

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.16.011

氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法的建立*

曹寒梅^{1,2}, 蔡虎³, 杨晓莉⁴, 常春¹, 傅强^{1Δ}

(1. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061; 2. 陕西浩瀚管理技术咨询有限公司, 陕西 西安 710065;
3. 陕西省医疗器械质量监督检验院, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立氧氟沙星胶囊的微生物限度检查方法。方法 在供试液中添加氯化镁和聚山梨酯 80, 冲洗液中添加聚山梨酯 80, 采用薄膜过滤法对氧氟沙星胶囊需氧菌、霉菌和酵母菌总数的计数方法及控制菌大肠埃希菌的检查方法进行适用性试验。结果 采用上述方法可有效消除氧氟沙星胶囊的抑菌作用, 需氧菌、霉菌和酵母菌的总数计数方法适用性试验中的回收比值均在 0.5~2.0 之间; 控制菌检查方法适用性试验检出阳性试验菌。结论 所建立的方法可作为氧氟沙星的微生物限度检查方法。

关键词:氧氟沙星胶囊; 微生物限度检查; 方法适用性试验; 氯化镁; 薄膜过滤法

中图分类号: R917; R978

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)16-0035-04

Establishment of Microbial Limit Test for Ofloxacin Capsules

CAO Hanmei^{1,2}, CAI Hu³, YANG Xiaoli⁴, CHANG Chun¹, FU Qiang¹

(1. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Shaanxi Haohan Management Technology Consultation Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710065; 3. Shaanxi Institute of Medical Device Quality Supervision and Inspection, Xianyang, Shaanxi, China 712046;

4. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To establish a microbial limit test method for Ofloxacin Capsules. **Methods** By adding magnesium chloride and polysorbate 80 to the test solution and adding polysorbate 80 to the flushing solution, the suitability tests of the counting method of total aerobic bacteria, mold and yeast in Ofloxacin Capsules and the checking method of controlling bacterial *Escherichia coli* were carried out by membrane filtration method. **Results** The above method can effectively eliminate the bacteriostasis of Ofloxacin Capsules. The recovery ratios of aerobic bacteria, mold and yeast in the suitability test of the counting methods were in the range of 0.5-2.0. Positive test bacteria were detected in the suitability test of control bacteria test method. **Conclusion** The established method can be used for the microbial limit test of ofloxacin.

Key words: Ofloxacin Capsules; microbial limit test; method suitability test; magnesium chloride; membrane filtration method

氧氟沙星对需氧革兰阴性杆菌、肠杆菌科、假单胞菌属、支原体、衣原体、非典型分枝杆菌等均有良好的抗菌活性, 尤其对需氧革兰阴性杆菌的抗菌活性最强。对该品种进行微生物限度检查时, 需要消除样品的抑菌活性, 真实地反映其微生物污染情况, 防止出现假阴性检查结果。本研究中依照 2015 年版《中国药典(四部)》^[1]进行方法适用性试验, 利用氯化镁与喹诺酮类抗菌药物的络合作用及聚山梨酯 80 的中和作用, 通过薄膜过滤法, 在稀释剂、冲洗液、培养基中添加氯化镁及聚山梨酯 80 消除抑菌活性, 建立氧氟沙星胶囊的微生物限度和控制菌大肠埃希菌的检查方法^[2-3]。现报道如下。

1 材料

菌种: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501]、白色念珠菌 (*Candida albicans*)

[CMCC(F)98001]、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003]、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102], 均购自中国医学细菌保藏管理中心, 工作用菌株均为第 3 代。

仪器: LDZX-30KBS 型压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); XY500JC 型电子天平(常州市幸运电子设备有限公司); HFSafe-1800TE II B2 型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); BSD-TX345 型台式恒温振荡器(上海博讯实业有限公司); HH-系列电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); LRH-250F 型生化培养箱、MJ 250FI 型霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); FC752 型薄膜过滤器(杭州泰林生物技术有限公司, 批号为 20160102)。

试药: 氧氟沙星胶囊(某制药公司, 批号为 150801, 规格为每粒 0.1 g); 胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为 151107)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为 150824)、

*基金项目: 2020 年版《中国药典》药品标准提高项目[15]。

第一作者: 曹寒梅, 女, 大学本科, 工程师, 主要从事药品微生物检测及实验室体系建立和认证咨询工作, (电话)029-88225459 (电子信箱)281583332@qq.com。

Δ通信作者: 傅强, 男, 博士研究生, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为药物光学对映体的分离, (电子信箱)fuqiang@xjtu.edu.cn。

胰酪大豆胨液体培养基(批号为 151114)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号为 1505252)、蛋白胨培养基(批号为 160119)、麦康凯液体培养基(批号为 150911)、麦康凯琼脂培养基(批号为 1504162),均购自北京三药科技开发公司;氯化钠(天津市致远化学试剂有限公司,批号为 20160601);氯化镁(天津市百世化工有限公司,批号为 20150103)。

2 方法与结果^[1,4-6]

2.1 菌液制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的新鲜培养物分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养24h;将白色念珠菌的新鲜培养物接种于沙氏葡萄糖液体培养基中,25℃培养3d。上述培养物用无菌0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液;将黑曲霉的新鲜培养物接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,25℃培养7d或直至获得丰富的孢子,加入5mL含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

2.2 供试液制备

取供试品10g,加含5%聚山梨酯80的胰酪大豆胨液体培养基至100mL,45℃恒温振荡15min,制成1:10(*m/V*)的供试液A。取供试品10g,加含5%聚山梨酯80的胰酪大豆胨液体培养基至90mL,再加入10mL1mol/L的氯化镁溶液,45℃恒温振荡15min,制成1:10(*m/V*)的供试液B(即得含0.1mol/L氯化镁的供试液)。

2.3 微生物计数方法适用性试验

需氧菌总数计数方法:采用薄膜过滤法。试验组,取2.2项下供试液A、供试液B各1mL,置含100mL1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液的薄膜过滤器中,滤过,用含1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液分别试验冲洗5次、8次,每次100mL。在最后一次冲洗液中分别加入菌落数不超过100cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉试验菌液各1mL。制备好的滤膜,菌面朝上,贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上。供试品对照组,取制备好的供试液,以稀释液代替菌液,同试验组操作。菌液对照组,取不含中和剂的相应稀释液替代供试液,按试验组方法操作。中和剂对照组,取相应量稀释液替代供试品,同试验组方法操作。各组每株菌平行制备2皿,30~35℃培养2~3d。计算平均菌落数,结果见表1和表2。

霉菌和酵母菌总数计数方法:采用平皿法。试验组,取2.2项下供试液A分装于2个无菌试管中,每管装量9.9mL,再分别加入制备好的含菌量不大于10⁴cfu/mL

表1 需氧菌总数计数方法的回收结果

菌株	方法	菌落数(cfu/膜)				回收比值	
		菌对组	试验组	供对组	中对组	试验组	中对组
金	冲5次,每次100mL	74	16	0	76	0.22	1.03
	冲8次,每次100mL	67	25	0	65	0.37	0.97
铜	冲5次,每次100mL	73	12	0	68	0.16	0.93
	冲8次,每次100mL	73	29	0	73	0.40	1.00
枯	冲5次,每次100mL	61	0	0	57	0	0.93
	冲8次,每次100mL	60	10	0	58	0.17	0.97
白	冲5次,每次100mL	73	74	0	69	1.01	0.95
	冲8次,每次100mL	0	72	0	72	0.22	1.03
黑	冲5次,每次100mL	54	58	0	57	1.07	1.06
	冲8次,每次100mL	52	59	0	53	1.13	1.02

注:金为金黄色葡萄球菌,铜为铜绿假单胞菌,枯为枯草芽孢杆菌,白为白色念珠菌,黑为黑曲霉;菌对组为菌液对照组,供对组为供试品对照组,中对组为中和剂对照组。表2、表3同。中和剂为聚山梨酯80,表3同。

表2 需氧菌总数计数方法回收结果

菌株	方法	菌落数(cfu/膜)				回收比值	
		菌对组	试验组	供对组	中对组	试验组	中对组
金	冲5次,每次100mL	68	30	0	66	0.44	0.97
	冲8次,每次100mL	56	53	0	58	0.95	1.04
	冲8次,每次100mL	74	69	0	65	0.93	0.88
	冲8次,每次100mL	70	65	0	66	0.93	0.94
铜	冲5次,每次100mL	49	25	0	44	0.51	0.90
	冲8次,每次100mL	55	53	0	58	0.96	1.05
	冲8次,每次100mL	68	64	0	62	0.94	0.91
	冲8次,每次100mL	54	53	0	51	0.98	0.94
枯	冲5次,每次100mL	77	30	0	75	0.39	0.97
	冲8次,每次100mL	72	76	0	68	1.06	0.94
	冲8次,每次100mL	65	67	0	69	1.03	1.06
	冲8次,每次100mL	57	53	0	57	0.93	1.00
白	冲5次,每次100mL	70	64	0	72	0.91	1.03
	冲8次,每次100mL	64	68	0	62	1.06	0.97
	冲8次,每次100mL	57	62	0	65	1.09	1.14
	冲8次,每次100mL	66	63	0	61	0.95	0.92
黑	冲5次,每次100mL	52	50	0	51	0.96	0.98
	冲8次,每次100mL	49	47	0	49	0.96	1.00
	冲8次,每次100mL	45	47	0	50	1.04	1.11
	冲8次,每次100mL	52	55	0	57	1.06	1.10

注:中和剂为聚山梨酯80和氯化镁。

的白色念珠菌、黑曲霉试验菌液各0.1mL。取制备好的试验组样品液1mL,置直径为90mm的无菌平皿中,注入温度不超过45℃熔化的沙氏葡萄糖琼脂培养基约20mL,混匀,凝固,每株菌平行制备2皿,20~25℃培养3~5d。同法测定供试品对照组、菌液对照组及中和剂对照组,并计算各组的平均菌落数。结果见表3。

表3 霉菌和酵母菌计数方法的回收结果

菌株	菌落数(cfu/膜)				回收比值	
	菌对组	试验组	供对组	中对组	试验组	中对组
白	75	77	0	73	1.03	0.97
	66	68	0	62	1.03	0.94
	53	52	0	51	0.98	0.96
黑	72	68	0	67	0.93	0.94
	45	48	0	41	1.07	0.91
	53	51	0	55	0.96	1.04
	55	53	0	52	0.96	0.95

2.4 控制菌检查方法适用性试验^[7-9]

试验组:取供试液A 10 mL,加入含100 mL 1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液的滤器中,混匀,薄膜过滤,用含1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液分别冲洗3次、5次、8次,每次100 mL。滤完,取出滤膜,接种至300 mL胰酪大豆胨液体培养基中,各接入1 mL含菌量不大于100 cfu的大肠埃希菌菌液,混匀,35℃培养18 h。同法取供试液A 10 mL,加入含100 mL 1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液的滤器中,混匀,薄膜过滤,用含1%聚山梨酯80的0.1%蛋白胨水溶液冲洗3次,每次100 mL。滤完,取出滤膜,接入至90 mL胰酪大豆胨液体培养基中,再加入10 mL 1 mol/L的氯化镁溶液(即得含0.1 mol/L氯化镁的胰酪大豆胨液体培养基),接入1 mL含菌量不大于100 cfu的大肠埃希菌菌液,混匀,35℃培养18 h。取上述各培养物1 mL接种至100 mL麦康凯液体培养基,42℃培养24 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,35℃培养18 h。阴性对照试验:以稀释液代替供试液,照相应控制菌检查方法检查。结果见表4。

表4 大肠埃希菌检查方法不同培养基不同体积的结果

稀释液	体积/mL	薄膜过滤法	试验组		阴性对照组	
			A基	B基	A基	B基
胰酪大豆胨液体培养基	300	冲3次,每次100 mL	-	无菌落生长	-	无菌落生长
	300	冲5次,每次100 mL	-	无菌落生长	-	无菌落生长
	300	冲8次,每次100 mL	-	无菌落生长	-	无菌落生长
含1% 1 mol/L氯化镁胰酪大豆胨液体培养基	100	冲3次,每次100 mL	+	典型菌落生长	-	无菌落生长

注:“+”表示浑浊,有菌生长;“-”表示澄清,无菌生长。A基指麦康凯液体培养基,B基指麦康凯琼脂培养基。

由表1至表3可见,含5%聚山梨酯80或/和含有氯化镁的中和剂对照组的回收比值在0.5~2.0范围内,说明5%聚山梨酯80或/和含有0.1 mol/L氯化镁的中和剂对试验菌株无毒害作用。由表1及表2可见,氧氟沙星对细菌的抑制作用很强,采用含聚山梨酯80

的中和剂,冲洗800 mL时,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的回收比值均小于0.5,不能消除氧氟沙星胶囊对3种细菌的抑制作用,当在含聚山梨酯80稀释液中再添加氯化镁时,冲洗800 mL,可使金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收比值均大于0.9,表明可采用该方法作为需要菌总数的计数方法。由表3可见,氧氟沙星胶囊对白色念珠菌和黑曲霉的抑制作用较弱,可采用含5%聚山梨酯80中和剂的常规法(1 mL/皿,10⁻¹)作为霉菌和酵母菌总数的计数方法。由表4可见,当冲洗量为800 mL且加大培养基体积为300 mL时,亦无法消除氧氟沙星对大肠埃希菌的抑制作用。当冲洗量为300 mL时,滤过后,将膜接入含0.1 mol/L氯化镁的胰酪大豆胨液体培养基100 mL,即可检出阳性试验菌大肠埃希菌,且阴性对照试验无菌生长。说明该方法可作为控制菌大肠埃希菌的检查方法。

3 讨论

氧氟沙星胶囊对霉菌和酵母菌抑制作用较弱,因此霉菌和酵母菌总数采用常规平皿法即可。在预试验中,需氧菌以常规法试验,供试液稀释到1:100(V:V)时,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的回收比值皆为0。由此可见,氧氟沙星对细菌有很强的抑菌活性,遂在薄膜过滤法过程中采用了最后一次冲洗时加入试验菌的方法,并取制备的1:10供试液1 mL或10 mL加入含100 mL冲洗液滤器中,混匀后过滤,可有效防止药物颗粒堵塞薄膜。在中和剂的选择上,第一,氧氟沙星有较强的抑菌活性,首选添加聚山梨酯80,因为一定浓度的聚山梨酯80能促进胶囊剂的乳化与分散,并对抑菌活性有中和作用;第二,氧氟沙星为喹诺酮类抗菌药物,可与金属离子(Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Al³⁺)发生络合反应,使抗菌活性下降。试验中选择1% 1 mol/L氯化镁和5%聚山梨酯80作为中和剂加入供试液中及1%聚山梨酯80加入冲洗液中。结果表明,在制备供试液中添加一定量的氯化镁并采用薄膜过滤法,对需氧菌的抑菌活性有明显的减弱作用,且在控制菌大肠埃希菌检查的方法适用性试验组,增大培养基体积和加大冲洗次数都较增菌培养基中直接添加氯化镁消除抑菌效力弱。在日后的探索中,可以尝试将金属离子中和剂直接添加至琼脂培养基中,探索效果是否更佳,且可探索消除该类抑菌活性的金属离子的最低有效浓度^[10-11]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 140-151.
- [2] 万进, 林蒙, 谢委, 等. 盐酸左氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法验证[J]. 医药导报, 2015, 34(11): 1486-1489.