

文章编号: 1001-8689(2018)01-0080-05

## 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

李辉<sup>1</sup> 杨晓莉<sup>1</sup> 梁泽梅<sup>2</sup> 秦亚红<sup>3</sup> 绳金房<sup>1</sup>

(1 陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065; 2 延安大学西安创新学院, 西安 710100; 3 渭南市食品药品检验所, 渭南 714000)

**摘要:** **目的** 通过不同的前处理方式, 建立硝酸咪康唑不同剂型的微生物限度检查法。**方法** 参照《中国药典》2015年版四部, 根据硝酸咪康唑胶囊剂、散剂和乳膏剂的理化特点, 选择均质、萃取和静置等前处理方式, 采用平皿法和薄膜过滤法建立适用于硝酸咪康唑不同制剂的微生物限度检查方法, 并比较方法差异。**结果** 建立的3种不同剂型硝酸咪康唑的微生物限度检查方法满足《中国药典》2015年版要求, 需氧菌总数, 霉菌和酵母菌总数检查法中的试验菌回收率均在50%~200%之间, 加入的控制菌均可检出, 各方法适用于不同剂型硝酸咪康唑的微生物限度检查。**结论** 硝酸咪康唑不同剂型的微生物限度检查方法差异较大, 应灵活选择适宜的前处理方式, 解决样品抑菌性的去除和难于过滤的问题。

**关键词:** 硝酸咪康唑; 微生物限度检查法; 抑菌性; 前处理方法

**中图分类号:** R978.5 **文献标志码:** A

## Study and evaluation on the applicability of different microbiological methods for miconazole nitrate

Li Hui<sup>1</sup>, Yang Xiao-li<sup>1</sup>, Liang Ze-mei<sup>2</sup>, Qin Ya-hong<sup>3</sup> and Sheng Jin-fang<sup>1</sup>

(1 Shanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065; 2 Xi'an Innovation College of Yan'an University, Xi'an 710100;

3 Weinan Institute for Food and Drug Control, Weinan 714000)

**Abstract Objective** To establish the microbial limit test of different dosage forms of voriconazole by different pretreatment methods. **Methods** According to the physical and chemical characteristics of the capsule, powder and cream, the microbial limit test methods of different preparation of voriconazole were established by plating and membrane filtration, and the differences were compared. **Results** The microbial limit test methods of three different formulations of voriconazole met the requirements of Chinese Pharmacopoeia 2015, the test microorganisms recovery rates of total aerobic microbial count and total combined yeasts and molds count were 50%~200%, and the added specified microorganisms were checked out. The methods can be used for microbiological examination of miconazole nitrate. **Conclusion** The methods of the microbial limit test of different dosage forms of miconazole nitrate are different, and the suitable pretreatment method should be flexibly selected to solve the problem of antibacterial removal and filtration.

**Key words** Miconazole; Microbial limit test; Antimicrobial; Pretreatment method

硝酸咪康唑1984年获准上市, 商品名为“Lotrimin”, 1989年由西安杨森公司引进中国市场, 商品名为“达克宁”<sup>[1]</sup>。硝酸咪康唑系一种广谱、高效、毒副作用小的咪唑类抗真菌药物, 对大

多数皮肤癣菌、酵母菌和放线菌等有良好的抗菌作用<sup>[2]</sup>, 还对葡萄球菌、链球菌和炭疽杆菌等革兰阳性菌有抑菌作用<sup>[3]</sup>, 市场上常用剂型有软胶囊剂、散剂和软膏剂等。微生物限度检查是反映药品安全性的

收稿日期: 2017-02-20

作者简介: 李辉, 男, 生于1984年, 主管药师, 研究方向为药品的微生物检验和研究, E-mail: flywithme100@163.com

重要指标<sup>[4]</sup>,在建立硝酸咪康唑的微生物限度检查法时,常因样品复杂的基质和较强的抑菌作用而使一般的处理方式发生试验菌回收失败,薄膜过滤法存在过滤效率低甚至堵膜的问题。本文参照《中国药典》2015年版四部要求<sup>[5]</sup>,针对不同剂型硝酸咪康唑的理化特点,采用均质、静置和萃取等前处理方式,建立的系列微生物限度检查法科学、合理、简单且可靠,适用于硝酸咪康唑不同剂型的微生物限度检查。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

MLS-3020型高压蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器公司),BS2202S型电子天平(德国赛多利斯公司),HFsafe-1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),SHA-C型水浴恒温振荡器(天津鑫博得有限公司),LRH-250F生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),LRH-250F霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),LRH-150B生化培养箱(广东省医疗器械厂),DK-98-1恒温水浴(天津奉斯特仪器公司),VITEK2全自动微生物鉴定系统(法国Bio-Merieux公司),OLYMPUS.CH型三目显微镜(日本Olympus公司),PB-10 pH酸度计(赛多利斯科技北京有限公司),Bag System均质器(法国Interscience公司),WJ-6无菌检查仪(天津市罗根科技有限公司)。

### 1.2 样品和试剂

硝酸咪康唑阴道软胶囊(规格:0.4g;批号:140113779),硝酸咪康唑散(批号:151013809)和硝酸咪康唑乳膏(批号:160225408)均由西安杨森制药有限公司生产。氯化钠(批号:20150716)、聚山梨酯80(批号:20151105)购自国药集团化学试剂有限公司。十四烷酸异丙酯(批号:20140219)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、3%过氧化氢试液按要求新鲜配制。

### 1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:151230);沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:151219);胰酪大豆胨液体培养基(批号:150507);沙氏葡萄糖液体培养基(批号:150801),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:150801);溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号:150801),均由北京陆桥技术有限责任公司生产,培养基适用性检查结果均符合中国药典2015版的要求。

## 1.4 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[CMCC(B)63501]、白念珠菌(*Candida albicans*)[CMCC(F)98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)[CMCC(F)98003],上述标准菌株均来自中国食品药品检定研究院,工作菌株为第3代。

## 2 实验方法

### 2.1 菌液的制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养24h;将白念珠菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基中,25℃培养3d。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液;将黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,25℃培养7d,加入5mL含0.05%(mL/mL)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含0.05%(mL/mL)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

### 2.2 供试液的制备

#### 2.2.1 用于平皿稀释法的供试液制备

分别称取硝酸咪康唑阴道软胶囊和硝酸咪康唑乳膏10g,各加入含5%(mL/mL)聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液100mL,45℃水浴保温振荡15min,制成1:10供试液。称取硝酸咪康唑散10g,加入pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液至100mL,45℃水浴保温振荡15min,静置15min后取上层清液作为1:10供试液。各取上述3种供试液适量,用pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液稀释成1:20和1:50供试液。

#### 2.2.2 用于薄膜过滤法的供试液制备

称取硝酸咪康唑阴道软胶囊10g,加入pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液100mL至无菌袋中,用均质器均质1min使胶囊壳破裂,内容物充分释放,制成1:10供试液。称取硝酸咪康唑散10g,加入pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液至100mL,45℃水浴保温振荡15min,静置15min后取上层清液作为1:10供试液。称取硝酸咪康唑乳膏10g,加入pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液和无菌十四烷酸异丙酯各100mL,充分震荡萃取,静置15min后取下层水相的上清液作为1:10供试液。

## 2.3 计数方法适用性试验

### 2.3.1 平皿法

试验组取适量“2.2.1”项制备好的1:10、1:20和1:50的各供试液9.9mL,分别加入不大于 $10^4$ CFU/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉试验菌菌悬液0.1mL,混匀。取1mL上述试验组供试液置于直径为90或150mm的无菌平皿中,加入温度不超过45℃熔化的胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基约20或50mL,摇匀,待凝固后按规定温度和时间培养,观察结果。菌液组以等量的无菌胰酪大豆胨液体培养基替代供试液,方法同试验组。对照组,除不加入菌液外,方法同试验组。另做阴性对照。

### 2.3.2 薄膜过滤法

试验组,取1:10供试液10mL加入含1%(mL/mL)聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液200mL冲洗液的输液瓶中,薄膜过滤,用含1%(mL/mL)聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗(硝酸咪康唑阴道软胶囊冲洗5次,硝酸咪康唑散冲洗3次),100mL/次。在最后一次冲洗液中分别加入不大于100CFU/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉试验菌液1mL,取膜贴于胰酪大豆胨液体培养基和胰酪大豆胨琼脂培养基上。菌液组以等量的无菌胰酪大豆胨液体培养基替代供试液,方法同试验组。对照组除不加入菌液外,方法同试验组。另做阴性对照。

### 2.3.3 回收率计算方法

各菌株回收率(%)=(试验组菌落数-供试液对照菌落数)/菌液组菌落数 $\times 100\%$ 。根据《中国药典》2015版四部规定,若回收率为50%~200%,方法可用于样品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的计数检查。

## 2.4 控制菌的检查

3种硝酸咪康唑制剂均为外用制剂需控制金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌,阴道软胶囊还需控制白念珠菌。供试液制备见“2.2”,按以下2种方法制备胰酪大豆胨液体培养物于35℃培养18h后划线接种于甘露醇氯化钠琼脂、溴化十六烷基三甲铵琼脂和沙氏葡萄糖琼脂平板(软胶囊)上,继续在35℃培养18h后观察。

### 2.4.1 直接接种法

取硝酸咪康唑阴道软胶囊、硝酸咪康唑散和硝

酸咪康唑乳膏的1:10供试液各10mL分别接种至胰酪大豆胨液体培养基和沙氏葡萄糖液体培养基(软胶囊)100、200和400mL中,各加入含菌量不大于100CFU/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白念珠菌(软胶囊)菌悬液1mL,混匀。

### 2.4.2 薄膜过滤法

取硝酸咪康唑阴道软胶囊和硝酸咪康唑散的1:10供试液10mL加到含1%(mL/mL)聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液200mL的薄膜过滤器中进行过滤,用含1%(mL/mL)聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗(硝酸咪康唑阴道软胶囊冲洗5次,硝酸咪康唑散冲洗3次),100mL/次。各供试液在最后一次冲洗液分别加入不大于100CFU/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白念珠菌(软胶囊)菌液1mL,经薄膜过滤器过滤。滤膜经滤干后取出接种至胰酪大豆胨液体培养基100mL中,摇匀。

## 3 实验结果

### 3.1 计数方法(平皿法)适用性结果

不同剂型硝酸咪康唑需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数采用平皿法进行方法适用性试验结果见表1。硝酸咪康唑对试验菌有较强的抑菌作用,除散剂的试验菌回收率均在50%~200%之间符合要求,可采用1:50供试液1mL,直径150mm平皿进行平皿法计数外,软胶囊和乳膏剂回收率不符合要求,不能采用平皿法计数。

### 3.2 计数方法(薄膜过滤法)适用性结果

不同剂型硝酸咪康唑需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数采用薄膜过滤法进行方法适用性试验结果见表2。薄膜过滤法可较好的去除硝酸咪康唑的抑菌作用,软胶囊和乳膏剂试验菌回收率均在50%~200%之间,符合要求,可采用薄膜过滤法对需氧菌总数,霉菌和酵母菌总数计数。

### 3.3 控制菌检查法适用性结果

硝酸咪康唑阴道软胶囊和散剂的控制菌检查方法适用性试验,样品对金黄色葡萄球菌和白念珠菌有较强的抑制作用,采用直接接种法和培养基稀释接种法无法去除抑菌作用,故未检出试验菌,而薄膜过滤法均可检出试验菌,可采用薄膜过滤法对其进行控制菌检查。乳膏剂采用1:10供试液10mL接种至200mL胰酪大豆胨液体培养基的方法,培养后可检出试验菌金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌,可采

表1 不同剂型硝酸咪康唑微生物计数平皿法回收率(%)

Tab. 1 The recoveries of plate-count methods of microbial count in different dosages formiconazole (%)

试验菌	1:10(Φ90mm)			1:20(Φ90mm)			1:50(Φ90mm)			1:50(Φ150mm)			
	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂	
铜绿假单胞菌	1	0	25	79	72	44	80	76	65	79	78	78	-
	2	0	24	101	61	54	91	81	76	93	91	76	-
	3	-	-	-	-	-	-	86	73	91	89	86	-
金黄色葡萄球菌	1	0	0	5	0	0	42	0	50	93	0	88	-
	2	0	0	16	2	0	49	4	42	89	0	82	-
	3	-	-	-	-	-	-	3	41	84	0	71	-
枯草芽胞杆菌	1	0.11	0	79	2	42	68	60	71	85	63	76	-
	2	17	4	87	1	45	81	74	58	70	67	83	-
	3	-	-	-	-	-	-	60	63	69	70	79	-
白念珠菌	1	0	0	0	0	0	0	0	43	0	0	68	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	78	0
	3	-	-	-	-	-	-	0	50	0	0	67	0
黑曲霉	1	0	0	0	0	0	0	0	46	0	0	78	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	73	0
	3	-	-	-	-	-	-	0	59	0	0	88	0
白念珠菌*	1	0	0	0	-	0	-	-	44	-	-	78	-
	2	0	0	0	-	0	-	-	64	-	-	84	-
	3	0	-	-	-		-	-	61	-	-	80	-
黑曲霉*	1	0	0	0	-	0	-	-	47	-	-	99	-
	2	0	0	0	-	0	-	-	60	-	-	79	-
	3	0	-	-	-		-	-	66	-	-	86	-

注：“-”表示该项未进行试验；“\*”表示霉菌和酵母菌总数检查方法适用性实验数据；“Φ”表示所用平皿直径；“1, 2, 3”表示试验次数

表2 不同剂型硝酸咪康唑微生物计数薄膜过滤法回收率(%)

Tab. 2 The recoveries of membrane filtration methods of microbial count in different dosages formiconazole (%)

试验菌	软胶囊			乳膏剂		
	1	2	3	1	2	3
铜绿假单胞菌	79	98	89	88	79	80
金黄色葡萄球菌	66	78	81	97	81	100
枯草芽胞杆菌	93	92	96	78	83	84
白念珠菌	65	76	75	80	71	75
黑曲霉	65	67	76	67	77	74
白念珠菌*	69	74	84	87	82	69
黑曲霉*	75	74	88	71	74	82

注：“\*”表示霉菌和酵母菌总数检查方法适用性数据；“1, 2, 3”表示试验次数

用培养基稀释接种法对其进行控制菌检查。

4 讨论

平皿法是非无菌制剂微生物计数的传统方法，具有简单方便，成本低，结果准确的优点，是优先考虑的方法。因硝酸咪康唑较强的抑菌作用，采用1:10、1:20和1:50稀释液均无法满足试验菌的回收率要求，散剂应用直径150mm大平皿进一步稀释，回收试验成功，而其他剂型均失败，改用薄膜过滤法，该法在微生物计数法中非首选方法，但其具有取样量大，定量限更低，有利于去除抑菌性的优点，联合特殊的样品前处理方式及一定浓度的聚山

表3 不同剂型硝酸咪康唑控制菌检测方法适用性结果

Tab. 3 The results of suitability of the specified micro-organisms test methods in different dosages formiconazole

试验菌	薄膜过滤法			100mL			200mL			400mL		
	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂	软胶囊	散剂	乳膏剂
金黄色葡萄球菌	+	+	/	-	-	-	-	-	+	-	-	/
铜绿假单胞菌	+	+	/	+	+	+	/	/	+	/	/	/
白念珠菌	+	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/

注：“+”表示试验菌生长良好；“-”表示无试验菌生长；“/”表示无此项或未进行该项试验，100、200和400mL分别代表采用直接接种法时所用培养基体积梯度；

梨酯80建立了阴道软胶囊剂和乳膏剂的微生物计数法。本文建立散剂的计数法采用了高稀释级和大平皿协同稀释以降低抑菌作用,方法可行,但定量限相对较高,准确性稍差。阴道软胶囊和乳膏剂采用薄膜过滤法可满足消除抑菌性和限度标准要求。将乳膏剂和散剂的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检查方法合并为薄膜过滤法,可增强方法的科学性和易操作性。聚山梨酯80是一种表面活性剂,可作为乳化剂和中和剂等,用于药品的微生物限度检查时供试液的制备<sup>[6]</sup>,使供试液分散系统更具相容性,另外聚山梨酯80对咪唑类有一定的中和作用<sup>[7]</sup>,有文献报道5%(mL/mL)聚山梨酯80对试验菌株本身生长没有影响<sup>[8]</sup>,在试验中选择使用了不同浓度的聚山梨酯80,有利于样品的滤过和微生物的检出。薄膜过滤法是去除药品中抗菌成分的最有效方法<sup>[9]</sup>,但硝酸咪康唑阴道软胶囊和乳膏剂供试液易堵塞薄膜,虽尝试适当提高冲洗液的温度至45℃时,可以增加供试液的滤过性<sup>[9-10]</sup>,但温度不易控制,可操作性低。硝酸咪康唑不同剂型的微生物限度检查方法差异较大,应根据样品理化性质,抑菌作用和限度要求,灵活选择萃取,静置和均质等适宜的前处理方式使样品分散均匀,可有效解决因样品性质导致的抑菌

性的去除和难于过滤的问题。

### 参考文献

- [1] 张秉华, 宋莉, 杜珊, 等. HPLC法测定硝酸咪康唑原料有关物质的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(4): 638-641.
- [2] 李彩文, 陈宝泉, 骆红琴. 硝酸咪康唑乳膏的处方筛选及其质量控制[J]. 天津理工大学学报, 2007, 23(5): 43-45.
- [3] 刘燕. 硝酸咪康唑乳膏中防腐剂测定方法的建立[J]. 中国药业, 2015, 20(24): 85-86.
- [4] 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.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典[S]. (2015年版四部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 140-151.
- [6] 廖祥茹, 陈晨, 李旻, 等. 聚山梨酯80在微生物限度检查中的应用[J]. 中国药师, 2014, 17(10): 1776-1777.
- [7] 赵丽元, 张兴哲, 刘英慧. 中和法在微生物限度检查中的应用[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(4): 5-6.
- [8] 江志杰, 高春, 井良义. 发用类化妆品微生物检验方法适用性的研究[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(12): 1096-1099.
- [9] 刘鹏, 戴翠, 马仕洪, 等. 大环内酯类抗生素口服制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(67): 352-358.
- [10] 李芳, 刘冬玲, 刘浩, 等. 氟罗沙星胶囊微生物检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 445-447.