

引用本文:李敏,龚亚,曹健,等.磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂微生物限度检查方法的建立[J].安徽医药,2021,25(8):1497-1500.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.004.



◇ 药物分析 ◇

## 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂微生物限度检查方法的建立

李敏,龚亚,曹健,邢茂

作者单位:陆军军医大学第二附属医院药剂科,重庆 400037

通信作者:邢茂,男,副主任药师,研究方向为药物制剂,Email:Xingmao1997@sina.com

基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ06-2)

**摘要:** **目的** 建立磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的微生物限度检查方法。**方法** 按《中国药典》(2015年版)四部规定,采用平皿法、培养基稀释法进行磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的微生物计数方法适用性试验,并采用直接接种法、培养基稀释法和中和法进行控制菌检查方法适用性试验。**结果** 所建立的检查方法对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉5种验证菌株的回收率均在0.50~2.00,控制菌(大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌)可检出,结果符合中国药典规定。**结论** 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的微生物限度检查中需氧菌采用培养基稀释法(0.2 mL/皿),霉菌及酵母菌采用平皿法(1 mL/皿),控制菌检查采用中和法(0.5%对氨基苯甲酸)进行检查。方法简便可行,结果准确可靠。

**关键词:** 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂; 微生物限度检查; 培养基稀释法; 中和法

## Establishment of microbial limit test method for sulfadiazine fish oil nasal drops

LI Min, GONG Ya, CAO Jian, XING Mao

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of the Army Medical University, Chongqing 400037, China

**Abstract:** **Objective** To establish microbial limit test method for sulfadiazine fish oil nasal drops. **Methods** According to the requirements in *Chinese Pharmacopoeia* (vol. IV, 2015 edition), the plate method and the dilution method were used for the applicability test of the microbial count for sulfadiazine fish oil nasal drops, and the direct inoculation method, the medium dilution method and the neutralization method were used for the applicability test of control bacteria. **Results** The method established had a recovery rate of 0.50-2.00 for five test bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, control bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) could be detected, which were consistent with the *Chinese pharmacopoeia*. **Conclusion** In the microbial limit test of sulfadiazine fish oil nasal drops, aerobic bacteria are examined by medium dilution method (0.2 mL/dish), mold and yeast by plate method (1 mL/dish), and the control bacteria are examined by neutralization method (0.5% p-aminobenzoic acid). The method is simple and feasible, and the result is accurate and reliable.

**Key words:** Sulfadiazine fish oil nasal drops; Microbial limit test; Dilution method; Neutralization method

磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂为陆军军医大学第二附属医院的自制制剂[中国人民解放军中央军委后勤部卫生局非标准制剂,批准文号:总制字(2018)F705015],其主要成分为磺胺嘧啶、鱼肝油,用于治疗鼻黏膜糜烂性溃疡,鼻中隔手术后促进肉芽生长,加速伤口愈合,并有润滑鼻黏膜的作用。根据《中国药典》(2015年版)规定,对含抑菌成分的制剂进行微生物限度检查时,应先消除供试品相应成分的抑菌活性,再依法进行检查,以保证方法的适用性<sup>[1]</sup>。该制剂因含有磺胺类抑菌成分,无法通过简单一种方法进行试验,因此需要采用多种方法进行研究及比较,并选取最优且符合中国药典标准的方法进行其微生物限度检查。本研究拟通过采用平

皿法、培养基稀释法和中和法<sup>[2-3]</sup>,降低或消除其抑菌作用,建立磺胺类药物科学的微生物限度检查方法。也为其他有类似抑菌性的药品建立微生物限度方法学验证提供相应的借鉴。

### 1 仪器与试药

**1.1 仪器** BP-II型架盘天平(上海医用激光仪器厂);LRH-70型生化培养箱(上海一恒科技有限公司);MOST-T24-B型台式灭菌器(山东新华有限公司);CS101-2ABN型电热鼓风干燥箱(重庆永生有限公司);BSC-1000-II-A2型生物安全柜(苏州华宇有限公司)。

**1.2 供试品** 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂(批次190422, 190730, 191223),为陆军军医大学第二附

属医院自制。

**1.3 菌株** 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]由中国食品药品检定研究院菌种保藏中心提供,均为1代冷冻保存菌株;黑曲霉[CMCC(F)98003]由北京三药科技提供,为4代冷冻保存菌株。

**1.4 培养基、试剂及稀释液** 胰酪大豆胨琼脂培养基(批次180427)、胰酪大豆胨液体培养基(批次171218)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批次170316)、沙氏葡萄糖液体培养基(批次161118)、麦康凯液体培养基(批次170313)、麦康凯琼脂培养基(批次171211)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批次181227)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批次180326)均购自北京陆桥有限公司,经过适应性试验验证符合《中国药典》2015年版四部规定;聚山梨酯-80(成都市科隆化学品有限公司,批次2017091901)、对氨基苯甲酸(上海化学试剂总厂,批次82-12-01);稀释液为0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批次M18050704)。

## 2 方法与结果

**2.1 供试液的制备** 取磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂10 mL,加入10 mL聚山梨酯-80,用稀释液逐级稀释制成1:10、1:100供试液。

**2.2 菌液的制备** 按照《中国药典》2015年版四部通则1105和1106中规定的菌液制备方法,制成适宜浓度的各菌悬液。

**2.3 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法的适**

**用性试验** 取上述磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂供试液9.9 mL于灭菌试管中,加入金黄色葡萄球菌菌悬液0.1 mL,使供试液中含试验菌不大于100 cfu/mL,同法制备含铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉不大于100 cfu/mL的供试液。平皿法:分别取各供试液1 mL,置无菌平皿中,每皿1 mL;培养基稀释法:分别取供试液1 mL,置2个或5个无菌平皿中,使每皿0.5 mL或0.2 mL。注入15~20 mL温度不超过45℃熔化的琼脂培养基,混匀,凝固。胰酪大豆胨琼脂培养基于32.5℃培养2 d,作需氧菌计;沙氏葡萄糖琼脂培养基于22.5℃下培养3 d,作霉菌和酵母菌计,作为试验组。供试品对照组以稀释液代替菌液,菌液对照组以稀释液代替供试液,乳化剂对照组以聚山梨酯-80代替供试品,其余均同试验组操作。每株试验菌平行制备两组。该操作在C级背景下的A级单向流空气区域内进行。

磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的三个不同批次进行试验,计算回收率:试验组的回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组平均菌落数;乳化剂对照组的回收率=乳化剂对照组平均菌落数/菌液对照组平均菌落数。从表1可以看出,平皿法(1毫升/皿)适用于磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的霉菌和酵母菌计数检查,但无法消除其需氧菌计数检查中枯草芽孢杆菌的检查;培养基稀释法(0.2毫升/皿)适用于磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的需氧菌计数检查。10%的聚山梨酯-80不会干扰上述各菌株的生长。

**2.4 控制菌检查方法的适用性试验** 取1:10磺胺

表1 需氧菌、霉菌和酵母菌各试验菌株的回收率( $n=2$ )

| 组别     | 检查方法   | 稀释级 | 需氧菌总数   |        |        |       |      | 霉菌和酵母菌总数 |      |
|--------|--------|-----|---------|--------|--------|-------|------|----------|------|
|        |        |     | 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  | 白色念珠菌    | 黑曲霉  |
| 乳化剂对照组 | —      | I   | 0.75    | 0.82   | 0.73   | 0.87  | 0.95 | 0.90     | 1.14 |
| 试验组    | 平皿法    | I   | 0       | 0.63   | 0      | 0     | 0.97 | 0.87     | 1.07 |
|        |        |     | 0       | 0.58   | 0      | 0     | 0.89 | 0.95     | 0.88 |
|        |        |     | 0       | 0.57   | 0      | 0     | 0.92 | 1.10     | 0.88 |
|        |        |     | 0.73    | 1.11   | 0.37   | 0.87  | 0.80 | —        | —    |
|        | 培养基稀释法 | II  | 0.79    | 0.94   | 0.26   | 1.07  | 1.15 | —        | —    |
|        |        |     | 0.75    | 1.17   | 0.19   | 0.85  | 1.11 | —        | —    |
|        |        |     | 0.85    | 0.85   | 0.44   | 0.73  | 0.96 | —        | —    |
|        |        |     | 0.76    | 1.17   | 0.37   | 1.13  | 1.07 | —        | —    |
|        |        | II  | 0.87    | 0.96   | 0.29   | 0.84  | 1.15 | —        | —    |
|        |        |     | 0.88    | 1.12   | 0.88   | 0.85  | 0.86 | —        | —    |
|        |        |     | 1.12    | 0.86   | 0.76   | 1.16  | 1.06 | —        | —    |
|        |        |     | 0.97    | 0.93   | 0.94   | 0.79  | 1.14 | —        | —    |

注: I 为 1:10, II 为 1:100; “—” 为无需试验;试验组数据为三批样品数据。

嘧啶鱼肝油滴鼻剂供试液 10 mL, 及不大于 100 cfu/mL 的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌悬液 1 mL, 分别加至适宜体积、含适宜浓度对氨基苯甲酸的胰酪大豆胨液体培养基中, 照《中国药典》2015 年版四部(通则)1106 项下控制菌检查方法进行检查, 作为试验组。供试品对照组以稀释液代替菌液, 阴性对照组以稀释液代替供试液和菌液, 阳性对照组以稀释液代替供试液, 乳化剂对照组以聚山梨酯-80 代替供试品, 其余均同试验组操作; 中和剂对照组以含适宜浓度对氨基苯甲酸的胰酪大豆胨液体培养基代替胰酪大豆胨液体培养基, 其余同阳性对照组操作。该操作在 C 级背景下的 A 级单向流空气区域内进行。

如表 2 所示, 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的控制菌检查中铜绿假单胞菌采用直接接种法、培养基稀释法(200 mL)、中和法(0.5% 对氨基苯甲酸, 下同)可检出, 大肠埃希菌采用培养基稀释法(400 mL)、中和法可检出, 金黄色葡萄球菌采用中和法可检出。综合上述结果, 控制菌检查采用中和法适用于磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的控制菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检查, 且乳化剂及中和剂对 3 种菌种均无毒性。

### 3 讨论

《中国药典》2015 年版规定<sup>[1]</sup>, 微生物限度检查应在不低于 D 级背景下的 B 级单向流空气区域内进行, 本试验在 C 级背景下的 A 级单向流空气区域内操作; 鼻用制剂可接受的最大需氧菌总数为 200 cfu/mL, 最大霉菌和酵母菌总数为 20 cfu/mL, 即需氧菌、霉菌和酵母菌计数检查时供试品稀释级分别高于 1:200、1:20 时无意义。本品为磺胺类药物, 抗菌谱广, 对大多数细菌如金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、大肠杆菌、芽孢杆菌等有良好的抗菌活性<sup>[4]</sup>, 试验中通过稀释供试品的方法无法消除其抑菌活性。当供试品因其抑菌活性无法选择最低稀释级的供试液进行方法适用性试验时, 应采用适宜的方法对

供试液进一步处理<sup>[5-6]</sup>。如果供试品对微生物的抑制作用无法以其他方法消除, 供试液可经过中和、稀释或薄膜过滤处理后再加入试验菌悬液进行方法适用性试验<sup>[7-8]</sup>。前期试验证明, 薄膜过滤法对于混悬剂适用性差, 易造成薄膜堵塞。

本试验采用平皿法无法消除该药对需氧菌中枯草芽孢杆菌的抑菌作用, 采用培养基稀释法可消除其抑菌活性, 各菌株的回收率均符合规定。本品对真菌的抗菌活性较弱<sup>[4]</sup>, 结果证明, 采用平皿法试验, 白色念珠菌和黑曲霉的回收率范围在 0.5~2.0, 即进行霉菌和酵母菌计数检查时可采用平皿法进行适用性试验。本品对铜绿假单胞菌的抑制作用相对较弱<sup>[9]</sup>, 故控制菌检查采用直接接种法即可进行铜绿假单胞菌的适用性检查, 但不适用于大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的检查。根据中国细菌耐药监测网数据, 磺胺类药物对大肠埃希菌耐药率高于 50%, 而对金黄色葡萄球菌(包括甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌)耐药率低于 20%, 因此通过培养基稀释法, 培养基体积增大到 400 mL 时可消除其对大肠埃希菌的抑制作用, 但即使体积增加至 1 000 mL 时, 也无法消除其对金黄色葡萄球菌的抑制作用。磺胺类药物主要通过与其对氨基苯甲酸竞争性结合二氢蝶酸合成酶, 阻断细菌叶酸的合成而干扰细菌生长繁殖, 这种抑菌作用可被对氨基苯甲酸逆转, 且这种逆转作用呈现浓度依赖性。本研究对中和剂对氨基苯甲酸的浓度进行了筛选, 将供试品接种至含 0.5% 对氨基苯甲酸的胰酪大豆胨液体培养基 100 mL, 可消除本品对控制菌金黄色葡萄球菌的抑制作用。经验证, 此法同样适用于控制菌大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的适用性检查。

因此, 微生物计数检查中需氧菌计数采用培养基稀释法, 霉菌及酵母菌采用平皿法; 控制菌检查采用中和法, 适用于磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂微生物限度检查。本试验所建立的方法简单可行, 结果准确有效, 为其他磺胺类药物微生物限度检查方法的

表 2 控制菌检查的适用性试验结果

| 检查方法   | 对氨基苯甲酸<br>浓度/% | 培养基稀释<br>体积/mL | 大肠埃希菌 | 金黄色葡萄球菌 | 铜绿假单胞菌 |
|--------|----------------|----------------|-------|---------|--------|
| 直接接种法  | 0              | 100            | -     | -       | +      |
| 培养基稀释法 | 0              | 200            | -     | -       | +      |
|        | 0              | 400            | +     | -       | +      |
|        | 0              | 1000           | +     | -       | +      |
|        | 0.2            | 100            | +     | -       | +      |
| 中和法    | 0.5            | 100            | +     | +       | +      |
|        | 0.8            | 100            | +     | +       | +      |

注: (1)“+”有菌生长,“-”无菌生长; (2)表中数据均表示三批样品试验组结果; (3)供试品对照组、阴性对照组均无菌生长; (4)阳性对照组、中和剂对照组、乳化剂对照组三种菌种均生长。

建立提供参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005版 四部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:140-151.
- [2] 凌真, 丁莉, 李倚云, 等. 复方磺胺甲噁唑片微生物限度检查方法验证[J]. 海峡药学, 2010, 22(1):51-53.
- [3] 徐吉文, 马春梅. 复方磺胺甲噁唑片微生物限度检查法的验证试验[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(4):94-95.
- [4] 萧莉, 吴玉娥. 复方磺胺类药物微生物限度检查方法的探索[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(3):347-349.
- [5] 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.

- [6] 田冬梅, 史春辉, 姜志红, 等. 药品微生物计数方法及方法适用性探讨[J]. 中国药物评价, 2017, 34(2):97-99, 103.
- [7] 董勇. 薄膜过滤法在药品检验中的应用研究[J]. 临床合理用药, 2018, 11(6A):105-108.
- [8] 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):5-7.
- [9] 巴特利特, 奥威特. ABX指南:感染性疾病的诊断与治疗[M]. 上海:上海科技文献出版社, 2012.

(收稿日期:2020-05-14, 修回日期:2020-06-27)

引用本文:史恒峰,王栋,陈志萍. 新型冠状病毒肺炎的CT表现与临床特征之间的时间顺序关系[J]. 安徽医药, 2021, 25(8):1500-1504. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.005.

◇临床医学◇



## 新型冠状病毒肺炎的CT表现与临床特征之间的时间顺序关系

史恒峰, 王栋, 陈志萍

作者单位:安庆市立医院CT室, 安徽 安庆 246004

基金项目:安庆市新型冠状病毒感染疫情应急科技计划项目(2020Z1003)

**摘要:** **目的** 探讨新型冠状病毒肺炎(NCP)的CT表现与临床特征之间的时间顺序关系。**方法** 收集2020年1-2月安庆市立医院确诊为NCP的病人81例临床资料,包括病人一般情况、病人来源、发病日期及症状、全身症状缓解日期、体温异常及恢复正常日期、核酸检测日期及结果、首次CT检查日期及结果;由2名放射科主治医师评估峰值CT图像和出院前末次CT图像并评分且记录检查时间。将相关数据按照时间节点及病人数归纳出关系图,影像学评分表及潜伏期/滞后期统计表。**结果** 81例病人中自疫源地返回的一代病人占55.6%。临床潜伏期范围在0~26 d不等。97.3%的病人影像学-临床潜伏期、77.3%的影像学-体温滞后期、78.4%的临床-影像学恢复期、84.6%的核酸转阳-影像学潜伏期和94.8%的核酸转阴-影像学滞后期均为 $\geq 0$ ,可归纳总结为NCP病程中各节点时间顺序流程图。73.3%的峰值CT图像及88%的出院前CT图像均评分为轻度或中度。**结论** NCP流行性可控、大部分病人病情程度不重但病程较长,其发展趋势总体符合病程中各节点时间顺序流程图,临床医生有效利用这种时间顺序特征将对NCP病人的筛查和治疗有所裨益。

**关键词:** 新型冠状病毒肺炎(COVID-19); 时间顺序; 体层摄影术; X线计算机

### Chronological relationship between of CT manifestations and clinical features of novel coronavirus pneumonia

SHI Hengfeng, WANG Dong, CHEN Zhiping

Author Affiliation: CT Room, Anqing Municipal Hospital, Anqing, Anhui 246004, China

**Abstract:** **Objective** To discuss the time sequence relationship between CT findings and clinical features of novel coronavirus pneumonia (NCP). **Methods** Eighty-one patients diagnosed with NCP in Anqing Municipal Hospital from January to February 2020 were selected as the study objects, and their clinical data were retrospectively collected, including patient general condition, patient source, date of onset and symptoms, date of systemic symptom relief, abnormal body temperature and recovery date, nucleic acid detection date and results, and the date and results of the first CT examination. The two attending radiologists were asked to evaluate the peak CT images and the last CT images before hospital discharge and to score and record the examination time. The above data were summarized into a relational graph, imaging rating scale and statistical table of latency/lag period according to the time node and the number of patients. **Results** 55.6% of the 81 patients returned from the epidemic focus have been regarded as the first-generation patient. The clinical Latent period (CLP) ranges from 0-26 days. In 97.3% of the patients, the Radiographic Latent Period1 (RLP1),