自江西阿尔法高科技(有限公司),苯扎溴铵(批号210401,纯度96.0%)购自四川博利恒药业有限公司, MEM 细胞培养基(批号32621004)购自 Corning、消化液(批号2462633)购自 Gibco,胎牛血清(批号20080501)购自浙江天杭生物科技股份有限公司,细胞裂解液(批号0000521244)购自 Promega 公司,荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号7E652E2)购自 Promega 公司。

### 1.5 细胞

HEK293puroISRE-Luc 细胞购自中国食品药品检定研究院。

### 1.6 人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂样品

人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂样品(长春生物制品研究所有限责任公司),苯扎溴铵含量分别为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.08和0.1 mg·mL<sup>-1</sup>,样品编号依次为B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7。

人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂样品(含苯扎氯铵或苯扎溴铵),分别用电子天平称量2 mg的苯扎氯铵和苯扎溴铵加入到100 mL的人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂样品溶液中混匀,使其中苯扎氯铵和苯扎溴铵的含量均为0.02 mg·mL<sup>-1</sup>。

### 1.7 标准品

重组人干扰素 $\alpha$ 1b 国家活性标准品(批号97/01,中国食品药品检定研究院),中国细菌浊度标准国家标准品(批号230021-202162,每支4.5 mL,中

国食品药品检定研究院)。

## 2 方法

### 2.1 抑菌剂筛选

参照FDA非活性成分搜索已批准的药品(Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products),苯扎溴铵作为眼科制剂抑菌剂的最大剂量为0.01%。参照《药用辅料手册》(第六版)<sup>[4]</sup>,苯扎氯铵浓度为0.002%~0.02%(w/v)时可用作鼻用和耳用制剂的抑菌防腐剂。因此,在人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂制剂处方溶液中分别加入0.02 mg·mL<sup>-1</sup>苯扎氯铵和0.02 mg·mL<sup>-1</sup>苯扎溴铵进行筛选。将未加入抑菌剂的制剂处方溶液作为空白对照。空白对照与加入抑菌剂的制剂处方溶液均分别过滤除菌后分装,空白对照标记编号为1-0,加入0.02 mg·mL<sup>-1</sup>苯扎氯铵的标记编号为1-1,加入0.02 mg·mL<sup>-1</sup>苯扎溴铵的标记编号为1-2,全部避光置于37℃电热恒温培养箱中,选5个时间点取样,进行生物学活性检测。

### 2.2 抑菌效力检查

#### 2.2.1 菌液制备

依据2020年版《中国药典》三部通则1211抑菌效力检查法分别制备金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉的菌液。

#### 2.2.2 培养基适用性检查

依据2020年版《中国药典》三部通则1211抑菌效力检查法进行培养基适用性检查,合格标准为:若被检培养基上的菌落平均数不小于对照培养基上菌落平均数的50%,且菌落形态大小与对照培养基上的菌落一致,判定培养基的适用性检查符合规定。

#### 2.2.3 抑菌剂剂量筛选设计

参照FDA Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products,设计抑菌剂剂量筛选试验,用不同浓度的抑菌剂分别对4种试验菌的抑菌效果进行考察,筛选出抑菌剂的合理添加量。苯扎溴铵作为眼科制剂抑菌剂的最大剂量为0.01%。因此,将苯扎溴铵的抑菌浓度0.001%~0.01%作为筛选点,有效抑菌浓度筛选点确定为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.08和0.10 mg·mL<sup>-1</sup>,依次按照处方配制供试品。将含有不同浓度苯扎溴铵的人干扰素 $\alpha$ 1b 喷雾剂样品标记编号B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7。

### 2.2.4 微生物计数方法适用性检查

依据 2020 年版《中国药典》三部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法进行计数方法适用性试验<sup>[1]160</sup>,本试验采用平皿法中的倾注法进行微生物计数。合格标准为:试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值应在 0.5~2 范围内。

供试品制备至加入检验用培养基,不得超过 1 h,并使其中含有 0.10 mg·mL<sup>-1</sup>(抑菌剂拟筛选浓度的上限)的苯扎溴铵,以验证针对本供试品的微生物计数方法是否适用性良好。取供试品,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,或 pH 7.2 磷酸盐缓冲液,或胰酪大豆胨液体培养基溶解或稀释制成 1:10 供试品。要控制供试品 pH 至 6~8。必要时,用同一稀释液将供试品进一步 10 倍系列稀释。所加菌液的体积应不超过供试品体积的 1%。为确认供试品中的微生物能被充分检出,首先应选择最低稀释级的供试品进行计数方法适用性试验。

(1) 试验组:取试验可能用的最低稀释级(1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>)供试品加入菌液混匀,使 1 mL 供试品中含菌量为 10~100 cfu。

(2) 菌液组:取与试验组供试品的相同体积的稀释液加入菌液混匀,使 1 mL 稀释液中含菌量为 10~100 cfu。

(3) 供试品对照组:取试验可能用的最低稀释级(1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>)供试品加入与菌液相同体积的稀释液混匀。

以上 3 组均取 1 mL 注入平皿中,立即倾注培养基(测定细菌用胰酪大豆胨琼脂培养基,混匀,凝固,倒置培养,培养条件为 30~35 °C 培养 2 d,不超过 3 d;测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养条件为 20~25 °C 培养 3 d,不超过 5 d,下同),每株试验菌平行制备 2 个平皿,按平皿法测定其菌数。

### 2.2.5 抑菌效力检查

**2.2.5.1 供试品接种** 取相同体积的未加入抑菌剂苯扎溴铵的供试品溶液做阳性对照;将配制好的每 1 种供试品溶液和阳性对照溶液分作 4 份,每份 9.9 mL,分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉菌悬液,每 1 mL 供试品的接菌量为 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cfu,接种菌液的体积(0.1 mL)不得超过供试品体积的 1%,充分混合,使试验菌均匀分布,然后置 20~25 °C 避光贮存。

**2.2.5.2 存活菌数测定** 在供试品刚接种(0 时)及规定的时间间隔(5、8、19、26、33 d)取样,每份供试品取样 1 mL(共 28 份),用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别进行 10 倍系列稀释(1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>),备用。每稀释级每种培养基至少制备 2 个平板,取稀释后浓度 ≤100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的供试品各 1 mL,分别加入到无菌平皿中。

接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的供试品和稀释液注入 15~20 mL 温度不超过 45 °C 熔化的胰酪大豆胨琼脂培养基,接种的每个平板平行制备 2 个,混匀、凝固,倒置 30~35 °C 培养 3~5 d。接种白色念珠菌、黑曲霉菌悬液的供试品和稀释液注入 15~20 mL 温度不超过 45 °C 熔化的沙氏葡萄糖琼脂培养基,接种的每个平板平行制备 2 个,混匀、凝固,倒置 20~25 °C 培养 5~7 d,分别观察菌落生长情况,点计平板上生长的所有菌落数,菌落蔓延生长成片的平板不宜计数,计算各稀释级供试液的平均菌落数,按菌数报告规则报告菌数,计数并报告,若同稀释级的 2 个平板的菌落数平均值 ≥15,则 2 个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上。以稀释液代替供试品溶液进行阴性对照试验,阴性对照试验应无菌生长。

2020 年版《中国药典》三部通则 1211 抑菌效力检查法供试品(耳用制剂、鼻用制剂、皮肤给药制剂、吸入制剂)抑菌效力评价标准见表 1,表中的“减少的 lg 值”是指各间隔时间测定的菌数 lg 值与 1 mL 供试品中接种的菌数 lg 值的相差值。表中“A”是指应达到的抑菌效力标准,特殊情况下,如抑菌剂可能增加不良反应的风险,则至少应达到“B”的抑菌效力标准。试验结果按有效数字的修约规则进舍,保留小数点后 1 位有效数字。结果符合“抑菌剂抑菌效力判断标准表”要求可判定该产品抑菌效力符合规定。

## 3 结果

### 3.1 抑菌剂筛选结果

人干扰素 α1b 喷雾剂制剂处方抑菌剂筛选的生物学活性检测结果见表 2,生物学活性变化趋势见图 1,由生物学活性检测结果及变化趋势图分析可知,相对于空白对照来说,加入抑菌剂苯扎溴铵要比苯扎氯铵的制剂溶液干扰素生物学活性趋势有可视效果上的减缓;因此,最终选择季铵盐类的苯扎溴铵作为人干扰素 α1b 喷雾剂的抑菌剂。

表 1 抑菌效力判断标准

Tab. 1 Criteria for judging bacteriostatic efficacy

判断标准 (criteria)		减少的 lg 值 (reduced lg value)			
		2 d	7 d	14 d	28 d
细菌 (bacterium)	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
真菌 (fungus)	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

注 (note): NI 表示未增加,是指对前一个测定时间,试验菌增加的数值不超过 0.5 lg (NI indicates not increased, which means that for the previous measurement time, the increase value of test bacteria does not exceed 0.5 lg)

表 2 抑菌剂筛选的生物学活性检测结果

Tab. 2 Biological activity test results of bacteriostatic agent screening

时间 (time)/d	生物学活性 (biological activity) / ( × 10 <sup>5</sup> IU · mL <sup>-1</sup> )		
	空白对照 (blank control)	苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)	苯扎溴铵 (benzalkonium bromide)
0	5.00	4.84	5.18
5	4.44	4.19	5.05
8	4.16	4.24	4.69
19	4.13	4.47	5.53
26	3.49	3.82	4.77
33	3.35	3.50	3.77

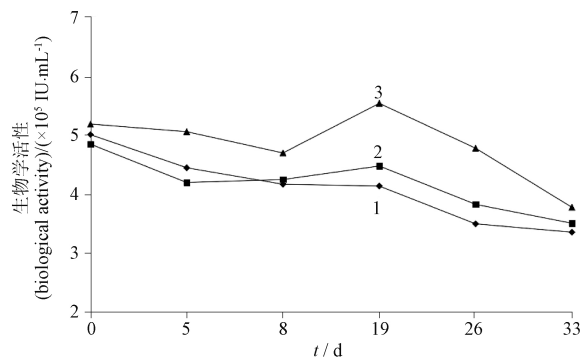
表 3 培养基适用性检查结果

Tab. 3 Test results of medium suitability

供试菌种类 (type of test bacteria)	被检培养基 (test culture medium)		对照培养基 (contrast culture medium)		比例 (ratio) / %
	计数 (count) / cfu	均值 (average value)	计数 (count) / cfu	均值 (average value)	
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	42	39	39	41	95
	35		42		
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	71	64	65	58	110
	57		50		
白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	53	55	55	54	102
	57		53		
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	18	19	20	20	95
	19		19		

注 (note): 对照培养基购自中国食品药品检定研究院 (contrast culture medium was purchased from National Institutes for Food and Drug Control)

菌落数的比值均在 0.5 ~ 2 范围内; 所以可以判定应用平皿法中的倾注法进行微生物计数, 方法适用性



1. 空白对照 (blank control) 2. 苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)  
3. 苯扎溴铵 (benzalkonium bromide)

图 1 抑菌剂筛选的生物学活性检测趋势图

Fig. 1 The trend of biological activity detection of bacteriostatic agent screening

### 3.2 抑菌效力检查结果

#### 3.2.1 培养基适用性检查结果

培养基适用性检查结果见表 3, 被检培养基上的菌落平均数不小于对照培养基上菌落平均数的 50%, 且菌落形态大小与对照培养基上的菌落一致, 所以可以判定本公司培养基室提供的胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基的适用性良好, 可满足试验需求。

#### 3.2.2 微生物计数方法适用性检查结果

微生物计数方法适用性检查结果见表 4, 试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组

良好, 可满足本制剂抑菌剂最低有效浓度筛选过程中的微生物计数要求。

表 4 微生物计数方法适用性检查结果

Tab. 4 Results of applicability examination of microbial counting method

培养基种类 (type of culture medium)	供试液稀释级 (dilution level of test solution)	供试菌种类及计数(type and count of test bacteria)/cfu			
		金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )
对照组(contrast group)		0	0	0	0
试验组(test group)	1:10	69	33	56	17
		63	55	44	13
平均值(average)		66	44	50	15
比值(ratio)		1.10	1.19	0.88	0.88
试验组(test group)	1:10 <sup>2</sup>	53	41	60	18
		77	39	66	16
平均值(average)		65	40	63	17
比值(ratio)		1.08	1.08	1.11	1.00
试验组(test group)	1:10 <sup>3</sup>	71	44	58	16
		55	38	58	18
平均值(average)		63	41	58	17
比值(ratio)		1.05	1.11	1.02	1.00
试验组(test group)	1:10 <sup>4</sup>	58	32	46	12
		78	44	66	20
平均值(average)		68	38	56	16
比值(ratio)		1.13	1.03	0.98	0.94
试验组(test group)	1:10 <sup>5</sup>	51	33	48	20
		67	31	48	16
平均值(average)		59	32	48	18
比值(ratio)		0.98	0.86	0.84	1.06
菌液组(bacterial liquid group)		63	38	57	19
		57	36	57	15
平均值(average)		60	37	57	17

### 3.2.3 抑菌效力检查结果

抑菌效力检查结果见表 5, 根据抑菌效力判断标准可以看出, 苯扎溴铵浓度为 0.04 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> 时对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌效力均符合 A 级; 苯扎溴铵浓度为 0.05 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> 时对白色念珠菌、黑曲霉的抑菌效力均符合 A 级; 继续采用苯扎溴铵抑菌浓度为 0.04 mg · mL<sup>-1</sup> 和 0.05 mg · mL<sup>-1</sup> 进行抑菌效力验证。

### 3.2.4 抑菌效力检查验证结果

抑菌效力检查验证结果见表 6, 根据抑菌效力判断标准可以看出, 苯扎溴铵浓度为 0.04 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> 时对铜绿假单胞菌和黑曲霉的抑菌效力均符合 A 级; 苯扎溴铵浓度为 0.05 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> 时对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌效力均符合 A 级; 确定了人干扰素 α1b 喷雾剂制剂处方中抑菌剂

苯扎溴铵的最低有效抑菌浓度为 0.05 mg · mL<sup>-1</sup>, 苯扎溴铵的合理添加剂量为 0.05 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup>。

## 4 讨论

本文采用生物学活性检测方法筛选了人干扰素 α1b 喷雾剂制剂处方中抑菌剂。结果可以看出, 相对于空白对照来说, 抑菌剂苯扎溴铵比苯扎氯铵对蛋白的保护效果要好一点, 所以, 最终选择苯扎溴铵作为人干扰素 α1b 喷雾剂的抑菌剂进行抑菌效力测定。

由于任何一种抑菌剂均具有一定的毒性, 因此, 制剂中抑菌剂的量应为最低有效量, 同时, 为保证用药安全, 成品制剂中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度<sup>[5-12]</sup>。已有文献表明了苯扎溴铵具有良好的抑菌性。抑菌效力测试对于药品制剂的用药安全非常重要, 对于抑菌剂的添加一定要在最低有效量的范围内, 不能过少, 更不能肆意添加<sup>[13-16]</sup>。

表 5 抑菌效力检查结果  
Tab. 5 Results of bacteriostatic efficacy test

苯扎溴铵浓度 (benzalkonium bromide concentration)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	供试品中菌落计数(以 lg 值计) [ colony count in the test sample (calculated by lg value) ]					是否符合规定 (compliance with regulations)
	0 d	2 d	7 d	14 d	28 d	
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )						
0.01	6.2	5.4(0.8)	4.1(2.1)	4.3(1.9)	4.3(1.9)	否(No)
0.02	6.0	5.2(0.8)	3.3(2.7)	3.2(2.8)	3.3(2.7)	否(No)
0.03	6.0	4.4(1.6)	3.2(2.8)	2.9(3.1)	2.9(3.1)	否(No)
0.04	5.7	3.7(2.0)	2.6(3.1)	2.5(3.2)	2.5(3.2)	是(Yes)
0.05	5.4	3.1(2.3)	2.3(3.1)	2.3(3.1)	2.1(3.3)	是(Yes)
0.08	4.8	2.3(2.5)	1.7(3.1)	1.4(3.4)	1.4(3.4)	是(Yes)
0.1	4.0	2.0(2.0)	1.0(3.0)	1.0(3.0)	1.0(3.0)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	6.2	6.2	6.0	6.4	5.7	是(Yes)
铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )						
0.01	6.5	5.0(1.5)	4.2(2.3)	4.2(2.3)	4.2(2.3)	否(No)
0.02	6.4	5.0(1.4)	4.1(2.3)	4.1(2.3)	4.1(2.3)	否(No)
0.03	6.4	5.0(1.4)	4.0(2.4)	4.0(2.4)	4.0(2.4)	否(No)
0.04	6.4	4.0(2.4)	3.0(3.4)	2.9(3.5)	2.9(3.5)	是(Yes)
0.05	6.3	4.0(2.3)	2.9(3.4)	2.9(3.4)	2.9(3.4)	是(Yes)
0.08	6.3	4.0(2.3)	2.8(3.5)	2.8(3.5)	2.7(3.6)	是(Yes)
0.1	6.3	3.9(2.4)	2.7(3.6)	2.7(3.6)	2.5(3.8)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	6.4	5.9	5.9	6.0	6.1	是(Yes)
白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )						
0.01	6.1	5.1(1.0)	5.2(0.9)	5.1(1.0)	5.1(1.0)	否(No)
0.02	6.3	5.1(1.2)	5.1(1.2)	4.7(1.6)	4.8(1.5)	否(No)
0.03	6.2	5.2(1.0)	4.9(1.3)	4.3(1.9)	4.2(2.0)	否(No)
0.04	6.2	5.2(1.0)	4.8(1.4)	4.2(2.0)	4.2(2.0)	否(No)
0.05	6.1	4.0(2.1)	2.7(3.4)	2.1(4.0)	2.0(4.1)	是(Yes)
0.08	6.1	3.9(2.2)	2.4(3.7)	1.8(4.3)	1.3(4.8)	是(Yes)
0.1	6.2	3.0(3.2)	2.3(3.9)	1.6(4.6)	1.3(4.9)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	6.1	6.3	6.3	6.4	6.4	是(Yes)
黑曲霉( <i>Aspergillus niger</i> )						
0.01	5.3	4.2(1.1)	4.2(1.1)	4.1(1.2)	3.3(2.0)	否(No)
0.02	5.3	4.0(1.3)	3.7(1.6)	3.5(1.8)	2.3(3.0)	否(No)
0.03	5.4	3.5(1.9)	2.1(3.3)	2.0(3.4)	2.0(3.4)	否(No)
0.04	5.3	3.4(1.9)	2.3(3.0)	2.0(3.3)	1.9(3.4)	否(No)
0.05	5.4	3.3(2.1)	2.3(3.1)	1.8(3.6)	1.8(3.6)	是(Yes)
0.08	5.2	3.2(2.0)	2.2(3.0)	1.7(3.5)	1.7(3.5)	是(Yes)
0.1	5.3	3.1(2.2)	2.1(3.2)	1.5(3.8)	1.5(3.8)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	5.3	5.2	5.3	5.4	5.5	是(Yes)
阴性对照组(negative control group)	-	-	-	-	-	是(Yes)

注(note): 括号内数值为与 0 d 相比减少的 lg 值(the values in parentheses represent the reduced lg value compared to 0 d)

表 6 抑菌效力验证检查结果  
Tab. 6 Results of bacteriostatic efficacy test

苯扎溴铵浓度 (benzalkonium bromide concentration)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	供试品中菌落计数(以 lg 值计) [colony count in the test sample (calculated by lg value)]					是否符合规定 (compliance with regulations)
	0 d	2 d	7 d	14 d	28 d	
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )						
0.04	6.0	4.9(1.1)	3.9(2.1)	2.9(3.1)	2.7(3.3)	否(No)
0.05	5.9	3.2(2.7)	2.9(3.0)	2.5(3.4)	2.1(3.8)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	5.9	6.3	6.1	6.1	6.0	是(Yes)
铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )						
0.04	6.0	3.9(2.1)	2.9(3.1)	2.9(3.1)	2.8(3.2)	是(Yes)
0.05	6.0	3.9(2.1)	2.9(3.1)	2.9(3.1)	2.6(3.4)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	6.4	5.8	6.0	6.1	6.4	是(Yes)
白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )						
0.04	5.8	5.5(0.3)	4.8(1.0)	4.2(1.6)	3.5(2.3)	否(No)
0.05	5.8	3.3(2.5)	2.7(3.1)	2.3(3.5)	2.3(3.5)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	5.7	6.1	6.2	6.1	6.2	是(Yes)
黑曲霉( <i>Aspergillus niger</i> )						
0.04	5.3	2.3(3.0)	2.3(3.0)	2.3(3.0)	2.3(3.0)	是(Yes)
0.05	5.2	2.2(3.0)	2.1(3.1)	2.0(3.2)	1.7(3.5)	是(Yes)
阳性对照组(positive control group)	5.4	5.3	5.4	5.2	5.2	是(Yes)
阴性对照组(negative control group)	-	-	-	-	-	是(Yes)

注(note):括号内数值为与0 d相比减少的lg值(the values in parentheses represent the reduced lg value compared to 0 d)

苯扎溴铵毒性低,对皮肤黏膜也是低刺激性,急性毒性的半数致死量(LD<sub>50</sub>,大鼠、口服)为230 mg · kg<sup>-1</sup>,参照FDA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products,苯扎溴铵作为眼科制剂的抑菌剂的最大剂量为0.01%<sup>[17]</sup>。本文依据2020年版《中国药典》通则1121 抑菌效力检查法,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌株,进行培养基适用性检查,菌落计数方法适用性检查,及不同浓度的苯扎溴铵分别对4种试验菌的抑菌效力检查及验证。在培养基适用性良好,应用平皿法中的倾注法进行微生物计数,方法适用性良好的基础上,确定了苯扎溴铵的最低有效抑菌浓度为0.05 mg · mL<sup>-1</sup>,苯扎溴铵的合理添加剂量为0.05 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup>。既达到了抑制微生物生长的目的,又使抑菌剂苯扎溴铵对人体的刺激和损害降至最低,以确保产品质量可靠,安全有效和稳定。

#### 参考文献

[1] 中华人民共和国药典2020年版. 四部[S]. 2020;8, 354, 176, 160

ChP 2020. Vol IV[S]. 2020;8, 354, 176

- [2] 潘学田. 中国医院制剂规范[M]. 第2版. 北京:中国医药科技出版社,1995:20  
PAN XT. Pharmaceuticals Regulates of Hospitals in China [M]. 2nd Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1995: 20
- [3] 郑俊民. 药用辅料手册[M]. 第四版. 北京:化学工业出版社,2005:60  
ZHENG JM. The Handbook of Pharmaceutical Excipients [M]. 4th Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:60
- [4] RAYMOND CR, PAUL JS, MARIAN EQ. Handbook of Pharmaceutical Excipients [M]. 6th Ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009: 56
- [5] 熊家娟. 药品中防腐剂的抗菌效力测定与评价[J]. 中国药事,2005,19(10):592  
XIONG JJ. Evaluation and testing of antimicrobial preservatives in drug [J]. Chin Pharm Aff, 2005, 19(10): 592
- [6] 李宁,陈松杰. 聚季铵盐-1和苯扎氯铵在眼用制剂中的应用研究进展[J]. 今日药学,2015,25(2):140  
LI N, CHEN SJ. Progress in the application of polyquaternary ammonium salt -1 and benzalkonium chloride in ophthalmic preparations [J]. Pharm Today, 2015, 25(2): 140
- [7] 李珏,王知坚,项露婷,等. 苯达赖氨酸滴眼液中抑菌剂的检

- 测与评价[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(5):884
- LI J, WANG ZJ, XIANG LT, *et al.* Evaluation and testing of antimicrobial preservatives in bendazac lysine eye drops[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(5):884
- [ 8 ] 肖璜, 杨美琴, 王似锦, 等. 国产滴眼液中常用抑菌剂的应用分析与评价[J]. 药学研究, 2017, 36(9):519
- XIAO H, YANG MQ, WANG SJ, *et al.* Analysis and evaluation of bacteriostatic agent application in domestic eye drops[J]. *J Pharm Res*, 2017, 36(9):519
- [ 9 ] 牛振东, 江志杰, 张光华, 等. 用微生物挑战性试验考察化妆品防腐剂效果[J]. 日用化学品科学, 2012, 35(3):36
- NIU ZD, JIANG ZJ, ZHANG GH, *et al.* Evaluation of the effect of preservatives in cosmetic with microbial challenge test[J]. *Deterg Cosmet*, 2012, 35(3):36
- [10] 朱荣峰, 陈伟盛, 简敏骞, 等. 阿昔洛韦滴眼液中苯扎溴铵含量的合理性探讨[J]. 中国药品标准, 2015, 16(6):420
- ZHU RF, CHEN WS, JIAN MQ, *et al.* Exploration of rational benzalkonium bromide contents in acyclovir eye drops[J]. *Drug Stand China*, 2015, 16(6):420
- [11] 肖璜, 林吉恒, 陈万胜, 等. 氯霉素滴眼液处方中尼铂金乙酯含量合理性探讨[J]. 中国药师, 2014, 17(5):785
- XIAO H, LIN JH, CHEN WS, *et al.* Exploration of rational ethylparaben contents in chloramphenicol eye drop [J]. *China Pharm*, 2014, 17(5):785
- [12] 林吉恒, 肖璜, 陈万胜, 等. 氯霉素滴眼液处方中硫柳汞含量的合理性分析[J]. 中国药师, 2014, 17(10):1687
- LIN JH, XIAO H, CHEN WS, *et al.* Analysis of rational thiomersal contents in chloramphenicol eye drop [J]. *China Pharm*, 2014, 17(10):1687
- [13] 罗庆进, 陈吉祥, 李素琴, 等. 一种不含抑菌剂的氧氟沙星滴眼液及其制备工艺:中国, CN105232452A[P]. 2015-10
- LUO QJ, CHEN JX, LI SQ, *et al.* An Ofloxacin Eye Drop without Antimicrobial Agent and Its Preparation Technology: China, CN105232452A[P]. 2015-10
- [14] CHA SH, LEE JS, OUM BS, *et al.* Corneal epithelial cellular dysfunction from benzalkonium chloride (BAC) *in vitro*[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2004, 32(2):180
- [15] PELLINEN P, HUHTALA A, TOLONEN A, *et al.* The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium *in vitro* and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues *in vivo*[J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(2):145
- [16] 张超, 赛景影, 张晓天, 等. 一次性氧氟沙星滴眼液抑菌效力的检测及其结果评价[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(1):113
- ZHANG C, SAI JY, ZHANG XT, *et al.* Detection of bacteriostatic effect and evaluation of disposable ofloxacin eye drops[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2014, 40(1):113
- [17] 朱世真, 王丽芳, 王尊文, 等. 常用滴眼剂抑菌效力的考察[J]. 中国药品标准, 2016, 17(2):95
- ZHU SZ, WANG LF, WANG ZW, *et al.* Investigation on bacteriostatic efficacy of common eye drops [J]. *Drug Stand China*, 2016, 17(2):95

(本文于2023年12月20日修改回)