

3种咪唑类抗真菌乳膏剂微生物限度检查方法学研究

李 辉^{1, 2}, 杨晓莉^{2, 3}, 刘立科⁴, 马元斌³, 绳金房^{2, 3*}

1. 陕西盛德泰林生物安全技术检测有限公司, 陕西 西安 710065

2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065

3. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065

4. 陕西省医疗器械质量监督检验院, 陕西 咸阳 712046

摘 要: 目的 建立硝酸咪康唑、酮康唑、曲安奈德益康唑3种咪唑类抗真菌乳膏剂的微生物限度检查方法。方法 采用含5%聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液制备3种乳膏剂1:10供试液,并稀释至1:20和1:50,分别加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉接种无菌平皿中,按照《中国药典》2015年版四部1105考察平皿法及稀释-平皿法计数方法适用性;分别取3种乳膏剂加入无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液和十四烷酸异丙酯两相系统中萃取,取萃取后的下层水相的上清液薄膜过滤处理后,分别加入5种试验菌,进行萃取-薄膜过滤法计数法适用性试验;分别取未经萃取-薄膜过滤处理和经过萃取-薄膜过滤的1:10供试液,接种至不同体积的胰酪大豆胨液体培养基中,按照《中国药典》2015年版四部1106进行控制菌检查适用性试验。结果 通过平皿法或稀释处理,3种乳膏剂的3种细菌类试验菌回收率即符合要求;3种乳膏剂对白色念珠菌、黑曲霉均有较强的抑菌作用,无论是平皿法还是稀释处理后的平皿法,2种试验菌回收率均远小于0.5,不符合方法适用性要求。萃取-薄膜过滤法可有效去除3种咪唑类抗真菌乳膏剂对各试验菌的抑菌作用,3种乳膏剂的试验菌回收率均在0.5~2.0,符合计数方法适用性要求。经过萃取-薄膜过滤处理的供试液控制菌检出优于未经处理的供试液。结论 采用萃取-薄膜过滤法可解决样品抑菌性的去除和滤膜堵塞的问题,适用于3种咪唑类抗真菌乳膏剂的微生物限度检查。

关键词: 萃取;咪唑类抗真菌药;硝酸咪康唑;酮康唑;曲安奈德益康唑;乳膏剂;微生物限度

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)04-0721-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.007

Study on microbial limitation methodology of three imidazole antifungal creams

LI Hui^{1, 2}, YANG Xiaoli^{2, 3}, LIU Like⁴, MA Yuanbin³, SHENG Jinfang^{2, 3}

1. Shaanxi Sheng de tai lin Biological Safety Technical Testing CO. Ltd, Xi'an 710065, China

2. NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Xi'an 710065, China

3. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China

4. Shaanxi Institute of Medical Device Quality Supervision and Inspection, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To establish the microbial limit test method for three kinds of imidazole antifungal creams, such as miconazole nitrate, ketoconazole, and triamcinolone econazole. **Methods** Sterile sodium chloride peptone buffer of pH 7.0 containing 5% polysorbate 80 was used to prepare three kinds of cream 1:10 for test solution, and dilute to 1:20 and 1:50, respectively. Test solution was added with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, and inoculated sterile plate. According to the 1105 of Volume four from the "Chinese Pharmacopoeia" 2015 edition, the applicability of plate method and dilution plate method was investigate. Cream was added to a two-phase system of sterile pH 7.0 sterile sodium chloride peptone buffer and isopropyl myristate. Add five kinds of test bacteria and perform the counting method suitability test. The test solution of 1:10 with and without extraction membrane filtration treatment were inoculated into different volumes of tryptic soy peptone liquid culture medium, according to 1106 of Volume four from the "Chinese Pharmacopoeia" 2015 edition to carry out control bacteria test suitability test. **Results** Through the plate method or dilution treatment, the recovery rates of three kinds of

收稿日期: 2020-08-17

基金项目: 陕西省重点研发项目(2019SF062)

第一作者: 李 辉(1984—),男,陕西西安人,副主任药师,研究方向为药品微生物控制与标准研究。Tel: 15202967585

*通信作者: 绳金房,男,主任药师,研究方向为药品质量控制与标准研究。Tel: 13379253836

bacteria in the three creams met the requirements; the three creams had strong antibacterial effect on *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, and the recovery rates of the two kinds of bacteria were far less than 0.5, which did not meet the applicability requirements of the method. The recovery rate of each test bacteria for the determination of total aerobic microbial count, total combined yeasts and molds count all met the requirements of 0.5 ~ 2.0, and the detection of control bacteria in the test solution after extraction-membrane filtration treatment was better than that of the untreated Test solution. **Conclusion** The extraction-membrane filtration method can solve the problem of sample antibacterial removal and filter clogging. It is suitable for the microbial limit inspection of three imidazole antifungal creams.

Key words: extraction; imidazole antifungals; miconazole nitrate; ketoconazole; triamcinolone econazole; cream; microbial limit test

硝酸咪康唑、酮康唑和益康唑均为广泛应用于临床的咪唑类抗真菌药物,通过与细胞色素P450调节的14- α -脱甲基酶(P450_{DM})结合,抑制多种微粒体P450同工酶^[1],干扰麦角固醇的生物合成,抑制真菌细胞的生长。咪唑类抗真菌药物开发较早^[2],具有广谱抗真菌作用,抗菌活性高,对皮肤真菌、念珠菌、曲霉菌、新型隐球菌等均有较好的抗菌作用^[3],对金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌也有抑制作用^[4-5],但其系统用药疗效差,毒副作用大,目前仅供外用^[6-8]。乳膏剂是临床上常用的外用制剂,尤其在抗真菌类皮肤感染方面有使用方便、性质稳定、溶解性能较好等独特优势,是咪唑类抗真菌药物的主要剂型。微生物限度是乳膏剂药品质量控制的重要安全性指标,然而在建立咪唑类抗真菌乳膏剂的微生物限度检查方法时,常因其复杂的基质和较强的抑菌作用而使试验菌回收失败,薄膜过滤法存在过滤效率低甚至严重堵塞滤膜的问题。针对硝酸咪康唑乳膏(A)、酮康唑乳膏(B)和曲安奈德益康唑乳膏(C)3种乳膏剂的理化特点和生物活性,本研究采用油-水两相系统萃取的前处理方式,处理后薄膜过滤的方法建立了微生物限度检查法,适用于咪唑类抗真菌乳膏剂的微生物限度计数检查。

1 材料

1.1 主要仪器

VITEK2 compact全自动微生物生化鉴定系统(法国Biomerieux公司);HFsafe-1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);BS2202S型电子天平(德国赛多利斯公司);LRH-250F型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);DK-98-1型恒温水浴(天津奉斯特仪器公司);PB-10型pH酸度计(赛多利斯科技北京有限公司);WJ-6型无菌检测仪(天津市罗根科技有限公司);MLS-3020型高压蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器公司)。

1.2 样品和主要试剂

硝酸咪康唑乳膏(规格20 g,批号160225408)、酮康唑乳膏(规格10 g,批号160128507)、曲安奈德

益康唑乳膏(规格15 g,批号160223530)均来自西安杨森制药有限公司;氯化钠与聚山梨酯80均购自国药集团化学试剂有限公司;十四烷酸异丙酯购自北京牛牛基因技术有限公司;1%(mL/mL)二盐酸N,N-二甲基对苯二胺试液临用现配。

1.3 菌种与培养基

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉等标准菌株均来自中国食品药品检定研究院,工作菌为按照《中国药典》2015年版四部通则1105及1106新鲜制备的第3代菌悬液,并进行质量控制。

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB),均由北京陆桥技术股份有限公司生产,培养基均在有效期内临用现配,且适用性检查结果符合《中国药典》2015年版的要求。

2 方法

2.1 供试液制备

2.1.1 用于平皿法的供试液制备 分别称取A、B、C各10 g,加入含5%聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液100 mL,45℃水浴恒温振荡15 min,制备1:10供试液,分别量取上述3种1:10供试液,用pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液稀释成1:20、1:50供试液。

2.1.2 用于薄膜过滤法的供试液制备 分别称取A、B、C各10 g,加入无菌两相系统(pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液和十四烷酸异丙酯各100 mL),充分震荡,萃取,静置15 min后,量取下层pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液的上清液作为1:10供试液。

2.2 计数方法适用性试验

准确的计数方法是评估药品受微生物污染程度的关键,是药品安全性评价的重要方面,《中国药典》规定,应建立计数需氧菌总数(total aerobic microbial count, TAMC)、霉菌及酵母菌总数(total combined yeasts and molds count, TYMC)的方法,通

过适用性试验的计数方法可用于药品的微生物计数。以下分别采用平皿法、稀释-平皿法和薄膜过滤法对3种乳膏剂进行TAMC、TYMC试验,具体试验方法如下。

2.2.1 平皿法及稀释-平皿法 试验组:取“2.1.1”项制备好的1:10、1:20、1:50的供试液各9.9 mL,分别加入 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各0.1 mL,充分震荡混匀,分别量取1 mL供试液置于直径为90 mm或150 mm的无菌平皿中,加入不超过45 °C的TSA和SDA培养基约20 mL或50 mL。菌液组:以等量的无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代供试液,其他操作同试验组。对照组:取供试品,以等量的无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代菌悬液(不加入试验菌),其他操作同试验组。同时,设置阴性对照组,以无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代供试液和菌悬液(不加入试验菌),其他操作同试验组。待各组平皿凝固后,分别按规定培养条件培养,计数。

2.2.2 薄膜过滤法 试验组:分别取“2.1.2”项制备好的1:10供试液1 mL加入pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液200 mL中,充分震荡,薄膜过滤,用pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗3次,每次100 mL。分别在最后1次冲洗液中加入小于100 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉试验菌液1 mL,过滤后取出滤膜,贴于相应的TSA及SDA上。菌液组:以等量的无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代供试液,其他操作同试验组。对照组:以等量的无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代菌悬液,其他操作同试验组。同时,设置阴性对照组,以无菌pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液替代供试液和菌悬液(不加入试验菌),其他操作同试验组。将制备好的平皿置于规定培养条件培养、计数。

2.2.3 回收率计算方法 各试验菌的回收率为试验组平均菌落数与对照组平均菌落数之差与菌液组平均菌落数的比值。若各试验菌的回收率均为0.5~2.0,判定方法通过,否则方法未通过。

2.3 控制菌检查方法适用性试验

2.3.1 接种方法 分别取“2.1.1”或“2.1.2”项制备好的1:10供试液10 mL接种至TSB培养基100 mL或200 mL中,同时分别接入含菌量不大于100 cfu的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌菌悬液1 mL,混匀,35 °C培养18 h,取上述培养物划线接种于适宜

培养基(甘露醇氯化钠琼脂或溴化十六烷三甲胺琼脂)平板上,35 °C培养18 h,观察,经生化鉴定和VITEK2 compact仪器鉴定确认。取“2.1.1”供试液至100 mL的TSB记为方法1,取“2.1.1”供试液至200 mL的TSB记为方法2,取“2.1.2”供试液至100 mL的TSB记为方法3,取“2.1.2”供试液至200 mL的TSB记为方法4。

2.3.2 判定方法 控制菌检查试验组培养后,接种金黄色葡萄球菌的培养液在甘露醇氯化钠琼脂上呈现金黄色,并经VITEK2 compact全自动细菌鉴定及药敏分析系统确认,判定为检出,记为“+”,未生长或经确认后非金黄色葡萄球菌,记为“-”。铜绿假单胞菌在溴化十六烷三甲胺琼脂上生长,且通过1%二盐酸N,N-二甲基对苯二胺试液做氧化酶试验,若30 s内培养物呈现粉红色并逐渐变为紫红色为阳性,并经VITEK2 compact确认,判定为检出,记为“+”,未生长或氧化酶试验阴性,记为“-”。

3 结果

3.1 平皿法及稀释-平皿法计数方法适用性结果

3种乳膏剂TAMC、TYMC采用平皿法进行计数方法适用性试验结果见表1。硝酸咪康唑对金黄色葡萄球菌抑制作用较强,1:50稀释即可去除抑菌性,对铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌没有抑菌作用。酮康唑对3种试验细菌均有抑菌作用,但活性较低,1:20稀释即可去除抑菌性。曲安奈德益康唑对3种试验细菌均无抑菌作用。3种乳膏剂的3种细菌类试验菌通过平皿法或稀释处理,回收率即符合要求。3种乳膏剂对白色念珠菌、黑曲霉均有较强的抑菌作用,无论是平皿法还是稀释处理后的平皿法,2种试验菌回收率均远小于0.5,不符合方法适用性要求,该方法适用性实验未通过。因此,3种乳膏剂TAMC、TYMC不能采用平皿法计数。

3.2 萃取-薄膜过滤法计数方法适用性结果

3种乳膏剂TAMC、TYMC采用萃取-薄膜过滤法进行方法适用性试验结果见表2。萃取-薄膜过滤法可有效去除3种咪唑类抗真菌乳膏剂对各试验菌的抑菌作用,3种乳膏剂的试验菌回收率均在0.5~2.0,符合计数方法适用性要求,3种咪唑类抗真菌乳膏剂可采用萃取-薄膜过滤法对TAMC、TYMC计数。

3.3 控制菌检查方法适用性结果

3种乳膏剂的控制菌检查方法适用性试验结果见表3,硝酸咪康唑对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,采用直接接种法未检出试验菌,增加培养

表1 3种咪唑类抗真菌乳膏剂微生物计数平皿法和稀释-平皿法回收率

Table 1 Recoveries of plate count methods and dilution-plate count methods of three creams

供试液	组别	铜绿假单胞菌		金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		白色念珠菌		黑曲霉		白色念珠菌 [△]		黑曲霉 [△]	
		试验1	试验2	试验1	试验2	试验1	试验2	试验1	试验2	试验1	试验2	试验1	试验2	试验1	试验2
1:10 (Φ90 mm)	A	0.79	1.01	0.05	0.16	0.79	0.87	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0.45	0.41	0.43	0.4	0.46	0.39	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	1.13	1.09	1.15	1.11	0.95	0.86	0	0	0	0	0	0	0	0
1:20 (Φ90 mm)	A	0.80	0.91	0.42	0.49	0.68	0.81	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0.58	0.63	0.52	0.49	0.75	0.74	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	1.25	1.23	1.00	0.95	1.07	0.93	0	0	0	0	0	0	0	0
1:50 (Φ90mm)	A	0.79	0.93	0.93	0.89	0.85	0.70	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	0.86	0.91	0.70	0.65	0.80	0.68	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0.68	0.80	0.75	0.82	0.63	0.73	0.03	0.08	0	0.03	0.04	0	0	0
1:50 (Φ150 mm)	A	/	/	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	/	/	/	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	/	/	/	/	/	/	0.04	0	0	0	0	0	0	0

△-TYMC 检查方法适用性实验数据;Φ-所用平皿直径;/-未进行该项实验

△ - test data of TYMC test method applicability; Φ - diameter of plate used; / - test was not carried out

表2 3种咪唑类抗真菌乳膏剂萃取-薄膜过滤法微生物计数回收率

Table 2 Recoveries of extraction-membrane filtration methods of three creams

组别	试验	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉	白色念珠菌 [△]	黑曲霉 [△]
A	1	0.88	0.97	0.78	0.8	0.67	0.87	0.71
	2	0.79	0.81	0.83	0.71	0.77	0.82	0.74
	3	0.80	1.00	0.84	0.75	0.74	0.69	0.82
B	1	0.85	0.90	0.9	0.9	0.73	0.89	0.81
	2	0.88	0.85	0.92	0.84	0.91	0.82	0.95
	3	0.82	0.89	0.96	0.81	0.85	0.88	0.88
C	1	0.63	0.69	0.78	0.72	0.77	0.85	0.79
	2	0.79	0.73	0.75	0.74	0.74	0.76	0.74
	3	0.70	0.86	0.87	0.66	0.79	0.81	0.85

△-TYMC 检查方法适用性实验数据

△ - test data of TYMC test method applicability

表3 3种乳膏剂控制菌检查方法适用性结果

Table 3 Results of suitability of specified microorganisms test methods of three creams

方法	组别	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
方法1	A	—	+
	B	+	+
	C	+	+
方法2	A	+	+
	B	/	/
	C	/	/
方法3	A	+	+
	B	+	+
	C	+	+
方法4	A	+	+
	B	/	/
	C	/	/

+ - 检出; — - 未检出;/-未进行该项实验

+ - detected; — - not detected; / - the experiment has not been carried out

基的用量至200 mL可去除抑菌作用检出试验菌。酮康唑和曲安奈德益康唑可采用直接接种法检出试验菌。方法3与方法4均采用萃取后的供试液,3种乳膏剂均可直接接种检出试验菌。因此,采用萃取后的供试液检查控制菌优于直接接种的处理方法,该方法可用于3种乳膏剂的控制菌检查。

4 讨论

计数方法适用性实验结果表明3种咪唑类抗真菌乳膏剂对白色念珠菌和黑曲霉等真菌有较强的抑制活性导致平皿法及稀释-平皿法试验菌回收失败,供试液稀释(1:20,1:50)与培养基稀释(Φ150 mm)等稀释方法联用的方法不足以去除3种乳膏剂的抑真菌活性。供试液稀释与培养基稀释联用的2步稀释方法去除抑菌活性的能力弱于萃取-薄膜过滤法,但可

用于较弱抑菌活性的去除,如去除硝酸咪康唑、酮康唑对金黄色葡萄球菌的抑制作用。薄膜过滤法具有较强的去除抑菌活性能力,在理化性质允许过滤的抗菌药物方法选择时应优先考虑。对于油膏类基质影响过滤的抗菌药物如硝酸咪康唑乳膏等,难过滤的特性导致薄膜过滤法无法应用,而萃取-薄膜过滤法显示出较强的去除抑菌活性能力和应用优势。

抗菌药物的外用制剂如乳膏剂、软膏剂、凝胶剂等常具有较强的抑菌活性,其基质影响复杂,供试液制备繁琐且易造成滤膜堵塞^[9-12],因此该类药品的微生物限度检查方法的建立是个难点问题^[13]。乳膏剂是由油相与水相经过乳化作用形成的^[14],处方中常含有聚氧乙烯-7-硬脂酸酯、聚氧乙烯-5-油酸酯、液体石蜡、十四烷酸异丙酯等非水溶性基质,特殊的理化性质限制了薄膜过滤法的使用,使微生物限度检查法的建立较为困难。有文献报道双柏膏^[15]、四黄软膏^[16]、瑞他莫林软膏^[9]等软膏剂采用十四烷酸异丙酯制备供试液的方法,而采用萃取-薄膜过滤法解决了理化性质和生物抑菌活性两方面的问题。在由等量 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液和十四烷酸异丙酯组成的油水两相系统中,抑菌药物成分与非水溶性基质被萃取到油相中去,微生物则被主要保留到水相,同时萃取处理也降低了水相的抑菌作用和非水溶性基质对滤膜的影响。萃取后微生物在油相、水相中非均匀分布,其主要分布特点是微生物趋向于分布在有利于其生存的环境条件水相中^[17]。在水相中,自由微生物存在于水以及微小油滴周围,但是在油相中,所有的微生物都分散在微小的水滴中^[18],微生物存在于油包水状态的水相或与之相关的水相中,或在油水界面处,使它们得以生存^[19],通过萃取可使乳膏剂中污染微生物在两相系统重新分布,有利于污染微生物的检出。由于真实状况下乳膏剂污染微生物具有多样性,试验菌不可能完全覆盖潜在污染微生物的种类,该法可能无法计数有机相(十四烷酸异丙酯)中存在的微生物。有研究通过从原油中提取 DNA,检测到先前被忽略的微生物^[20]。然而,计数方法用以评估微生物污染水平而非精确定量,因此该法具有可行性,方法适用性结果支持了该方法的使用。

聚山梨酯 80 作为分散剂、乳化剂、增溶剂等常用于药品微生物限度检查中^[21],且不对微生物造成损伤,可促进供试品分散均匀^[22]。在稀释液中加入适量的聚山梨酯 80 对于乳膏剂的均匀分散起到了

积极作用。培养时间的限制反映了在规定的极端条件下培养基和检测方法的检出能力^[23],在控制菌检查方法适用性试验中选择了较短的培养时间 18 h,有利于提高方法的耐用性和敏感性。方法适用性试验的本质就是建立样品影响更小、操作得率更高的实验方法^[24],去除药品的抑菌活性是药品微生物限度检查方法适用性的关键,是检出药品中污染微生物、避免假阴性结果出现的重要环节^[25-26],结合药品的理化性质、抑菌活性、污染风险等因素,建立科学、准确、便捷的个性化的检查方法是微生物方法学研究要考虑的重要问题。

尽管研究是基于《中国药典》2015 年版的要求开展的,但经比较分析认为《中国药典》2020 年版(简称新版药典)在该类药品的微生物检查方法要求上并无实质变化,因此在执行新版药典时,该方法对于解决咪唑类抗真菌乳膏类药品微生物检查方法时的抑菌活性去除等难点问题,具有实际参考和应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘瑜新,傅静兰,夏霄彤,等. 华法林与唑类抗真菌药物相互作用及其机制研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(13): 1406-1409.
Liu Y X, Fu J L, Xia X T, et al. Research of the interaction and their mechanisms between warfarin and azole antifungal agents [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(13): 1406-1409.
- [2] 韩晓燕,宋亚丽,白 埔,等. 抗真菌药物的系统分类、耐药机制及新药研发进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1430-1436.
Han X Y, Song Y L, Bai P, et al. Systematic classification of antifungal drugs, resistance mechanisms and development of new drugs [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2019, 36(11): 1430-1436.
- [3] 刘晓环,张朝晖. 抗真菌药物作用靶点机理及新药研发进展 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 193-202.
Liu X H, Zhang Z H. The action target mechanism of antifungal agents and research advances of novel drugs [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(2): 193-202.
- [4] Abd El-Baky R M, Sandle T, John J, et al. A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 1703-1718.
- [5] 林文鑫,孙逸威,管章委,等. 硝酸咪康唑乳膏中 9 种抑

- 菌剂的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(1): 103-106.
- Lin W X, Sun Y W, Guan Z W, et al. Determination of nine bacteriostats in miconazole nitrate cream by HPLC [J]. Chin J Pharm, 2018, 49(1): 103-106.
- [6] 王爱平, 王若珺, 李若瑜. 抗真菌药物新进展 [J]. 皮肤科学通报, 2017, 34(5): 540-550,4.
- Wang A P, Wang R J, Li R Y. New progress of antifungal agents [J]. Dermatol Bull, 2017, 34(5): 540-550,4.
- [7] 王光裕, 杨英, 车宝泉, 等. 抗真菌药物及其耐药机制研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2018, 29(6): 856-860, 865.
- Wang G Y, Yang Y, Che B Q, et al. Progress in antifungal drugs and drug-resistance mechanisms [J]. Lett Biotech, 2018, 29(6): 856-860, 865.
- [8] 刘昱, 阎澜, 姜远英. 新型抗真菌药物研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(2): 105-113.
- Liu Y, Yan L, Jiang Y Y. Research progress of new antifungal drugs [J]. Chin J Mycol, 2018, 13(2): 105-113.
- [9] 郑小玲, 王征南, 李珏. 瑞他莫林软膏的微生物限度检查适用性试验 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 634-637.
- Zheng X L, Wang Z N, Li J. Applicability test of microbial limit test for retapamulin ointment [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 33(5): 634-637.
- [10] 唐菱, 侯晓军, 周剑, 等. 硫酸新霉素凝胶微生物限度检查方法的适用性试验 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(9): 680-683.
- Tang L, Hou X J, Zhou J, et al. Operational test of methodology on the microbial limit test for neomycin sulphate gel [J]. J Chin Antibiot, 2016, 41(9): 680-683.
- [11] 陈静, 严佳, 钟桂香, 等. 复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法适用性试验研究 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37(4): 357-360, 369.
- Chen J, Yan J, Zhong G X, et al. Validation of microbial limit test for compound terbinafine gel [J]. J Pharm Pract, 2019, 37(4): 357-360, 369.
- [12] 李辉, 杨晓莉, 梁泽梅, 等. 不同剂型硝酸咪康唑微生物限度检查方法适用性研究与评价 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 80-84.
- Li H, Yang X L, Lang Z M, et al. Study and evaluation on the applicability of different microbiological methods for miconazole nitrate [J]. J Chin Antibiot, 2018, 43(1): 80-84.
- [13] 刘冬玲, 李芳, 冯震, 等. 林可霉素利多卡因凝胶微生物限度检查方法的探究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 838-843.
- Liu D L, Li F, Feng Z, et al. Study on the method for microbial limit test of lincomycin hydrochloride and lidocaine hydrochloride gel [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(5): 838-843.
- [14] 祁金玉, 李娜坤, 刘黎瑶, 等. 紫苏叶提取物乳膏剂的处方研究 [J]. 天津农学院学报, 2018, 25(3): 65-69.
- Qi J Y, Li N K, Liu L Y, et al. Ointment formulation optimization of extracts from *Perilla frutescens* [J]. J Tianjin Agricult Univ, 2018, 25(3): 65-69.
- [15] 钟柳芳, 肖文可, 孙树周, 等. 双柏膏微生物限度检查方法适用性试验 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(14): 195-197.
- Zhong L F, Xiao W K, Sun S Z, et al. Applicability test of microbial limit test for Shuangbai Ointment [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2017, 11(14): 195-197.
- [16] 王瑞荣, 戴震. 四黄软膏微生物限度检验方法的验证 [J]. 中国药物评价, 2019, 36(5): 363-367.
- Wang R R, Dai Z. Verification experiment on microbial limit test method of Sihuang Ointment [J]. Chin J Drug Eval, 2019, 36(5): 363-367.
- [17] 李辉, 李翠, 杨晓莉, 等. 油脂类乳膏药品萃取后微生物在油相与水相中的分布状况研究 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 496-501.
- Li H, Li C, Yang X L, et al. Distribution of microorganisms in oil and aqueous phase of grease cream drugs after extraction [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(3): 496-501.
- [18] Liang B, Zhang K, Wang L Y, et al. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 841.
- [19] Li X X, Mbadinga S M, Liu J F, et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2017, 120: 170-185.
- [20] Wang L Y, Ke W J, Sun X B, et al. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(9): 4209-4221.
- [21] 赵新霞, 杨淑先, 王海波, 等. 聚山梨酯80对药品微生物限度检查的影响 [J]. 中国药品标准, 2019, 20(3): 224-230.
- Zao X X, Yang S X, Wang H B, et al. Effects of polysorbate 80 on microbiological examination of drugs [J]. Drug Stand China, 2019, 20(3): 224-230.
- [22] 李辉, 杨晓莉, 秦亚红, 等. 改进培养基制备的平皿法应用于芬太尼透皮贴剂微生物限度检查 [J]. 药学研究, 2017, 36(9): 512-515.
- Li H, Yang X L, Qin Y H, et al. Application of the plate-

- count methods of improved medium preparation on fentanyl transdermal patches microbial limit examination [J]. J Pharm Res, 2017, 36(9): 512-515.
- [23] 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.
- Yang X L, Li H, Ma Y Y, et al. Interpretation and countermeasure of the microbiological examination for nonsterile products: tests for specified microorganisms in Chinese pharmacopoeia (2015 edition) [J]. China Pharm, 2016, 19(4): 748-752.
- [24] 马仕洪, 刘 鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877-882.
- Ma S H, Liu P, Yang L H, et al. Experimental study on microorganism introduction method in suitability test of microbial limit test [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(5): 877-882.
- [25] 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.
- Yang X L, Li H, Ma Y Y, et al. Interpretation of the microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration test of Chinese pharmacopoeia 2015 edition [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(6): 1101-1107.
- [26] 刘冬玲, 蒋 波, 刘 浩. 西罗莫司口服溶液微生物限度检查方法的探讨 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(5): 730-734.
- Liu D L, Jiang B, Liu H. Exploration of microbial limit test method for sirolimus oral solutions [J]. Chin J Pharm, 2017, 48(5): 730-734.

【责任编辑 兰新新】