

· 研究报告 ·

复方间苯二酚洗剂微生物存活性考察

黄雄伟,高静华,高春红(同济大学附属杨浦医院药剂科,上海 200090)

[摘要] **目的** 考察微生物在复方间苯二酚洗剂中的存活性,确认复方间苯二酚洗剂的杀菌作用。**方法** 在复方间苯二酚制剂中分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 个菌种,放置 24 h,再按薄膜过滤法分别对 5 个菌种进行微生物限度检测。**结果** 在复方间苯二酚洗剂中 5 种微生物菌种均未长菌,说明均被杀死,回收率均为零。**结论** 复方间苯二酚洗剂中微生物不能存活。

[关键词] 复方间苯二酚洗剂;微生物存活性;薄膜过滤法

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)01-0076-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.020

Study on microbial viability of compound resorcinol lotion

HUANG Xiongwei,GAO Jinghua,GAO Chunhong (Department of Pharmacy,Shanghai Yangpu Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200090,China)

[Abstract] **Objective** To study the microorganism viability in compound resorcinol lotion, confirming with bactericidal compound resorcinol lotion. **Methods** 5 bottles of compound resorcinol lotion were respectively added *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida*, *Aspergillus niger*, placed 24 h, then the membrane filtration method was used respectively in 5 species of microbial limit test. **Results** In compound resorcinol lotion, 5 microbial strains were not given birth to bacterium, were killed, the recovery rate was zero. **Conclusion** Microbial cannot survive in compound resorcinol lotion.

[Key words] compound resorcinol lotion; microbial viability; membrane filtration method

复方间苯二酚洗剂为我院自制制剂。该制剂主要用于治疗霉菌性皮肤病,如手足癣、体癣、股癣、脂溢性皮炎。制剂主要成分为硼酸、间苯二酚、苯酚、丙酮。药品微生物限度检查是控制药品质量的重要检查项目,2010年版《中国药典》规定,所有普通制剂品种进行药品检验时均应做微生物限度检测,含有抑菌成分的制剂必须消除抑菌成分后再对其进行微生物限度检测^[1]。复方间苯二酚洗剂为强抑菌制剂,为了证实该制剂是否具有杀菌作用,笔者通过在制剂中加入菌种,再观察其存活情况,证明微生物在该制剂中不能存活。现介绍如下。

1 仪器材料

1.1 仪器 霉菌培养箱(MJ-IDO,上海跃进医疗器械有限公司);生化培养箱(SPX-80B,上海跃进医疗器械厂);生物安全柜(BHC-1300 II A/B3型,苏州净化设备有限公司)。

1.2 试验菌株 大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、金

黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、黑曲霉[CMCC(F)98003]二代冻存管,均购自上海科佳生物制品有限公司,以上菌株传代次数均不超过5代。

1.3 培养基及试剂 营养琼脂培养基(130527),玫瑰红钠琼脂培养基(130722),营养肉汤培养基(130923),改良马丁培养基(131008),改良马丁琼脂培养基(1306027),胆盐乳糖培养基(130816),溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(130712),卵黄磷脂氯化钠琼脂培养基(130115),以上均为上海中科昆虫生物技术开发有限公司产品,并通过培养基适用性检查。0.9%无菌氯化钠注射液(批号:20131230,广东大家制药有限公司),其他试剂均为分析纯或化学纯。

2 方法与结果^[2]

2.1 菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌新鲜培养物至营养肉汤培养基中,置30~35℃培养18~24h,分别取上述培养物各1ml,加0.9%无菌氯化钠溶液9ml,10倍递增稀释制成50~100cfu/ml的菌悬液。接种白色念珠菌的

[作者简介] 黄雄伟,本科,主任药师.研究方向:药物制剂及药品检验.E-mail:13361879201@163.com

新鲜培养物至改良马丁培养基中,置23~28℃培养24~48 h,取培养物各1 ml,加0.9%无菌氯化钠溶液9 ml,10倍递增稀释制成50~100 cfu/ml的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基中,置23~28℃培养5~7 d,加入5 ml含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。吸出孢子悬液置无菌试管内,取原液1 ml,加入含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液9 ml,10倍递增稀释制成50~100 cfu/ml的孢子悬液。

2.2 供试液制备 即为原制剂溶液。

2.3 实验方法

2.3.1 试验组细菌培养 取50 ml灭菌容量瓶3个,各加入复方间苯二酚洗剂原液10 ml,分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌3个菌种1 ml(含菌数为50~100 cfu/ml),放置24 h,用微孔薄膜过滤器全量过滤,用0.9%无菌氯化钠溶液(100 ml/次)冲洗4次,取出滤膜,菌面朝上贴于已制备的营养琼脂培养基平板,平行制备2个薄膜,置30~35℃培养箱培养3 d,逐日观察,测定其菌数。

2.3.2 试验组霉菌培养 取50 ml灭菌容量瓶2个,各加入复方间苯二酚洗剂原液10 ml,分别加入白色念珠菌、黑曲霉2个菌种1 ml(含菌数为50~100 cfu/ml),放置24 h,用微孔薄膜过滤器全量过滤,用0.9%无菌氯化钠溶液(100 ml/次)冲洗4次,取出滤膜,菌面朝上贴于已制备的玫瑰红钠琼脂培养基平板上,平行制备2个薄膜,置23~28℃培养箱培养5 d,逐日观察,测定其菌数。

2.3.3 对照试验 取50 ml灭菌容量瓶3个,各加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌3个菌种1 ml(含菌数为50~100 cfu/ml),放置24 h,余下按“2.3.1”项下操作,测定细菌数。取50 ml灭菌容量瓶2个,各加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,分别加入白色念珠菌、黑曲霉2个菌种1 ml(含菌数为50~100 cfu/ml),放置24 h,余下按“2.3.2”项下操作,测定霉菌数。

2.3.4 菌液组菌种培养 取0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,用微孔薄膜过滤器全量过滤,用0.9%无菌氯化钠溶液(100 ml/次)冲洗4次,在最后100 ml加入菌种,余下按“2.3.1”和“2.3.2”项操作,测定各菌种菌落数。

2.3.5 空白组试验 取50 ml灭菌容量瓶2个,各加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,不加菌液,放置24 h,余下分别按“2.3.1”和“2.3.2”项操作,测定空白菌落数。

2.3.6 供试液本底菌测定 取50 ml灭菌容量瓶2个,各加入复方间苯二酚洗剂溶液10 ml,不加菌液,放置24 h,余下分别按“2.3.1”和“2.3.2”项操作,测定供试液本底菌落数。本底菌落数均未检出,均被杀死。

试验组细菌回收率=(试验组平均菌落数-空白组平均菌落数)/菌液组平均菌落数×100%。

对照组细菌回收率=(对照组平均菌落数-空白组平均菌落数)/菌液组平均菌落数×100%

空白组主要检测操作过程中污染菌落数。计算细菌、霉菌回收率时分别取各自空白。以上各组试验均做3次,求得平均值数据,回收率亦为平均值,结果见表1,表中各试验数据均为3次试验数据均值。

表1 二组菌种回收率试验结果(n=3)

菌种	菌液组 菌落数 (cfu/ml)	对照组		试验组	
		菌落数 (cfu/ml)	回收率 (%)	菌落数 (cfu/ml)	回收率 (%)
大肠埃希菌	76	70	92	0	0
金黄色葡萄球菌	83	80	96	0	0
枯草芽孢杆菌	84	76	90	0	0
白色念珠菌	78	72	92	0	0
黑曲霉菌	84	77	92	0	0

2.4 控制菌存活验证

2.4.1 铜绿假单胞菌检测

2.4.1.1 试验组 取50 ml灭菌容量瓶,加入复方间苯二酚洗剂原液10 ml,加铜绿假单胞菌1 ml(50~100 cfu),放置24 h,用微孔薄膜过滤器全量过滤,用0.9%无菌氯化钠溶液(100 ml/次)冲洗4次,取出滤膜,菌面朝上贴于已制备的溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基35℃培养24 h。

2.4.1.2 阳性对照组 取50 ml灭菌容量瓶,加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,加铜绿假单胞菌1 ml(50~100 cfu),放置24 h,余下按试验组操作。

2.4.1.3 阴性对照组 取50 ml灭菌容量瓶,加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,以0.9%无菌氯化钠溶液释液取代供试液,不加菌液,其余操作同试验组。

2.4.1.4 结果 试验组未检出铜绿假单胞菌;阳性对照组检出铜绿假单胞菌;阴性对照组无菌生长。铜绿假单胞菌在复方间苯二酚洗剂中不能存活。上述验证重复一次,结果相同。

2.4.2 金黄色葡萄球菌检测

2.4.2.1 试验组 取50 ml灭菌容量瓶,加入复方间苯二酚洗剂原液10 ml,加金黄色葡萄球菌1 ml(50~100 cfu),放置24 h,用微孔薄膜过滤器全量

过滤,用0.9%无菌氯化钠溶液(100 ml/次)冲洗4次,取出滤膜,菌面朝上贴于已制备的卵黄磷脂氯化钠琼脂培养基35℃培养24 h。

2.4.2.2 阳性对照组 取50 ml灭菌容量瓶,加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,加金黄色葡萄球菌1 ml(50~100 cfu),放置24 h,余下按试验组操作。

2.4.2.3 阴性对照组 取50 ml灭菌容量瓶,加入0.9%无菌氯化钠溶液10 ml,以0.9%无菌氯化钠溶液释液取代供试液,不加菌液,其余操作同试验组。

2.4.2.4 结果 试验组未检出金黄色葡萄球;阳性对照组检出金黄色葡萄球;阴性对照组无菌生长。金黄色葡萄球菌在复方间苯二酚洗剂不能存活。上述验证重复一次,结果相同。

3 讨论

从表1可见,在复方间苯二酚洗剂中,各菌种回收率均为零。控制菌验证(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌)为阴性,说明本制剂具有杀菌作用。

按中国药典规定,含有抑菌成分的制剂需消除抑菌作用后再进行微生物限度检测。普通制剂配制是在10~30万级净化环境中操作的,在这样环境下配制出来的制剂或多或少都含有细菌,但只要不超标(100 cfu/ml)就视为合格。药品微生物限度检测是对制剂全配制过程污染程度的检验。若制剂中的

微生物被其中的抑菌成分所抑制而不能生长,但在消除其抑菌作用后,微生物又能生长,这说明制剂中的成分仅能抑制微生物生长,而不能杀死微生物。若制剂具有杀菌作用,将微生物结构破坏、杀死,无论制剂中是否有微生物存在,无论用哪种方法消除杀菌成分,均不能检查出微生物,也就是说这样的制剂进行微生物限度检测似乎意义不大。制剂若经6种微生物(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、铜绿假单胞菌)验证证明在其中不能存活的,是否一定做微生物限度检测,有待各方专家达成共识,笔者倾向于不做。

本制剂含有苯酚、间苯二酚、硼酸等成分,均具有抗菌作用,且苯酚浓度为1%,间苯二酚浓度高达10%,对细菌、霉菌等多数菌种具有较强杀灭作用,一般微生物在这样的环境中不能存活,无论是制剂本底菌还是加入菌,均不能存活,故这类制剂进行微生物限度检测意义不大。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录107,一附录116.
- [2] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[S].北京:中国医药科技出版社,2010:351-382.

[收稿日期] 2014-08-25 [修回日期] 2015-03-02

[本文编辑] 顾文华

(上接第58页)

镇痛作用,50 mg/kg剂量时有显著的抗炎活性。均印证了挥发油为鹅掌柴镇痛抗炎的有效成分之一,同时对民间治疗外伤多用鲜叶入药提供了科学依据。

鹅掌柴资源丰富,野生和种植均普遍存在。本研究为进一步开发利用该药用植物资源提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志第54卷[M].北京:科学技术出版社,1978:26.
- [2] Do TL. Glossary of Vietnamese Medical Plants[M]. Hanoi: Science and Technics Publication,1977:817.
- [3] Sung TV, Lavaud C, Porzel A, et al. Triterpenoids and their glycosides from the bark of *Schefflera octophylla*[J]. Phytochemistry,1992,31(1):227-231.
- [4] Li YL, Ooi LSM, Wang H, et al. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China[J]. Phytother Res,2004,18:718-724.
- [5] Li YL, But PPH, Ooi VEC. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla*

(L.) Frodin[J]. Antivir Res,2005,68(1):1-9.

- [6] 吴春丽,李杰明,杭晔,等. GC法测定鱼腥草注射液中(-)-4-萜品醇的含量[J].中国药房,2013,24(44):4204-4206.
- [7] 浙江医科大学药理组.几种芳香油平喘作用的初筛报告[J].上海日用化工,1977,(1):26-28.
- [8] Akram Z, Mohammad R, Louwance W, et al. Identification of sphulenol in *Salvia mirzayunii* and the immunomodulatory effects[J]. Phytotherapy Res,2011,25(4):557-561.
- [9] Huo M, Cui X, Xue J, et al. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model[J]. J Surg Res,2013,180(1):47-52.
- [10] Batista PA, Werner MF, Oliveira EC, et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice[J]. Neurosci Lett,2008,440(3):299-304.
- [11] Park SN, Lim YK, Freire MO, et al. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria[J]. Anaerobe,2012,18(3):369-373.
- [12] Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. Bark[J]. Phytomed,2010,17(2):149-153.

[收稿日期] 2015-01-14 [修回日期] 2015-06-16

[本文编辑] 顾文华