

盐酸莫西沙星微生物检验技术的应用研究

焦明辉 李彩华 李丹丹
天方药业有限公司 河南 驻马店 463000

摘要: 目的根据现行的《中国药典》(2020版)要求,建立盐酸莫西沙星原料药微生物限度检验方法。方法微生物计数中的需氧菌计数检查法采用中和剂联合薄膜过滤法,霉菌和酵母菌计数检查法采用平皿法,大肠埃希菌检查采用中和剂联合薄膜过滤法,中和剂使用0.1%的硫酸镁溶液。结果采用以上方法试验组微生物回收率在0.7-1.0之间,符合2020年版《中国药典》的0.5-2.0的规定,可用于此药品微生物检验的质量控制。结论 薄膜过滤联合中和剂硫酸镁能有效消除盐酸莫西沙星的抑菌抗菌活性,能作为盐酸莫西沙星原料药的微生物检查。

关键词: 盐酸莫西沙星; 微生物限度; 薄膜过滤法; 中和剂

盐酸莫西沙星为全身用抗菌药可用于急性细菌性鼻窦炎、慢性支气管炎急性发作、社区获得性肺炎、非复杂性皮肤和皮肤组织感染等疾病的治疗。莫西沙星为第四代新型的氟喹诺酮类抗生素,它对革兰阳性杆菌(金黄色葡萄球菌等)、革兰阴性菌(大肠杆菌等)、厌氧菌与非典型病原体均有良好的抗菌活性。盐酸莫西沙星含有喹诺酮环分子结构,此分子结构能与金属离子发生络合反应,能引起盐酸莫西沙星的抗菌活性下降,所以可以选择含镁离子的硫酸镁或氯化镁作为中和剂降低该药物的抗菌活性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

HTY-305S微生物检测仪; VC-S-1300型 净化工作台; XG1.DWX-0.36D灭菌柜; BSC-1300IIA2生物安全柜; BD-SPX-430需氧菌培养箱; BD-SPX-250霉菌和酵母菌培养箱; BD-SPX-430大肠埃希菌培养箱。

1.2 试剂

盐酸莫西沙星原料药(批号201106004 201206001 201206002); 胰酪大豆胨琼脂干粉培养基(每100ml中含0.1mol/L硫酸镁溶液5ml); 沙氏葡萄糖琼脂干粉培养基; 胰酪大豆胨液体培养基(每100ml中含0.1mol/L硫酸镁溶液5ml), 麦康凯液体培养基; 麦康凯琼脂培养基; 上述培养基均已经过培养基的适用性检查,满足现行《中国药典》的要求; 7水硫酸镁; 磷酸二氢钾; 氢氧化钠。

1.3 菌种

铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]白色念珠菌[CMCC(F)98001]黑曲霉[CMCC(F)98003]大肠埃希菌[CMCC(B)44102]来源:

中国食品药品检定研究院

2 方法与结果

2.1 菌液及缓冲液制备

按2020版《中国药典》的方法分别制备金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等适宜浓度的菌悬液。制备后将它们保存在2~8℃冰箱,当天内使用。

缓冲液配制:取0.2mol/L磷酸二氢钾溶液250ml加入0.2mol/L氢氧化钠溶液118ml,用水稀释至1000ml,摇匀,过滤灭菌备用。

2.2 供试液的制备

称取规定量的供试品10g,至三角瓶中,加缓冲液至100ml,振摇、搅拌5分钟使其混合均匀,作为1:10的供试品原液,静置备用。

2.3 需氧菌总数计数采用的方法:中和剂联合薄膜过滤法(滤膜孔径0.45μm,直径为50mm)

2.3.1 试验组:取上述制备好的供试品原液上清液1ml(相当于供试品0.1g),加入至400ml稀释液中,搅拌、振摇使其溶解后,加入中和剂60ml,混合均匀,作为供试液。静置约3分钟后,使用微生物限度检测仪将供试液过滤,全部过滤完成后,用冲洗液冲洗滤膜,每次进行冲洗100ml,总量冲洗500ml。在最后100ml的冲洗液中添加不大于100cfu的金黄色葡萄球菌菌悬液,进行过滤冲洗后,取出滤膜,菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂平板培养基表面上,将其倒置在30~35℃的培养箱中,培养3天,每日观察并计数。照上述同样的方法,分别以铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌为试验菌进行试验,于30~35℃的培养箱中倒置3天,并逐日观察计数;分别以白色念珠菌、黑曲霉为试验菌进行试验,于30~35℃的培养箱中倒置培养5天,计数。

2.3.2 菌液对照组：分别取缓冲液（不含中和剂）替代供试液，加入金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、黑曲霉、白色念珠菌菌液，同试验组操作，作为菌液对照组。

2.3.3 中和剂对照组：分别取缓冲液（含中和剂硫酸镁）替代供试液，加入金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆

菌、铜绿假单胞菌、黑曲霉、白色念珠菌菌液，同试验组操作，作为中和剂对照组。

2.3.4 需氧菌总数计数方法适用性结果

需氧菌总数计数试验微生物回收如下表1(胰酪大豆胨琼脂培养基)：

表1 需氧菌总数计数方法验证结果

批号	试验菌	试验组	菌液对照组	中和剂对照组	试验组菌落数回收比值	中和剂对照组菌落数回收比值
201106004		54cfu			0.81	
201206001	铜绿假单胞菌	57cfu	67cfu	68cfu	0.84	1.01
201206002		55cfu			0.82	
201106004		60cfu			0.75	
201206001	金黄色葡萄球菌	59cfu	80cfu	77cfu	0.73	0.96
201206002		63cfu			0.79	
201106004		58cfu			0.79	
201206001	枯草芽孢杆菌	61cfu	73cfu	71cfu	0.82	0.97
201206002		56cfu			0.77	
201106004		78cfu			0.94	
201206001	白色念珠菌	81cfu	83cfu	79cfu	0.96	0.95
201206002		75cfu			0.90	
201106004		70cfu			0.93	
201206001	黑曲霉	72cfu	75 cfu	73cfu	0.95	0.97
201206002		71cfu			0.95	

注：表中菌落数回收率等于试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值除以菌液对照组菌落数。

结果分析：取供试品溶液上清液，采用薄膜过滤法联合中和剂（硫酸镁），能够有效的抑制盐酸莫西沙星中的抗菌活性，使得试验组菌落数回收比值和中和剂对照组菌落数回收比值均达到0.5-2.0之间，同时也证明了此中和剂对试验菌株的生长无影响，满足《中国药典》（2020版）的要求，此方法可以用于需氧菌总数计数。

2.4 霉菌和酵母菌总数计数采用的方法：平皿倾注法

2.4.1 试验组：取9.9ml 1：10的供试品原液上清液，加入0.1ml的白色念珠菌菌悬液（含不大于1000cfu），混合均匀，各取其1ml，注入到直径为90mm的2个无菌平皿中，然后再注入20ml左右，温度为30-40℃熔化的沙氏葡萄糖琼脂培养基，将它们混合均匀，待其凝固后，倒置于20~25℃的培养箱中培养5天，每日观察计数。照上述同样的方法，以黑曲霉为试验菌制备2个平皿，进行20~25℃倒置培养5天，计数。

2.4.2 菌液对照组：分别取缓冲液替代供试液，加入白色念珠菌菌悬液、黑曲霉菌液同试验组操作，作为菌液对照组。

2.4.3 供试品对照组：取供试品原液，以缓冲液代替菌液按试验组的方法进行操作。

2.4.4 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性结果

霉菌和酵母菌总数计数试验微生物回收如下表2（沙氏葡萄糖琼脂培养基）：

表2 霉菌和酵母菌总数计数方法验证结果

批号	试验菌	试验组	菌液对照组	菌落数回收比值
201106004		73cfu		0.92
201206001	白色念珠菌	75cfu	79cfu	0.95
201206002		70cfu		0.89
201106004		68cfu		0.94
201206001	黑曲霉	62cfu	72cfu	0.86
201206002		67cfu		0.93

结果分析：盐酸莫西沙星原料药对黑曲霉、白色念珠菌等真菌的抗菌作用较低，试验组的菌落数回收比值在0.8-1.0，满足《中国药典》（2020年版）的要求，此方法可以用于霉菌和酵母菌总数计数。

2.5 大肠埃希菌检查采用的方法：

2.5.1 试验组：量取制备好的供试品原液上清液10ml（相当于供试品1g），加入至400ml缓冲液中，搅拌、振摇使其溶解后，加入40ml中和剂，混合均匀，作为供试液。静置约3分钟后，使用微生物限度检测仪将供试液过滤，全部过滤完成后，用冲洗液冲洗滤膜，每次冲洗100ml，共冲洗5次。在最后100ml的冲洗液中加入不大于100cfu的大肠埃希菌悬液，过滤后，取出滤膜加入至每瓶装量为200毫升的胰酪大豆胨液体培养基中，混合均匀，置培养箱（温度为30~35℃）中培养18小时后，取出培养后的培养物1ml接种到10麦康凯液体培养基（100ml）中，置培养箱（温度为42~44℃）中培养24小时。培养结束后再取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上，置培养箱（温度为30~35℃）中培养18小时。确证是否为大肠埃希菌。

2.5.2 中和剂对照组：取缓冲液替代供试液，按试验组方法加入大肠埃希菌进行操作，作为中和剂对照组。

2.5.3 阴性对照组：取缓冲液代替供试液，不加入试验菌，其它与试验组同法操作，作为阴性对照。

2.5.4 大肠埃希菌控制菌方法适用性结果如下表3

表3 大肠埃希菌控制菌方法验证结果

批号	试验菌	试验组	中和剂对照组	阴性对照组
201106004		+		-
201206001	大肠埃希菌	+	+	-
201206002		+		-

结果分析：供试品的大肠埃希菌检查方法研究试验中，阴性对照组应无菌生长，中和剂对照组、试验组经分离菌落生长典型，确证为大肠埃希菌，符合规定。

3 讨论

盐酸莫西沙星对于革兰阴性杆菌（大肠杆菌等）、

革兰阳性菌（金黄色葡萄球菌等）、非典型病原体与厌氧菌均有良好的抗菌活性，采用培养基加中和剂、冲洗剂加中和剂和薄膜过滤法，能够有效的去除盐酸莫西沙星的抗菌活性。培养基添加中和剂的量和冲洗剂中添加中和剂的量需要进一步优化。霉菌和酵母菌的回收试验中发现盐酸莫西沙星对真菌也具有一定的抑制作用，可以进一步优化供试液浓度的比例。

需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法的试验中，各试验菌的回收率均在0.5~2.0范围内，各试验菌的微生物回收试验符合《中国药典》2020年版要求；大肠埃希菌控制菌的检查生长正常，因此，该供试品原液的制备方法以及微生物计数中的需氧菌计数检查法采用中和剂联合薄膜过滤法、霉菌和酵母菌总数计数采用平皿倾注法、控制菌检查法采用中和剂联合薄膜过滤法适用于盐酸莫西沙星的微生物限度检查。

参考文献

- [1] 沈小莉, 陈家润. 盐酸莫西沙星的合成及结构解析[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(10): 50-54
- [2] 孟静娟. 新抗生素莫西沙星国内外研究应用最新进展[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 98-101
- [3] 刘九雨, 郭惠元. 广谱高效的新喹诺酮类抗菌药莫西沙星[J]. 国外医药抗生素分册, 2002, 23(6): 274-278.
- [4] 张家玲, 樊慧芝, 潘景浩. 电化学方法研究氟喹诺酮类药物与金属镁、锰离子的相互作用[J]. 山西临床医学, 1996, 59(4): 311-314.
- [5] 刘鹏, 马仕洪, 戴翠, 等. 加替沙星微生物限度检查方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 881-884.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 2020年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 107-115.