

平皿法及薄膜过滤法用于液体制剂微生物检验的适用性分析

农兆丰 陈洁华 周马林 龚健古 蓝 利

广西医科大学 广西南宁 530021

【摘要】目的 研究应用平皿法及薄膜过滤法用于液体制剂微生物检验的适用性。**方法** 分别采用平皿法和薄膜过滤法对4种液体制剂微生物检验方法进行适用性试验。**结果** 菌株回收率0.5-1.5,可检出铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, E.coli)以及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa),阴性对照组无控制菌检出。**结论** 采用平皿法对复方苯甲酸搽剂、氯化钾溶液进行微生物检验,应用薄膜过滤法进行适用性实验,操作过程较为便捷,精准性高,能够准确评估生物微生物污染情况。

【关键词】 平皿法;薄膜过滤法;液体制剂微生物检验;适用性分析

【中图分类号】 R446.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 2095-9753 (2022) 08-019-03

药品微生物检验是保证药品安全的重要指标,其主要是反映药品制剂在生产过程中受到微生物污染的情况^[1]。其中液体制剂生物检验过程较为复杂,制剂型号较为多样化,同时每种型号的液体制剂也都需要与之相适应的微生物检验方式^[2]。2015年我国药典中对用于药品检验的微生物检验方法进行了适当的修改,尤其注重检验方法的适用性分析。在本院中常用的液体制剂主要为复方苯甲酸搽剂、氯化钾溶液、苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂,但对于上述液体制剂的微生物检验方式的适用性和精确性还有待进一步验证。本次研究依据液体制剂微生物检验方式相关规定,对平皿法和薄膜过滤法的适用性进行相关评估分析。现报道如下。

1 仪器、资料及方法

1.1 仪器

在此次研究中,采用的仪器主要包括由上海博讯实业有限公司生产的型号为SPX-25B-2的生化培养箱,由上海精科实业公司生产的型号为WFH-202B的暗箱室紫外投射仪,由上海一恒科学仪器有限公司生产的型号为CU-420的电热恒温水浴锅,由广东宏展科技有限公司生产的型号为MJ-70-I的霉菌培养箱,由海尔智家股份有限公司生产的型号为BCD-328WDGF的电冰箱,由上海苏净实业有限公司生产的型号为HJ-CJ-2FD的净化工作台,由深圳市盛美仪器有限公司生产的型号为GL124-1SCN的电子天平,以及由上海垒固仪器有限公司生产的型号为JYT-20的架盘药物天平等。

1.2 材料

本次研究所选取液体制剂样本为复方苯甲酸搽剂、氯化钾溶液、苯扎溴铵搽剂、复方氯霉素搽剂。同时在此次研究中,所选菌种均来源于广西医科大学微生物学教研室。培养基及稀释液主要包括胰酪大豆琼脂培养基(Tryptose Soya Agar, TSA)、麦康凯液体培养基(MacConkey Broth Reference Medium, MacB)。除此之外,还包括溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(Cetrimide Agar Medium Base, CAMB)。不仅如此,还包括甘露醇氯化钠琼脂培养基(Mannitol Salt Agar, MSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud Dextrose Agar, SDA)。另外,采用的材料还包括胰酪大豆胨液体培养基(Tryptic Soy Broth Medium, TSB)以及沙氏葡萄糖液体

培养基(Sabouraud Dextrose Broth Medium, SDB),同时也采用了麦康凯琼脂培养基(MacConkey Agar, MacA)。所有培养基及稀释液均经过试验验证,符合国家相关规定。缓冲液采用的是pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液。

1.3 方法

1.3.1 需氧菌总数、霉菌及酵母菌总数计数方法

对于复方苯甲酸搽剂和氯化钾溶液应用平皿法。分别取两种制剂进行稀释,稀释程度为10倍、100倍,以制作成100mL的供试液剂。以《我国药典四部通则》中的1105项对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, B. subtilis)、白色念珠菌(*Candida albicans*, C. albicans)以及乙型副伤寒沙门菌的实验菌悬液进行制备,菌液浓度不大于100cfu/mL。此组为试验组,取1mL液剂于无菌平皿中培养制作。对于苯扎溴铵搽剂、复方氯霉素搽剂应用薄膜过滤法,稀释液选取材料中pH为7.0的缓冲液,稀释10倍后制作供试液,取10mL进行过滤处理,经过3次冲洗、滤膜,于最后一次中加入内菌液,内菌液的量为100cfu,取出滤膜放置于无菌平皿中培养。可选用pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液作为供试剂,以此作为对照组。根据培养条件,可选用TSA或SDB代替供试剂,加入试验菌液,作为菌液对照组。微生物计数回收率及计算公式为:

$$\text{细胞回收率} = \frac{\text{试验组菌落数} - \text{供试剂对照组菌落数}}{\text{菌液对照组菌落数}} \times 100\%$$

1.3.2 控制菌检查方法

复方苯甲酸搽剂、苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂均进行铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的检查,10倍稀释样品后,取10mL供试剂与100cfu以内菌液增菌培养,接种至CAMB观察结果。对于氯化钾溶液检查大肠埃希菌,同样进行稀释,稀释培养完成后接种到MacA观察结果。对于苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂应用薄膜过滤法,10倍稀释后,过滤取有菌滤膜,接种至100mLTSA进行增菌培养,后接种至MSA平板观察结果。采用pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试剂。阳性对照组正常加入菌液但不加入供试剂,而阴性对照组则不加入菌液。在常规方法控制下,菌检验显示,前者能够将控制菌检出,且后者不受干扰,方法准确可行。

1.4 观察指标

统计不同液体制剂微生物计数回收率情况及适用性检验

作者简介:农兆丰,1974年8月,男,壮族,大学本科,广西南宁市,助理实验师,研究方向:医学微生物学。

情况。其中,液体制剂主要包括复方苯甲酸搽剂、氯化钠溶液、苯扎溴铵搽剂以及复方氯霉素搽剂。微生物主要包括黑曲霉菌(*Aspergillus niger*, *A. niger*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、*C. albicans*、*Pa*、*Sa*、*B. subtilis*^[3-4]。

2 结果

表 1: 微生物计数回收率 [%]

菌种	制剂	复方苯甲酸搽剂			氯化钾溶液			苯扎溴铵搽剂			复方氯霉素搽剂		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
需氧菌总数	白色念珠菌	0.99	0.93	0.94	1.04	0.99	0.97	0.92	0.85	0.84	0.87	0.82	0.77
	黑曲霉	0.82	0.87	0.93	0.91	0.93	0.71	0.77	0.82	0.87	0.81	0.85	0.77
	铜绿假单胞菌	0.78	0.82	0.85	0.75	0.81	0.79	0.75	0.71	0.78	0.73	0.81	0.78
	金黄色葡萄球菌	0.96	0.92	0.96	0.95	0.89	0.90	0.72	0.78	0.81	0.81	0.84	0.80
	枯草芽孢杆菌	0.85	0.87	0.84	0.78	0.79	0.82	0.84	0.79	0.80	0.86	0.88	0.83
霉菌及	白色念珠菌	1.03	0.97	0.92	0.99	0.97	0.98	0.83	0.79	0.75	0.85	0.88	0.86
酵母菌总数	黑曲霉	0.86	0.94	0.82	0.93	0.91	0.94	0.78	0.84	0.81	0.78	0.80	0.74

表 2: 控制菌检查法方法学适用性试验结果 [%]

控制菌	制剂	复方苯甲酸搽剂			氯化钾溶液			苯扎溴铵搽剂			复方氯霉素搽剂		
		试验组	阴性对照	阳性对照	试验组	阴性对照	阳性对照	试验组	阴性对照	阳性对照	试验组	阴性对照	阳性对照
大肠埃希菌	TSA	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	/
	Macb	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	/
	MacA	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	/
铜绿假单胞菌	TSA	+	-	+	/	/	/	+	-	+	+	-	+
	CAMB	+	-	+	/	/	/	+	-	+	+	-	+
金黄色葡萄球菌	TSB	+	-	+	/	/	/	+	-	+	+	-	+
	MSA	+	-	+	/	/	/	+	-	+	+	-	+

3 讨论

近年来,随着医疗改革进程的推进,各大医院内液体制剂逐渐被市场销售药品所取代,而医院内液体制剂的生产安全标准也逐渐提高,应用液体制剂剂型和品种也处于逐年降低的趋势。当前阶段,我国大部分医院的液体制剂多数为外用或局部用药制剂,均含有一定的乙醇溶剂或抑菌成分,对液体制剂的微生物检查造成一定影响。而液体制剂的微生物检查结果对于药品安全至关重要,因此液体制剂的微生物检查方式是药品安全检查的关键之处。

液体制剂微生物检验技术与液体制剂的种类、原料、用药途径均有一定的关系,在进行检测时,不同种类的液体制剂需采用一种或多种控制菌进行微生物检验^[5-6]。在检验过程中,细菌总数的检测目的主要是判断细菌对于液体制剂的污染程度,通常情况下,对于细菌总数的检测方式主要采用平皿计数法,测定被检液体制剂单位质量或体积内的所含活菌总数^[7]。在本次研究所选取的液体制剂中,复方苯甲酸搽剂所含的水杨酸和苯甲酸属于消毒防腐类药物,不仅能够将细菌细胞膜的通透性予以改变,而且在对*C. albicans*、*Pa*、*Sa*、*B. subtilis*等微生物进行有效抑制方面也有较好的效果。与此同时,氯化钾溶液含有羟苯乙酯成分,可改变细胞蛋白性质,进而发挥抑菌作用^[8-9]。两种液体制剂抑菌作用均与制剂浓度有关,可选用普通稀释方法;苯扎溴铵搽剂中的苯扎溴铵能够改变细胞浆膜通透性,阻碍细胞代谢,进而起到抑菌的作用,普通稀释方法很难影响其抑菌作用,复方氯霉素搽剂中的氯霉素直接作用于细菌核糖核蛋白,在抑制阴性细菌方面具有较强的作用力。因此,上述两种液体制剂应采用薄膜过滤法,其优势在于将制剂的抑菌作用予以消除,然后方可展开微生物计数检查等^[10-11]。

2.1 液体制剂微生物计数回收率

菌株回收率 0.5-1.5, 观察试验结果并计数。详见表 1。

2.2 控制菌检查法方法学适用性试验结果

试验组检出菌种: *E. coli*、*Pa*、*Sa*, 无阴性对照组检查菌种。

适用性试验验证后,菌液检出结果符合适应性结果。详见表 2。

对于复方苯甲酸搽剂、氯化钾溶液采用普通稀释平皿方法,对于苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂应用薄膜过滤法,本次研究结果显示,复方苯甲酸搽剂、氯化钾溶液、苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂进行微生物检验,试验组检出菌种: *C. albicans*、*Pa*、*Sa*, 无阴性对照组检查菌种。在适用性试验下,菌液检出结果符合适应性结果。同时,微生物的检查需保持在无菌环境中进行,以此避免受到其他因素影响,降低微生物检测的准确性。

综上所述,复方苯甲酸搽剂和氯化钾溶液微生物检测适用平皿法,而苯扎溴铵搽剂和复方氯霉素搽剂的微生物检验适用薄膜过滤法,两种方法可准确评估液体制剂微生物污染情况,从而提高液体制剂的质量。

参考文献:

- [1] 闵红, 杨晓莉, 李翠, 等. 阿莫西林胶囊微生物检查方法学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(2):218-223.
- [2] 李翔, 黎春彤, 王晶, 等. 4 种医院液体制剂微生物限度检验方法的建立[J]. 中国药师, 2019, 22(6):1183-1185.
- [3] 马海玲, 陶扬洋, 徐春飞, 等. 三种医院制剂微生物限度检查方法适用性研究[J]. 国际中医中药杂志, 2020, 42(5):469-474.
- [4] 王玲, 郭志廷, 杨峰, 等. 薄膜过滤法在中药常山散微生物限度检查中的应用研究[J]. 中国兽医杂志, 2019(5):99-103.
- [5] Cho H U, Lee M, Shin J, et al. Lignin fractionation from waste wood using organosolv treatment combined with membrane filtration[J]. Membrane Water Treatment, 2020, 11(1):25-29.
- [6] 余为. 薄膜过滤法在药品检验中的应用探讨[J]. 世界

(下转第 22 页)

护理前两组患者 SAS 评分、SDS 评分无明显差异 ($P>0.05$), 护理后研究组患者 SAS、SDS 评分比对照组高 ($P<0.05$), 数据统计结果如表 1。

2.2 两组患者的护理不良事件发生率

对比对照组与研究组患者的护理不良事件发生率, 研究组患者明显低于对照组 ($P<0.05$), 数据结果如表 2。

表 2: 两组患者护理不良事件发生率 (n, %)

组别 (n=49)	感染	压疮	坠床	跌倒	护理不良 事件发生率
对照组	2 (4.08)	3 (6.12)	2 (4.08)	1 (2.04)	8 (16.33)
研究组	0 (0.00)	1 (2.04)	1 (2.04)	0 (0.00)	2 (4.08)
χ^2	4.009				
P	0.045				

2.3 两组患者护理满意度统计

通过对比两组患者的护理满意度, 结果发现研究组患者护理满意度更高 ($P<0.05$), 详细数据如表 3。

表 3: 两组患者护理满意度观察 (n, %)

组别	例数	不满意	满意	非常满意	护理满意度
对照组	49	9 (18.37)	16 (32.65)	24 (48.98)	40 (81.63)
研究组	49	2 (2.04)	18 (36.73)	29 (59.18)	47 (95.92)
χ^2	5.018				
P	0.045				

3 讨论

肾内科疾病是一种常见的高发病, 不仅病情发展迅速, 发病原因复杂, 还具有严重的危害性。对于患有肾内科疾病的患者而言, 不积极入院进行治疗, 导致病情加重, 不但会引发尿毒症, 甚至会导致患者死亡。目前, 高血压肾病作为肾内科疾病中的一种, 对患者的生命健康影响极大, 且患者多数存在精神焦虑、抑郁悲观等不良情绪, 为了提升患者的治疗依从性, 还要选择合理有效的护理干预方式, 以改善患者的负面情绪, 提升其临床护理效果^[3]。

舒适护理作为常见的护理干预措施, 既可以满足患者日常生活中的基本需求, 也能够满足患者更高层次的需要, 提升患者的生理、心理和社会层面舒适度^[4]。因此, 肾内科疾病患者在治疗过程中实施舒适护理干预, 加强对护理人员进行舒适护理培训, 在提升护理人员护理质量, 降低其出现护理差错的同时, 还可以通过对患者进行心理护理, 缓解患者的不良情绪, 提高患者的治疗自信心, 促使患者能够以更好的心态进行治疗, 从而提升患者的治疗效果。此外, 在对肾内科疾病患者实施舒适护理的过程中, 对患者进行用药指导, 也可以减少患者用药后的不良反应, 而病房环境护理可以为患者提供舒适的休息环境, 也有利于患者的身体康复。因此, 在此次研究中, 研究组患者护理后的 SAS、SDS 评分和护理满

意度比对照组患者高, 护理不良事件发生率则比对照组低, 研究结果表明舒适护理干预在肾内科疾病患者的护理中, 可以改善患者的焦虑、抑郁情绪, 且护理不良事件发生几率大幅度下降, 患者对护理服务的满意度也更高。

在王旭等^[5]人的研究结果中, 护理组患者的护理技术、护理流程、服务态度、治疗效果责任心、综合评分, 以及患者经过护理后的肌酐水平相较于对照组, 明显更高, 研究结果说明高血压合并肾内科疾病患者, 在采取舒适护理措施后, 护理质量更显著, 且可以有效改善患者的肾功能。在刘争艳^[6]的研究中, 实验组患者在采取护理干预后, 其 SAS、SDS 评分、护理满意度与对照组相比更高, 且结果与本次研究的结果基本相符, 结果证实肾内科疾病患者在采取优质护理干预后, 对患者的不良情绪有良好的缓解作用, 患者对护理服务的满意度则显著提升。在王丽^[7]的研究中, 实验组患者护理不安全事件发生率相较于对照组更低, 护理满意度则更高, 该结果与此次研究的结果基本相近, 研究证实肾内科疾病患者在实施护理干预后, 可以降低护理不安全事件发生率, 增加患者对护理服务的满意程度, 具有显著的护理效果。

综合以上内容可知, 肾内科疾病患者采取舒适护理, 对患者焦虑、抑郁等负面情绪有所减轻, 能改善患者的精神状态, 还可以在很大程度上避免护理不良事件的发生, 提高患者的护理安全效果。而且, 采用舒适护理干预措施, 还可提升肾内科疾病患者对护理服务的满意度, 具有较高的护理质量。因此, 该护理干预模式更适合用于肾内科疾病患者的临床护理中, 具有良好的临床应用价值。

参考文献:

- [1] 陈熙, 彭福梅. 优质护理服务在肾内科护理中的应用[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2018, 3(33):12-13.
- [2] 骆云静, 杨娟. 肾内科护理中实施风险管理的效果分析[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(06):1042-1044.
- [3] 吴洋. 探究舒适护理在高血压合并肾内科疾病中的护理效果观察[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2019, 4(42):115+121.
- [4] 陈德英, 冯少馨, 陈华婕, 王静, 游少珺. 舒适护理在高血压合并肾内科疾病中的护理应用价值分析[J]. 心血管病防治知识, 2021, 11(12):40-42.
- [5] 王旭, 杨帆, 王迪, 白晓莹. 舒适护理在高血压合并肾内科疾病中的护理效果观察[J]. 饮食科学, 2017(16):22.
- [6] 刘争艳. 优质护理干预应用于肾内科护理中的效果评价[J]. 中国医药指南, 2017, 15(17):285-286.
- [7] 王丽. 老年肾内科护理的安全隐患和护理干预措施分析[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2017, 39(S1):214-215.

(上接第 20 页)

最新医学信息文摘, 2019, 19(60):270.

[7] 曾志明, 沈中锋, 潘波, 等. 不同消毒预处理对包装饮用水薄膜过滤检测结果的影响[J]. 饮料工业, 2020, 23(2):32-35.

[8] 黄丽华, 梁蔚阳, 陈宇堃, 等. 阿德福韦酯片微生物限度检查方法的建立[J]. 中国医药导报, 2019, 16(30):118-121.

[9] Zagklis D P, Papageorgiou C S, Paraskeva C A. Technoeconomic Analysis of the Recovery of Phenols from Olive Mill Wastewater through Membrane Filtration and Resin

Adsorption/Desorption[J]. Sustainability, 2021, 13(4):2376.

[10] 牛振东, 郝运伟, 刘文杰, 等. 地拉罗司分散片微生物限度检查方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1):40-44.

[11] Peng H, Guo J. Removal of chromium from wastewater by membrane filtration, chemical precipitation, ion exchange, adsorption electrocoagulation, electrochemical reduction, electrodialysis, electrodeionization, photocatalysis and nanotechnology: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2020, 18(6):2055-2068.