

箱、MJ-160B霉菌培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 样品

盐酸左氧氟沙星片[江西制药有限责任公司,批号:1301018、1304064、1307118,规格:每片0.1 g(以左氧氟沙星计)]。

1.3 稀释液与试剂

稀释液为pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(广东环凯微生物科技有限公司,批号:3102112);硫酸镁(佛山西陇化工有限公司,批号:20121017)。

1.4 培养基

胆盐乳糖培养基(批号:130126)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:130216)、营养琼脂培养基(批号:130126)、营养肉汤培养基(批号:121026)、改良马丁培养基(批号:120912)、改良马丁琼脂培养基(批号:121012)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(批号:120915)、胆盐乳糖增菌培养基(批号:121015)、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基(批号:121026)均来自北京路桥技术有限责任公司。

1.5 验证菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B) 63501]、大肠埃希菌[CMCC(B) 44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均来自中国医学菌种中心。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

参照2010年版《中国药典》附录^[9],接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,置于33℃培养20 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中25℃培养24 h,然后分别用0.9%无菌氯化钠溶液10倍递增稀释,制成50~100 CFU/ml的菌悬液;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中培养6 d,加入5 ml含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液至无菌试管中,用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液10倍递增稀释,制成50~100 CFU/ml的孢子悬液,备用。

2.2 供试液制备

取供试品10 g,置于研钵中研细,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 ml,振摇混匀,静置30 min,取上清液作为1:10供试液。

2.3 回收率的测定

2.3.1 细菌数薄膜过滤法测定。

(1)试验组。由于左氧氟沙星对细菌具有较强的抑菌作用,故采用薄膜过滤法和薄膜过滤法(不同冲洗量的冲洗液)加中和剂硫酸镁去除抑菌性,方法见A~E。

A:取1:10供试液1 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,用稀释液500 ml分5次冲洗,在最后一次冲洗液中加入50~100 CFU试验菌,过滤,取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基平板上,置于30~35℃培养24~72 h,逐日观察结果,统计菌落数。

B:取1:10供试液1 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液500 ml分5次冲洗,其余操作同“A”。

C:取1:10供试液1 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液800 ml分8次冲洗,其余操作同“A”。

D:取1:10供试液1 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液300 ml分3次冲洗,在最后一次冲洗液中加入50~100 CFU试验菌,过滤,取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基平板上(加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml),置于30~35℃培养24~72 h逐日观察结果,统计菌落数。

E:取1:10供试液1 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液500 ml分5次冲洗,其余操作同“D”。

(2)菌液组。以1 ml稀释液替代供试液,照“(1)项下A、B、C、D、E”试验组方法处理后,立即贴膜于营养琼脂培养基平板上(加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml),置于30~35℃培养24~72 h,逐日观察结果,统计菌落数。

(3)供试品对照组。取1:10供试液1 ml,照“(1)项下A、B、C、D、E”试验组方法处理后(不加试验菌),立即贴膜于营养琼脂培养基平板上(加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml),置于30~35℃培养24~72 h,逐日观察结果,统计菌落数。

2.3.2 霉菌及酵母菌平皿法测定。

(1)试验组。取1:10供试液1 ml及50~100 CFU/ml试验菌1 ml同时加入平皿中,立即注入15~20 ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于23~28℃培养24~120 h,逐日观察结果,统计菌落数。

(2)菌液组。取稀释液1 ml及50~100 CFU/ml试验菌1 ml同时加入平皿中,立即注入15~20 ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于23~28℃培养24~120 h,逐日观察结果,统计菌落数。

(3)供试品对照组。取1:10供试液1 ml,立即注入15~20 ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于23~28℃培养24~120 h,逐日观察结果,测定供试品本底菌数。

2.3.3 回收率的计算。

按如下公式计算试验组的加菌回收率,结果见表1。

试验组的加菌回收率=(试验组的平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数)/菌液组的平均菌落数×100%。

表1 不同方法各试验菌平均回收率结果(% , n=3)

Tab 1 Average recovery rate of test bacterial by different methods(% , n=3)

| 菌种 | 平皿法 | 薄膜过滤法 | | | | |
|---------|-----|-------|----|----|----|----|
| | | A | B | C | D | E |
| 金黄色葡萄球菌 | / | 0 | 20 | 30 | 60 | 98 |
| 大肠埃希菌 | / | 0 | 10 | 25 | 65 | 82 |
| 枯草芽孢杆菌 | / | 0 | 50 | 60 | 75 | 80 |
| 白色念珠菌 | 90 | / | / | / | / | / |
| 黑曲霉 | 82 | / | / | / | / | / |

注:“/”为空白,表示未试验

note:“/” means blank, no test

2.3.4 结果。

从表1结果可以看出,采用薄膜过滤法,用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液500 ml分5次冲洗,琼脂培养基中加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml后(即方法E),3种细菌菌株的回收率均大于

表3 硫酸镁对3种试验菌生长的影响

Tab 3 Effects of magnesium sulfate on the growth of 3 kinds of test bacterials

| 菌种 | 菌落数 | |
|---------|------------------------------|-----------|
| | 含1 mol/L 硫酸镁溶液1 ml的营养琼脂培养基平板 | 营养琼脂培养基平板 |
| 大肠埃希菌 | 62 | 65 |
| 金黄色葡萄球菌 | 75 | 78 |
| 枯草芽孢杆菌 | 70 | 70 |

2.6 样品检查

取其余2批盐酸左氧氟沙星片样品,按“2.2”项下方法制备供试液,采用“2.3.1(1)项下E”方法进行细菌检查,“2.3.2”项下方法进行霉菌及酵母菌检查,“2.4”项下方法进行控制菌检查,结果均符合规定。

3 讨论

杨小春^[9]等采用离心加薄膜过滤法进行了盐酸左氧氟沙星胶囊的细菌微生物限度检查;而本文采用薄膜过滤法,供试液无需离心处理,故操作更简单。

在对具有抗菌活性的药品进行微生物限度检查时,应首先消除其抗菌活性^[6]。盐酸左氧氟沙星具有较强的抗菌活性,单纯采用薄膜过滤法,不能去除抗菌活性。从喹诺酮类药化学性质方面进行分析,该药与金属离子(Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+})等络合能形成稳定的六元环络合物,掩盖其活性基团,使抗菌活性消失^[7];有文献表明,金属离子与喹诺酮类药可发生络合反应,显著降低其抑菌作用^[4]。因此笔者首先分别用500、800 ml含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液每次100 ml进行冲洗,但均不能消除该药物对3种试验菌的抗菌作用,回收率均低于70%。考虑到药物与 Mg^{2+} 反应时间较短,随后在培养基中加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml,分别用300、500 ml含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液每次100 ml进行冲洗,其中300 ml冲洗后仅有枯草芽孢杆菌回收率大于70%,500 ml冲洗后能消除该药物对3种试验菌的抗菌作用,回收率均高于70%,符合要求。

参考文献

- [1] 朱莉贞,傅瑜,初乃惠,等.利福类联合多种药物长疗程治疗方案治疗耐药药肺结核[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(8):520.
- [2] 颜永芽,周燕文,石全,等.盐酸左氧氟沙星片人体药理学及生物等效性研究[J].中国药房,2008,19(26):2 033.
- [3] 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.
- [4] 刘兴兰,汤玖安,文小玲.比浊法测定制霉菌素含量的研究[J].药物分析杂志,2005,25(3):358.
- [5] 杨小春,谢家军.盐酸左氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法的建立[J].实用医技杂志,2011,11(18):1 173.
- [6] 李玉芹.浅谈目前无菌检查和微生物限度检查存在的问题[J].中国药事,2007,21(12):1 011.
- [7] 张光华,余立,刘文杰.硫酸锰在几种喹诺酮类药物无菌检查中的应用[J].中国药品标准,2008,9(1):35.

(收稿日期:2013-10-15 修回日期:2014-03-05)

70%;采用平皿法,白色念珠菌及黑曲霉的回收率均大于70%,平行3次试验结果均符合要求。因此,细菌检查可采用薄膜过滤法(用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液500 ml分5次冲洗,琼脂培养基中加入1 mol/L硫酸镁溶液1 ml)测定,酵母及霉菌检查可采用平皿法。

2.4 控制菌检查方法的验证

2.4.1 供试液的制备。

同“2.2”项下方法制备。

2.4.2 试验组。

取供试液10 ml注入微生物限度用薄膜过滤器中,分别用含0.1 mol/L硫酸镁的稀释液100、300 ml冲洗,每次100 ml,加入50~100 CFU大肠埃希菌试验菌(将试验菌加入最后一次冲洗液中),取滤膜加入100 ml的胆盐乳糖增菌培养基液中,置于35℃培养24 h。取上述培养物0.2 ml,接种至含5 ml MUG培养基的试管内培养,于5.24 h在366 nm紫外线下观察,同时用未接种的MUG培养基作本底对照。观察后,沿管壁加入数滴靛基质试液,观察。同时取胆盐乳糖培养基的培养物划线接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基,培养18~24 h,观察有无典型菌落生长。

2.4.3 阴性对照组。

取稀释液10 ml照“2.4.2”试验组方法处理(不加试验菌),观察有无菌落生长,结果见表2。

表2 大肠埃希菌检查方法方法学验证试验结果

Tab 2 Methodology validation results of *E. coli* test

| 大肠埃希菌检查 | 试验组 | | 阴性对照组 |
|-----------|--------|--------|-------|
| | 100 ml | 300 ml | |
| 胆盐乳糖增菌培养基 | - | + | - |
| MUG 靛基质试验 | -- | ++ | -- |
| 曙红亚甲蓝琼脂平板 | 无菌落生长 | 典型菌落生长 | 无菌落生长 |
| 加入菌数(CFU) | 86,80 | | / |

注:“+”为阳性,“-”为阴性,“/”为空白

note:“+” means positive,“-” means negative,“/” means blank

2.4.4 结果。

从表2结果可以看出,盐酸左氧氟沙星片控制菌(大肠埃希菌)检查采用薄膜过滤法,采用含0.1 mol/L硫酸镁稀释液300 ml冲洗,每次100 ml。试验组MUG呈现荧光,MUG阳性,靛基质试液液面呈玫瑰红色,阴性对照组未检出试验菌,试验组均检出试验菌。表明该法可消除该药物的抑菌成分,可用于控制菌的检查。

2.5 硫酸镁溶液对试验的影响

参考文献^[9],本文考察了含1 mol/L硫酸镁溶液1 ml的营养琼脂培养基平板对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及枯草芽孢杆菌生长的影响情况。分别取50~100 CFU试验菌注入微生物限度用薄膜过滤器中,用稀释液100 ml冲洗,取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基平板和含1 mol/L硫酸镁溶液1 ml的营养琼脂培养基平板上,置于30~35℃培养24~72 h,逐日观察结果,统计菌落数。结果表明,含1 mol/L硫酸镁溶液1 ml的营养琼脂培养基平板对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及枯草芽孢杆菌生长均未见明显影响,结果见表3。