

诺氟沙星微生物检验技术的应用研究

李彩华 焦明辉 廖岩峰
天方药业有限公司 河南 驻马店 463000

摘要:目的:根据2020年版《中国药典》微生物检查法的变更,建立诺氟沙星微生物限度检验方法。方法:供试品原液采用1:20的制备方法;冲洗液和培养基采用添加中和剂的方法降低诺氟沙星的抗菌活性;需氧菌总数计数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,大肠埃希菌检查采用中和剂联合薄膜过滤和增大培养基法,中和剂使用0.1mol/l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,可用于该药品的质量控制检验。结论:薄膜过滤联合中和剂硫酸镁能有效消除样品的抑菌活性,可用于诺氟沙星的微生物限度检查。

关键词:诺氟沙星;微生物限度;薄膜过滤法;中和剂

引言:诺氟沙星(Norfloxacin)是喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌作用强、生物利用度高、口服吸收快,已被广泛用于临床^[1]。由于《中国药典》对药品的安全性提出了更高要求,在微生物限度检测中取消了难溶性药品使用离心沉淀法制备供试品溶液的方法^[2-5]。诺氟沙星具有很强的抑菌性和难溶于中性的缓冲溶液。为满足变化,试验对诺氟沙星微生物限度检查方法做了进一步研究,以确认抑菌活性的消除和检查方法的可靠性。建立此方法需解决两个难点:1、供试液制备时,解决其难溶性;2、降低诺氟沙星的抑菌活性,消除其对微生物检查的干扰性。经过实验研究和查阅文献,制备更高比例的供试液合并二步稀释法可以增加供试品溶解性;我们发现喹诺酮类抗菌药物能与金属离子发生络合并引起抗菌活性下降^[6-9],选择硫酸镁作为中和剂降低其抗菌活性,同时增大培养基的量联合薄膜过滤来降低其抗菌活性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

WT5002K电子天平;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 试药与试剂

诺氟沙星原料药(批号210413厂家:河南康泰药业有限公司);胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基;胰酪大豆胨液体培养基、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基;培养基的适用性检查符合2020年版中国药典通则要求。硫酸镁。

稀释液:pH7.0无菌氯化钠—蛋白胨缓冲液(含5%的

聚山梨酯80)

缓冲液及冲洗液:pH7.0无菌氯化钠—蛋白胨缓冲液

中和剂:0.1mol/l硫酸镁溶液

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 菌液制备

按中国药典的要求制备大肠埃希菌、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等适宜的菌悬液。

2.2 供试液的制备

供试液选择:诺氟沙星难溶性和抑菌作用强,制备1:20的供试品原液,会使每毫升的供试品原液的抑菌性比1:10的弱,溶解性比1:10的强,故选择1:20作为供试品原液的选择。

称取供试品10g,加缓冲液至200ml,搅拌、振摇使其混匀,作为1:20的供试品原液,静置备用。

2.3 需氧菌总数计数研究:

2.3.1 因诺氟沙星的强抑菌性,试验选择了2种检测方法,对其方法进行研究:1,薄膜过滤法^[2];2,中和剂联合薄膜过滤法。(滤膜孔径0.45μm,直径为50mm)

试验组1:取供试品原液上清液2ml(相当于供试品0.1g),加入至200ml稀释液中,搅拌、振摇使其溶解后,作为供试液。使用微生物限度检查仪将供试液过滤,过滤后用缓冲液冲洗滤膜,每次冲洗100ml,共冲

洗5次。在最后一次冲洗液中加入不大于100cfu的金黄色葡萄球菌菌悬液,过滤后,取出滤膜,菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂平板上,将其倒置于30~35℃的培养箱中3天,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℃倒置培养3天,计数;分别以白色念珠菌、黑曲霉为试验菌进行试验,于30~35℃倒置培养5天,计数。

试验组2:取供试品原液上清液2ml(相当于供试品0.1g),加入至200ml稀释液中,搅拌、振摇使其溶解后,加入中和剂10ml,混合均匀,作为供试液。使用微生物限度检查仪将供试液过滤,全部过滤完成后,用缓冲液(含1%的中和剂)冲洗滤膜,每次冲洗100ml,共冲洗5次。在最后一次冲洗液中加入不大于100cfu的金黄色葡萄球菌菌悬液,过滤后,取出滤膜,菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂(含5%的中和剂)平板上,将其倒置培养箱中,30~35℃培养3天,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℃倒置培养3天,计数;分别以白色念珠菌、黑曲霉为试验菌进行试验,于30~35℃倒置培养5天,计数。

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

中和剂对照组:分别取含中和剂的稀释液替代供试液,加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液,同试验组操作,作为中和剂对照组。

供试品对照组:取制备好的供试液,以缓冲液代替菌液同试验组操作。

2.3.2 两种方法的试验结果如下

1,中和剂对照组的菌种回收率在0.9-1.2之间,在中国药典规定范围内,说明此中和剂对这几个菌种的生长均没有干扰作用,可以选择硫酸镁作为中和剂使用。

2,铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌三个菌种的回收率试验组二>试验组一,试验组一的回收率<0.5不符合药典的要求,试验组二菌种的回收率在0.5-0.6之间。由试验可见,中和剂硫酸镁的使用对试验菌的回收率有较大的影响,但虽符合国家药典要求,但回收率偏低,需要调整中和剂硫酸镁的使用量,来提高试验菌的回收率。

2.3.3 中和剂硫酸镁的使用量对试验菌回收率的研究:

采用上述试验组2的方法进行试验,试验菌采用铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌。试验组分别采用3种条件试验:条件1,二步稀释添加20ml中和剂

及冲洗液中添加2%的中和剂;条件2,二步稀释添加30ml中和剂及冲洗液中添加4%的中和剂;条件3,二步稀释液中添加40ml中和剂及冲洗液中添加5%的中和剂。

中和剂硫酸镁的使用量对试验菌回收率的研究结果如下:

(1)使用条件3各个菌种的回收率可以达到很好的效果,回收率在0.8-1.1之间。

(2)需氧菌总数计数采用薄膜过滤法联合中和剂(硫酸镁),中和剂的添加量采用条件3,这样菌种可以达到较高的回收率,满足中国药典的要求。

2.4 霉菌和酵母菌总数计数方法研究

2.4.1 试验组:取9.9ml 1:20的供试品原液上清液,加入0.1ml的白色念珠菌菌悬液,混匀,使每1ml供试液中含不大于100 cfu的白色念珠菌,各取其1ml,置直径90mm的2个无菌平皿中,然后注入15~20ml温度不超过45℃熔化的沙氏葡萄糖琼脂培养基(含5%的中和剂),将其混匀,待培养基凝固后,20~25℃倒置培养5天,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 中和剂对照组:分别取含中和剂的稀释液替代供试液,加入白色念珠菌菌悬液、黑曲霉菌液,同试验组操作,作为中和剂对照组。

2.4.4 供试品对照组:取制备好的供试液,以缓冲液代替菌液同试验组操作。

霉菌和酵母菌总数计数方法研究结果:诺氟沙星对白色念珠菌、黑曲霉等真菌的抑制,可用培养基中加中和剂法消除,试验组的菌落数回收比值在0.8-1.0,符合2020年版《中国药典》的要求,此方法可以用于霉菌和酵母菌总数计数。

2.5 控制菌大肠埃希菌检查采用的方法

2.5.1 大肠埃希菌作为控制菌,诺氟沙星的检验量须为1.0g。由于1.0g的诺氟沙星其抑菌性特别强,我们选择10ml半量过滤的方法作为试验。

试验组:取制备好的供试品原液10ml(相当于供试品0.5g),分别加入至500ml稀释液(含5%的聚山梨酯80),加入40ml中和剂,混合均匀,作为供试液。使用微生物限度检查仪将供试液过滤,全部过滤完成后,用冲洗液(含5%的中和剂)冲洗滤膜,每次冲洗100ml,共冲洗5次。在最后一次冲洗液中加入不大于100cfu的大肠埃希菌菌悬液,过滤后,取出滤膜加入至每瓶装量为

500ml的胰酪大豆胨液体培养基(含5%的中和剂)中,混匀,置30~35℃培养箱中进行18小时培养后,取上述培养物1ml接种至100ml麦康凯液体培养基中,置42~44℃培养箱中进行24小时培养。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30~35℃培养箱中进行18小时培养。确证是否为大肠埃希菌。

2.5.2 中和剂对照组:取冲洗液替代供试液,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1

表1 大肠埃希菌控制菌方法验证结果

取样量	试验菌	试验组	中和剂对照组	阴性对照组
10ml	大肠埃希菌	+	+	-

结果分析:供试品的控制菌检查方法中,阴性对照组无菌生长,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。故诺氟沙星控制菌检查时,需用10ml半量过滤,全量分开用500ml的胰酪大豆胨液体培养。

3 讨论

诺氟沙星原料药纯度高同样10g的重量其抑菌效力是其制成制剂的几十倍,建立原料的微生物限度检查法比其制剂困难大,有关文献中其胶囊剂型的微生物限度检查的方法不适用原料药的检查,故须进一步探究诺氟沙星原料药的微生物限度的检查。控制原料药的安全检查对控制整个制药过程的安全起关键性作用。

诺氟沙星需氧菌计数的检查:供试液须制备成1:20,二步稀释液中需要先加聚山梨酯80以增大诺氟沙星的溶解性,再加入一定量的中和剂溶液,过滤的冲洗液和培养基中加入5%的中和剂,这一系列的组合使用才能有效的降低其抗菌活性,保证各个菌种的回收达到0.8-1.1

之间,符合2020年版《中国药典》的要求。

酵母菌和霉菌的计数:由于诺氟沙星对真菌的抑制能力较弱,故采用培养基添加中和剂的平板倾注法。

控制菌大肠埃希菌检查法:由于诺氟沙星原料药纯度高,需要采取10ml的半量过滤法,二步稀释需加入500ml的稀释液(含5%聚山梨酯80)和一定量的中和剂,过滤的冲洗液和增大到500ml的胰酪大豆胨液体培养基中分别加入5%的中和剂溶液。这一系列的组合才能保证大肠埃希菌的检出,符合2020年版《中国药典》的要求。

参考文献

- [1]张宇,姜瑛,吕凤莲,方彬.喹诺酮类药物微生物限度检查几个问题的讨论[J].中药学,2004,2(6):367.
- [2]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.
- [3]国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:481~482.
- [4]国家药典委员会.中华人民共和国药典.四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:145-149.
- [5]国家药典委员会.中国药典分析检测技术指南.北京:中国医药科技出版社,2017,564-596.
- [6]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.
- [7]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.
- [8]梁月秋,刘涛,朱斌,等.应用于喹诺酮类药物无菌检查金属离子的初步筛选[J].药物分析杂志,2009,29(2):334-336.
- [9]裴小龙,黎隽,杨晓莉,等.喹诺酮类药物无菌检查中Mg²⁺的应用研究[J].药物鉴定,2011,20(1):28-29.