

腋臭粉及含汞制剂微生物限度检查方法研究

赵新霞¹, 王倩雯², 牛坡³, 聂桂华¹

1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

3. 河南省人民医院, 河南 郑州 450003

摘要: 目的 建立有效、简便的方法对腋臭粉及含汞制剂进行微生物限度检查。方法 通过加入中和剂硫代乙醇酸钠来中和氧化汞, 以达到破坏供试品抑菌活性的目的。细菌数测定采用离心沉淀-中和-薄膜过滤法, 霉菌和酵母菌数测定以及控制菌检查采用中和-培养基稀释法。结果 细菌、霉菌和酵母菌计数方法验证实验中, 实验组和稀释剂对照组的菌回收率均不低于70%, 控制菌检查结果符合要求。结论 该方法有效、简便, 可行性强, 可作为腋臭粉及含汞制剂的微生物限度检查方法。

关键词: 腋臭粉; 含汞制剂; 微生物限度检查; 中和法

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)02-0111-003

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.008

Microbiological limit test for Yexiu Powder and mercury containing preparations

ZHAO Xin-xia¹, WANG Qian-wen², NIU Po³, NIE Gui-hua¹

1. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China

2. School of Pharmacy, Zhongshan University, Guangzhou 510006, China

3. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To establish an effective method for the microbiological limit test of Yexiu Powder and mercury containing preparations. **Methods** Sodium thioglycollate was used to neutralize mercuric oxide so that the antibacterial activity in the test was destroyed. Centrifugal sedimentation-neutralization-membrane filtration method was used for the validation test of bacteria count, and neutralization-medium dilution method was used for the validation test of mold and yeast count and control bacteria inspection. **Results** In the validation tests of bacterial, mold and yeast count, the microbial recovery rates were not less than 70% both in test group and in diluted control group. In the tests of specified microbial species, the results met the standard. **Conclusion** The method is effective and feasible, which could be used for the microbiological limit test for Yexiu Powder and mercury containing preparations.

Key words: Yexiu Powder; mercury containing preparations; microbiological limit test; neutralization method

腋臭粉是用于祛除腋臭的药物,其组成有红粉、白矾(煅)、丁香、石膏、龙骨,其中红粉和白矾都具极强的抑菌活性。红粉为红氧化汞(HgO)^[1],汞的化合物能与微生物呼吸酶中的巯基(-SH)结合,使其固定而失去活力,从而使微生物陷于窒息状态而死亡;汞离子还能与细菌体内蛋白生成不溶性蛋白盐沉淀,使细菌被杀死^[2]。白矾为硫酸盐类矿物明矾石经加工提炼制成,主要成分为含水硫酸铝钾[KAl(SO₄)·12H₂O],煅至失去结晶水时,有较强吸水、收敛、防腐、抑菌及对蛋白的凝固作用。因此,对本品进行微生物限度检查时,应消除供试品的抑菌活性,再依法检查。本实验通过加入硫代乙醇酸

钠来中和氧化汞,以减弱氧化汞的抑菌能力;再加入1%蛋白胍溶液,对实验菌起到保护作用。通过实验对腋臭粉的微生物限度检查方法进行研究,为其建立有效的微生物检验方法。

1 仪器及材料

1.1 仪器

电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂),高压蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器有限公司),恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),数显恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂),离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),HTY-2000B型集菌仪(杭州高得

收稿日期: 2012-12-31

作者简介: 赵新霞(1983—),女,河南三门峡人,主管药师,本科,研究方向为微生物检验。Tel: 18625569127 E-mail: zxybfq@sohu.com

医疗器械有限公司)。

1.2 样品

腋臭粉(河南仲景药业股份有限公司,批号100820、110517、110610,规格:每盒装60g)。

1.3 培养基及试剂

玫瑰红钠琼脂培养基(批号1008192)、营养肉汤培养基(批号100915)、胆盐乳糖培养基(批号1101242)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号100816)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号100129)均由北京三药科技开发公司生产。营养琼脂培养基(NA)(批号20090707),由青岛高科园海博生物技术有限公司生产。蛋白胨(批号110222),由北京陆桥技术有限责任公司生产。pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(自制),硫代乙醇酸钠(批号20101014),由国药集团化学试剂有限公司生产。

1.4 菌种

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],黑曲霉[CMCC(F)98003],铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]。以上菌种均来源于中国食品药品检定研究院。

2 方法及结果

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、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,培养18~24h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,培养24h。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成含菌数为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上,培养7d,加入5 mL含0.05%(体积分数)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,再用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成含孢子数为50~100 cfu/mL的孢子悬液。

2.2 1 mol/L 硫代乙醇酸钠溶液的配制

取5.13 g 硫代乙醇酸钠溶于36 mL水中。用1 mol/L NaOH溶液调纯化水pH值,使溶液的终pH值为7.0。

2.3 供试品溶液的制备

取供试品10 g,加入pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,混匀,作为1:10供试液。

2.4 验证方法

2.4.1 细菌计数方法验证 (1) 试验组 取1:10供试液10 mL,500 r/min离心3 min,取离心后的上清液,与1 mol/L 硫代乙醇酸钠溶液,1%蛋白胨溶液按1:1:1(体积比)混匀,取混匀后的溶液3 mL(相当于含1:10溶液1 mL),注入100 mL含1%聚山梨酯80的pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,进行薄膜过滤,先用500 mL含1%聚山梨酯80的pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进行冲洗,再用100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,并在最后50 mL冲洗液中加入1 mL含50~100 cfu/mL的试验菌悬液,滤过后,取出滤膜,菌面朝上贴于凝固的营养琼脂培养基上。(2) 菌液组^[3] 取1 mL含菌数为50~100 cfu/mL的试验菌悬液,注入50 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中进行薄膜过滤,滤过后,取出滤膜,菌面朝上贴于凝固的营养琼脂培养基上。(3) 供试品对照组^[4] 取与试验组同一供试品溶液测定供试品本底菌数。(4) 稀释剂对照组 取相应的稀释剂代替供试品,照试验组中的方法进行测定。

试验组的加菌回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数

按公式计算回收率,结果应不低于70%。稀释剂对照组加菌回收率=(稀释剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数),结果应不低于70%。试验平行3次。3批样品试验结果分别见表1。各试验菌在试验组和稀释剂对照组中的回收率均高于70%,说明本品细菌计数、霉菌和酵母菌计数可采用此方法。

表1 回收率测定结果(n=3)

Table 1 Results of recovery test (n=3)

批号	组别	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
100820	试验	93	92	90	95	95
	稀释剂	98	97	97	99	97
110517	试验	86	90	90	94	91
	稀释剂	96	98	95	99	95
110610	试验	92	86	85	98	93
	稀释剂	99	99	96	100	98

2.4.2 霉菌和酵母菌计数方法验证 (1) 试验组 取1:10供试液,与1 mol/L 硫代乙醇酸钠溶液,1%蛋白胨溶液按1:1:1(体积比)混匀,取混匀后的溶液0.6 mL(相当于含1:10溶液0.2 mL),注入平皿中,每个平皿再加入1 mL含50~100 cfu/mL的实验菌悬液,立即加入玫瑰红钠琼脂培养基。

(2) 菌液组 取 1 mL 含 50~100 cfu/mL 的试验菌悬液注入平皿中,立即加入玫瑰红钠琼脂培养基。(3) 供试品对照组 取与试验组同一供试品溶液测定供试品本底菌数。(4) 稀释剂对照组 取相应的稀释剂代替供试品,照试验组中的方法进行测定。上述各组培养后按规定方法点计菌落数,计算回收率;试验平行 3 次。3 批样品试验结果分别见表 1。

2.4.3 控制菌检查方法学验证 (1) 金黄色葡萄球菌检查方法学验证试验 取 1:10 供试液 10 mL,加入 500 mL 营养肉汤培养基中(培养基中含有 0.17 g 硫代乙醇酸钠),并加入 1 mL 含 10~100 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌悬液,培养 48 h 后分离划线于甘露醇氯化钠琼脂平板上,培养 72 h。(2) 铜绿假单胞菌检查方法学验证试验 取 1:10 供试液 10 mL,加入 300 mL 胆盐乳糖培养基中(培养基中含有 0.17 g 硫代乙醇酸钠),并加入 1 mL 含 10~100 cfu/mL 的铜绿假单胞菌悬液,培养 24 h 后分离划线于溴化十六烷基三甲胺琼脂平板上,培养 24 h。结果分别见表 2、3(表中“+”表示阳性菌生长)。

表 2 控制菌金黄色葡萄球菌验证方法试验结果

Table 2 Results of verification test for *Staphylococcus aureus*

批号	培养基	结果
100820	营养肉汤	+
	甘露醇氯化钠琼脂平板	+
110517	营养肉汤	+
	甘露醇氯化钠琼脂平板	+
110610	营养肉汤	+
	甘露醇氯化钠琼脂平板	+

表 3 控制菌铜绿假单胞菌验证方法试验结果

Table 3 Results of verification test for *Pseudomonas aeruginosa*

批号	培养基	结果
100820	胆盐乳糖培养基	+
	溴化十六烷基三甲胺琼脂平板	+
110517	胆盐乳糖培养基	+
	溴化十六烷基三甲胺琼脂平板	+
110610	胆盐乳糖培养基	+
	溴化十六烷基三甲胺琼脂平板	+

3 讨论

按照《中国药典》2010 年版要求,当供试品有抑菌活性时,应采用适当方法进行处理,以消除供试液的抑菌活性,再依法检查。腋臭粉为局部给药制剂,按药典要求需进行微生物限度检查,但腋臭

粉中含有红粉,红粉不溶于水,且红粉浓度达 6×10^{-5} 时在体外对常见化脓性细菌,如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌有很强的杀菌作用^[2]。因此,有效去除或者减弱红粉的抗菌作用是本实验的关键。

实验中利用硫醇可与重金属汞等形成不溶于水的硫醇盐,从而可以用作重金属汞等中毒的解毒剂这一反应原理,加入中和剂硫代乙醇酸钠,从而有效地减弱了红粉的抗菌能力,使得实验操作简便可行,实验结果能客观地反映制剂的微生物污染情况。且本实验方法也可用于其他含汞制剂的微生物限度检查。

因供试品的强抗菌作用,不加中和剂时,霉菌和酵母菌数测定及控制菌检查均需采用离心沉淀-薄膜过滤法,实验结果才能达到要求。细菌数测定时也需采用离心沉淀-薄膜过滤法,且冲洗量达到 2 000 mL 时,试验菌的回收率才能达到 70%以上,因药典规定采用薄膜过滤法时,总冲洗量不得超过 1 000 mL,以避免滤膜上的微生物受损伤,因此此实验方法繁琐且不可行。本实验采用中和法及加入 1%蛋白胨溶液的方法,有效地解决了这一问题。

加入 1%蛋白胨溶液与否,对于细菌和霉菌计数方法验证试验结果影响较大,而对于酵母菌计数方法验证试验结果影响不大。在细菌计数方法验证试验中不加 1%蛋白胨溶液时枯草芽孢杆菌的回收率低于 70%,而在霉菌计数方法验证试验中不加 1%蛋白胨溶液时,结果的重现性不好。

微生物限度检查时所采用的处理措施必须保证对微生物无毒性,本实验中稀释剂对照组的试验菌回收率均高于 70%,说明所加入的硫代乙醇酸钠对实验菌没有毒性。

细菌计数方法验证试验中,冲洗液选用含 1%吐温 80 的 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液与选用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液比较,选用前者时,实验结果重复性好。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- [3] 李近磊, 王嘉怡, 迟丹怡, 等. 复方克林霉素凝胶微生物限度检查法的方法验证研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(25): 2380-2382.
- [4] 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(4): 307-310.