

姜兴荣,李 冰,孙继超,等. 添加防腐剂的五氯柳胺混悬液抑菌效力的检测与评价[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):143-145.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.036

添加防腐剂的五氯柳胺混悬液抑菌效力的检测与评价

姜兴荣,李 冰,孙继超,王玮玮,张吉丽,张继瑜

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,甘肃兰州 730050)

摘要:为了比较添加防腐剂的五氯柳胺混悬液与未添加此类防腐剂的五氯柳胺混悬液的抑菌效力,探讨其防腐剂添加的合理性及必要性,选取未添加防腐剂和原药、未添加防腐剂、添加防腐剂的制剂,采用《中华人民共和国药典》2015 版四部 1121 抑菌效力检查法,以铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种菌株对其进行抑菌效力测定。结果表明:添加防腐剂的五氯柳胺混悬液均达到《中华人民共和国药典》2015 版抑菌效力标准;不添加防腐剂的未能达到抑菌效力标准。可见五氯柳胺混悬液中防腐剂的添加是合理的,不含防腐剂的五氯柳胺混悬液可能存在潜在的风险。

关键词:五氯柳胺;混悬液;防腐剂;抑菌剂效力;评价

中图分类号:S853.74 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)03-0143-03

在国外,五氯柳胺是水杨苯胺类抗寄生虫类药物,对吸虫病具有优良的疗效,主要用于治疗牛羊肝片吸虫病,同时对绦虫和线虫均具有良好的治疗效果。但在国内,五氯柳胺尚无成品制剂上市。本试验对添加防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)的五氯柳胺混悬液的抑菌效力进行了探究。口服制剂在使用过程中容易存在微生物污染问题,《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)允许这类产品添加防腐剂,但是过量的防腐剂存在危害,所以对防腐剂的应用进行评价^[1-3]。本试验针对未添加防腐剂的五氯柳胺(主药)和添加防腐剂的五氯柳胺混悬剂的抑菌效力进行考察,探究其防腐剂添加的合理性。

1 试验样品、仪器及试验设计

收稿日期:2018-11-06

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2015BAD1101);国家现代农业产业技术体系专项(编号:CAR-38)。

作者简介:姜兴荣(1994—),男,山东菏泽人,硕士,研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail:Jiangxingcan0908@163.com。

通信作者:张继瑜,研究员,博士生导师,研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail:infzjy@sina.com。

1.1 供试品

五氯柳胺混悬液(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所自制),考察其抑菌效力情况。

1.2 仪器

隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台、LDZM-60KCS-II 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)、电热恒温鼓风干燥箱、恒温振荡器、优普超纯水制造系统、THOMAS 细胞密度计、比色杯(光径为 10 mm)、KQ3200DE 数控超声波清洗器、BSA423S-CW 天平(sartorius)、烧杯、三角瓶等。

1.3 培养基及试剂

胰酪大豆胨液体培养基(TSB)(产品批号:1073051)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)(产品批号:1073051)、胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)(产品批号:1073191)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(产品批号:1072401)均来自广东环凯微生物科技有限公司;培养基适用性检查结果符合中华人民共和国药典要求;对羟基苯甲酸甲酯(批号:20180118)和对羟基苯甲酸丙酯(批号:20130830)购自国药集团化学试剂有限公司,氯化钠(批号:L218041910)购自四川科伦药业股份有限公司。

参考文献:

- [1]李秀萍,李春远,渠桂荣,等. 五倍子的研究概况[J]. 中医学报,2002,30(3):72-74.
- [2]赵 拉. 五倍子制备没食子酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2008,25(5):5-7.
- [3]林启寿. 中草药化学成分[M]. 北京:科学出版社,1977:168.
- [4]杜瑞莲,杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药,2008,30(6):839-841.
- [5]张雅丽. 五倍子没食子酸的制备,抑菌作用及机理研究[D]. 西安:陕西师范大学,2014.
- [6]张雅丽,李建科,刘 柳,等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食

品工业科技,2013(10):386-390.

- [7]盛达成,陈 凌,王文茂,等. 高效液相色谱法同时分析五倍子提取物中的没食子酸和鞣花酸[J]. 中国农学通报,2013,29(4):148-154.
- [8]李红然,付大友,李艳清,等. 超声微波协同萃取-HPLC 测定五倍子中的没食子酸含量[J]. 化工时刊,2011,25(1):36-38,41.
- [9]金 石,高 梓. 大鼠血浆中儿茶素主要代谢产物没食子酸含量测定[J]. 海峡药学,2011,23(6):41-43.
- [10]程志斌,葛长荣,韩剑众. 中草药有效成分对动物免疫功能的影响及其应用[J]. 动物科学与动物医学,2002,19(1):M1-M3.
- [11]聂秀丽. 发挥我省五倍子资源优势的几个问题[J]. 贵州社会科学,1986(7):41-44.

1.4 菌种

大肠埃希菌(*E. enteritidis*) [CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003]、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] 菌种均来自中国食品药品检定研究院^[1-5]。

1.5 试验设计

参照《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015) 四部附录通则^[2] 1105 中“微生物学计数法”对五氯柳胺混悬液计数方法进行方法适用性试验^[1]。根据试验结果,按照抑菌剂效力检查法(《中华人民共和国药典》2015 年版四部 1121 抑菌剂效力检查法)对样品进行抑菌剂效力测定^[4-11]。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备

参照“《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015) 四部 1121 抑菌剂效力检查法”的方法进行菌液制备^[1]。采用适宜方法制成含菌量约为 10⁷~10⁸ CFU/mL 的菌悬液,备用^[9-19]。

2.2 计数方法的适用性

2.2.1 平皿法 取供试液,加入小于供试液体积 1% 的菌悬液,使每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 CFU,混匀后取 1 mL 置直径 90 mm 的无菌平皿中,用于细菌培养的平皿注入 20 mL 温度不超过 45 ℃ 的胰酪胨大豆琼脂培养基,用于真菌培养的平皿注入 20 mL 温度不超过 45 ℃ 的沙氏葡萄糖琼脂培养基,按规定条件培养,计数^[1,20-22]。

2.2.2 计数方法 回收率计算公式为:回收率=(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,5 种试验菌回收率均高于 90%,结果(表 1)表明该方法可用于该供试品试验。

表 1 计数方法适应性试验结果

菌种	平均菌落数				
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	黑曲霉	白色念珠菌
试验组	83	85	80	71	82
对照组	0	0	0	0	0
菌液组	89	88	85	76	89
回收率(%)	93.2	96.5	94.1	93.4	92.1

2.3 抑菌效力测定

取供试品转移至带塞塑料管中,每管 50 mL,混匀,作为供试品溶液备用。同法制备 5 份。分别取菌液制备中的菌悬液(或孢子悬液)0.5 mL 接种于上述供试品溶液中,每个容器接种 1 种试验菌,混合,使供试品溶液中的试验菌均匀分布^[1]。在试验期间,接种的供试品溶液置 25 ℃ 培养箱中避光贮存。根据《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 1121 “抑菌剂效力检查法”抑菌剂效力,按口服制剂规定的间隔时间,分别从每个接种过的供试品容器中取供试品 1 mL,用 0.9% 氯化钠进行 10 倍倍比稀释,对各稀释级按相应的微生物计数方法进行操作。根据各间隔时间的菌数 lg 值相对于初始菌数 lg 值减少程度进行评价^[23-27]。

2.4 抑菌效力评价标准

五氯柳胺混悬液抑菌效力评价标准按照《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015) 四部通则 1121 “抑菌剂效力检查法”中口服制剂的抑菌剂效力判断标准^[1]。该判断标准分为 A、B 2 个标准,“A”是指应达到的抑菌剂效力标准,特殊情况下,如抑菌剂可能增加不良反应的风险,则至少应达到“B”的抑菌剂效力标准,满足《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015) 四部通则中抑菌剂效力检查法对口服制剂和直肠给药制剂抑菌剂效力的规定,与接菌量比较,14 d 细菌数下降均不小于 3lg 值,真菌数下降均不小于 1lg 值,28 d 细菌和真菌数对前一个测定时间增加的数量不超过 0.5 lg 值^[1,25-30]。

2.5 未添加防腐剂和原药、添加防腐剂的制剂及主药(未添加防腐剂)的抑菌剂效力结果

未添加防腐剂和原药的五氯柳胺混悬液抑菌剂效力结果见表 2。添加防腐剂五氯柳胺混悬液制剂抑菌剂效力结果见表 3。主药(未添加防腐剂五氯柳胺混悬液)抑菌剂效力结果见表 4。

表 2 未添加防腐剂和原药的五氯柳胺混悬液抑菌剂效力试验结果

检查菌种	接菌时		14 d		lg 值降	28 d 菌落数 lg 值
	菌落数	lg 值	菌落数	lg 值		
大肠埃希菌	2 000 000	6.3	10 000	4.0	2.3	NI
金黄色葡萄球菌	1 800 000	6.2	11 000	4.0	2.2	NI
铜绿假单胞菌	4 100 000	6.6	16 000	4.2	2.4	NI
白色念珠菌	370 000	5.5	90 000	4.9	0.6	NI
黑曲霉	110 000	5.5	87 000	4.9	0.6	NI

注:NR:试验菌未恢复生长;NI:未增加,是指相对前一个测定时间,试验菌增加的数量不超过 0.5lg^[1]。表 3、表 4 同。

表 3 添加防腐剂的制剂的五氯柳胺混悬液抑菌剂效力试验结果

检查菌种	接菌时		14 d		lg 值降	28 d 菌落数 lg 值
	菌落数	lg 值	菌落数	lg 值		
大肠埃希菌	2 000 000	6.3	<10	<1	>5	NR
金黄色葡萄球菌	1 800 000	6.2	<10	<1	>5	NR
铜绿假单胞菌	4 100 000	6.6	<10	<1	>5	NR
白色念珠菌	370 000	5.5	<10	<1	>4	NR
黑曲霉	110 000	5.5	<10	<1	>4	NR

表 4 主药抑菌剂效力试验结果

检查菌种	接菌时		14 d		lg 值降	28 d 菌落数 lg 值
	菌落数	lg 值	菌落数	lg 值		
大肠埃希菌	2 000 000	6.3	3 200	3.5	2.8	NR
金黄色葡萄球菌	1 800 000	6.2	1 800	3.2	3.0	NR
铜绿假单胞菌	4 100 000	6.6	5 500	3.7	2.9	NR
白色念珠菌	370 000	5.5	40 000	4.6	0.9	NR
黑曲霉	110 000	5.5	52 000	4.7	0.8	NR

3 讨论

3.1 处方分析

主药五氯柳胺对革兰氏阳性菌特别是金黄色葡萄球菌有较强的抑菌作用,对部分革兰氏阴性菌也有一定的抑制作用,对霉菌的抑菌作用较弱。防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及霉菌都

有一定的抑制作用。五氯柳胺与防腐剂配合使用后,具有较为理想的广谱抗菌作用^[12]。

3.2 抑菌效力结果分析

表 2 表明未添加防腐剂和原药的五氯柳胺混悬液在进行抑菌效力测试中,细菌中的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 14 d 菌数下降大于 2.0lg,但是均达不到《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的要求;真菌中黑曲霉 14 d 菌数下降大于 0.5lg 且小于 1.0lg,可知其不符合《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的抑菌效力标准。表 3 表明添加防腐剂的五氯柳胺混悬液制剂在进行抑菌效力测试中,细菌和真菌 14d 菌数下降大于 3.0lg,28 d 未恢复生长,从测试结果得出其符合《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的抑菌效力标准。表 4 数据显示,主药进行抑菌效力测试中,细菌:14d 菌数下降只有金黄色葡萄球菌大于 3.0lg,且 28 d 时未恢复生长;大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 14 d 菌数下降大于 2.0lg,小于 3.0lg,虽然 28 d 时未恢复生长,但未能达到《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的 14 d 抑菌效力标准。真菌:白色念珠菌和黑曲霉 14 d 下降均小于 1.0lg,未能达到《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的抑菌效力标准^[1]。

3.3 添加防腐剂的必要性

防腐剂可以用于抑制微生物的生长繁殖,防止微生物污染而影响产品质量。若药品制剂不具有足够的抑菌作用,为了防止药品制剂在使用中发生微生物污染,产生危害,在药品制剂中应加入合适的防腐剂,特别是口服液这样的药品制剂^[12,31]。《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)中抑菌效力检查法项下规定,用于存活菌数测定的方法,其方法适应性验证试验菌的回收率不得低于 70%。本次测试中不添加防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)的五氯柳胺混悬液未能达到《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)的抑菌效力标准。抑菌效力检查结果证明,在五氯柳胺混悬液处方中加入防腐剂可达到《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)抑菌效力要求^[1]。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社,2015.

[2] 毛腾霄,程 龙,张聪聪,等. 萘敏维滴眼液抑菌效力评价及抑菌剂最适浓度考察[J]. 药物分析杂志,2018(2):319-325.

[3] 杨玲玲,张明君,李海芳. 色甘酸钠滴眼液中苯扎溴铵抑菌剂筛选研究[J]. 中国抗生素杂志,2018(3):319-323.

[4] 刘 钊,吴静萍,陈 茜,等. 国产加替沙星滴眼液的质量评价[J]. 中国抗生素杂志,2018(3):313-318.

[5] 田 洁,赵丽元,吴世杰,等. 他克莫司滴眼液的抑菌效力测定研究[J]. 中国药师,2018(4):736-739.

[6] 王银环,张文婷,王征南,等. 健儿消食口服液中抑菌剂及抑菌效力研究[J]. 中国现代应用药学,2016,33(5):637-642.

[7] 刘 艳,王志宏,曲金瑶,等. 乙酰半胱氨酸口服溶液抑菌剂抑菌效力研究[J]. 药学研究,2015(3):152-155.

[8] 夏哲林,周 彬. 布洛芬混悬滴剂抑菌剂剂量筛选与抑菌效力研究[J]. 中国生化药物杂志,2016,36(3):154-156.

[9] 刘广楨,沈 振,任丽宏,等. 苯酚滴耳液抑菌效力测定和评价[J]. 中国现代应用药学,2016,33(5):645-648.

[10] 林 琳. 复方醋酸地塞米松乳膏抑菌剂含量测定及其抑菌效力评价[J]. 中国生化药物杂志,2016,36(4):186-188.

[11] 贺聪莹,王卫卫,杨晓莉,等. 复方角菜酸酯乳膏中抑菌剂效力测试[J]. 药物分析杂志,2015(5):934-937.

[12] 贺聪莹. 药品制剂中抑菌剂(防腐剂)效力测定及标准研究[D]. 西北大学,2015.

[13] 郑 笠. 甘安合剂与复方甘草口服溶液抑菌效力检测分析[J]. 福建医药杂志,2016,38(3):57-59.

[14] 丁 勃,徐晓洁,谢元超. 氢溴酸加兰他敏口服液添加抑菌剂筛选与抑菌效力研究[J]. 药物分析杂志,2011(12):2312-2317.

[15] 吴燕燕. 添加羟苯乙酯的加替沙星滴眼液抑菌效力的检测与评价[J]. 海峡药学,2018(4):87-90.

[16] 毛腾霄,程 龙,张聪聪,等. 萘敏维滴眼液抑菌效力评价及抑菌剂最适浓度考察[J]. 药物分析杂志,2018(2):319-325.

[17] 甘永琦,农 浚,朱 荣,等. 复方桔梗麻黄碱糖浆(Ⅱ)的微生物污染状况分析及抑菌剂效力考察[J]. 中国药学杂志,2018(11):925-930.

[18] 刘晓玲,吴燕燕. 添加季铵盐类防腐剂的加替沙星滴眼液抑菌效力的检测与评价[J]. 海峡药学,2017(2):66-70.

[19] 刘广楨,王国金,李显刚,等. 10%水合氯醛溶液抑菌效力测定和评价[J]. 中国药师,2017,20(2):372-374.

[20] 刘 峰,孟蕾蕾,王国平,等. 氟康唑滴眼液抑菌剂浓度筛选和抑菌效力研究[J]. 中国药师,2017,20(2):362-364.

[21] 赵敬丹,秦 峰,杨 燕,等. 滴眼液中抑菌剂的快速高通量测定及抑菌效力的研究初探[J]. 中国药学杂志,2017,52(4):308-313.

[22] 孟蕾蕾,刘 峰,王国平. 维生素 B₁₂滴眼液尼泊金乙酯的抑菌效力研究[J]. 药学研究,2017,36(3):149-152.

[23] 沈秋莲,杨育儒,王庆芬,等. 枸橼酸钾溶液中抑菌剂的抑菌效果观察[J]. 安徽医药,2017,21(4):623-626.

[24] 刘广楨,凌 霄,国 明,等. 复方盐酸普鲁卡因溶液 I 抑菌剂处方研究[J]. 中国抗生素杂志,2017,42(9):798-801.

[25] 杨晓莉,贺聪莹,绳金房,等. 中国药典 2015 年版抑菌效力检查法解读[J]. 中国药师,2016,19(9):1740-1742.

[26] 孟蕾蕾. 拉坦前列素滴眼液抑菌剂抑菌效力研究[J]. 中国现代应用药学,2017,34(5):715-718.

[27] 李东娟,杜春华,徐 怡,等. 白及糖浆的抑菌效力测定[J]. 云南中医中药杂志,2017,38(10):77-78.

[28] 高 磊,逢焕欢,毛 新,等. 国产盐酸洛美沙星滴眼剂抑菌效力考察[J]. 中国药师,2017(11):2093-2095.

[29] 肖 璜,林吉恒,陈万胜,等. 四国药典中抑菌剂效力检查法的比较[J]. 中国药品标准,2014,15(1):10-12.

[30] 刘广楨,张媛媛,冷佳蔚,等. 四磨汤合剂中抑菌剂的抑菌效力评价[J]. 中国现代应用药学,2017,34(2):232-234.

[31] Li N, Liu L, Jiang Y, et al. Evaluation of sustained-release bacteriostatic effect of compound ornidazole and pefloxacinmesylate sustained-release gum suppository[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae,2007,29(3):261-263.