

中图分类号: R917; R928.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)17-0100-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.17.023



罗红霉素胶囊微生物限度检查方法适用性研究*

马鹏飞, 贾萌, 闵红, 李翠[△], 杨晓莉, 由亚宁

(陕西省食品药品检验研究院·国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 通过微生物适用性试验, 建立罗红霉素胶囊的微生物限度检查方法。方法 按照2020年版《中国药典(四部)》通则1100生物检查法要求, 采用平皿法、薄膜过滤法并使用中和剂稀释等方法开展回收试验, 进行微生物计数检查、控制菌检查方法研究。结果 采用中和剂稀释联合分膜的薄膜过滤法, 可有效去除罗红霉素的抑菌作用, 回收率达到要求。结论 所建立的检查方法符合药典要求, 可作为罗红霉素胶囊的微生物限度检查方法。

关键词: 罗红霉素胶囊; 微生物方法验证; 计数方法适用性试验; 薄膜过滤法

Suitability of the Microbial Limit Test Methods for Roxithromycin Capsules

MA Pengfei, JIA Meng, MIN Hong, LI Cui, YANG Xiaoli, YOU Yaning

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method for Roxithromycin Capsules based on the microbial suitability test. **Methods** According to the requirements of the biological examination method in the general rule 1100 of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition Volume IV), the recovery test was carried out by the plate-count method, membrane filtration method, and dilution-neutralization method to study the microbial counting and control bacterial test methods. **Results** Dilution-neutralization method combined with the membrane filtration method with membrane filtration could effectively remove the antimicrobial activity of roxithromycin, and the recovery rate could meet the requirements. **Conclusion** The established test method can meet the requirements of the *Chinese Pharmacopoeia*, and can be used as the microbial limit test method for Roxithromycin Capsules.

Key words: Roxithromycin Capsules; microbial method validation; suitability test of counting method; membrane filtration method

罗红霉素是1987年上市的第2代大环内酯类抗菌药物^[1], 临床主要用于革兰阳性菌、厌氧菌、衣原体、支原体等病原体感染的治疗^[2-3]。罗红霉素难溶于水, 具有高渗透、耐酸、不被胃酸破坏、吸收好、血药浓度高, 且临床安全、有效、不良反应少、使用方便等特点, 临床应用广泛^[4-5]。药品在生产过程中有污染微生物的风险, 污染的微生物对人体有害^[6]。对药品进行微生物限度检查, 必须通过方法适用性研究消除其抑菌作用, 结果才能准确可靠, 故开展方法学适用性试验是做好微生物限度检查的重要步骤^[7]。在进行罗红霉素

胶囊方法学适用性试验时, 常用的平皿法、稀释法、薄膜过滤法等很难消除抑菌作用, 敏感菌回收率无法达到要求^[3]。为此, 本研究中按照2020年版《中国药典(四部)》通则1100生物检查法要求, 探索利用分膜进行检查方法适用性研究, 为抗菌药物微生物限度检查方法的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器、试剂、培养基与菌种

1.1 仪器

PL202型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司); HR40-A2型生物安全柜(青岛海尔生

*基金项目: 陕西省科技厅社发项目[2019SF-133]。

第一作者: 马鹏飞, 男, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为药品、食品及化妆品微生物检验与控制, (电子信箱)xampf@163.com。

[△]通信作者: 李翠, 女, 学本科, 主管药师, 研究方向为药品质量控制, (电子信箱)licui0526@163.com。

[8] 姚娜, 黄燕明, 李雪银, 等. 地骨皮配方颗粒质量标准提高研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(7): 84-87.
[9] 张静娴. 中药地骨皮的化学成分与质量控制方法研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2013.
[10] 刘美廷, 李倩, 屈敏红, 等. 何首乌与制何首乌的高效薄层色谱指纹图谱研究[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(2): 193-196.
[11] 刘振丽, 宋志前, 巢志茂, 等. 何首乌生品与炮制品薄层层析鉴别方法研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(3): 41-42.
[12] 周峰, 江勳, 彭婷婷. 安神补脑胶囊中制何首乌和淫羊

藿的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2021, 30(15): 59-61.
[13] 于士龙, 张汉道, 程越, 等. 复方降血脂丸质量标准研究[J]. 中国药业, 2017, 26(20): 25-28.
[14] 兰婷, 王宝龙, 李明华, 等. HPLC法测定何首乌中二苯乙烯苷的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(10): 1774-1775.
[15] 林艳, 刘月新, 李春, 等. 生/制何首乌HPLC指纹图谱结合模式识别与含量测定的质量控制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(12): 62-66.

(收稿日期: 2023-08-04; 修回日期: 2024-02-09)

物医疗股份有限公司);LRH-250型培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);IPP260型霉菌培养箱(德国Memmert公司);VITEK2型全自动微生物鉴定系统(梅里埃诊断产品<上海>有限公司);FC752型薄膜过滤器(浙江泰林生物技术股份有限公司)。

1.2 试药

罗红霉素胶囊(陕西新丰禾制药有限公司,批号为2307127,规格为每粒150 mg<以罗红霉素含量计>);pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(青岛海博生物技术有限公司,批号为221209),聚山梨酯80(批号为20230109),卵磷脂(批号为20210104),均购自国药集团化学试剂有限公司;1%聚山梨酯80(V/V)的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液A,3%聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液B,0.1%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液C,0.3%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液D,1%聚山梨酯80和含0.1%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液E,3%聚山梨酯80和含0.3%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液F,0.1%聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨为缓冲液G,均自制。

1.3 培养基

TSA(批号为20230802),SDA(批号为20230601),TSB(批号为20230808),SDB(批号为20220326),MCB(批号为230323),MCA(批号为221114),RV SEB(批号为20230616),XLD(批号为20230321),TSI(批号为230324),均购自青岛海博生物技术有限公司,适用性均符合2020年版《中国药典(四部)》相关要求。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC 26 003],铜绿假单胞菌[CMCC 10 104],枯草芽孢杆菌[CMCC 63 501],白色念珠菌[CMCC 98 001],黑曲霉[CMCC 98 003],大肠埃希菌[CMCC 44 102],乙型副伤寒沙门菌[CMCC 500 94],均来自中国医学细菌保藏管理中心(CMCC),工作用菌株为第3代。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

按照2020年版《中国药典(四部)》通则1105要求,制备金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉,并稀释至满足试验浓度的菌悬液;按照通则1106要求,制备大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌,并稀释至适宜浓度的菌悬液。

2.2 供试液制备

试验A组:称取样品10 g,加入缓冲液A至100 mL,分散制成1:10供试液。试验B组:称取样品10 g,加入缓冲液B,分散制成1:10供试液。试验C组:称取样品10 g,加入缓冲液C,分散制成1:10供试液。试验D组:称取样

品10 g,加入缓冲液D,制成1:10供试液。试验E组:称取样品10 g,加入缓冲液E,分散制成1:10供试液。试验F组:称取样品10 g,加入缓冲液F,分散制成1:10供试液。再取以上供试液,等比稀释制成1:50供试液。

2.3 方法适用性结果判断

各试验组固体培养基上的菌落平均数减去供试组菌落数与菌液组菌落平均数的比值在0.5~2范围内,中和剂平均数与菌液对照均数的比值在0.5~2范围内^[6],且菌落形态大小与对照培养基上的一致,判定方法适用性试验通过。试验组检出控制菌说明方法适用性通过。全过程作阴性对照试验,结果应无菌生长。

2.4 微生物计数

2.4.1 平皿法

试验组:分别取2.1项下制备好的各供试液10 mL,分装于无菌试管,接种含菌量不大于 10^4 cfu/mL的各菌液0.1 mL。

供试组:取以上供试液10 mL,加入缓冲液A 0.1 mL。

菌液组:取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10 mL分装于无菌试管中,同试验组操作分别接种2.1项下各菌液0.1 mL。

中和组:取10 mL缓冲液E装于无菌试管,同试验组操作分别接种菌液0.1 mL。

取试验组样品液1 mL,接入培养皿中,注入溶化的TSA或SDA约20 mL,混匀,凝固,按规定条件倒置培养、计数^[7]。同法测定供试组及菌液组、中和组菌数,计算各组的平均菌落数。由表1可知,需氧菌及霉菌酵母菌总数的白色念珠菌、黑曲霉符合判断要求,而且不同浓度、不同中和剂显示的数值相当,说明罗红霉素对白色念珠菌、黑曲霉不敏感;其余菌液平皿无菌生长,而且更高浓度也未生长,说明对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌极其敏感。

试验过程中发现,采用单一的中和剂,1%或3%的聚山梨酯80、0.1%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液接种,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌回收结果为0;卵磷脂不宜过多溶解于pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,0.3%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液容易产生沉淀影响试验。因此,将以上中和剂联合起来强化中和作用,以3%聚山梨酯80和0.3%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为中和剂,会产生沉淀且在后续薄膜过滤试验中易产生大量泡沫,最终选择1%聚山梨酯80和0.1%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进行试验。另外,霉菌和酵母菌试验的白色念珠菌、黑曲霉回收试验均符合要求,为使后续试验保持一致,确定使用缓冲液E配置的1:10供试液进行霉菌和酵母菌总数计数。

表1 微生物计数平皿法菌落回收率

Tab. 1 Recovery of microbial counting in the plate - count method

组别	供试液 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
试验A组	1:10	0	0	0	0.91	1.00	0.95	0.97
	1:50	0	0	0	0.97	1.00	0.92	1.00
试验B组	1:10	0	0	0	0.89	0.95	0.90	0.90
	1:50	0	0	0	0.92	0.94	0.88	0.91
试验C组	1:10	0	0	0	0.90	0.96	0.94	0.94
	1:50	0	0	0	0.94	0.92	0.92	0.90
试验D组	1:10	0	0	0	0.90	0.91	0.91	0.87
	1:50	0	0	0	0.92	0.96	0.93	0.95
试验E组	1:10	0	0.1	0	1.00	1.20	1.00	0.96
	1:50	0	0.8	0	0.99	1.20	0.98	1.00
试验F组	1:10	0	0.1	0	0.88	0.94	0.92	0.93
	1:50	0	0.4	0	0.92	0.95	0.97	0.91
试验E组中和剂对照组		1.01	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.98

2.4.2 薄膜过滤法

试验组:取试验E组供试液1 mL,置含100 mL缓冲液G的薄膜滤器中,过滤,用缓冲液G分别冲洗3次、5次、8次,每次100 mL。最后1次冲洗时分别加入各菌液1 mL。

供试组:取试验E组供试液1 mL,不加试验菌,同试验组方式过滤。

菌液组:不加样品,同试验组方法薄膜过滤。

中和组:取缓冲液E 1 mL,同试验组其余操作。

以上试验,取出滤膜贴于TSA上培养并计数。回收结果见表2。可见,随着稀释浓度的变化或冲洗次数的增加,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌回收比值略有提高,但仍不符合要求。

表2 需氧菌总数薄膜过滤法回收率

Tab. 2 Recovery of the total aerobic bacteria by the membrane filtration method

冲洗次数	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
3次	0	0.37	0	1.0	0.9
5次	0	0.48	0	0.9	1.0
8次	0/1.0	0.52/1.01	0/0.97	1.0/1.0	1.0/1.0

注:表中“/”左为菌液计数比值,右为中和剂计数比值。表3和表4同。

Note: The left side of “/” refers to the ratio of bacterial liquid count, and the right side of “/” refers to the ratio of neutralizing agent count (for Tab. 2 - 4).

2.4.3 中和剂稀释联合薄膜过滤法

试验组:取试验E组供试液1 mL,置含500 mL缓冲液E的无菌玻璃瓶中,混匀并薄膜过滤,用缓冲液G分

别冲洗3次、5次、8次,每次100 mL,最后1次冲洗时加入2.1项下各菌液1 mL。

供试组:取供试液1 mL,不加试验菌,同试验组方法过滤。

菌液组:不加样品,同试验组方法薄膜过滤。

中和组:不加样品液,取缓冲液E 1 mL,同试验组方法过滤。

其余同2.4.2项操作,回收结果见表3。与薄膜过滤法比较,试验菌落回收率略有提高,但没有达到要求,故不能使用中和剂稀释联合薄膜过滤法进行需氧菌试验。

表3 需氧菌总数中和剂稀释联合薄膜过滤法回收率(稀释500 mL)

Tab. 3 Recovery of the total aerobic bacteria by the dilution - neutralization method combined with the membrane filtration method (dilution 500 mL)

冲洗次数	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
3次	0	0.66	0	1.00	0.96
5次	0.24	0.74	0.30	1.01	0.98
8次	0.36/1.01	0.86/1.0	0.39/0.98	1.00/0.98	1.01/1.0

2.4.4 中和剂稀释联合分膜的薄膜过滤法

试验组:取试验E组供试液1 mL,将每0.5 mL接种至含500 mL缓冲液E的无菌玻璃瓶中,混匀并过滤,用缓冲液G冲洗3次、5次、8次,每次100 mL。最后1次冲洗时加入不大于100 cfu/mL的各菌液1 mL。

供试组:取试验E供试液1 mL,不加菌,同试验组方法过滤。

菌液组:不加试验E组供试液,同试验组方法过滤并接菌。

中和组:不加样品,取1 mL缓冲液E同试验组方法分膜过滤。

其余同2.4.2项下操作,回收结果见表4。可见,每0.5 mL加入500 mL缓冲液E并用缓冲液G冲洗8次,回收率符合要求。

表4 需氧菌总数中和剂稀释联合分膜的薄膜过滤法回收率

Tab. 4 Recovery of the total aerobic bacteria by the dilution - neutralization method combined with the membrane filtration method with membrane filtration

冲洗次数	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
3次	0.42	0.87	0.44	0.96	1.02
5次	0.48	0.94	0.51	0.99	1.01
8次	0.69/1.01	0.98/0.95	0.72/0.98	1.01/0.96	0.99/1.0

2.5 控制菌检查方法

2.5.1 大肠埃希菌

分别取试验E组供试液10 mL,置含100, 300, 500 mL的TSB无菌玻璃瓶中,同时各加入大肠埃希菌试验菌液1 mL,混匀,33 °C培养18 h;取以上培养液

1 mL加入100 mL MCB中,43 °C培养24 h;再取以上培养物划线接种于MCA上,33 °C培养18 h。试验未检出大肠埃希菌。

取试验E组供试液10 mL,加入100 mL缓冲液E中,过滤,用500 mL缓冲液G分5次冲洗。最后1次冲洗时加入大肠埃希菌试验菌液1 mL,取出滤膜接种至TSB 100 mL中,同法选择200 mL和300 mL TSB再分别试验。结果试验组均未检出大肠埃希菌。

分别取试验E组供试液10 mL,置含100, 300, 500 mL缓冲液E的无菌容器中,分散均匀并薄膜过滤,用缓冲液G冲洗滤膜5次,每次100 mL。最后1次冲洗加入不大于100 cfu/mL的大肠埃希菌液1 mL,滤完取出滤膜接种至200 mL TSB中,33 °C培养18 h。按照以上方法进行选择和分离培养。试验结果及菌落鉴定见表5。

表5 大肠埃希菌方法适用性试验结果

Tab. 5 Suitability test results of the *Escherichia coli* method

项目	第1次试验	第2次试验	第3次试验
菌液浓度(cfu/mL)	74	70	78
麦康凯琼脂平板	桃红色圆形菌落,表面光滑、湿润		
革兰染色镜检	革兰阴性杆菌,两端钝圆,无芽孢		
确认试验	VITEK2全自动鉴定系统,确认为大肠埃希菌		

采用直接接种法、培养基稀释法及薄膜过滤法均未检出目标菌。采用试验E组供试液10 mL加入500 mL缓冲液E中,混匀并过滤,用缓冲液G冲洗滤膜5次,每次100 mL,取出滤膜接种至200 mL TSB中,出现疑似菌落,进行革兰染色镜检及全自动鉴定系统鉴定,3次试验均确认为大肠埃希菌。

2.5.2 沙门菌

分别称取样品10 g,加入至300,500,1 000 mL缓冲液E中,分散均匀,同时加入不大于100 cfu/mL的沙门菌菌液1 mL,33 °C培养18 h。取上述菌液0.1 mL加至RV SEB 10 mL中,33 °C培养18 h;取出培养物划线接种于XLD上,33 °C培养18 h。观察平板生长情况,若XLD有菌落生长,挑取于TSI高层斜面上进行斜面高层穿刺接种,33 °C培养18 h。结果均未检出沙门菌。

称取样品10 g,每2.5 g加至100 mL缓冲液E中,制成100 mL进行薄膜过滤器,分别用缓冲液G冲洗5次、8次、10次,每次100 mL。取出滤膜,加入至2 000 mL缓冲液E中,同时加入沙门菌菌液1 mL,33 °C培养18 h。按照以上方法进行分离培养,并平行开展4份试验。结果均未检出沙门菌。

称取样品10 g,每1 g加至500 mL缓冲液E中,薄膜过滤,用缓冲液G 500 mL冲洗5次,取出滤膜再加入500 mL缓冲液E中,同时接入不大于100 cfu/mL的沙门

菌液1 mL,混匀,33 °C培养18 h。按照以上要求平行10份并培养,结果检出沙门菌,判断回收试验通过。

结果及菌落鉴定见表6。直接接种法、培养基稀释法、薄膜过滤法试验组均未检出目标菌。采用稀释中和联合分膜的薄膜过滤法检出菌落,通过镜检及全自动鉴定设备鉴定,确认为沙门菌。可见,采用中和剂稀释联合分膜的薄膜过滤法消除了样品的抑菌作用。

表6 沙门菌方法适用性试验结果

Tab. 6 Suitability test results of the *Salmonella* method

项目	第1次试验	第2次试验	第3次试验
菌液浓度(cfu/mL)	78	74	80
木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂平板	无色、半透明、中心呈黑色		
三糖铁琼脂	斜面红色,底层黑色		
革兰染色镜检	革兰阴性杆菌		
确认试验	VITEK2全自动鉴定系统,确认为沙门菌		

3 讨论

消除抑菌作用是微生物限度检查方法研究的难点,常用消除方法有稀释法、中和剂法、薄膜过滤法或以上方法联合使用^[8-9]。对于一般试验,中和剂对消除抑菌作用的影响较大,选择中和剂既要考虑中和及潜在细胞毒性^[10],还应考虑相容性,应保证乳化均一。聚山梨酯80^[11]、卵磷脂是《中国药典》推荐的中和剂,本研究结果也证明了其无化学毒性。罗红霉素难溶于水,聚山梨酯80在中和的同时能使其分散均匀。卵磷脂是由阴阳离子组成的两性离子表面活性剂^[11],适合罗红霉素分子式及胶囊剂型特点,且选用0.1%卵磷脂更易于操作。聚山梨酯80、卵磷脂联合使用具有较强的中和作用。

罗红霉素具有较强的抑菌作用,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏菌、沙门菌敏感度较高,对白色念珠菌、黑曲霉不敏感,这也佐证了罗红霉素对革兰阳性菌有强抑菌作用^[2]。另外,为使罗红霉素微粒均匀分散、光滑度强,生产企业采用预制胶化淀粉、滑石粉及罗红霉素按照相应工艺制得,根据《中国药典》的要求,控制菌还需检测沙门菌^[12]。

薄膜过滤法中的分膜试验^[13]主要针对强抑菌作用药品,通过将1 mL或1 g样品分到若干膜上分别过滤冲洗,其实质是降低了单膜冲洗量,增加了整体的冲洗量,分膜主要考虑冲洗对菌的损伤及膜耐受。本研究中取供试液1 mL稀释至500 mL,再冲洗800 mL,与《中国药典》规定冲洗最多不超过1 000 mL并不违背。因为菌液是在最后1次冲洗时才加入的,冲洗对菌株没有影响,而且过滤膜可承受几千毫升的冲洗量^[13]。微生物挑战试验中,样品环节或供试液制备环节加菌,能综合评判微生物在试验环节所受的影响,从而更接近污染微