

应注意透析过程中高血钾所致的心律失常，因此维持血液透析患者电解质平衡具有重要意义。

综上所述，心血管事件是维持性血液透析中常见的并发症，其发生的独立危险因素主要包括合并高血压、透析前血钾水平、透析前血镁水平、透析月龄和透析超滤率，透析医师应制定针对性、个体化的防控方案，以降低透析相关心血管事件的发生。

[参考文献]

(1) 张艾佳, 张睿. 单中心维持性血液透析患者的流行病学特征 (J). 中国老年学杂志, 2019, 39(18): 4514-4516.

(2) 许秀华, 李彩凤, 梁萌, 等. 107 例维持性血液透析患者死亡原因分析 (J). 东南国防医药, 2017, 19(1): 16-19.

(3) 邹杨, 洪大情, 蒲蕾, 等. 四川省血液透析死亡患者的流行病学调查 (2011 年~2016 年) (J). 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(3): 225-228.

(4) 蒋佳伟, 樊伟, 储虹, 等. 维持性血液透析患者发生心脑血管事件的危险因素分析 (J). 中华全科医师杂志, 2020, 19(9): 829-834.

(5) 中华医学会. 临床诊疗指南肾脏病学分册 (M). 北京: 人民卫生出版社, 2011: 242-260.

(6) 郭磊, 杨曼. 血液灌流在维持性血液透析患者中的应用效果 (J). 河南医学研究, 2020, 29(33): 6197-6198.

(7) 梅游英, 余晓玲, 孔曼丽, 等. 预测维持性血液透析患者心血管事件发生风险列线图模型的建立 (J). 中国血液净化,

2020, 19(2): 108-112.

(8) 冯艳翠, 谭晓军, 黄纪文. 维持性血液透析患者血清 hs-CRP、cTnT 水平与心血管事件发生的相关性研究 (J). 泰山医学院学报, 2018, 39(6): 628-630.

(9) 高振宇, 马艳, 祝文静. 血清 sST2、TN-C 水平与维持性血液透析患者心血管事件发生的关系 (J). 山东医药, 2020, 60(31): 49-52.

(10) 李迎婕, 魏晓岩, 贾军利, 等. 维持性血液透析终末期肾性高血压病患者血清 NT-proBNP、BPV 与心血管事件的相关性分析 (J). 疑难病杂志, 2019, 18(4): 364-368.

(11) 高翔, 苏华俊, 邓流飞, 等. 血压变异性、氨基末端脑利钠肽前体与维持性血液透析患者心血管事件的相关性分析 (J). 临床肾脏病杂志, 2019, 19(1): 49-53.

(12) 刘芳婕, 徐天华, 姚丽. 维持性血液透析患者中血清同型半胱氨酸与心血管疾病相关性研究 (J). 中国实用内科杂志, 2018, 38(6): 559-561.

(13) 袁静, 王聪, 李恒, 等. 维持性血液透析患者超滤率与心血管事件死亡的相关性 (J). 中华肾脏病杂志, 2018, 34(10): 727-731.

(14) 刘洪梅, 尤永森, 张舟, 等. 不同钾离子浓度透析液对维持性血液透析患者透析前后血钾状态及心律失常的影响分析 (J). 中医临床研究, 2018, 10(21): 36-38.

(15) 廖娟, 任亢宗, 张频, 等. 急性 ST 段抬高型心肌梗死病人血清电解质水平与 GRACE 评分、室性心律失常的关系 (J). 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(1): 164-167.

[文章编号] 1007-0893(2022)03-0015-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.03.005

复方蛇蚁喷雾剂微生物限度检查方法的建立

侯伟元 叶炳皇

(中山市黄圃人民医院, 广东 中山 528429)

[摘要] 目的: 建立复方蛇蚁喷雾剂的微生物限度检查方法。方法: 选用中山市黄圃人民医院制剂中心自 2017 年 11 月至 2017 年 12 月间配制的复方蛇蚁喷雾剂, 以试验菌的回收比为指标, 采用平皿法、薄膜过滤法考察需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的计数方法; 以供试品中的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的有效检出为指标, 采用平皿法、薄膜过滤法考察控制菌检查法。结果: 需氧菌总数计数方法采用薄膜过滤法、霉菌和酵母菌总数计数方法采用平皿法时, 各试验组菌落数与菌液对照菌落数的比值均在 0.5~2.0。控制菌检查法采用薄膜过滤法时, 能检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。结论: 本研究建立的方法适用于复方蛇蚁喷雾剂的微生物限度检查。

[关键词] 复方蛇蚁喷雾剂; 微生物限度; 薄膜过滤法; 平皿法

[中图分类号] R 284.1; R 283 [文献标识码] A

[收稿日期] 2021-11-04

[基金项目] 中山市医学科研项目 (2019A020503)

[作者简介] 侯伟元, 男, 主管药师, 主要研究方向是医疗机构制剂质量控制及研发。

Establishment of Microbial Limit Test Methods for Compound Snake-ant Spray

HOU Wei-yuan, YE Bing-huang

(Huangpu People's Hospital of Zhongshan, Guangdong Zhongshan 528429)

(Abstract) **Objective** To establish a microbial limit test method for Compound snake-ant spray. **Methods** The compound the compound snake-ant spray by Huangpu People's Hospital of Zhongshan from November 2017 to December 2017 was selected. The recovery ratio of the test bacteria was as an index. The total number of aerobic bacteria, fungus and yeast were counted by plate method and membrane filtration method. The effective detection of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa in the tested samples was taken as the index, and the control bacteria were examined by plate method and membrane filtration method. **Results** When the count method of aerobic bacteria was membrane filtration method and the count method of fungus and yeast was plate method, the ratio of colony number of experimental groups to that of liquid control group was between 0.5 and 2.0. Control bacteria inspection method using membrane filtration method, can detect staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa. **Conclusion** The method established in this study is suitable for the microbial limit test of compound snake-ant spray.

(Keywords) Compound snake-ant spray; Microbial limit test; Membrane filtration method; Plate method

复方蛇蚁喷雾剂为含醇外用制剂，是中山市黄圃人民医院与广州中医药大学共同开发的医疗机构制剂，主要用于腰痛、颈椎病、肩关节周围炎、关节炎、关节扭伤等。由于组方中的辣椒、赤芍、黄藤、红花有较强的抑菌活性^[1-8]，且本品含乙醇量为45%~65%，上述因素极有可能降低该制剂微生物方法学的精准性^[9]。

另外，自2015年版《中国药典》实施以来，微生物限度方法学验证的相关文献报道普遍存在概念不确切的现象^[10-15]，诸如在微生物计数的验证实验中，采用每皿0.2 mL或0.5 mL的培养基稀释法，与2015年版《中国药典》收录的验证方法平皿计数法“供试品溶液与菌液混合后再注皿”不一致，现今平皿法推崇的是“供试品溶液稀释法”，仅当药品的抑菌性较强时，霉菌计数多采用“供试品溶液稀释法与培养基稀释法相结合的方法”。又如控制菌验证实验中，自2015年版《中国药典》实施以来，药检部门已不接受定义为“常规法”控制菌验证报告，故本研究并未出现“常规法”的说法。为此，结合生产检验实际情况，本研究选用了2015年版《中国药典》规定的平皿法、薄膜过滤法对本品的微生物限度检查方法进行验证，来确定最为可靠、合理的检测方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器与样品

1.1.1 样品 由中山市黄圃人民医院制剂中心于2017年11月至2017年12月配制的批号为20171101、20171201、20171202的复方蛇蚁喷雾剂，目前药物处于研发中试阶段，处方保密。

1.1.2 主要仪器 立式压力蒸汽灭菌器(LDZM-80KCS-II, 上海申安医疗器械厂)、生物安全柜(BHC-1300 II A/B2, 苏净集团安泰公司)、生化培养箱(LRH-150-B, 广东省医疗器械厂)、红外灭菌器(HM-35, 上海沪析实业有限公司)、双人单面净化工作台(SW-CJ-2FD,

苏净集团安泰公司)。

1.1.3 试验用菌株 中国食品药品检定研究院的冻干菌如下：〔CMCC (B) 26003〕金黄色葡萄球菌、〔CMCC (B) 63501〕枯草芽孢杆菌、〔CMCC (B) 10104〕铜绿假单胞菌、白色念珠菌〔CMCC (F) 98001〕、〔CMCC (F) 98003〕黑曲霉。

1.1.4 培养基 批号为160309的溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基、批号为171206的沙氏琼脂培养基(SDA)、批号为170622的沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)、批号为171027的胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)、批号为3105654的甘露醇氯化钠琼脂培养基、批号为3106095的7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液、批号为171214的胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)。以上培养基购置于广东环凯微生物科技有限公司或北京三药科技开发公司，计数培养基适用性检查结果见表1。

表1 计数培养基适用性检查结果

试验菌	菌落计数 /cfu		被检培养基与对照培养基的菌落数比值
	被检培养基	对照培养	
金黄色葡萄球菌	71	76	0.93
铜绿假单胞菌	66	72	0.92
枯草芽孢杆菌	64	70	0.91
白色念珠菌(TSA)	78	85	0.92
黑曲霉(TSA)	67	71	0.94
白色念珠菌(SDA)	84	91	0.92
黑曲霉(SDA)	88	90	0.98

注：TSA—胰酪大豆胨琼脂培养基；SDA—沙氏琼脂培养基。

1.2 材料制备

1.2.1 菌液制备 取枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌，分别接种至TSB中，置30~35℃培养18~24 h；取白色念珠菌接种至SDB中，置20~25℃培养2~3 d；取黑曲霉接种至SDA中，置20~25℃培

养 5 ~ 7 d。细菌制备取新鲜培养物、真菌取孢子菌落加入适量含 0.05 % (mL · mL⁻¹) 聚山梨酯 80 的 0.9 % 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含孢子 10³ ~ 10⁴ cfu 的悬液。其中用于控制菌检查法验证试验的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌进一步制备成每 1 mL 含孢子 10 ~ 100 cfu 的悬液。

1.2.2 供试液的制备 取供试品原液，作为供试品。另取本品适量分别加 TSB 稀释至适量，制成 1:10 的供试液、1:20 的供试液、1:100 的供试液。

1.2.3 薄膜过滤法的检验条件 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为冲洗液，冲洗总量为 200 mL，分 2 次冲洗 (滤膜孔径 < 0.45 μm，直径为 50 mm)。

1.3 需氧菌总数的验证、霉菌和酵母菌总数的验证

1.3.1 试验组 (1) 平皿法：取 1:1、1:20、1:100 的供试液 1 mL、100 mL、100 mL (需氧菌总数的验证)；另取 1:1、1:10 的供试液 1 mL、100 mL (霉菌和酵母菌总数的验证)，分别加入 1.2.1 项下各试验菌悬液适量，混匀，即得。于直径 90 mm 的无菌平皿中加入上述制备号的混合供试液 1 mL，注入适宜温度的琼脂培养基 20 mL，摇匀，静置至凝固，倒置，分别按细菌和霉菌的法定条件培养、计数。(2) 薄膜过滤法：取 1:1 供试液 10 mL，加入每 1 mL 含菌量为 10³ ~ 10⁴ cfu 的各试验菌悬液 0.1 mL，使含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu，摇匀，精密量取混合供试液 1 mL，过滤，以 100 mL 冲洗液冲洗滤膜 1 次后，再以 100 mL 冲洗液冲洗滤膜，取出滤膜，菌面朝上贴于琼脂培养基上，倒置，分别按细菌和霉菌的法定条件培养、计数。

1.3.2 菌液组 方法参考试验组，供试品用 1 mL 稀释液代替。

1.3.3 供试品对照组 方法参考试验组，取制备好的供试液 1 mL，不加菌液，同法操作。

1.4 控制菌检查法验证

1.4.1 试验组 (1) 平皿法：取金黄色葡萄球菌菌液及铜绿假单胞菌菌液各 1 mL，分别加至装有 100 mL 或 200 mL TSB 的两个锥形瓶中，再加入供试品原液 1 mL，摇匀，于 33 ~ 35 °C 生化培养箱中，培养 22 ~ 24 h。取金黄色葡萄球菌培养物划线接种至甘露醇氯化钠琼脂培养基，另取铜绿假单胞菌培养物划线接种至溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上，均在 33 ~ 35 °C 生化培养箱中，培养 22 ~ 24 h，观察结果。(2) 薄膜过滤法：取供试品原液各 1 mL，分别加至装有 100 mL 冲洗液的一次性过滤器中，冲洗滤膜 1 次，单独加入金黄色葡萄球菌菌液及铜绿假单胞菌菌液各 1 mL (不大于 100 cfu · mL⁻¹)，混匀，再以 100 mL 冲洗液冲洗滤膜，滤过至干后，加入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基，于 33 ~ 35 °C 生化培养

箱中，培养 22 ~ 24 h。取金黄色葡萄球菌培养物划线接种至甘露醇氯化钠琼脂培养基，另取铜绿假单胞菌培养物划线接种至溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上，均在 33 ~ 35 °C 生化培养箱中，培养 22 ~ 24 h，观察结果。

1.4.2 供试品对照组 方法参考试验组，取制备好的供试液 1 mL，不加菌液，同法操作。

1.4.3 阴性对照组 方法参考试验组，供试品用 1 mL 稀释液代替。

1.4.3 阳性对照组 取金黄色葡萄球菌试验菌液及铜绿假单胞菌试验菌液各 1 mL (不大于 100 cfu · mL⁻¹)，方法同试验组。

2 结果

取 1:1 的供试液，用薄膜过滤法时，各菌株测得的回收试验比值在 0.5 ~ 2.0 范围内，3 次试验未见差异，故需氧菌总数计数可用薄膜过滤法，见表 2。取 1:1 的供试液，采用平皿法时，各菌株 3 次试验测得的回收试验比值在 50 % ~ 200 %，3 次试验未见差异，因此霉菌、酵母菌计数可用平皿法 (即供试品原液，每皿 1 mL)，见表 3。而表 4 表明可用薄膜过滤法检验金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌，具体参数：以 200 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为冲洗液，两次冲洗，滤膜孔径 < 0.45 μm，直径为 50 mm。

表 2 需氧菌总数各菌株回收试验比值 (n = 3)

验证菌株	验证次数	1:1 平皿法	1:20 平皿法	1:100 平皿法	薄膜过滤法
铜绿假单胞菌	1	0.2	0.0	0.4	0.6
	2	0.3	0.0	0.6	0.9
	3	0.0	0.4	0.7	0.6
金黄色葡萄球菌	1	0.0	0.5	0.1	0.9
	2	0.1	0.0	0.5	0.7
	3	0.0	0.0	0.6	0.7
枯草芽孢杆菌	1	0.0	0.0	0.0	1.0
	2	0.0	0.4	0.5	1.0
	3	0.4	0.2	0.5	1.3
白色念珠菌	1	0.0	0.2	0.8	0.7
	2	0.0	0.0	0.7	1.2
	3	0.5	0.0	0.0	1.0
黑曲霉	1	0.0	0.4	0.5	1.0
	2	0.0	0.4	0.7	1.1
	3	0.1	0.1	0.7	0.9

表 3 霉菌和酵母菌总数各菌株回收试验比值 (n = 3)

验证菌株	验证次数	1:1 平皿法	1:10 平皿法	薄膜过滤法
白色念珠菌	1	0.7	0.6	0.6
	2	0.5	0.8	0.6
	3	1.2	0.5	0.7
黑曲霉	1	0.6	0.5	1.2
	2	1.1	0.5	0.9
	3	0.9	0.6	1.1

表4 控制菌验证结果 (n=3)

控制菌	菌种代数	采用方法	结果
金黄色葡萄球菌	3	胰酪大豆胨液体培养基 (100 mL)	未检出
	3	胰酪大豆胨液体培养基 (200 mL)	未检出
	3	薄膜过滤法	检出
铜绿假单胞菌	3	胰酪大豆胨液体培养基 (100 mL)	未检出
	3	胰酪大豆胨液体培养基 (200 mL)	未检出
	3	薄膜过滤法	检出

3 讨论

由于组方中的辣椒、赤芍、黄藤、红花有较强的抑菌活性^[1-8]，本研究主要目的是通过考察不同试验方法，进一步确认供试品是否存在抑菌作用、抗菌作用的强弱。实验结果表明，消除本品抑菌活性的有效方式是薄膜过滤法，采用薄膜过滤法可以降低本品在日常卫生学检查出现假阴性的可能性与概率，从而保证了本喷雾剂中有害微生物能被有效检出。然各种测试菌的回收率是判断抑菌活性的金标准，本实验采用了与国际通用标准接轨的验证方法：回收比值设置为“0.5~2.0”，同时设定试菌悬液和标准菌悬液的浓度为“每1 mL 供试液含菌量不大于100 cfu”的新规^[6]。此举大大地降低了本实验时间成本，有效地调高了本实验的成功率，保证了本验证方法准确性、可行性。另外，笔者发现，在进行本品的酵母菌、霉菌的计数回收率试验时，采用平皿法即可以满足上述两种微生物的回收比值，提示本品对黑曲霉和白色念珠菌的抑菌作用较弱。为保证本品在长期存储过程中依旧能保持不被微生物污染，因此本课题也对本品防腐剂的加入量进行了考察，结果表明0.1% 羟苯乙酯添加量可使蛇蚊喷雾剂抑菌效力达到《中国药典》2015年版中皮肤给药制剂的相关规定。

在制备黑曲霉菌液的过程中，笔者发现，试管大小直接影响菌液的浓度。因为不同的试管大小各异，经过反复的测试，如果采用了较小的试管进行培养，那么培养基斜面上的孢子，强制规定加入3~5 mL 溶液来进行洗脱时，会溢出来，影响试验结果，增加试验过程的不确定性。故黑曲霉菌液制备时，含0.05% (mL·mL⁻¹) 的0.9% 无菌氯化钠洗脱溶液的加入量建议修改为适量。诚然2020年版《中国药典》亦对此项进行了修正“加入

适量含0.05% (mL·mL⁻¹) 的0.9% 无菌氯化钠溶液进行洗脱”。另外，笔者发现，虽然回收率试验中“后加菌”方式较前显得更加科学，但是供试液加菌的时间很难控制，不同的实验人员、不同的实验条件，菌液和供试液混合后的作用时间不一样，若是供试液本身具备抑菌活性，那么有可能影响到回收率试验的结果。

[参考文献]

- (1) 杨红文, 艾玲, 雒秋江. 大蒜等12种中草药的体外抑菌实验(J). 时珍国医国药, 2009, 9(20): 2209-2210.
- (2) 吕娜, 赵昱玮, 汲立伟, 等. 黄藤的研究进展(J). 中国实验方剂学杂志, 2016, 19(22): 199-202.
- (3) 李建志, 刘文丽, 王亚贤. 9种中草药抗菌作用实验研究(J). 中医药学报, 2012, 1(40): 45-46.
- (4) 白亮亮, 邹鸣峰, 王恒, 等. 3种红花的体外抑菌作用研究(J). 食品科技, 2015, 2(40): 311-313.
- (5) 房华, 汪瑞忠, 张晓雪, 等. 6种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究(J). 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 396-399.
- (6) 柯文杰, 覃华斌, 陈言峰, 等. 25种中草药对普通变形杆菌的体外抑菌试验(J). 水产科技情报, 2019, 46(6): 328-331.
- (7) 莫佐红, 左国营, 吴玉霞, 等. 223种中草药体外抗菌活性筛选(J). 水产科技情报, 2020, 40(9): 1357-1367.
- (8) 李贞, 陈伟琴, 胡俊, 等. 中药对念珠菌的抑菌现状及机制研究进展(J). 上海中医药杂志, 2019, 53(12): 83-92.
- (9) 宋勤, 杜平华. 中成药微生物限度检查方法的探讨(J). 中国药事, 2006, 20(1): 46-48.
- (10) 高霞, 严筱楠, 高娟, 等. 《中国药典》2015年版与2010年版复方青黛胶囊微生物限度检查法的验证研究(J). 药物生物技术, 2017, 24(5): 402-405.
- (11) 余静, 刘亮镜, 徐斌. 四种医院制剂微生物限度检查方法的适用性研究(J). 临床医药实践, 2020, 29(6): 445-447.
- (12) 倪玉佳, 汤露, 戈煜, 等. 四种含抑菌成分外用制剂微生物限度检查方法验证(J). 东南国防医药, 2020, 22(1): 52-55.
- (13) 张婧娴, 黎向阳, 谢芳. 三种医院制剂微生物限度检查方法验证(J). 海峡药学, 2018, 30(9): 68-71.
- (14) 张小华, 马新换, 汪付田, 等. 2种医院制剂微生物限度检查方法学适用性研究(J). 中国药事, 2019, 33(8): 949-953.
- (15) 吴宏扬, 袁巍. 建立5种医院制剂微生物限度检查法(J). 中国卫生标准管理, 2018, 9(24): 70-73.