

氧氟沙星滴眼液的抑菌效力测定

李昊^{1*}, 邹宇¹, 张帆², 张亚杰¹(1.辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036; 2.沈阳三生制药有限责任公司, 沈阳 110027)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0841-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.33

摘要 目的:建立测定氧氟沙星滴眼液抑菌效力的方法。方法:按照2015年版《中国药典》“抑菌效力检查法”项下要求,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、黑曲霉和白色念珠菌为试验菌,对氧氟沙星滴眼液样品进行菌落计数方法适用性试验,并按该试验确定的方法测定不同时间点的存活菌数,计算1 mL供试品中各试验菌所加的菌数及各间隔时间的菌数,并换算成lg值。结果:氧氟沙星滴眼液样品能达到“B”的抑菌效力标准。结论:采用该方法可有效判定氧氟沙星滴眼液的抑菌效力是否达标。

关键词 氧氟沙星滴眼液;菌落计数;抑菌效力检查法

Determination of Antibacterial Effect of Ofloxacin Eye Drop

LI Hao¹, ZOU Yu¹, ZHANG Fan², ZHANG Yajie¹(1.Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China; 2.Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co. Ltd., Shenyang 110027, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of antibacterial effect of Ofloxacin eye drop. METHODS: According to the requirements in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition) “antibacterial effect test”, using *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* as test bacteria, colony count method suitability test was conducted for Ofloxacin eye drop samples, the verified method was used to determine the number of viable bacteria at each time point, calculate the bacteria number of 1 mL in the sample and the number of bacteria at each time point and convert to lg value. RESULTS: Ofloxacin eye drop sample can reach the standard of antibacterial effectiveness of the “B”. CONCLUSIONS: The method can effectively determine whether the antibacterial effect of Ofloxacin eye drop fits the standard.

KEYWORDS Ofloxacin eye drop; Colony count; Antibacterial effect test method

氧氟沙星滴眼液在临床上常用于细菌性结膜炎和角膜炎的治疗,具有良好的效果及安全性,能在较短时间内控制感染^[1]。而眼用制剂常为多剂量包装,需要加入抑菌剂抑制微生物的生长与繁殖,以保证产品的质量和疗效^[2]。抑菌剂通过干扰微生物的生长、繁殖和新陈

代谢过程发挥抑菌作用^[3]。氧氟沙星滴眼液虽为广谱抗菌药物,但是在生产、贮藏、运输以及反复使用和开启包装过程中,仍然有污染微生物的风险^[4],故亦需要加入抑菌剂。从2015年版《中国药典》开始,将“抑菌效力检查法”由以往的指导原则变为正式检查项目。本试验按照

- 质增生症 60 例[J]. 中国药业, 2012, 21(8): 93-94.
- [4] 国家卫生部. 卫生部药品标准: 中药成方制剂: 第 7 册[S]. 北京: 化学工业出版社, 1993: 74-75.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[S]. WS3-B-1338-93-1.
- [6] 刘湘豫, 彭词艳, 胡焰, 等. 抗骨增生片制备工艺及质量标准研究[J]. 中南药学, 2013, 11(8): 572-574.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57-57.
- [8] 杨立芳, 宋文著. 高效液相色谱法测定抗骨增生丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2006, 17(18): 1420-1422.
- [9] 杨小妹, 朱俊彦. 高效液相色谱法测定抗骨增生片中淫羊藿苷含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(4): 314-315.
- [10] 刘淑娟, 张妮瑜, 辛秀, 等. 抗骨增生片定性定量方法研究[J]. 中南药学, 2014, 12(6): 574-575.
- [11] 顾利红, 张莹. HPLC 测定护心胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1092-1094.
- [12] 杨增明. HPLC 法测定淫羊藿苷含量研究[J]. 中国药品标准, 2008, 9(1): 143-144.
- [13] 蒋桂平. 高效液相色谱法测定抗骨增生丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中南药学, 2008, 6(3): 322-323.
- [14] 张贵财, 朱旭江, 杜兴, 等. HPLC 法测定兰州肉苁蓉中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 801-803.
- [15] 柴茂, 董诚明, 江道会, 等. 不同品种怀地黄中梓醇和毛蕊花糖苷的高效液相色谱法测定[J]. 中医学报, 2013, 28(5): 690-692.

(收稿日期: 2016-02-06 修回日期: 2016-02-26)

(编辑: 张静)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 微生物检验。电话: 024-31266313。E-mail: h-o-lee@163.com

2015年版《中国药典》“通则1121”“抑菌效力检查法”项下要求对氧氟沙星滴眼液的抑菌效力进行测定,以判定其抑菌效力是否达标。

1 材料

1.1 仪器

HF safe-1500型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);KB240型恒温培养箱(德国Binder公司);HVE-50型全自动高压灭菌锅(日本Hirayama公司);YX930D型电动吸引器(上海医疗器械工业公司医用吸引器厂)。

1.2 药品

氧氟沙星滴眼液(辽宁某企业生产,规格:8 mL:24 mg,批号:15021,使用的抑菌剂是羟苯乙酯,抑菌剂含量为0.025%)。

1.3 菌种

大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均由中国食品药品检定研究院提供,菌株传代数均为第四代。

1.4 培养基和试剂

胰酪酪大豆琼脂培养基(TSA,美国BD公司,批号:1221965);沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,北京陆桥技术股份有限公司,批号:141030);氯化钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20141029);pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(青岛蓝雁绿检生物技术有限公司,批号:20150212)。培养基适用性检查试验结果符合2015年版《中国药典》要求。

2 方法

2.1 菌液制备

取经33℃培养24h的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的TSA斜面培养物适量,用接种环研细并加入到0.9%无菌氯化钠溶液中,制成适宜浓度的菌悬液。

取经24℃培养24h的白色念珠菌的SDA斜面培养物适量,用接种环研细并加入到0.9%无菌氯化钠溶液中,制成适宜浓度的菌悬液。

取经24℃培养7d的黑曲霉的SDA斜面培养物适量,加5 mL含0.05%(V/V)聚山梨酯-80的0.9%无菌氯化钠溶液,洗下霉菌孢子,制成适宜浓度的孢子悬液。

2.2 菌落计数方法适用性试验

2.2.1 供试液制备 取样品10 mL,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,振荡使分散均匀,作为1:10供试液。

2.2.2 细菌计数(薄膜过滤法) 取“2.2.1”项下1:10供

试液1 mL,溶于pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL中,薄膜滤过,用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,总冲洗量为1 000 mL,每次冲洗50 mL,在最后一次冲洗液中加入50~100 cfu试验菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌或铜绿假单胞菌),滤过,依法进行计数。

2.2.3 真菌计数(常规法) 取“2.2.1”项下1:10供试液9.9 mL,2份,分别加入2种试验菌(白色念珠菌、黑曲霉)0.1 mL(含菌量约为 10^4 cfu/mL),混匀,立即分别取1 mL注入平皿,倾注SDA,按平皿法测定其菌落数。

2.2.4 回收率测定 回收率=(试验组菌数-供试液对照组菌数)/菌液组菌数 \times 100%。试验组菌数:分别按“2.2.2”“2.2.3”项下的菌落计数方法进行试验,计算供试液的平均菌落数;菌液组菌数:测定加入样品的每一株菌的菌数;供试液对照组菌数:取“2.2.1”项下1:10供试液1 mL,按上述菌落计数方法测定样品本底菌数。

2.3 抑菌效力测定

2.3.1 供试品接种 试验组:取包装完整的样品5瓶,分别依次接种上述金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉菌悬液80 μ L,使其最终菌浓度为 $10^5\sim 10^6$ cfu/mL,使样品与试验菌充分混合均匀。置于20~25℃避光保存。

菌液组:取5个无菌试管,分别加入0.9%无菌氯化钠溶液8 mL,然后分别接种上述金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉菌悬液80 μ L,使其最终菌浓度为 $10^5\sim 10^6$ cfu/mL,充分混合均匀,依次10倍梯度稀释,分别吸取各稀释度菌液1 mL,注入平皿中,倾注相应琼脂培养基,培养,计数,计算出相当于1 mL样品中各试验菌所加的菌数。

2.3.2 存活菌数测定 本品为眼用制剂,按2015年版《中国药典》“通则1121”“抑菌效力检查法”项下要求,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌分别于接种试验菌后的6 h、24 h、7 d、28 d测定供试品中所含菌数,从上述添加试验菌的样品中取1 mL,依次10倍梯度稀释,吸取适宜计数的梯度的供试品溶液适量,按照氧氟沙星滴眼液方法适用性试验所确定的菌落计数方法,采用TSA,测定供试液中所含的细菌数;白色念珠菌和黑曲霉分别于接种试验菌后的7、14、28 d测定样品中所含菌数,从上述添加试验菌的样品中取1 mL,依次10倍梯度稀释,吸取适宜计数的梯度的样品溶液适量,按照氧氟沙星滴眼液方法适用性试验所确定的菌落计数方法,采用SDA,测定供试液中所含的真菌数。

根据存活菌数测定结果,计算1 mL样品各试验菌所加的菌数及各间隔时间的菌数,并换算成lg值。

3 结果

3.1 菌落计数方法适用性试验结果

氧氟沙星滴眼液样品细菌数、真菌数菌落计数及回收率测定结果见表1。结果表明,在3次独立的平行试验中,薄膜过滤法测定细菌数、常规法测定真菌数的回收率均>70%。根据此结果,确定氧氟沙星滴眼液样品微生物限度检查法细菌计数可采用薄膜过滤法,真菌计数可采用常规法。

表1 菌落计数及回收率结果

Tab 1 Colony count and the recovery results

试验菌种	菌种代数	培养基	试验次数	供试液对照组菌数,cfu	菌液组菌数,cfu	试验组菌数,cfu	试验组回收率,%
大肠埃希菌	第四代	TSA	1	0	80	63	79
			2	0	68	60	88
			3	0	69	57	83
金黄色葡萄球菌	第四代	TSA	1	0	90	81	90
			2	0	60	52	87
			3	0	74	62	84
铜绿假单胞菌	第四代	TSA	1	0	63	55	87
			2	0	75	62	83
			3	0	76	65	86
白色念珠菌	第四代	SDA	1	0	75	65	87
			2	0	62	50	81
			3	0	81	70	86
黑曲霉	第四代	SDA	1	0	58	48	83
			2	0	56	50	89
			3	0	50	42	84

3.2 抑菌效力测定结果

氧氟沙星滴眼液样品抑菌效力测定结果见表2。

表2 抑菌效力测定结果

Tab 2 Determination results of antibacterial effectiveness

组别及接种时间	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌	黑曲霉
菌液组菌数,cfu/mL	55×10^5	72×10^5	64×10^5	47×10^4	18×10^4
菌液组lg值	6.74	6.86	6.81	5.67	5.26
试验组6h菌数,cfu/mL	82×10^5	12×10^5	<10		
试验组6h的lg值	4.91	6.08	<1		
试验组24h菌数,cfu/mL	47×10^5	44×10^4	<10		
试验组24h的lg值	3.67	5.64	<1		
试验组7d菌数,cfu/mL	<10	41×10	<10	12×10^2	12×10^3
试验组7d的lg值	<1	2.61	<1	3.08	4.08
试验组14d菌数,cfu/mL				<10	10×10^3
试验组14d的lg值				<1	4
试验组28d菌数,cfu/mL	<10	<10	<10	<10	12×10
试验组28d的lg值	<1	<1	<1	<1	2.08

由表2可知,试验组的细菌数与菌液组相比,各菌种6h菌数lg值下降不能全部达到2,24h菌数lg值下降不能全部达到3,而能够全部>1,7d菌数lg值下降能够全部>3,而28d菌数lg值未再增加。本品为眼用制剂,按2015年版《中国药典》“通则1121”“抑菌效力检查法”项下要求,氧氟沙星滴眼液样品对细菌能达到“B”的抑菌效力标准。试验组的真菌数与菌液组相比,各菌种7d菌数lg值下降不能全部达到2,14d菌数lg值下降全部>1,而28d菌数lg值未再增加。本品为眼用制剂,按

2015年版《中国药典》“通则1121”“抑菌效力检查法”项下要求,氧氟沙星滴眼液样品对真菌能达到“B”的抑菌效力标准。

综上所述,氧氟沙星滴眼液样品达到“B”的抑菌效力标准。采用2015年版《中国药典》“通则1121”“抑菌效力检查法”项下方法可有效地判定氧氟沙星滴眼液的抑菌效力是否达标。

4 讨论

眼用制剂的抑菌剂要求对眼睛的刺激性较小,适用的抑菌剂根据结构和化学性质可以分为有机汞类、季铵盐类、醇类、酯类和酸类^[5]。本试验考察的氧氟沙星滴眼液中的抑菌剂是酯类的羟苯乙酯。羟苯乙酯适宜的pH范围很大,且具有广谱抗菌活性,其水溶液在pH3~6的范围内可热压灭菌不发生降解^[6]。本试验结果显示,氧氟沙星滴眼液加入0.025%的抑菌剂羟苯乙酯后能够达到“B”的抑菌效力标准。

药品生产企业在筛选抑菌剂时应采用最低有效浓度,既要达到抑制微生物生长的目的,又要使抑菌剂对眼睛的刺激和损害降至最低^[7]。氧氟沙星滴眼液抗细菌作用较强,对霉菌、酵母菌的抑制作用较弱,采用抑制霉菌、酵母菌作用较强且毒性较小的羟苯乙酯作为抑菌剂较为适宜。抑菌剂的正确选择与合理使用是一项系统工程,需要根据产品特点、贮藏条件等因素进行抑菌效力试验,选择合理的抑菌剂,以确保产品安全、有效和稳定^[7-8]。

参考文献

- [1] 阙全程,于玲,张晓坚,等.氧氟沙星滴眼液临床疗效探讨[J].河南医药信息,2000,8(1):44-45.
- [2] 张世磊,白若琬,李津,等.萘敏维滴眼液的抑菌效力测定[J].食品与药品,2011,13(1):42-44.
- [3] 宁黎丽,赵德恒.对多剂量眼用制剂不添加抑菌剂的思考[J].中国新药杂志,2009,18(7):589-591.
- [4] 梁光江,王延东,叶成添,等.滴眼剂中常用几种抑菌剂的应用和观察[J].今日药学,2010,20(3):43-44.
- [5] 安彦.眼用制剂中抑菌剂的应用与质量控制[J].天津药学,2011,23(1):56-58.
- [6] 张世磊,贺艳丽.眼用制剂中抑菌剂的应用[J].食品与药品,2010,12(9):343-347.
- [7] 尚悦,韩鹏,许华玉.关于眼用制剂中添加抑菌剂的思考[J].中国药品标准,2014,15(1):12-15.
- [8] 宁黎丽.眼用制剂研发过程中应关注抑菌剂的合理使用和质量控制[J].中国药学杂志,2007,42(23):1836-1838.

(收稿日期:2016-03-02 修回日期:2017-01-12)

(编辑:周 箐)