

# 2种含硫黄制剂的微生物限度检查方法研究

赵新霞<sup>1\*</sup>, 牛 坡<sup>2</sup>(1.河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2.河南省人民医院, 郑州 450003)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3147-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.27

**摘要** 目的:建立对2种含硫黄制剂(硫软膏和喘舒片)进行微生物限度检查的方法。方法:硫软膏供试液分别采用常规法、培养基稀释法、中和(加入中和剂亚硫酸钠)-常规法等进行验证试验,喘舒片供试液分别采用常规法、培养基稀释法和离心沉淀-薄膜过滤法、中和-培养基稀释法进行验证试验,并对筛选出的可行方法进行控制菌验证试验。结果:硫软膏检查中只有中和法对各菌的菌回收率均高于70%;喘舒片检查中细菌计数中只有中和法的菌回收率高于70%;控制菌验证试验中试验组结果均为阳性。结论:加入亚硫酸钠后可中和制剂中所含的硫黄而消除供试品抑菌活性。硫软膏细菌计数采用中和-常规法,喘舒片细菌计数采用中和-培养基稀释法,霉菌和酵母菌计数、控制菌检查采用常规法,试验结果符合要求。建立的方法简便、有效、可行,可作为这2种含硫黄制剂的微生物限度检查方法。

**关键词** 硫软膏;喘舒片;含硫黄制剂;微生物限度检查;中和法;亚硫酸钠

## Study of Microbiological Limit Test for 2 Kinds of Sulfur Preparation

ZHAO Xin-xia<sup>1</sup>, NIU Po<sup>2</sup>(1.Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for microbial limit test of 2 kinds of sulfur preparation (Sulfur ointment and Chuanshu tablets). METHODS: Test solution of Sulfur ointment were validated by routine method, culture medium dilution method, neutralization (adding neutralizing agent sodium sulfite)-routine method; test solution of Chuanshu tablets were validated by routine method, culture medium dilution method, centrifugation-membrane-filter procedure, neutralization-culture medium dilution method; validation test of control bacteria was carried out for selected feasible method. RESULTS: Recovery rate of all bacterials by neutralization method of Sulfur ointment was higher than 70%. Recovery rate of neutralization method was higher than 70% in bacterial count of Chuanshu tablets. Validation test of control bacteria was positive in test group. CONCLUSIONS: The bacteriostatic action of test sample is effectively eliminated by sulfur in samples after adding sodium sulfite. The number of bacterial of Sulfur ointment was counted by neutralization-routine method; the number of bacterial in Chuanshu tablet was counted by neutralization-medium dilution method. The molds and yeast count and control bacteria test were performed using routine method. The test results met the requirements. The method is simple, effective and feasible. It can be used for microbial limit test for 2 kinds of Sulfur preparations.

**KEY WORDS** Sulfur ointment; Chuanshu tablets; Sulfur preparation; Microbial limit test; Neutralization method; Sodium sulfite

硫软膏是用于治疗疥疮、头癣、痤疮、脂溢性皮炎、酒渣鼻、单纯糠疹、慢性湿疹的一种制剂;喘舒片是用于治疗慢性支气管炎、支气管哮喘、肺气肿,尤其适用于喘息型气管炎的一种制剂。这2种制剂中均含有硫黄,硫黄有溶解角质、杀疥虫、杀菌、杀真菌的作用<sup>[1]</sup>。因此,对这2种制剂进行微生物限

度检查时,应先消除供试品中硫黄的抑菌活性,再依法进行检查。笔者利用硫与亚硫酸钠生成硫代硫酸钠的反应原理,在供试液中加入亚硫酸钠溶液,以此来中和供试品中所含的硫黄,从而进行2种含硫黄制剂的微生物限度检查,建立了有效的微生物限度检查方法。

## 参考文献

- [1] 陆芳,金孝玲.复方特非那定凝胶滴鼻剂的制备[J].中国实用医药,2009,4(26):126.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:840-841.
- [3] 李丽敏,郝彬.人血浆中特非那定的LC-MS测定法[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(4):432.
- [4] Ghonein M, Issa R, Tavfik A. Assay of terfenadine in pharmaceutical formulation and human plasma by adsorptive stripping voltammetry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001,26(4):593.
- [5] 吴海雯.特非那定片溶出度检查和含量测定流动相的改进[J].药学实践杂志,2007,25(2):98.
- [6] 高振强,刘珠.HPLC法测定盐酸氯哌丁原料药的有关物质[J].中国药房,2008,19(22):1738.

\*主管药师。研究方向:微生物检验。E-mail:zxxybfq@sohu.com

(收稿日期:2013-02-28 修回日期:2013-04-23)

## 1 材料

### 1.1 仪器

电热恒温干燥箱、恒温培养箱、数显恒温水浴锅(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);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.2 药品

硫软膏(新乡市琦宁药业有限公司,批号:120202、120401、120404,含量:10%);喘舒片(河南华峰制药有限公司,批号:20100201、20100202、20100601,规格:每片0.32 g)。

### 1.3 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]均来源于中国食品药品检定研究院。

### 1.4 培养基与试剂

营养琼脂培养基(批号:201105256)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1008192)、营养肉汤培养基(批号:201105303)、胆盐乳糖培养基(批号:201104271)均由广东环凯微生物科技有限公司生产;甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:100817)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号:100129)、曙红亚甲蓝培养基(批号:1001252)、乳糖胆盐发酵培养基(批号:1104142)均由北京三药科技开发公司生产;无水亚硫酸钠(天津市塘沽新华化工厂,批号:880526,分析纯)。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌液制备<sup>[2]</sup>

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18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,培养24 h。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含菌数为50~100 CFU的菌悬液。另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7 d,加入5 ml含0.05%(V/V)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每1 ml含孢子数为50~100 CFU的孢子悬液。

### 2.2 1 mol/L 亚硫酸钠溶液的配制

取12.6 g无水亚硫酸钠溶于100 ml纯化水中,用1 mol/L HCl调pH值为7.0。

### 2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 硫软膏供试液。A供试液:取供试品5 g,加至含溶化的5 g司盘80、3 g单硬脂酸甘油酯、10 g聚山梨酯80无菌混合物的烧杯中,搅拌成团后,慢慢加入45℃、pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(以下简称缓冲液)至100 ml,边加边搅拌,使供试品充分乳化,作为1:20溶液。B供试液:取供试品5 g,加至含溶化的5 g司盘80、3 g单硬脂酸甘油酯、10 g聚山梨酯80无菌混合物的烧杯中,搅拌成团后,慢慢加入缓冲液64.4 ml,边加边搅拌,使供试品充分乳化,再慢慢加入15.6 ml亚硫酸钠溶液,混匀,作为1:20溶液。

2.3.2 喘舒片供试液。取供试品10 g,加入缓冲液至100 ml,电动匀浆混匀,作为1:10溶液。

### 2.4 硫软膏微生物限度验证方法

2.4.1 采用常规法、培养基稀释法进行细菌计数方法验证。(1)试验组。①常规法:分别取“2.3.1”项下A供试液2 ml、含菌

数为50~100 CFU的试验菌悬液1 ml注入平皿中,倾注营养琼脂培养基(含0.001%氯化三苯四氮唑)。②培养基稀释法:取“2.3.1”项下A供试液2 ml,等量分注5个平皿中,每个平皿再加入1 ml含菌数为50~100 CFU的枯草芽孢杆菌悬液,倾注培养基(含0.001%氯化三苯四氮唑)。(2)菌液组。取1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液,注入平皿中,倾注培养基(含0.001%氯化三苯四氮唑)。(3)供试品对照组。取与试验组相同量的供试品溶液,测定供试品本底菌数。(4)稀释剂对照组。取缓冲液代替供试品,照“2.3.1”项下A供试液制备方法及试验组相同方法进行测定。

按公式计算:试验组的加菌回收率<sup>[3]</sup>=[(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]×100%;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)×100%。试验组和稀释剂对照组的菌回收率均应不低于70%,试验结果见表1。

表1 硫软膏细菌计数方法验证试验结果(样品批号:120202)  
Tab 1 Results of validation test of bacteria count in Sulfur ointment(sample batch number: 120202)

测定方法	组别	菌回收率,%		
		大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
常规法	试验组	95.84,86	75.80,89	0
	稀释剂对照组	91,100,100	89,100,92	87
培养基稀释法	试验组			0.4
	稀释剂对照组			90

表1结果表明,大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌在常规法试验中菌回收率均高于70%,而枯草芽孢杆菌在常规法和培养基稀释法中试验组的菌回收率均低于70%,表明这2种方法均不适用于硫软膏细菌计数。

2.4.2 采用中和-常规法进行细菌、霉菌和酵母菌计数方法验证。(1)试验组。分别取“2.3.1”项下供试液B 2 ml、含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液1 ml注入平皿中。细菌数测定:倾注含0.001%氯化三苯四氮唑溶液的营养琼脂培养基,待其凝固后,再在培养基表面倾注一薄层营养琼脂培养基;霉菌和酵母菌数测定:采用玫瑰红钠培养基。(2)菌液组。取1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液,注入平皿中,倾注与试验组相同的培养基。(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。取缓冲液代替供试品,照“2.3.1”项下B供试液制备方法和试验组相同方法进行测定。试验平行3次。3批样品试验结果见表2。

表2 硫软膏微生物限度检查验证试验结果(n=3)

Tab 2 Results of microbial limit validation test for Sulfur ointment(n=3)

样品批号	组别	菌回收率,%				
		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
120202	试验组	87	83	86	80	84
	稀释剂对照组	94	93	86	95	79
120401	试验组	92	91	85	89	79
	稀释剂对照组	94	93	86	95	79
120404	试验组	90	90	84	89	81
	稀释剂对照组	94	93	86	95	79

表2结果表明,各试验菌在试验组和稀释剂对照组中的菌回收率均高于70%,说明硫软膏细菌、霉菌和酵母菌计数均可采用中和-常规法。

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“2.3.1”项下B供试液20 ml,加入200 ml营养肉汤培养基中,并加入1 ml含10~100 CFU的金黄色葡萄球菌悬液,培养24 h后分离划线于甘露醇氯化钠琼脂平板上,培养72 h,结果3批样品试验均为阳性。(2)铜绿假单胞菌检查方法学验证试验。取“2.3.1”项下B供试液20 ml,加入200 ml胆盐乳糖培养基中,并加入1 ml含10~100 CFU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3批样品试验均为阳性,表明方法可行,结果符合要求。

## 2.5 喘舒片微生物限度验证方法

2.5.1 采用常规法、培养基稀释法进行细菌计数方法验证。

(1)试验组。①常规法:分别取“2.3.2”项下1:10溶液1 ml、含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液1 ml注入平皿中,倾注营养琼脂培养基。②培养基稀释法:取“2.3.2”项下1:10溶液1 ml等量分注5个平皿中,每个平皿再加入1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液注入平皿中,倾注营养琼脂培养基。(2)菌液组、供试品对照组同“2.4.1”项下操作,试验结果见表3。

表3 喘舒片细菌计数方法验证试验结果(样品批号:20100601)

Tab 3 Results of validation test of bacteria count in Chuanshu tablets (sample batch number: 20100601)

测定方法	组别	菌回收率, %		
		大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
常规法	试验组	56	0	0
培养基稀释法	试验组	99, 90, 95	92, 89, 96	3
离心沉淀-薄膜过滤法	试验组			0
	稀释剂对照组			84

2.5.2 采用离心沉淀-薄膜过滤法进行细菌计数方法验证。(1)试验组。取“2.3.2”项下1:10溶液10 ml, 500 r/min离心3 min, 取上清液1 ml, 薄膜过滤, 冲洗量为1 000 ml, 在最后一次冲洗液中加入1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液。(2)菌液组。取1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液, 注入100 ml稀释剂中, 过滤。(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。取缓冲液代替供试品, 加入试验菌, 使最终菌浓度为50~100 CFU/ml, 照试验组方法测定。试验结果见表3。

表3结果表明, 在常规法、培养基稀释法和离心沉淀-薄膜过滤法中, 试验组枯草芽孢杆菌的回收率均低于70%, 表明这3种方法均不适用于喘舒片细菌计数。

2.5.3 采用中和-培养基稀释法进行细菌计数方法验证。(1)试验组。分别取“2.3.2”项下1:10溶液1 ml, 等量分注5个平皿中, 每个平皿再加入0.28 ml亚硫酸钠溶液、1 ml含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液, 倾注培养基。(2)菌液组。同“2.4.1”项下操作。(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。取缓冲液代替供试品, 照试验组方法测定。3批样品试验结果见表4。

2.5.4 霉菌和酵母菌计数方法验证。(1)试验组。分别取“2.3.2”项下1:10溶液和含菌数为50~100 CFU的试验菌悬液各1 ml, 加入平皿中, 倾注培养基。(2)菌液组、供试品对照组分别同“2.4.1”项下中各组操作。试验平行3次。3批样品试验结果见表4。

表3、表4结果表明, 各试验菌的菌回收率均高于70%, 说

表4 喘舒片微生物限度检查验证试验结果(n=3)

Tab 4 Results of microbial limit validation test for Chuanshu tablets (n=3)

样品批号 组别	菌回收率, %				
	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
20100601 试验组	88	95	90	92	92
稀释剂对照组	99	94	96		
20100201 试验组	91	97	85	96	91
稀释剂对照组	99	94	96		
20100202 试验组	95	95	84	88	91
稀释剂对照组	99	94	96		

明喘舒片细菌计数可采用中和-培养基稀释法, 霉菌和酵母菌计数可采用常规法。

2.5.5 控制菌检查方法学验证。(1)大肠埃希菌检查方法学验证试验: 取“2.3.2”项下1:10溶液10 ml, 加入100 ml胆盐乳糖培养基中, 并加入1 ml含10~100 CFU的大肠埃希菌悬液, 培养24 h后分离划线于曙红亚甲蓝琼脂培养基上, 培养24 h, 结果3批样品试验均为阳性。(2)大肠菌群检查方法学验证试验: 取相同1:10溶液1 ml, 加入10 ml乳糖胆盐发酵培养基中, 并加入1 ml含10~100 CFU的大肠埃希菌悬液, 培养24 h后观察现象, 并分离划线于曙红亚甲蓝琼脂培养基平板上, 培养24 h, 结果3批样品试验均为阳性, 表明方法可行, 符合要求。

## 3 讨论

试验时先取3批样品中的1批进行预试验, 结果显示, 不加中和剂时, 试验操作烦琐且结果不符合要求。加入中和剂亚硫酸钠后, 通过中和反应, 消除了供试品中的硫黄对试验菌的抑制作用, 大大简化了试验操作, 且能有效地进行供试品的微生物限度检查。同时该试验原理可用于其他硫黄制剂的微生物限度检查。

试验中, 以硫与亚硫酸钠按1:1物质的量之比反应计算, 喘舒片细菌计数方法验证试验中每0.2 ml供试液, 需要加入1 mol/L亚硫酸钠溶液0.28 ml进行中和。依此原理, 硫软膏试验中需要加入1 mol/L亚硫酸钠溶液15.6 ml进行中和。结果表明, 中和试验充分, 均消除了供试品的抑菌作用。

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, 本试验中稀释剂对照组的试验菌回收率均高于70%, 说明所加入的亚硫酸钠溶液对试验菌的生长无明显影响。

进行硫软膏微生物限度检查时, 由于枯草芽孢杆菌的蔓延, 造成试验结果难以观察。因此, 本试验中采用了倾注含0.001%氯化三苯四氮唑溶液的营养琼脂培养基的方法, 待培养基凝固后, 再在培养基表面倾注一薄层营养琼脂培养基, 有效地解决了这一问题。

## 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 1册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 422.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录80.
- [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.

(收稿日期: 2012-11-30 修回日期: 2013-02-20)