

· 论 著 ·

2 种外用制剂微生物限度检查方法的建立

杨晓峰, 秦利芬, 李 聃, 李惠英[△]
(昆明市儿童医院, 云南 昆明 650000)

[摘要] **目的** 建立医院 2 种外用制剂——0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂的微生物限度检查方法。**方法** 按 2020 年版《中国药典》(通则 9202)采用平皿法对 2 种制剂各 3 个批次开展计数方法和控制菌检查方法的适用性试验。需氧菌、霉菌、酵母菌总数计数采用 Minitab21 软件进行分析,并计算回收率。**结果** 需氧菌、霉菌、酵母菌计数方法适用性试验中各试验菌的回收比为 0.62~0.91;按常规法检测控制菌,生长良好。**结论** 通过方法适用性试验回收比均达到 0.5~2.0 标准范围,平皿法能真实反映 2 种制剂微生物检测结果。采用 1:10 稀释法制备 0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂供试品,选择平皿法可适用于 2 种外用制剂的日常微生物限度检查。

[关键词] 微生物限度检查; 滴鼻剂; 洗剂; 平皿法; 回收率
DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.07.004 **中图法分类号:**R927.1
文章编号:1009-5519(2025)07-1555-05 **文献标识码:**A

Establishment of microbial limit test methods for two kinds of external preparations

YANG Xiaofeng, QIN Lifan, LI dan, LI Huiying[△]
(Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan 650000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for microbial limit test of two kinds of external preparations (0.9% sodium chloride nasal drops and white lotion). **Methods** According to the 2020 edition of The Chinese Pharmacopoeia (General 9202), the applicability test of counting method and control bacteria test method was carried out for three batches of two preparations by plate method. The total count of aerobic bacteria, molds and yeasts was analyzed by Minitab21, and the recovery rate was calculated. **Results** The recovery rate of each test bacteria in the applicability test of aerobic bacteria, mold and yeast counting method was 0.62—0.91. According to the conventional method, the control bacteria grew well. **Conclusion** The recovery rate of the method applicability test reaches the standard range of 0.5—2.0, and the plate method can truly reflect the microbial test results of the two preparations. The test samples of 0.9% sodium chloride nasal drops and white lotion were prepared by 1:10 dilution method. The plate method can be applied to the daily microbial limit test of two kinds of external preparations.

[Key words] Microbial limit test; Nasal drops; Lotion; Plate method; Recovery rate

微生物限度检查是用于检测和控制药品中微生物数量和种类的方法^[1]。在药品的原料选取、制剂、包装等过程中均可能引入微生物,微生物会降低药物的疗效,甚至使药品变质或失效,从而对人体健康存在潜在的危害^[2-3]。因此,要建立有效的微生物限度检查方法,确认所采用的方法适合于制剂的微生物计数及控制菌检查,保证生产过程中每个批次的药品均安全、有效,保障患者的健康和权益^[4-5]。

0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂为某儿童医院根据儿童生理特点、结合临床用药需求自主研发的医院制剂,多年临床使用具有疗效好,不良反应少等特点。0.9%氯化钠滴鼻液主要成分为氯化钠,为等渗溶液,

可清洁并湿润鼻腔,用于鼻腔干燥治疗。白色洗剂由氧化锌、液化酚等组成,用于皮炎、皮肤瘙痒症治疗等。白色洗剂中的苯酚具有消毒的功效,有使蛋白变性的作用。为系统地验证样品浓度在检验条件下对污染微生物的生长没有抑制作用,样品中的微生物能真实反映出来^[6]。本研究按 2020 年版《中国药典》(通则 9202)指导原则初步建立了 2 种制剂的微生物限度检查方法,制定有效的制剂质量控制标准,以保证检验结果的准确性和有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与菌株 胰酪大豆胨琼脂培养基

作者简介:杨晓峰(1989—),硕士研究生,主管药师,主要从事制剂检验工作。 [△] **通信作者,** E-mail:370870092@qq.com。

网络首发 <https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250702.0913.002>

(1068601)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(1068011)、胰酪大豆胨液体培养基(1068901)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(1065732)、溴十六烷基三甲铵培养基(1073801)、麦康凯琼脂培养基(171291)、麦康凯液体培养基(1065841)、pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(1106631)、金黄色葡萄球菌 CMCC(B) 26003、铜绿假单胞菌 CMCC(B) 10104、枯草芽孢杆菌 CMCC(B) 63501、白色念珠菌

CMCC(F) 98001、黑曲霉菌 CMCC(F) 98003、大肠埃希菌 CMCC(B) 44102^[7]、0.9%氯化钠滴鼻液[滇药制字(H) 20102807A, 批号: 20181221、20190124、20190315]、白色洗剂[滇药制字(H) 20082806A, 批号: 20181203、20190131、20190402]等。
1.1.2 仪器与设备 各仪器、设备的生产厂家、型号、编号等见表 1。

表 1 仪器与设备

仪器名称	厂家	型号	编号
鼓风干燥箱	上海跃进医疗器械有限公司	GZX-3BS-II/H	10251711
电子天平	上海舜宇恒平科学有限公司	JY10002	SHP021017100599
立式压力蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	LDZM-60KCS-II	60G180030
生物安全柜	苏净安泰	BSC-1304IIA2	J17112385
生化培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	LRH-150F	171146062
生化培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	LRH-150F	171147490
霉菌培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	MJ-150F-I	171042415

1.2 方法

1.2.1 供试液制备 随机抽取 0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂最小包装各 2 份, 分别取 2 种制剂 10 mL, 用已灭菌的缓冲液稀释至 100 mL, 制成 1:10 的供试液^[8]。于 1 h 内使用完。

1.2.2 菌液的制备^[9]

1.2.2.1 需氧菌的菌液制备 用取样环分别取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的胰酪大豆胨琼脂斜面培养物一环, 放入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基内, 30~35 ℃培养 24 h, 取培养物 10 mL 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成 10⁻¹ 的菌液, 依法 10 倍稀释至 10⁻⁷, 取 50~100 CFU/mL 菌液备用。

1.2.2.2 白色念珠球菌的菌液制备 取白色念珠菌的沙氏葡萄糖琼脂斜面培养物, 加入沙氏葡萄糖琼脂培养基中, 20~25 ℃培养 2~3 d 取白色念珠菌的沙氏葡萄糖琼脂培养物一铂金饵, 加入 9 mL、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 制成 10⁻¹ 的菌液, 依法 10 倍稀释至 10⁻⁷, 取 50~100 CFU/mL 菌液备用。

1.2.2.3 黑曲霉菌的菌液制备 取黑曲霉的新鲜培

养物接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面上, 20~25 ℃培养 5 d, 加入 10 mL 含 0.05%聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 将孢子洗脱。取 1 mL 孢子悬液加入含 0.05%聚山梨酯 80 的 9 mL、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 制成 10⁻¹ 的菌液, 依法 10 倍稀释至 10⁻⁷, 取 50~100 CFU/mL 菌液备用。

1.2.2.4 大肠埃希菌的菌液制备 用取样环取大肠埃希菌的胰酪大豆胨琼脂斜面培养物一环, 放入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基内, 30~35 ℃培养 24 h 取培养物 10 mL 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成 10⁻¹ 的菌液, 依法 10 倍稀释至 10⁻⁷, 取 50~100 CFU/mL 菌液备用。

1.2.3 需氧菌、霉菌、酵母菌计数方法适用性试验^[10] 需氧菌计数方法适用性试验见表 2。霉菌、酵母菌计数方法适用性试验见表 3。

1.2.4 控制菌检查方法验证 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌检查方法验证见表 4~6。

1.2.5 回收比计算 根据试验数据计算回收率, 回收率(%) = $\frac{\text{试验组菌落数} - \text{供试品对照组菌落数}}{\text{菌液组菌落数}}$ 。

表 2 需氧菌计数方法适用性试验

组别	样品制备		样品取样量(mL)	培养基	培养条件
	菌液 ^a 量(mL)	供试液 ^b 量(mL)			
试验组	1	10	1	分别加入胰酪大豆胨琼脂培养基	30~35 ℃, 不超过 3 d
供试品对照组	缓冲液 1 mL 替代	10	1		
菌液对照组	1	缓冲液 10 mL 替代	1		
阴性对照组	0	缓冲液 10 mL 替代	1		

注: ^a 指 1.2.2.1、1.2.2.2、1.2.2.3 项中 5 种菌液; ^b 指 1.2.1 项中各供试液。

表 3 霉菌、酵母菌计数方法适用性试验

组别	样品制备		样品取样量(mL)	培养基	培养条件
	菌液 ^a 量(mL)	供试液 ^b 量(mL)			
试验组	1	10	1	分别加入沙氏葡萄糖琼脂培养基	20~25 ℃,不超过 5 d
供试品对照组	缓冲液 1 mL 替代	10	1		
菌液对照组	1	缓冲液 10 mL 替代	1		
阴性对照组	0	缓冲液 10 mL 替代	1		

注：^a 指 1.2.2.2、1.2.2.3 项中 2 种菌液；^b 指 1.2.1 项中各供试液。

表 4 金黄色葡萄球菌检查方法验证

组别	样品制备		增菌培养基	增菌培养条件	分离培养	分离培养条件
	菌液 ^a 量(mL)	供试液 ^b 量(mL)				
供试品组	缓冲液 1 mL 代替	10	分别加入胰酪大豆胨液体培养基	30~35 ℃,18 h	接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上	30-35 ℃,18 h
试验组	1	10				
菌液对照组	1	缓冲液 10 mL 代替				
阴性对照组	0	缓冲液 10 mL 代替				

注：^a 指 1.2.2.1 项中金黄色葡萄球菌菌液；^b 指 1.2.1 项中各供试液。

表 5 铜绿假单胞菌检查方法验证

组别	样品制备		增菌培养基	增菌培养条件	分离培养	分离培养条件
	菌液 ^a 量(mL)	供试液 ^b 量(mL)				
供试品组	缓冲液 1 mL 代替	10	分别加入胰酪大豆胨液体培养基	30~35 ℃,18 h	接种于溴十六烷基三甲铵培养基平板上	30~35 ℃,18 h
试验组	1	10				
菌液对照组	1	缓冲液 10 mL 代替				
阴性对照组	0	缓冲液 10 mL 代替				

注：^a 指 1.2.2.1 项中铜绿假单胞菌菌液；^b 指 1.2.1 项中各供试液。

表 6 大肠埃希菌检查方法验证

组别	样品制备		增菌培养基	增菌培养条件	分离培养	分离培养条件
	菌液 ^a 量(mL)	供试液 ^b 量(mL)				
供试品组	缓冲液 0.1 mL 代替	10	分别取胰酪大豆胨液体培养物 1 mL 于麦康凯液体培养基中	42~44 ℃,24~48 h	接种于麦康凯琼脂培养基平板上	30~35 ℃,18~72 h
试验组	0.1	10				
菌液对照组	0.1	缓冲液 10 mL 代替				
阴性对照组	0	缓冲液 10 mL 代替				

注：^a 指 1.2.2.4 项中大肠埃希菌菌液；^b 指 1.2.1 项中 0.9%氯化钠滴鼻液。

1.3 统计学处理 应用 Mintab21 统计软件对数据进行分析,采用单因子方差分析,以微生物计数培养结果为响应,设置信水平 95%双侧区间类型,比较误差率为 5,假设等方差的比较过程 Tukey 对数据进行分组,得到均值、标准差及差异性。对制剂需氧菌、霉菌、酵母菌总数各组别计数均值进行对比,当差异性共享字母时均值之间无明显差异,反则有差异。

2 结 果

2.1 2 种制剂需氧菌、霉菌、酵母菌总数计数检查方

法适用性检查结果 0.9%氯化钠滴鼻液各菌液组、试验组菌株生长良好,供试品对照组和阴性对照组无生长,且组内均值无差异;白色洗剂各菌液组、试验组菌株生长良好,供试品对照组和阴性对照组无生长,其中需氧菌总数计数中金黄色葡萄球菌、黑曲霉均值有差异。见表 7、8。

2.2 回收比 需氧菌、霉菌、酵母菌总菌株计数回收比均在 0.5~2.0 的范围内,符合《中国药典》2020 年版规定^[11]。见表 9。

表 7 0.9%氯化钠滴鼻液需氧菌、霉菌、酵母菌总数 计数方法适用性检查结果				
菌株名称	N 值	均值	标准差	差异性 *
需氧菌				
金黄色葡萄球菌				
菌液组	6	87.0	11.3	a
试验组	6	81.0	15.6	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
枯草芽孢杆菌				
菌液组	6	72.0	8.5	a
试验组	6	55.5	2.1	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
铜绿假单胞菌				
菌液组	6	63.0	5.7	a
试验组	6	72.5	4.9	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
白色念株菌				
菌液组	6	50.5	30.4	a
试验组	6	40.0	5.7	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
黑曲霉				
菌液组	6	50.5	6.4	a
试验组	6	55.5	6.4	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
霉菌和酵母菌				
白色念株菌	6	62.0	7.1	a
白色念株菌				
菌液组	6	42.0	8.5	a
试验组	6	0	0	
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组				
黑曲霉				
菌液组	6	64.0	11.3	a
菌液组	6	55.0	29.7	a
试验组	6	0	0	
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	

注：* 不共享字母的均值之间具有明显差异；a 表示不同组数据比较无差异。

表 8 白色洗剂需氧菌、霉菌、酵母菌总数计数 方法适用性检查结果				
菌株名称	N 值	均值	标准差	差异性 *
需氧菌				
金黄色葡萄球菌				
菌液组	6	95.5	2.1	a
试验组	6	61.5	12.0	b
供试品对照组	6	0	0	

续表 8 白色洗剂需氧菌、霉菌、酵母菌总数计数 方法适用性检查结果				
菌株名称	N 值	均值	标准差	差异性 *
阴性对照组				
6	0	0		
枯草芽孢杆菌				
菌液组	6	51.5	2.1	a
试验组	6	38.5	13.4	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	a
铜绿假单胞菌				
菌液组	6	59.0	8.5	
试验组	6	45.5	4.9	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
白色念株菌				
菌液组	6	50.5	30.4	a
试验组	6	46.0	1.4	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
黑曲霉				
菌液组	6	95.5	0.7	a
试验组	6	59.5	12.0	b
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
霉菌和酵母菌				
白色念株菌				
菌液组	6	62.0	7.1	a
试验组	6	40.5	5.0	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	
黑曲霉				
菌液组	6	79.0	9.9	a
试验组	6	57.0	14.1	a
供试品对照组	6	0	0	
阴性对照组	6	0	0	

注：* 不共享字母的均值之间具有显著差异；a 表示不同组数据比较无差异，b 表示同组数据比较有差异。

2.3 控制菌检查方法验证结果 控制菌在试验组和菌液组均可检出，阴性对照组和供试品组均未检出。见表 10。

表 9 回收比		
适用性检查	平均回收率	
	0.9%氯化钠滴鼻液	白色洗剂
需氧菌总数		
金黄色葡萄球菌	0.93	0.64
枯草芽孢杆菌	0.77	0.75
铜绿假单胞菌	1.15	0.77
白色念珠菌	0.79	0.91

续表 9	回收比	
	平均回收率	
	0.9%氯化钠滴鼻液	白色洗剂
适用性检查		
黑曲霉	1.10	0.62
霉菌和酵母菌总数		
白色念珠菌	0.68	0.65
黑曲霉	0.86	0.72

表 10 2 种制剂控制菌检查方法验证结果				
制剂名称	试验组	菌液组	阴性对照组	供试品组
0.9%氯化钠滴鼻液				
金黄色葡萄球菌	+	+	—	—
铜绿假单胞菌	+	+	—	—
大肠埃希菌	+	+	—	—
白色洗剂				
金黄色葡萄球菌	+	+	—	—
铜绿假单胞菌	+	+	—	—

注：—表示无菌生长；+表示控制菌生长良好。

3 讨 论

本研究对 2 种制剂供试品分别进行平行回收率试验,通过回收比值公式计算,2 种外用制剂所有实验菌种的需氧菌、霉菌、酵母菌总数计数回收比均在 0.5~2.0 的范围内,证明采用的供试品制备方法、计数方法对可能污染的微生物生长没有影响^[12]。由表 8 可见,白色洗剂需氧菌总数计数金黄色葡萄球菌、黑曲霉均值对比具有差异。白色洗剂中含有的苯酚为消毒防腐剂,可使蛋白质凝固沉淀具有抑菌作用,可能对试验组金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌具有抑制作用,该菌液组、试验组虽均值存在差异,回收率分别为 0.64、0.62,但符合规定,表明供试品采用常规稀释(1:10)检查法适用于 0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂的检查。有研究采用常规法对控制菌检查进行检查结果显示,2 种外用制剂的微生物限度检查结果均符合规定^[13]。

综上所述,部分医院制剂质量标准制定较早,微生物限度检查方法适用性检查缺失,日常检验结果准确性尚有待于验证。本研究根据 2020 年版《中国药典》(通则 9202)进行计数方法适用性试验和控制菌检

查,结果符合药典要求。采用平皿法证实 2 种制剂的需氧菌、霉菌、酵母菌回收比值均为 0.5~2.0,用常规法可检出控制菌^[14-15]。本研究建立了医院制剂 0.9%氯化钠滴鼻液、白色洗剂的微生物限度检查方法,为质量控制提供了可靠的检测手段,能为相关的研究提供参考依据,对保障制剂质量具有重要意义。

参考文献

[1] 蔡金莲.7 批化妆品微生物检查方法学研究[J].海峡药学,2020,32(2):68-71.

[2] 郑域茹,吴燕燕,程琳,等.非布司他原料药微生物限度检查法的建立[J].中国医药科学,2023,13(21):75-79.

[3] 翁静艳,赵柳娅,张平,等.4 种抑菌液体剂制微生物限度检查方法学研究及比较[J].中国医院药学杂志,2024,44(5):495-499.

[4] 李昀铮.不同厂家二丁颗粒微生物限度检查方法建立及结果分析评价[J].工业微生物,2023,53(6):115-117.

[5] 赵慧雯,冯斌.15 种医院口腔抑菌制剂微生物限度检查方法的建立[J].中国药业,2024,33(8):75-79.

[6] 于世海,胡佳,马丽.金草片微生物限度检查方法的适用性研究[J].中国卫生产业,2017,14(31):38-39.

[7] 李惠英,秦利芬,李聃,等.医院制剂紫黄软膏微生物限度检查法的建立[J].儿科药学杂志,2020,26(9):53-55.

[8] 刘立.板蓝根颗粒和感冒清热颗粒微生物限度试验方法的适用性研究[J].天津药学,2024,36(1):11-13.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].四部.北京:中国医药科技出版社,2020:1105-1107.

[10] 潘震宇,汤茜,李瑞莲.硝酸布康唑栓微生物限度检查方法适用性试验研究[J].中国药事,2017,31(1):43-48.

[11] 庞云娟,刘康连,梁晓玲,等.药品微生物限度检查方法适用性的研究进展[J].药物分析杂志,2024,44(8):1258-1292.

[12] 王一帆,夏伟,贺娟,等.3 种医院制剂的微生物限度方法验证[J].云南化工,2022,49(12):56-58.

[13] 郑域茹,朱铮,郑挺,等.安乐阴洗剂微生物限度检查方法学的研究[J].中国医药科学,2023,13(23):77-81.

[14] 孙莺,郭朝晖,宋京都.8 种医院制剂微生物限度检查方法验证[J].中国药事,2014,28(8):839-842.

[15] 刘佳,杨跃辉.赤丹丸微生物限度检查方法适用性研究[J].海峡药学,2024,36(7):44-47.

(收稿日期:2024-09-20 修回日期:2024-02-26)

(上接第 1554 页)

[25] CHIN A P M,VAN U J,RIPHAGEN I,et al. The functional effects of physical exercise training in frail older People;a systematic review[J]. Sports Med,2008,38(9):781-793.

[26] WARNER L M,SCHIIZ B,KNITTLE K,et al. Sources of perceived self-efficacy as predictors of physical activity in older adults[J]. Appl Psychol Health Well Being, 2011,3(2):172-192.

[27] 邓思思,何懿,姬亚茹,等.强直性脊柱炎疼痛患者运动锻炼状况及影响因素分析[J].护理学杂志,2019,34(5):82-85.

[28] 刘婷婷,程胜娟,杨淑怡.慢性病病人社会支持与感知控制现状及其影响的研究进展[J].循证护理,2023,9(3):431-434.

(收稿日期:2024-08-20 修回日期:2025-02-23)