

氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法研究

毛腾霄^{1*},熊雯¹,秦玉花^{2#}(1.成都市食品药品检验研究院,成都 610041;2.成都中医药大学基础医学院,成都 610072)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2559-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.39

摘要 目的:建立氧氟沙星凝胶的微生物限度检查方法。方法:采用不同浓度的硫酸锰、氯化钙、氯化镁破胶剂制备供试液,采用薄膜过滤法检查细菌数和控制菌,同时采用常规法检查霉菌和酵母菌数。结果:不以破胶剂处理制备供试液,经常规法检查,白色念珠菌和黑曲霉的回收率均>70%;以5%硫酸锰、3%氯化钙、1%氯化镁处理制备的供试液,经薄膜过滤法检查,大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率均>70%;以破胶剂处理制备的供试液,经薄膜过滤法检查,能正常检出控制菌。结论:加入适当浓度的破胶剂能够有效消除氧氟沙星凝胶的抑菌性。所建立的方法适用于该制剂的微生物限度检查。

关键词 氧氟沙星凝胶;微生物限度检查;破胶剂;薄膜过滤法

Research on the Method of Microbial Limit Test for Ofloxacin Gel

MAO Teng-xiao¹, XIONG Wen¹, QIN Yu-hua²(1.Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610041, China; 2.Basic Medical College, Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of microbial limit test for Ofloxacin gel. METHODS: Test sample solutions were prepared by MnSO₄, CaCl₂ and MgCl₂ gelout with different concentrations, the numbers of bacteria and control bacteria were detected by membrane filtration method, and the numbers of molds and yeasts were determined by conventional method. RESULTS: The conventional method showed the recoveries of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were more than 70% after not treated by gel breaker; the membrane filtration method showed the recoveries of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were more than 70% after treated by 5% MnSO₄, 3% CaCl₂ and 1% MgCl₂; the membrane filtration method could detect the control bacteria after treated by gel breaker. CONCLUSIONS: Gel breaker with appropriate concentrations can effectively eliminate the antibacterial activity of Ofloxacin gel. The established method is suitable for its microbial limit test.

KEYWORDS Ofloxacin gel; Microbial limit test; Gel breaker; Membrane filtration method

氧氟沙星凝胶为局部外用制剂,对多种细菌有抗菌作用。按2010年版《中国药典》(二部)附录XIJ微生物限度检查方法规定,本品每1g中细菌数不得过100 CFU,霉菌和酵母菌数不得过100 CFU,金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌不得检出。由于本品抑菌性强,故采用薄膜过滤法检查细菌数,但在过滤时,发现供试液会使滤膜堵塞,原因是基质中的卡波姆在稀释液中会形成胶体溶液,导致无法滤过,故应先消除卡波姆

的影响^[1-2]。本试验利用金属离子与凝胶中的卡波姆结合形成沉淀的原理^[3],采用硫酸锰、氯化钙、氯化镁破胶剂制备供试液,考察不同离子浓度对细菌回收率的影响,建立了氧氟沙星凝胶的微生物限度检查方法并进行了方法学验证。

1 材料

1.1 仪器

SW-CJ-2FD型洁净工作台(苏净集团安泰公司);LRH 250

V/V)和甲醇-2%乙酸(48:52, V/V)]。结果发现,采用甲醇-水(50:50, V/V)为流动相时,峰形好,柱效高,分离度好且配比简单。因此,本试验选择甲醇-水(50:50, V/V)为流动相。

综上所述,本方法操作简单、便捷,结果准确,专属性好,精密度高,可用于痤疮酊的质量控制。

参考文献

[1] 解放军总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗单位制剂规范[S].1991年版.北京:人民军医出版社,1991:63.

* 农艺师,硕士。研究方向:药品微生物检验。电话:028-85362197。E-mail:pzh_maotx@126.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中西医结合基础。电话:028-61800219。E-mail:sinesister0328@163.com

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:776.

[3] 刘照振,王俊秋,李文东.HPLC法测定复方氯霉素洗剂和氯柳啶中氯霉素的含量[J].中国药房,2014,25(20):1910.

[4] 黄海波,欧阳吉德,吴美香.高效液相法测定痤疮搽剂中氯霉素、水杨酸的含量[J].国际医药卫生导报,2010,16(18):28.

[5] 赵梅,阮克宽,谷俊峰.HPLC法测定复方痤疮搽剂中氯霉素和水杨酸的含量[J].中国民族民间医药,2010,19(15):65.

(收稿日期:2015-03-05 修回日期:2015-05-14)

(编辑:申琳琳)

型生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);YT-X300型微生物限度检测仪(杭州盈天科学仪器有限公司);HVA-110型高压灭菌锅(日本Hirayama公司)。

1.2 药品与试剂

氧氟沙星凝胶(山东方明药业集团股份有限公司,批号:130225,规格:10 g/支);蛋白胨(北京三药科技开发公司,批号:130730);氯化钠(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20140210);硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$,批号:20140328)、无水氯化钙($CaCl_2$,批号:20130225)、氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$,批号:20131216)均由成都化学试剂厂提供。

1.3 菌种

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)[CMCC(B)44102];金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[CMCC(B)26003];枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[CMCC(B)63501];铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B)10104];白色念珠菌(*Candida albicans*)[CMCC(F)98001];黑曲霉(*Aspergillus niger*)[CMCC(F)98003],均为第3代菌种,由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 培养基

营养琼脂培养基(批号:140313)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1401162)、胆盐乳糖培养基(批号:130410)、营养肉汤培养基(批号:140120)、改良马丁琼脂培养基(批号:121025)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号:131205)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号:1302052)均来自北京三药科技开发公司。

2 方法与结果

2.1 菌液制备^[4]

取经35℃培养22 h的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的营养肉汤培养基培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的菌悬液,作菌落计数备用;取经25℃培养24 h的白色念珠菌改良马丁琼脂培养基斜面培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的菌悬液,作菌落计数备用;取经25℃培养7 d的黑曲霉改良马丁琼脂培养基斜面培养物,加5 ml 0.9%无菌氯化钠溶液洗下孢子,用管口带有薄纱布的无菌毛细吸管吸出孢子悬液至无菌试管中,用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至约含50~100 CFU/ml的孢子悬液,作菌落计数备用。

2.2 破胶液制备

分别称取一定量硫酸锰、氯化钙和氯化镁,加0.1%蛋白胨缓冲液配成40%的盐溶液,于121℃、15 min灭菌,备用。

2.3 供试液制备

2.3.1 供试液 I 制备 取供试品5 g,加0.1%蛋白胨缓冲液至100 ml,制成1:20供试液 I,搅拌均匀,作检查霉菌和酵母菌数用。

2.3.2 供试液 II 制备 取供试品5 g,加适量破胶液,搅拌均匀,加0.1%蛋白胨缓冲液至100 ml,分别制成含破胶剂(硫酸锰、氯化钙、氯化镁)浓度为1%、3%、5%(即每100 ml中分别含3种成分1、3、5 g)的1:20混悬液。取上述混悬液适量,以500 r/min离心3 min(相对离心力:4 360×g),收集上清液,制成供试液 II,作检查细菌数和控制菌用。

2.4 细菌、霉菌和酵母菌检查方法的建立及验证

2.4.1 常规法 (1)供试品组。取供试液 I 1 ml,平行注入2个无菌平皿,倾注营养琼脂培养基,待凝固后,于35℃培养3

d,计数,测定供试品本底细菌数。取供试液 I 1 ml,平行注入2个无菌平皿,倾注玫瑰红钠琼脂培养基,待凝固后,于25℃培养5 d,计数,测定供试品本底霉菌和酵母菌数。(2)菌液组。分别取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉5种试验菌悬液1 ml,注入平皿,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注琼脂培养基,待凝固后,置规定温度培养,测定所加试验菌数。(3)试验组。取供试液 I 1 ml和大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌悬液1 ml,分别注入平皿中,倾注营养琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平板,待凝固后,于35℃培养3 d,计数。取供试液 I 1 ml和白色念珠菌、黑曲霉悬液1 ml,分别注入平皿中,倾注玫瑰红钠琼脂培养基,每株试验菌平行制备2个平板,待凝固后,于25℃培养5 d,计数。(4)稀释剂对照组。取0.1%蛋白胨缓冲液作为稀释剂,其余操作同试验组。(5)回收率计算。试验组试验菌回收率(%)=(试验组平均菌落数-供试品组平均菌落数)/菌液组平均菌落数×100%。稀释剂对照组试验菌回收率(%)=稀释剂对照组平均菌落数/菌液组平均菌落数×100%。(6)结果分析。采用常规法检查,大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌3种试验菌的回收率均为0,说明不可采用常规法进行细菌计数;白色念珠菌、黑曲霉的回收率均高于70%,说明可采用常规法进行霉菌和酵母菌数的检查。采用常规法和稀释剂的试验菌回收率结果详见表1。

表1 采用常规法和稀释法的试验菌回收率结果(CFU)

Tab 1 Results of bacterial recoveries by conventional method and medium dilution method(CFU)

试验菌	菌液组		稀释剂对照组		试验组(常规法)		试验组(稀释法)			
			菌落数	回收率,%	菌落数	回收率,%	菌落数	回收率,%		
大肠埃希菌	76	80	75	81	100	0	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	66	72	65	68	96	0	0	0	12	10
枯草芽孢杆菌	88	93	87	82	93	0	0	0	9	13
白色念珠菌	90	85	82	86	95	85	82	95		
黑曲霉	44	46	42	45	98	40	42	91		

2.4.2 稀释法 取供试液 I 1 ml,等量分注于5个无菌平皿中,每皿0.2 ml,其余操作均同“2.4.1”项,结果详见表1。3种试验菌回收率均低于70%,应采用其他方法检查。

2.4.3 薄膜过滤法^[5] 试验组分别取含破胶剂1%、3%、5%的供试液 II 1 ml,滤过,用400 ml 0.1%蛋白胨缓冲液冲洗,每次50 ml,最后一次冲洗时分别加入1 ml大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌液。取出滤膜,菌面朝上,贴于营养琼脂培养基平板上,于35℃培养3 d,计数。供试品组、菌液组、稀释剂对照组同“2.4.1”项操作,结果详见表2~表4。由表2~表4可见,用不同浓度的破胶剂处理供试品后,试验菌回收率各有不同。硫酸锰对大肠埃希菌的最低回收浓度为5%,对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的最低回收浓度为1%;氯化钙对3种试验菌的最低回收浓度均为3%;氯化镁对3种试验菌的最低回收浓度均为1%。综合各组结果,确定硫酸锰、氯化钙、氯化镁的最低有效破胶浓度分别为5%、3%、1%。

2.5 控制菌检查方法的建立及验证

2.5.1 金黄色葡萄球菌 (1)供试液 II 制备。采用5%硫酸锰、3%氯化钙和1%氯化镁破胶制备供试液,操作同“2.3.2”项。(2)试验组。取1:20供试液 II 20 ml,每10 ml加入到500 ml 0.1%蛋白胨缓冲液中,按薄膜过滤法检查,用500 ml 0.1%蛋白胨缓冲液冲洗5次,每次100 ml,在最后一次冲洗液中加

表2 不同浓度硫酸锰处理对试验菌回收率的影响(CFU)
Tab 2 The effects of MnSO₄ with different concentrations on bacterial recoveries(CFU)

浓度,%	试验菌	菌液组	试验组		稀释剂对照组	
			菌落数	回收率,%	菌落数	回收率,%
1	大肠埃希菌		41	39	48	
3	大肠埃希菌	80 88	55	61	69	85 82 99
5	大肠埃希菌		63	67	77	
1	金黄色葡萄球菌		66	70	92	
3	金黄色葡萄球菌	72 76	68	73	95	67 73 95
5	金黄色葡萄球菌		66	70	92	
1	枯草芽孢杆菌		62	67	79	
3	枯草芽孢杆菌	79 85	66	73	85	86 88 106
5	枯草芽孢杆菌		67	70	84	

表3 不同浓度氯化钙处理对试验菌回收率的影响(CFU)
Tab 3 The effects of CaCl₂ with different concentrations on bacterial recoveries(CFU)

浓度,%	试验菌	菌液组	试验组		稀释剂对照组	
			菌落数	回收率,%	菌落数	回收率,%
1	大肠埃希菌		39	44	57	
3	大肠埃希菌	70 76	53	55	74	66 69 92
5	大肠埃希菌		55	61	79	
1	金黄色葡萄球菌		61	58	68	
3	金黄色葡萄球菌	85 90	65	69	77	80 86 95
5	金黄色葡萄球菌		72	74	83	
1	枯草芽孢杆菌		65	62	69	
3	枯草芽孢杆菌	88 95	71	75	80	81 85 91
5	枯草芽孢杆菌		77	80	86	

入1 ml金黄色葡萄球菌悬液。将过滤后的2张滤膜一并接种至200 ml营养肉汤培养基中,于35℃培养20 h后,取培养物,划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上,依法检查。(3)

表5 采用薄膜过滤法的控制菌检查验证试验结果

Tab 5 Validation results of control bacteria by membrane filtration method

控制菌检查	培养基	试验组			供试品组		
		5%硫酸锰	3%氯化钙	1%氯化镁	5%硫酸锰	3%氯化钙	1%氯化镁
金黄色葡萄球菌	营养肉汤	+	+	+	-	-	-
	甘露醇氯化钠琼脂	+	+	+	-	-	-
铜绿假单胞菌	胆盐乳糖	+	+	+	-	-	-
	溴化十六烷基三甲胺琼脂	+	+	+	-	-	-

3 讨论

本试验对3种常用破胶剂在不同浓度下对细菌回收率的影响进行了研究。结果表明,硫酸锰的最低有效破胶浓度为5%,氯化钙为3%,氯化镁为1%。破胶剂本身无抑菌作用^[6],可以用来处理供试品。在采用薄膜过滤法检查细菌数时,应采用少量多次冲洗的方法尽可能消除抑菌性。

现根据验证结果将氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法总结如下:取本品5 g,加入破胶剂,用0.1%蛋白胍缓冲液稀释制成1:20混悬液,取一定量混悬液,以500 r/min离心3 min(相对离心力:4 360×g),取上清液作检查用供试液。细菌计数采用薄膜过滤法,取1 ml供试液过滤,用400 ml 0.1%蛋白胍缓冲液冲洗;霉菌和酵母菌计数采用常规法(可不用破胶剂处理);检查金黄色葡萄球菌和铜假胞单胞菌时,采用薄膜过滤法,取20 ml破胶后供试液分2次过滤,每次10 ml(冲洗量500 ml),合并2张滤膜接种至200 ml营养肉汤和胆盐乳糖培养基中,依法检查^[4],应符合规定。

表4 不同浓度氯化镁处理对试验菌回收率的影响(CFU)
Tab 4 The effects of MgCl₂ with different concentrations on bacterial recoveries(CFU)

浓度,%	试验菌	菌液组	试验组		稀释剂对照组	
			菌落数	回收率,%	菌落数	回收率,%
1	大肠埃希菌		70	72	86	
3	大肠埃希菌	80 86	75	78	92	82 88 102
5	大肠埃希菌		79	83	98	
1	金黄色葡萄球菌		60	65	83	
3	金黄色葡萄球菌	79 72	64	69	88	69 71 93
5	金黄色葡萄球菌		66	75	93	
1	枯草芽孢杆菌		69	77	82	
3	枯草芽孢杆菌	86 92	81	86	94	84 89 97
5	枯草芽孢杆菌		80	85	93	

供试品组。除不加试验菌外,其余操作同试验组。(4)结果分析。试验组检出金黄色葡萄球菌,供试品组未检出,说明可采用该方法检查金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌检查验证试验结果详见表5(表中,“+”表示有控制菌检出,“-”表示无控制菌检出)。

2.5.2 铜绿假单胞菌 (1)供试液Ⅱ制备。参见“2.5.1”项。(2)试验组。取1:20供试液Ⅱ 20 ml,每10 ml加入到0.1%蛋白胍缓冲液中,按薄膜过滤法检查,用500 ml 0.1%蛋白胍缓冲液冲洗5次,每次100 ml,在最后一次冲洗液中加入1 ml铜绿假单胞菌悬液。将过滤后的2张滤膜一并接种至200 ml胆盐乳糖培养基中,于35℃培养20 h后,取培养物,划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上,依法检查。(3)供试品组。除不加试验菌外,其余操作同试验组。(4)结果分析。试验组检出铜绿假单胞菌,供试品组未检出,说明可采用该方法检查铜绿假单胞菌。铜绿假单胞菌检查验证试验结果详见表5。

参考文献

- [1] 毕宏生,苏卫华,郭俊国,等.丝裂霉素C眼用凝胶的制备及质量控制[J].生物医学工程研究,2011,30(3):181.
- [2] 刘超英,张慧慧.HPLC法测定复方苯妥英钠凝胶剂中苯妥英钠的含量[J].中国药师,2012,15(3):345.
- [3] 钱文静,张玫,袁耀佐.盐酸特比萘芬凝胶微生物限度检查方法的验证[J].药物分析杂志,2008,28(12):2 135.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010;附录XIJ.
- [5] 桑国卫.中国药品检验标准操作规范[S].北京:中国医药科技出版社,2005:325.
- [6] 赫爱平,张亚杰,郎非,等.加替沙星眼用凝胶中微生物检查法的建立[J].华西药学杂志,2008,23(6):701.

(收稿日期:2014-12-12 修回日期:2015-05-06)

(编辑:周 箭)