

## 氧化锌滑石粉洗剂微生物限度检查的方法适用性研究

田怀平, 杜毅, 李超, 林志燕, 唐跃年\*

上海交通大学医学院附属新华医院, 上海 200092

**摘要:** **目的** 建立符合《中国药典》2015年版要求的氧化锌滑石粉洗剂的微生物限度检查方法。**方法** 采用离心沉淀联合薄膜过滤法进行样品前处理, 对10批次的氧化锌滑石粉洗剂进行微生物计数检查和控制菌检查。计数检查: 需氧菌总数使用TSA培养基检查, 菌种为: 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉; 霉菌和酵母菌总数使用SDA培养基检查, 菌种为白色念珠菌和黑曲霉, 每种菌株分别制备加菌试验组和菌液对照组, 每种培养基分别制备供试品对照组和阴性对照组, 进行菌落计数, 计算回收率。控制菌检查: 应用铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌, 设置菌液验证组、供试品对照组和阴性对照组, 取各组培养物于相应培养基平板上划线, Microflex LT质谱仪进行菌种鉴定。**结果** 10批次微生物计数检查的5种菌株的回收率均在0.75~1.16; 控制菌检查的菌液验证组均可检出铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌, 供试品对照组和阴性对照组均未见菌生长, 适用性验证合格。**结论** 氧化锌滑石粉洗剂的微生物限度检查方法经验证符合《中国药典》2015年版要求。

**关键词:** 氧化锌滑石粉洗剂; 微生物计数检查; 限度菌检查; 薄膜过滤法

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)10-1432-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.013

## Methodological study on microbial limit test of zinc oxide and talcum powder lotion

TIAN Huai-ping, DU Yi, LI Chao, LIN Zhi-yan, TANG Yue-nian

Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the microbial limit test of zinc oxide and talcum powder lotion in Chinese Pharmacopoeia 2015. **Methods** Microbial enumeration test and specified microorganisms test with instructions were conducted from Chinese Pharmacopoeia 2015, which involved 10 batches zinc oxide and talcum powder lotion and five species of bacteria in all. The samples were treated by centrifugation and membrane filtration. Microbial enumeration test: the total number of aerobic bacteria using TSA medium to examine, strains were *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger*; The total number of molds and yeasts using SDA culture medium to examine, strains were *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Each strain was divided into two groups: Adding bacteria test group and bacteria control group. Sample control group and negative control group of each culture medium was prepared respectively. Count the colonies and calculate the rate of recovery. Specified microorganisms test: *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were applied and set the bacteria validation group, sample control group, and negative control group. The culture medium of each group was crossed on the corresponding medium plate, and Microflex LT mass spectrometer was used to identify the bacteria. **Results** The recoveries of all kinds of strains in microbial enumeration test, total yeast and mold count were 0.75 — 1.16 in all batches. In the validations of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, all kinds of strains were respectively detected in bacteria validation group, and there were no bacterial growth in sample control group and negative control group. **Conclusion** The microbiological examination methods for zinc oxide and talcum powder lotion can meet the requirements of Chinese Pharmacopoeia 2015.

**Key words:** Zinc oxide and talcum powder lotion; microbial enumeration test; microbial limit test; membrane filtration method

收稿日期: 2017-04-19

作者简介: 田怀平(1974—), 主管药师, 药理学硕士, 研究方向为临床药学, 药品的质量控制。E-mail: tianhuaping@xinhua.com.cn

\*通信作者 唐跃年(1958—), 副主任药师, 研究方向为药品的质量控制。E-mail: tangyuenian@xinhua.com.cn

氧化锌滑石粉洗剂是我院最早注册的院内制剂之一,临床应用多年,年生产量近7万瓶,深受皮肤科患者欢迎,其主要成分有氧化锌、滑石粉和甘油,外观为白色混悬液体,具有保护皮肤和轻度收敛作用,用于亚急性湿疹、接触性皮炎及结节性痒疹等。该制剂按照《医疗机构制剂配制质量管理规范》(GPP)标准生产,常规的质量控制检查包括鉴别、装量、含量测定和微生物限度检查等<sup>[1]</sup>。该制剂主要成分滑石粉在《中国药典》2015年版收载于两处<sup>[2]</sup>,分别是一部中药材和四部药用辅料,这两处药品的微生物检查的标准并不一致<sup>[3]</sup>。

《中国药典》2015年版的微生物检查法在培养基、培养条件和检验方法等方面有重大改变<sup>[4]</sup>,目前其微生物检查方法适用性研究报道较少。本文按照《中国药典》2015年版要求,对10批次的氧化锌滑石粉洗剂微生物限度检查法进行方法适用性研究,为药品质量控制部门进行微生物限度检查和质量分析提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ME204 电子天平(梅特勒-托利多(上海)有限公司);CLG-32L 高压蒸汽灭菌锅(日本ALP CO., Ltd.公司);M017 生物安全柜(Thermo Fisher Scientific);SW-CJ 医用型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HTY-APL01 集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司);KSF330 集菌培养器(批号20161105,杭州泰林生物技术设备有限公司);PYX-DHS 4050 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂);MJ-250I 霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司);Microflex LT 质谱仪(德国布鲁克道尔顿公司)。

### 1.2 样品

所用10批次氧化锌滑石粉洗剂,来自本院制剂室2016年5月至2016年12月生产的成品,批号分别是1605051、1605262、1606071、1606222、1607143、1608092、1609281、1610252、1611151、1612212,规格100 mL,有效期限为1年。所抽样品的生产时间涵盖了空气湿度较大的梅雨期和较为干燥的冬季。

### 1.3 微生物限度标准

氧化锌滑石粉洗剂是皮肤给药制剂,根据《中国药典》2015年版四部1107非无菌药品微生物限度标准:需氧菌总数不超过 $10^2$  cfu/mL(1 mL或1 g

可接受的最大菌数为200),霉菌和酵母菌总数不超过10 cfu/mL(1 mL或1 g可接受的最大菌数为20)。不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(1 mL)<sup>[2]</sup>。

### 1.4 培养基和稀释液

胰酪大豆胨琼脂培养基(Tryptic Soy Agar, TSA,批号20160107)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud Dextrose Agar Medium, SDA,批号20160126)、胰酪大豆胨液体培养基(Trypticase Soytone Broth, TSB,批号20160219)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号20160125)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号20150921),培养基全部产自上海中科昆虫生物技术开发有限公司;稀释液:0.9%无菌氯化钠溶液(批号20160622),本院制剂室生产,质量检查合格;配制好的培养基采用121 °C高压蒸汽灭菌15 min,高压蒸汽灭菌采用3M1292生物指示剂(批号20160428,美国3M公司)验证合格;每批次培养基均按照中国药典2015年版要求,进行与对照培养基验证试验,适用性检查合格<sup>[2]</sup>。

### 1.5 试验菌种

微生物计数检查验证所用菌种:需氧菌总数使用TSA培养基检查,菌种为: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和黑曲霉ATCC 1698003;霉菌和酵母菌总数使用SDA培养基检查,菌种为白色念珠菌和黑曲霉。微生物控制菌检查菌种:铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌。试验菌种均为中国食品药品检定研究院提供的0代菌种,试验前传代至第3代菌种使用。

## 2 方法

### 2.1 试验菌液的制备

按照《中国药典》2015年版四部通则1105和1106方法,分别制备金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉第三代菌种的菌液<sup>[2]</sup>。菌液稀释倍数为 $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ ,浓度控制在最终试验组的接种量为1 mL含菌50~100 cfu。菌液制备后,室温放置在2 h以内使用,若保存在2~8 °C,24 h内使用。

### 2.2 供试液的制备

将氧化锌滑石粉洗剂样品混匀,取10 mL加入0.9%无菌氯化钠溶液至100 mL,稀释成1:10的供

试液。

### 2.3 微生物计数检查验证试验

**2.3.1 微生物计数检查分组** 计数检查方法验证时, 检品共分4组, 每种菌株分别制备加菌试验组和菌液对照组, 每种培养基分别制备供试品对照组和阴性对照组。(1) 加菌试验组: 取1:10的供试液10 mL, 500 r/min离心5 min, 取1 mL上清液, 集菌培养器薄膜过滤, 用0.9%无菌氯化钠溶液冲洗3次, 每次100 mL, 在最后一轮的冲洗液中加入50~100 cfu的试验菌;(2) 供试品对照组: 取1:10供试液同上操作, 最后一次冲洗液不加菌;(3) 菌液对照组: 用稀释液0.9%无菌氯化钠溶液替代供试液, 其余同加菌试验组操作, 最后一次冲洗液加入50~100 cfu的试验菌;(4) 阴性对照组: 用0.9%无菌氯化钠溶液替代供试液, 其余同加菌试验组操作, 最后一次冲洗液不加菌。

**2.3.2 微生物计数** 将“2.3.1”中4组滤膜取出, 菌面朝上贴于TSA或SDA培养基平板上, 不同培养基接种不同菌种。TSA平板接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌时, 33℃培养不超过3 d; 接种白色念珠菌和黑曲霉时, 33℃培养不超过5 d。SDA平板接种白色念珠菌和黑曲霉, 23℃培养不超过5 d。每批次样品的每株试验菌均制备2个平皿, 进行两组平行操作, 进行菌落计数, 取菌落数平均值作为培养结果, 计算回收率。

各试验菌的回收率=(加菌试验组的菌落数-供试品对照组的菌落数)/菌液对照组菌落数

### 2.4 微生物控制菌检查

**2.4.1 菌液验证组的设置** 取“2.2”项制作的1:

10的供试液10 mL, 500 r/min离心5 min, 取1 mL上清液, 集菌培养器薄膜过滤, 用0.9%无菌氯化钠溶液冲洗3次, 每次100 mL, 在最后一轮的冲洗液中加入50~100 cfu的铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。过滤冲洗后的集菌培养器加入100 mL TSB培养基, 33℃培养18~24 h。铜绿假单胞菌检查: 取培养物划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上, 33℃培养18~72 h, 若有菌落生长, 使用Microflex LT质谱仪进行分离纯化鉴定, 判断是否检出铜绿假单胞菌。金黄色葡萄球菌检查: 取培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 33℃培养18~72 h, 若有黄色菌落或外周有黄色环的白色菌落生长, 使用Microflex LT质谱仪进行分离纯化鉴定, 判断是否检出金黄色葡萄球菌。

**2.4.2 供试品对照组和阴性对照组的设置** 取“2.2”项制作的供试液同“2.4.1”项操作, 最后一次冲洗液不加菌, 为供试品对照组。用稀释液0.9%无菌氯化钠溶液替代供试液同“2.4.1”项操作, 最后一次冲洗液不加菌, 为阴性对照组。

若菌液验证组能够检出铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌, 供试品对照组和阴性对照组均未检出, 可认为氧化锌滑石粉洗剂的供试液制备及控制菌检查方法, 适用性验证合格。

## 3 结果

### 3.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的计数检查的验证结果

10个批次的氧化锌滑石粉洗剂进行了5个菌株、两种培养基的验证, 结果见表1。所有菌种的回收率均在0.75~1.16, 认为氧化锌滑石粉洗剂的

表1 微生物计数检查回收率

Table 1 Recovery ratio of validation strains of microbial enumeration test

氧化锌滑石 粉洗剂批次	需氧菌计数回收率					霉菌与酵母菌计数回收率	
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	黑曲霉	白色念珠菌	黑曲霉	白色念珠菌
1605051	0.96	0.76	0.88	1.04	1.10	0.87	0.87
1605262	0.79	1.07	1.06	1.09	1.04	0.83	0.92
1606071	1.07	0.80	1.12	0.97	0.99	0.94	1.00
1606222	0.91	0.78	0.98	1.03	0.95	0.97	1.05
1607143	0.93	1.04	0.80	1.13	1.11	1.01	0.97
1608092	1.16	0.75	0.78	1.15	1.01	1.07	0.89
1609281	0.89	0.82	1.16	1.06	0.94	0.99	0.96
1610252	0.86	0.91	1.04	1.16	1.02	1.04	1.03
1611151	0.91	0.76	1.14	1.07	1.00	0.89	1.08
1612212	0.84	1.05	1.08	1.00	0.93	0.91	1.07

供试液制备、薄膜过滤处理和计数方法,在需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数检查时,适用性验证合格。其中供试品对照和阴性对照组菌落数均为0。

### 3.2 控制菌检查的验证结果

10个批次的氧化锌滑石粉洗剂进行了铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的检出验证,结果见表2。所有批次的菌液验证组铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均可检出,供试品对照和阴性对照组均未见菌生长。认为本研究氧化锌滑石粉洗剂的供试液制备、预处理、培养条件和划线培养方法进行控制菌检查,适用性验证合格。

表2 控制菌检查的验证结果

Table 2 Results of methodology validation of microbial limit test

组别	批次	菌株	是否检出
供试品对照	10个批次	金黄色葡萄球菌	—
		铜绿假单胞菌	—
阴性对照	10个批次	金黄色葡萄球菌	—
		铜绿假单胞菌	—
菌液验证	10个批次	金黄色葡萄球菌	+
		铜绿假单胞菌	+

## 4 讨论

《中国药典》从2005年版开始引入微生物限度检查的方法验证试验<sup>[5]</sup>,经过2010年版的过渡和发展,2015年版药典中培养基和菌种的选择都有了较大变化,质量要求和安全性控制更加严格和合理<sup>[6-7]</sup>。

氧化锌滑石粉洗剂为混悬剂,属于水不溶性非油脂类供试品,具有一定的抑菌作用。本研究采用了《中国药典》2015年版许可的0.9%无菌氯化钠溶液作为稀释液和冲洗液,与之前的蛋白胨溶液比较,获取便利成本降低。样品按照1:10的比例稀释,对混悬液进行低速离心,薄膜过滤法进行前处理,能够较好地去除抑菌作用。微生物计数法验证过程中,各菌种的回收率都在0.5~2.0范围,符合药典要求。限度菌检查的验证中,铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均回收合格。因此,供试液稀释制备和培养过程经过验证,氧化锌滑石粉洗剂的微生物检

查方法适用性合格。

药品的微生物污染是影响质量控制的重要因素<sup>[8]</sup>。医院制剂由于生产规模和设备所限,微生物检查是质量控制的重要手段。氧化锌滑石粉洗剂中,滑石粉含量为10%,为主要组分之一,但该原料易受到微生物污染。原料生产厂家多以中药材微生物检查质量标准指导滑石粉的生产,此标准低于滑石粉作为药品辅料的微生物计数检查要求<sup>[9]</sup>。以往氧化锌滑石粉洗剂成品的霉菌和酵母菌计数超标现象时有发生,经排查,污染菌来自滑石粉原料。多次摸索之后,在制剂生产时,预先将滑石粉原料放入200℃恒温鼓风干燥箱加热2h,可以有效灭菌,保证了成品的微生物检查符合要求。在后续研究中,有必要对样品中检出的微生物与滑石粉原料的初始污染菌和生产环境检测采集的微生物进行同源性比对和溯源分析,以确定样品中微生物的来源,为原料的样品微生物控制提供依据,更好地对药品生产质量进行过程控制。

综上,本研究中氧化锌滑石粉洗剂的微生物检查方法经验证,符合《中国药典》2015年版要求,可以为洗剂类药品进行微生物检查提供参考。

## 参考文献

- [1] 氧化锌滑石粉洗剂成品质量标准 [S]. 2004.
- [2] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [3] 孙会敏, 杨锐, 张朝阳, 等. 2015年版《中国药典》提升药用辅料科学标准体系强化我国药品质量 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(15): 1353-1358.
- [4] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [5] 宁黎丽, 成海平, 魏农农. 微生物学检查方法验证与评价要求 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 6-9.
- [6] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法解读 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1101-1107.
- [7] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 《中国药典》2015年版非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法解读与对策 [J]. 中国药师, 2016, 19(4): 748-752.
- [8] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1747-1751.
- [9] 黄玉兰, 李镇涛, 吕谦. 中药制剂微生物污染的因素及对策 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 204-207.