

紫草婴儿凝胶及软膏的微生物限度检查方法学验证

解翠珠, 程 静 (云南省曲靖市食品药品检验所, 云南 曲靖 655000)

摘要 目的: 建立紫草婴儿凝胶和紫草婴儿软膏的微生物限度检查标准方法。**方法:** 按《中国药典》2005版的有关要求, 通过接种代表性的阳性菌株, 采用常规法、稀释法及薄膜过滤法进行方法学验证。**结果:** 紫草婴儿凝胶和紫草婴儿软膏由于剂型不同, 微生物限度检查所采用的方法也不同。**结论:** 紫草婴儿软膏细菌数、霉菌和酵母菌计数, 控制菌金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检查均可采用常规法进行检验; 紫草婴儿凝胶细菌数计数、控制菌金黄色葡萄球菌检查需采用稀释法进行检验, 霉菌和酵母数计数、控制菌铜绿假单胞菌检查可采用常规法进行检验。

关键词 紫草婴儿凝胶; 紫草婴儿软膏; 微生物限度检查; 方法学验证

中图分类号: R927.11 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)02-0136-03

紫草婴儿凝胶和紫草婴儿软膏均以紫草、红花为主药, 以不同的基质和辅料而制成的两种制剂, 具有清热、活血、润肤的作用, 临床用于婴儿臀红症(尿布疹)轻症的治疗及预防。当建立药品的微生物限度检查法时, 应进行方法的验证, 以证明所采用的方法适合于该药品的细菌、霉菌及酵母菌数的测定及控制菌检查^[1]。本文通过接种代表性的6种阳性菌株, 采用常规法, 稀释法, 薄膜过滤法等方法进行实验, 为同一品种不同剂型的两种制剂的药品建立了相应微生物限度检查标准方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 HTY-III型智能集菌仪(杭州泰林医疗器械厂生产); YJA型匀浆仪(台州市五椒江机械有限公司); SPX-100 B-Z型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 样品 紫草婴儿软膏(样品1)(云南雄业制药有限公司, 规格20g/支, 批号041203), 紫草婴儿凝胶(样品2)(云南雄业制药有限公司, 规格50g/瓶, 批号051205)。

1.3 培养基 胆盐乳糖培养基(批号, 05222), 玫瑰红钠琼脂(批号, 030710), 营养琼脂培养基(批号, 050328), 改良马丁琼脂培养基(批号, 010315), 营养肉汤培养基(批号, 011008), pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号, 050217)。

1.4 菌种 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(F) 44102]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10104], 上述菌种均由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法验证

微生物限度检查验证实验按中国药典2005年版微生物限度检查法(附录XIJ)^[2]进行。

2.1 菌液制备 取上述经34℃培养18~24h的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌与枯草芽孢杆菌肉汤液体培养物1mL, 加入9mL 0.9%氯化钠溶液中, 10倍稀释至 $10^5 \sim 10^7$ 备用; 取经24℃培养18~24期成绩h的白色念珠菌霉菌液体培养物1mL, 加入9mL 0.9%氯化钠溶液中, 10倍稀释至 10^5 备用; 取经培养1周的黑曲霉菌斜面物, 加0.9%氯化钠溶液3mL, 洗下孢子, 转移至另一空管, 标准比浊后, 取1mL加入0.9%氯化钠溶液中10倍稀释至 10^4 备用。

2.2 菌液的检验 取上述金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草杆菌、大肠埃希菌 $10^5 \sim 10^7$ 稀释液各1mL, 用45℃营养琼脂培养基20mL注皿, 各平行测定两皿, 30~35℃培养48h计数, 应约为50~100cfu/mL; 取上述白色念珠菌 $10^5 \sim 10^6$ 稀释液及上述黑曲霉菌 10^4 孢子悬液各1mL, 用45℃琥红琼脂培养基20mL注皿, 各平行测定两皿, 23~28℃培养, 逐日观察计数, 应约为50~100cfu/mL。结果见表1。

2.3 供试液制备 取样品10g加45℃pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100mL, 混匀, 作为1:10的供试液。

表 1 实验用菌液检验菌落计数结果 (cfu/mL)

实验方法	金葡菌 10 ⁶	枯草杆菌 10 ⁵	白色念珠菌 10 ⁵	黑曲霉 10 ⁴	大肠杆菌 10 ⁶	铜绿假单胞菌 10 ⁵
常规法	112 116	62, 60	138 142	79, 71	66, 70	99 98
稀释法	73 83	/	/	/	/	/
薄膜过滤法	46 58	/	/	/	/	/

注: 已通过验证。

2.4 回收率的测定

2.4.1 细菌数霉菌数常规法测定 ①试验组: 取 1: 10 供试液 1 mL, 50~100 cfu 试验菌同时加入平皿中, 立即倾注琼脂培养基, 待凝固后, 置规定温度培养 24~72 h 逐日观察结果。②菌液组: 测定每一菌株所加的试验菌数 (同菌液检验)。③供试品对照组: 取 1: 10 供试液 0.2 mL 加入平皿中, 立即倾注琼脂培养基, 待凝固后, 置规定温度培养 24~72 h 逐日观察结果, 测定供试品本底菌数。

2.4.2 细菌数霉菌数稀释法测定 ①试验组: 取 1: 10 供试液 0.2 mL/皿、50~100 cfu 试验菌同时加入平皿中, 立即倾注琼脂培养基, 待凝固后, 置规

定温度培养 24~72 h 逐日观察结果。②菌液组: 测定每一菌株所加的试验菌数 (同菌液检验)。③供试品对照组: 取 1: 10 供试液 0.2 mL 加入平皿中, 立即倾注琼脂培养基, 待凝固后, 置规定温度培养 24~72 h 逐日观察结果, 测定供试品本底菌数。

2.4.3 细菌数薄膜过滤法测定 取 1: 10 的供试液 1 mL, 注入开放式滤器 (先用少量缓冲液润湿滤器), 用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 每次 100 mL 共 4 次 (总冲洗 400 mL), 取 1 mL (50~100 cfu) 试验菌注入滤器, 混匀抽干后, 取出滤膜菌面朝上贴入规定琼脂平板培养基中, 置规定温度培养 4 d 逐日观察, 结果见表 2。

表 2 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证回收率 (%) 测定结果

实验方法	金葡菌	枯草杆菌	白色念珠菌	黑曲霉	大肠杆菌
样品 1(常规法)	90.2	100.0	77.2	86.7	95.6
样品 2(常规法)	24.3	81.8	93.9	100.0	100.0
样品 2(稀释法)	79.5	/	/	/	/
样品 2(薄膜过滤法)	88.5	/	/	/	/

注: 已通过验证。

2.5 回收率的计算 按如下公式计算试验组的加菌回收率:

试验组的加菌回收率 =

$$\frac{\text{试验组的平均菌落数} - \text{供试品对照组的平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

2.6 控制菌检查方法的验证 取 1: 10 供试液 10 mL 加入 100 mL 胆盐乳糖培养基中, 同时加入上述铜绿假单胞菌液 1 mL, 置 35 °C 培养 24 h 取稀释液 10 mL 加入 100 mL 胆盐乳糖培养基, 置 35 °C 培养 24 h 作为阴性对照。另取 1: 10 供试液 1 mL 加入 200 mL 亚硫酸钠肉汤培养基中, 同时加入上述金黄色葡萄球菌液 1 mL, 置 35 °C 培养 24 h 取稀释液 10 mL 加入 200 mL 亚硫酸钠肉汤培养基中, 置 35 °C 培养 24 h 作为阴性对照。

3 结果

从表 2~3 结果可以看出: 样品 1 常规法对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、大肠

埃希菌回收率均高于 70%; 样品 2 常规法对枯草杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、大肠埃希菌回收率均高于 70%, 对金黄色葡萄球菌低于 70%, 稀释法、薄膜过滤法对金黄色葡萄球菌回收率都高于 70%。

表 3 控制菌的检查结果

实验方法	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌
样品 1(常规法)	+	+
样品 2(常规法)	+	-
样品 2(稀释法)	/	+

注: 已通过验证。

4 讨论

当试验组菌回收率低于 70%, 应采用稀释法、薄膜过滤法进行方法验证^[3]; 控制菌试验组若未检出试验菌, 应采用稀释法进行方法验证^[4]。样品 1 常规法对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、大肠埃希菌回收率均高于 70%; 样品 2

(下转第 150 页)

4 创建以病房药房为中心的药师治疗团队

下临床的药师通常都会感到投入大量的精力, 收益和效果却甚微。因为它不像医师有 "三级查房制度", 住院医师有问题可以向上级主治、主任医师请示。药师在临床中有了问题, 多数需要自己去寻找解决问题的办法, 因此, 我们要调动自己身边药师的主观能动性。例如, 把每次下临床的问题与收获同病房药房小组成员分享。把典型病例摘抄下来做成药历, 与其它药师讨论, 找出治疗过程中合理的以及存在的问题。使那些没有机会下临床的药师也能将自己的专业特长发挥出来, 间接的为临床服务。同时, 大家取长补短, 互通有无, 使药师逐渐改变思考问题的方式, 整体药师素质得到提高, 逐渐形成临床药师的人才梯队。临床药师有了所有病房药房药师这样一个坚强的团体作为后盾, 每当遇到问题时, 都可以及时解决。由于经过讨论的建议都比较成熟, 下临床的药师可以将病历讨论的药物治疗计划和建议再与医师分享, 因此, 药师所提出的建议也容易被临床医师接受和采纳。这样临床药师就会逐渐成为治疗小组中不可缺少的一员, 并成为连接药房和病房的桥梁和纽带。

我国住院医师培训制度从 1921 年到现在经历四个阶段的演变, 即萌芽时期、试验时期、建立时期以及完善时期^[6]。现已经形成了规范的住院医师培训制度。而临床药师的工作之所以步履艰辛, 是因为目前的临床药师培养制度还不够完善。卫生部与国家中医药管理局于 2002 年 1 月 21 日联合颁布的《医疗机构药事管理暂行规定》提出医疗机构 "逐步建立临床药师制", 旨在规范药事管理, 促进合理用药, 提升药物治疗水平, 维护患者权益。这是我国首次最早提出临床药师的地位和工作内容的文件。

2005 年出台《医院管理评价指南》明确提出 "开展临床药学工作, 建立临床药师制"。为了更好的贯彻《医疗机构药事管理暂行规定》, 2005 年 11 月卫生部发布《关于开展临床药师培训试点工作的通知》在全国设立首批 19 个临床药师培训试点基地, 这表明国家正在逐步建立适合我国国情的临床药师培训模式、建设和培养临床药师师资队伍和管理队伍、促进我国临床药学制度的建立和完善等方面进行有益的探索和实践。

从宏观角度讲, 希望有关政府部门能够出台象住院医师培训制度一样的临床药师培训制度, 从宏观上给临床药师一个能够有制度保障的快速成长的环境, 使高年资药师的经验得以传授给年轻药师。从自身角度来讲, 药师应努力提高专业素质, 使自己能够顺应社会需求的发展。

总之, 年轻药师不能好高骛远, 只有踏踏实实把每一件小事做好, 不断地积累经验, 取得医师护士的支持, 赢得患者的信任, 正是药师下临床顺利工作的开始。

参考文献:

- [1] 黄祥, 许景峰, 李勇, 等. 药学服务模式与实践 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(4): 314.
- [2] 李向平, 李电明, 郭庭江. 抗生素后效应与合理用药 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(3): 369.
- [3] 孔微. 从希舒美 3 天疗法谈抗生素后效应 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2003, 13(2): 124.
- [4] 张健, 张静. 药师下临床的初步感受 [J]. 江苏药学与临床研究, 2004, (12): 37.
- [5] 306 种注射剂临床配伍应用检索表. 北京: 中国医药科技出版社, 2004.
- [6] 唐国瑶, 陈建俞. 我国住院医师培训制度的历史演变 [J]. 医学教育探索, 2006, 5(2): 99.

收稿日期: 2007-03-16

(上接第 137 页)

常规法对枯草杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌、大肠埃希菌回收率均高于 70%, 但对金黄色葡萄球菌回收率低于 70%, 而稀释法、薄膜过滤法对金黄色葡萄球菌回收率都高于 70%, 控制菌金黄色葡萄球菌常规法未检出试验菌, 采用稀释法检出了试验菌。当同一样品既可用稀释法测定又可用薄膜过滤法测定时, 一般采用稀释法进行测定, 这样既可以简化实验操作又可节约检验成本。

通过接种 6 株阳性试验菌株, 经方法学验证, 建立了紫草婴儿软膏、紫草婴儿凝胶微生物限度检查

标准方法: 紫草婴儿软膏细菌数、霉菌数、酵母菌数计数及控制菌检查均可采用常规法进行测定。紫草婴儿凝胶霉菌数、酵母菌数计数及控制菌铜绿假单胞菌检查均可采用常规法进行测定, 细菌数计数需采用稀释法进行测定, 控制菌金黄色葡萄球菌检查可采用稀释法进行测定。

参考文献:

- [1~5] 中国药典 2005 年版 [S]. 二部. 附录: 2005: 附录 94 93 94, 96.

收稿日期: 2007-06-28