

# 硝酸布康唑栓微生物限度检查方法适用性试验研究

潘震宇, 汤茜\*, 李瑞莲 (湖南省食品药品检验研究院, 长沙市 410001)

**摘要 目的:** 建立硝酸布康唑栓微生物限度检查方法。**方法:** 按照《中国药典》2015年版四部通则进行硝酸布康唑栓微生物限度检查方法适用性试验, 对中和剂的种类、薄膜过滤冲洗液体积、菌液加入时间等进行考察, 通过试验菌株的回收试验, 确立需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法, 并确立金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的检查方法。**结果:** 试验样品硝酸布康唑栓对细菌和真菌均具有较强的抑菌性。采用薄膜过滤法和中和法联用的方法可有效去除其抑菌性。**结论:** 建立的硝酸布康唑栓微生物限度检查方法符合《中国药典》2015年版要求, 可用于常规的药品质量控制检验工作。

**关键词:** 硝酸布康唑栓; 微生物限度; 薄膜过滤法; 中和法; 金黄色葡萄球菌; 铜绿假单胞菌; 白色念珠菌

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)01-0043-06  
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.01.009

## Methodological Study on Microbial Limit Test of Butoconazole Nitrate Suppositories

Pan Zhenyu, Tang Qian\*, Li Ruilian (Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China)

**Abstract Objective:** To establish testing methods of microbial limits for Butoconazole Nitrate Suppositories. **Methods:** Applicability tests were conducted according to the general principles of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition), Experiments were made on the varieties of neutralizing agent, the volume of rinsing solution and the addition time of bacteria suspension. The count methods were established by the recovery tests with tested strains. The methods for the examination of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* were also established. **Results:** Butoconazole Nitrate Suppositories had strong antimicrobial activities both on bacteria and fungi. The antimicrobial activities could be effectively eliminated with the membrane filtration method combined with the neutralization method. **Conclusion:** The method meets the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition), and can be used in routine microbial limits test for Butoconazole Nitrate Suppositories.

**Keywords:** Butoconazole Nitrate Suppositories; microbial limits; membrane filtration method; neutralization method; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*

硝酸布康唑的化学名为1-[4-(4-氯苯基)-2-[(2,6-二氯苯基)硫代]丁基]-1H-咪唑硝酸盐<sup>[1]</sup>。硝酸布康唑作为一种新型咪唑类抗真菌药物, 对革兰

阳性细菌、真菌和念珠菌具有优良的抗菌活性, 在体内对白色念珠菌的作用优于其他已上市的同类药物, 临床上对白色念珠菌、热带念珠菌等引起的阴

基金项目: 湖南省自然科学基金 (编号 2015JJ6053)

作者简介: 潘震宇, 副主任药师, 从事食品药品检测研究; Tel: (0731) 82275833; E-mail: 458897782@qq.com

通信作者: 汤茜, 从事微生物检测研究; Tel: (0731) 82275832; E-mail: esqian@aliyun.com

道感染高度有效,起效迅速,用药安全,具有广阔的应用前景<sup>[2-5]</sup>。

2015年版《中国药典》对非无菌产品的微生物控制与国际标准趋于一致,实现了与国际ICH要求的统一协调;同时,2015年版《中国药典》编制大纲也突出强调,要加强药品无菌与微生物限度检查方法的建立与验证方面的标准研究工作<sup>[6]</sup>。本文按照《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则1105)、非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法(通则1106)、非无菌产品微生物限度标准(通则1107)的具体规定<sup>[7]</sup>,对硝酸布康唑栓的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数,以及控制菌金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的检查方法,进行了适用性试验,其试验情况和结果的归纳对于2015年版《中国药典》有关内容的贯彻执行将起到促进作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

HTY-2000B集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司),BHC-1300 II A/B3生物安全柜(苏州净化设备有限公司),VB-95全自动高压蒸汽灭菌器(德国SYSTEC公司),Binder 240恒温培养箱(德国BINDER公司),SPX-380生化培养箱(宁波东南仪器有限公司),PL602-L电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FC752薄膜过滤器(批号:20150320,杭州泰林生物技术设备有限公司)。

### 1.2 样品

硝酸布康唑栓(规格:0.1 g·粒<sup>-1</sup>,湖南某制药公司生产)。

### 1.3 培养基

胰酪胨大豆琼脂培养基(批号:140701,北京三药科技开发公司),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:131227,北京三药科技开发公司),沙氏葡萄糖液体培养基(批号:1310162,北京三药科技开发公司),胰酪大豆胨液体培养基(批号:20140108,北京奥博星生物技术有限责任公司),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:3103250,广东环凯微生物科技有限公司),溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号:130316,北京路桥技术有限责任公司)。

### 1.4 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

[CMCC(B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10104]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003],均来源于中国医学细菌保藏管理中心。

### 1.5 稀释液及冲洗液

pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:130614,北京三药科技开发有限公司)。

## 2 方法与结果

按照《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则1105)和非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法(通则1106)的有关规定,对硝酸布康唑栓微生物限度检查方法进行方法适用性试验。

### 2.1 菌液制备

接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中,30~35℃培养18~24 h,取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至菌数不大于100 cfu·mL<sup>-1</sup>。接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中,20~25℃培养2~3d,取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至菌数不大于100 cfu·mL<sup>-1</sup>。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基中,20~25℃培养5~7d,用3~5 mL含0.05% (mL/mL) 聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液洗下霉菌孢子,吸取孢子悬液置无菌试管内,用含0.05% (mL/mL) 聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液稀释至孢子数不大于100 cfu·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 供试液制备

取本品10 g,加pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,45℃保温振摇,制成1:10的均匀供试液。

### 2.3 微生物计数方法适用性试验

#### 2.3.1 方法的选择过程

经查阅文献,硝酸布康唑对革兰阳性细菌、真菌和念珠菌具有较强的抗菌活性,且经试验,结果也表明常规平皿法不适合本品微生物限度检查。

本品剂型为栓剂,采用pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为稀释液,经45℃保温振摇,可制成1:10的均匀供试液,且滤过性好,确定薄膜过滤法为试验方法<sup>[8-12]</sup>。

按照《中国药典》2015年版四部通则1105的要求, 试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值应在0.5~2范围内。经试验, 采用敏感菌白色念珠菌和金黄色葡萄球菌作为试验菌, 以双联薄膜过滤器进行试验, 用pH7.0无菌

氯化钠-蛋白胨缓冲溶液冲洗滤膜, 每张滤膜冲洗1000 mL, 共冲洗2000 mL, 也无法消除1 g供试品的抑菌性。即单一采用薄膜过滤法, 冲洗量即使达到每张滤膜允许的最大限量(1000 mL·膜<sup>-1</sup>), 回收试验结果也不符合要求。试验结果见表1。

表1 单一采用薄膜过滤法回收试验结果

试验菌	冲洗体积 / (mL·膜 <sup>-1</sup> )	中和剂	菌落数	回收比值
白色念珠菌	500	/	0	0
	1000	/	0	0
金黄色葡萄球菌	500	/	0	0
	1000	/	1	0.01

根据上述试验情况, 考虑采用薄膜过滤法和中和法联用的方法消除供试品的抑菌性<sup>[13]</sup>。鉴于金属离子的络合作用, 考虑在培养基中分别添加

0.1M硫酸锰、0.1M硫酸镁、0.2M硫代硫酸钠、0.1M硫代硫酸钠等中和剂, 试验结果见表2。

表2 采用不同中和剂回收试验结果

试验菌	薄膜冲洗量 / (mL·膜 <sup>-1</sup> )	中和剂	菌落数	回收比值
白色念珠菌	1000	0.1M 硫酸锰	0	0
	1000	0.1M 硫代硫酸钠	0	0
	1000	0.2M 硫代硫酸钠	0	0
	500	0.1M 硫酸镁	14	0.2
	1000	0.1M 硫酸镁	60	0.8

由表2可以看出, 在培养基中添加硫酸锰或硫代硫酸钠, 均无明显效果; 而采用在培养基中添加0.1M硫酸镁的方法, 同时冲洗量为1000 mL·膜<sup>-1</sup>时, 白色念珠菌的回收比值达0.8, 试验结果符合要求。

《中国药典》2015年版四部通则1105在菌液加

入时间方面, 采用将菌液直接加入供试品溶液进行试验的方法, 指出若因供试品抗菌活性的原因导致方法适用性试验失败, 可在薄膜过滤处理后再加入菌悬液进行试验。这表明菌液加入时间的确定原则是越早加入越好。故本试验对菌液加入方式也进行了考察, 具体试验结果见表3。

表3 菌液不同加入时间回收试验结果

试验菌	薄膜冲洗量 / (mL·膜 <sup>-1</sup> )	中和剂	菌液加入方式	菌落数	回收比值
白色念珠菌	1000	0.1M 硫酸镁	供试液	0	0
	1000	0.1M 硫酸镁	冲洗后	60	0.8

结果表明,应在采用薄膜过滤法进行冲洗,消除供试品部分抑菌性后方可加入菌液;若将菌液加入1:10供试液,即使立即进行抽滤冲洗,回收试验仍会失败。

### 2.3.2 需氧菌总数计数方法适用性试验

经过上述试验过程的分析,确定采用薄膜过滤法和中和法联用的方法进行需氧菌总数计数方法适用性试验。试验时取1:10的供试液10 mL,加至100 mL pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液中,使分散均匀,抽滤入双联薄膜过滤器,全量滤过,以

pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液冲洗滤膜,每次200 mL,总冲洗量为2000 mL(1000 mL·膜<sup>-1</sup>),在最后一次冲洗液中分别加入不大于100 cfu的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液,混匀,抽滤,取膜,菌面朝上贴于含0.1M 硫酸镁的胰酪胨大豆琼脂培养基平板上,按药典方法培养、计数。试验结果见表4。由试验结果可见,该方法适合硝酸布康唑栓需氧菌总数计数。

表4 需氧菌总数微生物回收试验结果

试验菌	试验组 / cfu	菌液对照组 / cfu	供试品对照组 / cfu	中和剂对照组 / cfu	试验组 回收比值	中和剂对照组 回收比值
铜绿假单胞菌	68	66	0	70	1.0	1.1
金黄色葡萄球菌	86	91	0	89	0.9	1.0
枯草芽孢杆菌	58	56	0	50	1.0	0.9
白色念珠菌	72	85	0	81	0.8	1.0
黑曲霉	46	54	0	52	0.8	1.0

### 2.3.3 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

试验方法同需氧菌总数适用性试验。试验菌为白色念珠菌和黑曲霉。试验结果见表5。由试验

结果可见,该方法适合硝酸布康唑栓霉菌和酵母菌总数计数。

表5 霉菌和酵母菌总数微生物回收试验结果

试验菌	试验组 / cfu	菌液对照组 / cfu	供试品对照组 / cfu	中和剂对照组 / cfu	试验组 回收比值	中和剂对照组 回收比值
白色念珠菌	70	84	0	88	0.8	1.0
黑曲霉	47	54	0	49	0.9	0.9

### 2.3.4 控制菌检查方法适用性试验

本品应考察的控制菌为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌。试验时取1:10供试液10 mL, 加至100 mL pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液中, 使分散均匀, 抽滤入双联薄膜过滤器, 冲洗方式与体积同需氧菌总数方法适用性试验。取

膜, 接种至含0.1M 硫酸镁胰酪大豆胨液体培养基或沙氏葡萄糖液体培养基中, 对培养基的体积进行了试验摸索。试验结果见表6。结果表明, 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌分别采用500 mL、200 mL和800 mL体积的增菌液, 试验组显示阳性结果。经分离、纯化和鉴定, 其结果均为阳性。

表6 控制菌检查培养基不同体积结果比较

金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		白色念珠菌	
培养基体积 /mL	试验结果	培养基体积 /mL	试验结果	培养基体积 /mL	试验结果
100	-	100	-	100	-
200	-	200	+	200	-
300	-	300	+	300	-
500	+	/	/	500	-
800	+	/	/	800	+

## 3 讨论

### 3.1 敏感试验菌株的选择

硝酸布康唑对于细菌和真菌均具有较强的抑菌性。据文献报道, 硝酸布康唑的抗菌谱与其他咪唑类化合物类似, 对革兰阳性细菌具有抗菌活性, 对曲霉属真菌和念珠菌抗菌活性良好, 对革兰阴性细菌无活性<sup>[2]</sup>。故本试验采用白色念珠菌和金黄色葡萄球菌作为方法摸索阶段的试验菌。但试验过程显示, 本品对铜绿假单胞菌具有一定的抑菌活性, 在进行控制菌铜绿假单胞菌检查方法适用性试验时发现, 当增菌培养基体积为100 mL时, 试验组在18 h观察不到阳性结果; 而在进行需氧菌总数计数方法试验时, 发现铜绿假单胞菌试验组在不含硫酸镁的琼脂平板上, 菌落形态明显比添加硫酸镁培养基上的小, 表明细菌的生长繁殖受到了一定程度的影响。

### 3.2 增加滤膜数量

由于薄膜过滤方法自身的局限性, 冲洗液体积不宜过大, 按照2015年版药典通则规定, 每张膜总冲洗量不得超过1000 mL, 以避免滤膜上的微生物受到损伤。本试验采用了增加滤膜数量的方法, 选用双联薄膜过滤器, 滤过的供试品量不变, 总冲洗量可增至2倍。

### 3.3 中和剂的选择

据文献报道, 金属离子的络合作用, 可以降低部分药物的抑菌活性<sup>[14-15]</sup>。试验中采用了中和剂硫酸锰、硫代硫酸钠和硫酸镁进行试验, 结果显示硫酸镁为本品适宜中和剂, 可对今后咪唑类抗真菌药物的微生物限度或无菌检查方法的确立提供参考和借鉴。

### 3.4 薄膜过滤供试品量的确定

在考察同类型药品微生物限度检查方法时, 应尽量采用1g或1 mL (即取1:10供试液10 mL) 供试品进行试验。一方面, 是由于阴道给药制剂的微生物限度标准较低; 另一方面, 也是药典对于薄膜过滤法的一般规定。而国内不少相关文献报道均以1:10供试液1 mL的取用量进行方法试验, 存在供试品量过低的情况, 从而降低了对产品微生物污染状况的真实反映程度<sup>[9]</sup>。

### 3.5 菌液加入时间点的探讨

2015年版药典通则对此类试验的菌液加入时间点进行了修订, 要求将试验菌液加入供试液 (所加菌液体积不得超过供试液体积的1%), 混匀后再行试验。该修订提高了试验结果的可靠性, 体现出方法的科学性和严谨性。本试验针对此修订对菌液加入时间点进行了考察, 结果是将白色念珠菌液

加入供试液中进行试验, 试验组回收率为0; 而在对供试液进行薄膜过滤冲洗后, 再加入菌液, 试验组回收比值可达0.8。上述试验结果提示, 对于抑菌性较强的供试品, 可能仍需在采用适宜方法消除供试品部分抑菌性后, 方可加入试验菌液。

#### 参考文献:

- [1] 王泽民. 当代结构药物全集[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1993: 463.
- [2] 胡汉昆, 颜锵, 刘萍. 抗真菌新药: 硝酸布康唑[J]. 医药导报, 2010, 29: 893-895.
- [3] 吴代香, 王美莲. 硝酸布康唑阴道乳膏治疗念珠性阴道病的疗效观察[J]. 江苏医药, 2011, 37: 1209-1210.
- [4] 钟慧萍, 刘华, 刘淳. 外阴阴道念珠菌病的诊治[J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4: 59-61.
- [5] 程路, 林云飞, 丁黎, 等. 硝酸布康唑栓的人体药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2013, 44: 548-552.
- [6] 国家药典委员会. 《中国药典》2015年版编制大纲[EB/OL]. (2013-07-14) [2015-12-20]. <http://www.chp.org.cn/cms/about/current/program.html>.
- [7] 中国药典: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版, 2015: 140-151.
- [8] 易大为, 陈野, 潘强. 薄膜过滤法在局部给药制剂微生物限度检查中的应用[J]. 中国药事, 2008, 22: 342-345.
- [9] 郭江红, 张春瑛. 咪唑类抗真菌乳膏微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药师, 2007, 10: 602-603.
- [10] 肖建华, 周修森. 酮康唑尿素乳膏微生物限度检查方法的建立[J]. 海峡药学, 2015, 27: 76-77.
- [11] 王玉辉, 韩珍珍. 11种医院制剂微生物限度检查方法验证[J]. 临床医药实践, 2015, 24: 763-765.
- [12] 田洪根, 陈芳. 西他沙星细粒微生物限度检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40: 429-432.
- [13] 彭洁, 林丽英, 梁桂霞, 等. 头孢氨苄等抗生素药品微生物限度检查法的研究[J]. 今日药学, 2009, 19: 11-13.
- [14] 刘鹏, 马仕洪, 戴翠, 等. 加替沙星微生物限度检查方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2007, 27: 881-884.
- [15] 罗恩妮. 浅谈薄膜过滤法在药品微生物限度检查中的重要性及应用[J]. 科技创新导报, 2015, 14: 234.

(收稿日期 2015年12月25日 编辑 邹宇玲)