

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.18.008

均匀分散的抗菌类药品供试液及其上清液对菌落回收的影响

余凡¹, 高翔²

(1. 陕西省杨凌农业高新技术产业示范区药品检验监测评价中心微生物室, 陕西 杨凌 712100;

2. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 比较抗菌类药品供试液上清液及均匀分散的供试液对菌落回收的影响。方法 选取3种抗菌类药品,参照2015年版《中国药典(四部)》测定金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收比值。结果 敏感菌株同一稀释级回收比值,供试液上清液高于均匀分散的供试液;非敏感菌株,2种供试液回收比值无明显差异。结论 抗菌类药品均匀分散的供试液抑菌性强于供试液上清液。进行微生物限度检查时,应按适用性试验确定的方法进行供试液制备,以保证检验结果的准确性。

关键词:供试液上清液;均匀分散的供试液;敏感菌株;回收比值;抗菌药品

中图分类号:R917;R978.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)18-0021-04

Effect of Uniformly Dispersed Test Solution and the Supernatant of Test Solution for Antimicrobial Drugs on the Recovery of Bacterial Colony

SHE Fan¹, GAO Xiang²

(1. Microbiology Laboratory of Drug Testing Monitoring and Evaluation Center, Yangling Agricultural High-Tech Industrial Demonstration Zone, Yangling, Shaanxi, China 712100; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract:Objective To compare the effect of the supernatant of the test solution and uniformly dispersed test solution for antimicrobial drugs on the recovery of bacterial colony. **Methods** Three antibacterial drugs were selected and the recovery ratios of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were determined according to the Chinese Pharmacopoeia (2015 edition, volume IV). **Results** At the same dilution level, the recovery ratio of the supernatant of the sensitive strain test solution was higher than that of the uniformly dispersed test solution. There was no significant difference in the recovery ratio of non-sensitive strains between the two test solutions. **Conclusion** The antibacterial activity of uniformly dispersed test solution of antimicrobial drugs is stronger than that of the supernatant of the test solution. In the microbial limit test, the test solution should be prepared according to the method determined by the applicability test to ensure the accuracy of the test results.

Key words: supernatant of test solution; uniformly dispersed test solution; sensitive strain; recovery ratio; antimicrobial drugs

微生物限度检查方法适用性试验和微生物限度检查首先均需要均匀分散的供试液及其上清液,2010年版《中国药典(一部)》对有抑菌性的样品进行离心沉淀,取上清液混合^[1],但2015年版《中国药典(四部)》删除了该方法^[2-3]。本研究旨在考察均匀分散的抗菌类药品供试液与其上清液的抑菌性是否等同,现报道如下。

1 材料

仪器:HTY-601型集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司);FC752型薄膜过滤器、LS-B50L型压力蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器公司);HFsafe-760S型生物安全柜(上海精宏实验设备有限公司);MJ-250-III型霉菌培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);SPX-150型生化培养箱(上海金杨州惠科电子有限公司)。

试药:甲硝唑片(金华企业<集团>股份有限公司,批号为170915,规格为每片0.2g);红霉素肠溶片(西安利君制药有限责任公司,批号为1608439-1,规格为每片0.125g);盐酸左氧氟沙星片(山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,批号为170601,规格为每片0.1g);

吐温80(天津市天理化学试剂有限公司);无水硫酸镁(西陇化工股份有限公司)。

培养基、稀释液、冲洗液、中和剂:胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为150922)、胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为160204)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为150801)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为160602),pH6.8磷酸盐缓冲液(PBS,批号为20170317),pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液(批号为20170310),均购自北京路桥技术有限责任公司。

菌属: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],均来源于中国医学菌种保藏中心。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌

分别接种于TSB中,33℃培养24h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至SDB中,23℃培养48h。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至SDA上,23℃培养7d,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含0.05%吐温80的无菌0.9%氯化钠溶液制成含菌 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL孢子悬液。

2.2 供试液制备

甲硝唑片供试液上清液(A1液):取甲硝唑片10g,加TSB至100mL,40℃条件下水浴振摇10min,使充分溶解,静置30min,使出现明显分层,取上清液,制成1:10(V/V)的A1液,用TSB进一步稀释成1:20,1:50,1:100(V/V)的系列溶液。

甲硝唑片均匀分散供试液(A2液):同A1液制备方法,不静置,吸取前用力振摇,使分散均匀,制成A2系列溶液。

红霉素肠溶片供试液上清液(B1液):取红霉素肠溶片适量,置无菌研钵研成粉末,取10g,加pH6.8PBS至100mL,40℃条件下水浴振摇10min,静置30min,取上清液,制成1:10(V/V)的B1液,再用pH6.8PBS进一步稀释成1:100(V/V)的B1液。

红霉素肠溶片均匀分散供试液(B2液):同B1液制备方法,不静置,吸取前用力振摇,使分散均匀,制成B2液。

盐酸左氧氟沙星片供试液上清液(C1液):取供试品10g,加pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液定容至100mL,其余同A1液制备方法,制成1:10(V/V)的C1液,再用pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液进一步稀释成1:100的C1液。

盐酸左氧氟沙星片均匀分散供试液(C2液):同C1液制备方法,不静置,吸取前用力振摇,使分散均匀,制成C2液。

2.3 方法适用性试验

2.3.1 A1液及A2液方法适用性试验(平皿法)

试验组:取A1系列溶液各9.9mL,加相应菌液0.1mL,充分混匀,使小于100cfu/mL,各取1mL置平皿中。菌液组:取TSB9.9mL,其余同试验组方法。供试品对照组:取A1系列溶液,加TSB0.1mL,充分混匀,各取1mL置平皿中,加入TSA或SDA,置规定温度培养。同法操作A2系列溶液。甲硝唑片敏感菌株金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌在A1液中的回收比值大于A2液,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌随着稀释级的增大,药物浓度的降低,A1液和A2液回收比值[回收比值=(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]差距逐渐缩小。详见表1。

2.3.2 B1液及B2液方法适用性试验(平皿法)

取B1系列溶液及B2系列溶液各9.9mL,分组及

表1 A1液及A2液各组菌落数及回收比值

菌株	溶液	试验组				供对组	菌液组	回收比值			
		1:10	1:20	1:50	1:100			1:10	1:20	1:50	1:100
金	A1	75	79	83	94	0	92	0.82	0.86	0.90	1.02
	A2	0	0	47	84	0		0.00	0.00	0.51	0.91
枯	A1	0	0	25	38	0	66	0.00	0.00	0.38	0.58
	A2	0	0	0	0	0		0.00	0.00	0.00	0.00
铜	A1	72	77	85	96	0	97	0.74	0.79	0.87	0.99
	A2	18	22	42	81	0		0.19	0.23	0.43	0.84
白*	A1	35				0	38	0.92			
	A2	37				0		0.97			
黑*	A1	40				0	49	0.82			
	A2	39				0		0.80			
白*	A1	38				0	42	0.90			
	A2	36				0		0.86			
黑*	A1	41				0	45	0.91			
	A2	42				0		0.93			

注:“金”指金黄色葡萄球菌,“枯”指枯草芽孢杆菌,“铜”指铜绿假单胞菌,“白”指白色念珠菌,“黑”指黑曲霉;下表同。*为采用TSA培养基,*为采用SDA培养基。“供对组”指供试品对照组。

操作均同2.3.1项下方法。B1液中铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌,B2液中金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的回收比值均不超过0.11,表明此3种菌为红霉素肠溶片敏感菌株。详见表2。冲洗液对照组回收比值=冲洗液对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数。

表2 B液回收比值(n=3)

菌株	溶液	试验组			冲洗液对照组
		1:10(平皿法)	1:100(平皿法)	1:10(薄膜过滤法)	
需氧菌	金 B1		0.00	0.71	0.91
	B2		0.00	0.00	
	枯 B1		0.00	0.80	0.89
	B2		0.00	0.00	
铜	B1		0.11	0.84	0.94
	B2		0.00	0.28	
白	B1	0.82			0.97
	B2	0.85			
黑	B1	0.91			0.91
	B2	0.87			
霉菌酵母菌	白 B1	0.89			
	B2	0.91			
	黑 B1	0.92			
	B2	0.94			

2.3.3 B1液及B2液方法适用性试验(薄膜过滤法)

试验组:取1:10(V/V)B1液1mL,加入100mL含1%吐温80的pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液100mL的过滤器中,滤过,用含1%吐温80的pH7.0氯化钠蛋白胨缓冲液900mL冲洗,每次100mL,最后1次冲洗

液加入菌落数小于 100 cfu 的相应菌液,滤干后取滤膜菌面朝上贴于 TSA 平板上。菌液组:不加 B1 液,用 pH7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液同法冲洗,其余同试验组。冲洗液对照组:不加 B1 液,用含 1% 吐温 80 的 pH7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液同法冲洗,其余同试验组;供试品对照组:不加菌液,其余同试验组;同法操作 1:10(V/V) 的 B2 液。B1 液中 3 种菌的回收比值大于 B2 液。结果见表 2。

2.3.4 C1 液及 C2 液方法适用性试验(平皿法)

试验组:取 C1 系列溶液各 9.9 mL,加相应菌液 0.1 mL,充分混匀,使小于 100 cfu/mL,各取 1 mL 置含有 1 mol/L 硫酸镁溶液 1 mL 平皿中(倾注 SDA 不加中和剂硫酸镁溶液)。菌液组:不加供试液,不加中和剂,其余同试验组。供试品对照组:不加菌液,其余同试验组。中和剂对照组:同菌液组,置含有 1 mol/L 硫酸镁溶液 1 mL 平皿中。同法操作 C2 系列溶液。结果见表 3。

表 3 C 液回收比值($n=3$)

菌株	溶液	试验组			中和剂对照组	
		1:10 (平皿法)	1:100 (平皿法)	1:10 (薄膜过滤法)	平皿法	薄膜过滤法
需氧菌	金 C1		0.00	0.79	0.92	0.83
	C2		0.00	0.00		
	枯 C1		0.00	0.71	0.87	0.95
	C2		0.00	0.00		
	铜 C1		0.00	0.82	0.89	0.87
	C2		0.00	0.00		
	白 C1	0.84			0.95	0.85
	C2	0.88				
霉菌酵母菌	黑 C1	0.87			0.94	0.91
	C2	0.91				
	白 C1	0.88				
	C2	0.92				
	黑 C1	0.93				
	C2	0.95				

2.3.5 C1 液及 C2 液方法适用性试验(薄膜过滤法)

试验组:取 1:10(V/V)C1 液 1 mL,加入 pH7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液 100 mL 的滤器中,滤过,用 pH7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液 900 mL 冲洗,每次 100 mL,最后 1 次冲洗液加入菌落数小于 100 cfu 的菌悬液,滤干后取滤膜贴于含有 1 mol/L 硫酸镁溶液(中和液)1 mL 的 TSA 预制平板上;同法操作 C2 系列液。菌液组:不加供试液,不加中和剂,其余同试验组。供试品对照组:不加菌液,其余同试验组。中和剂对照组:同菌液组操作,滤干后取滤膜贴于含有 1 mol/L 硫酸镁溶液 1 mL 的 TSA 预制平板上。平皿法金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌回收比值均为 0,表明此 3 株菌为盐酸左氧氟沙星片的敏感菌株。薄膜过滤法 C1 液的回收

比值大于 C2 液,中和剂对照组回收比值(该值 = 中和剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌数)大于 0.5,说明 1 mol/L 的硫酸镁溶液对微生物无毒性,不影响微生物的回收。结果见表 3。

3 讨论

微生物试验结果易受试验条件的影响,特别是药品中含有对微生物生长有抑制作用的成分时影响更显著^[4-5]。抗菌类药品抑菌性较强,同一样品同一稀释级均匀分散的供试液和供试液上清液敏感菌株的回收比值不同,抑菌性也不同,前者回收比值比后者低,表明前者抑菌性更强。平皿法中取均匀分散的供试液时所含药物固体颗粒及药物含量较上清液多,注皿时可见较多细小的药物固体颗粒;薄膜过滤法中取均匀分散的供试液时,相比于上清液有较多药物固体颗粒被截留在滤膜上,不溶性颗粒无法冲洗干净,抑菌性不易去除,造成回收比值较上清液低。供试液经自然静置后的沉降作用,上清液中药物含量明显低于均匀分散的供试液,导致了回收比值的差异。

本试验中选取 3 种抗菌药品进行方法适用性试验,取均匀分散的供试液进行需氧菌总数测定时,抑菌性并未去除,原本污染的微生物难以检出,导致假阴性结果,表明供试液的制备和取样直接影响试验结果的准确性^[6]。

均匀分散的供试液和供试液上清液中非敏感菌株回收比值无明显差异,表明不同的供试液均不影响非敏感菌株微生物的回收。因此本试验中选取的 1:10(V/V)均匀分散的供试液或供试液上清液进行霉菌和酵母菌总数测定均可,均不影响检验结果的准确性和可靠性。

常用的抗菌药物有八大类,本试验中选取了硝咪唑类的甲硝唑片^[7]、大环内酯类的红霉素肠溶片^[8]和喹诺酮类的左氧氟沙星片^[9]。2015 年版《中国药典(四部)》规定,供试品有抗菌活性,应尽可能去除或中和,当回收比值大于 0.5,方可消除供试品的抑菌活性,常联用增加稀释液、加入中和剂、采用薄膜过滤法等方法^[10]。

文献报道的 β -内酰胺类的阿莫西林胶囊^[11]、头孢类的盐酸头孢他美酯干混悬剂^[12]、大环内酯类的抗生素微生物限度方法验证时均取其上清液进行验证试验^[13],若取均匀分散的供试液,则不能有效检出供试品中污染的微生物,导致试验结果无法体现污染的真实情况。

综上所述,抗菌类药品均匀分散的供试液抑菌性强于供试液上清液。微生物限度检查时,应按适用性试验确定的方法制备供试液,以保证检验结果的准确性^[14]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010:附录 79-附录 82.
- [2] 杨晓莉,李 辉,马英英,等.《中国药典》2015 年版非无菌产