

盐酸林可霉素微生物限度检测方法适用性研究

叶亚芝 张微芳

浙江诚意药业有限公司 浙江温州 325000

摘要: 随着我国医药产品的飞速发展,《中国药典》分析检验技术的整体水平有了极大提升,为建立严谨的药品标准、提高药品质量、强化药品监管奠定基础。盐酸林可霉素对大多革兰阳性菌和某些厌氧的革兰阴性菌有抗菌作用。因此根据2020年版中国药典四部通则非无菌产品微生物限度检查的有关规定,应进行需氧菌、霉菌及酵母菌数总数的方法验证,对控制菌检查应进行大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌验证。以确认所采用的方法适合于盐酸林可霉素微生物限度的检验。

关键词: 微生物限度; 抗生素; 薄膜过滤法; 接受标准

一、培养基试剂、菌种和仪器

1. 材料和培养基试剂

1.1 盐酸林可霉素(天方药业有限公司),批号:210437009、210437010、210437011。

1.2 培养基、缓冲液及试剂

氯化钠(中星化工),PH7.0氯化钠-蛋白胨、胰酪大豆胨琼脂、胰酪大豆胨液体、沙氏葡萄糖琼脂、麦康凯液体、麦康凯琼脂、甘露醇氯化钠琼脂培养基均购于广东环凯,聚山梨脂80(阿拉丁)。

2. 菌种 [中检院,传代数T3]

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉。

2.1 仪器

SGLASS-RX1D蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);MVS-83立式压力蒸汽灭菌器(大连华日金属成型厂);BSC-1604II A2生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);SHH-400J霉菌培养箱(重庆康城永生试验设备有限公司);SHH-400L生化培养箱(重庆康城永生试验设备有限公司);M47A一次性微孔滤膜(杭州盈天科学仪器有限公司,批号420230603,滤膜规格0.45 μm*47mm);HTY型微生物检验仪(泰林生物);其他如试管、三角瓶等均按规定清洗并于121℃下15min灭菌。

二、方法与结果

1. 实验

1.1 菌液制备(所用的稀释液、冲洗液均为0.9%无菌氯化钠溶液)

1.2 大肠埃希菌(*Escherichia coli*);金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)使用接种环分别取上述三种菌株的1环,接种于10mL胰酪大豆胨液体培养基中,在32℃条件下培养18-24h,在使用前稀释成不大于100cfu/mL的菌悬液。

1.3 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)

取含枯草芽孢杆菌并经32℃培养18~24h的胰酪大豆胨琼脂培养物,使用溶液洗脱菌苔,并稀释成不大于100cfu/mL的菌悬液。

1.4 白色念珠菌(*Candida albicans*)

使用接种环将白念的培养物,接种到10mL沙氏培养基中并在23℃培养24-48h,在使用前稀释成不大于100cfu/mL的菌悬液。

1.5 黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F)98 003]

取新鲜培养物接种至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上,23℃条件下7日,使用4ml含0.05%聚山梨脂的氯化钠溶液,将黑曲霉的孢子洗下并取洗脱液入无菌的试管中,使用洗脱液稀释成不大于100cfu的孢子菌液。

2. 需氧菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证

2.1 供试液制备

取10g盐酸林可霉素,加入无菌pH7.0氯化钠缓冲液稀释至100mL,摇晃均匀后,作为1:10供试液,待用。

2.2 试验组

准备14个培养皿,两个平皿为一组,分别做好各自相应菌种的标记。

取2.1项下的供试液10mL,使用pH7.0缓冲液加至100mL,混合均匀后过滤。用缓冲液冲滤膜,冲洗四次

(100mL每次), 在最后一轮的冲洗液中加入1.1项下制备的菌悬液1mL, 滤后使用镊子取出滤膜, 贴在对应平皿上, 每个菌作两个平皿, 胰酪大豆胨琼脂用于需氧菌, 沙氏葡萄糖琼脂用于霉菌和酵母菌。(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉贴于胰酪大豆胨琼脂培养基倒置32℃下培养3日, 白色念珠菌和黑曲霉贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基倒置23℃下培养5日)。

2.3 菌液组

准备14个培养皿, 两个一组, 分别做好各相应菌种的标记。

用缓冲液冲洗滤膜, 冲洗五次, 分别在每次冲洗液最后一次加入对应1.1项的1mL菌悬液, 过滤用镊子将滤膜贴于相对应的平板上, 倒置培养, 每个菌株做作两个平行样。制备的平皿培养条件同2.2项下。

2.4 供试品对照组

取2.1项下的供试液10mL, 并使用缓冲液稀释至100 mL, 摇匀, 过滤。缓冲液冲洗同2.2。取出滤膜贴于培养基平板上, 倒置培养, 作两个平皿。培养基条件同2.2。检定供试液的本底菌数。(需氧菌置32℃培养5日, 霉菌和酵母菌置23℃培养7日)

2.5 阴性组

用缓冲液代替供试液同2.4项下操作。测定本次空白的菌落。

2.6 试验组

需进行3次独立平行试验, 并分别计算各试验菌的回收试验结果。

三、大肠埃希菌控制菌的验证

1. 试验组

取2.1项下稀释好的供试液10mL, 接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中, 摇混后, 加入1mL已稀释好的大肠埃希菌悬液, 32℃培养18-24 h, 取1mL上述培养物接种至麦康凯液体培养基里, 43℃培养24 ~ 48h, 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, 32℃培养18 ~ 72h。若平板上有菌落生长, 应进行分离、纯化及适宜的鉴定试验, 确证是否为大肠埃希菌; 若麦康凯琼脂培养基平板上没有菌落生长, 或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性, 判供试品未出大肠埃希菌。

2. 供试品对照组

取2.1项下10mL供试液, 不加菌液, 按试验组的方法测定。不得检出大肠埃希菌。

3. 阳性对照组

缓冲液替代供试液, 按1方法测定。

4. 阴性对照组

稀释液替代2.1项下的供试品, 按上述操作。阴性对照应无菌生长。

5. 金黄色葡萄球菌控制菌的验证

5.1 试验组

取2.1项稀释好的供试液10mL, 接种至200mL的胰酪大豆胨液体培养基中, 摇均后, 加入1mL1.2项已稀释好对应的菌悬液, 32℃培养18~24h, 取上述培养物, 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上, 32℃培养18~72h。倘若长的菌落形态与金黄色葡萄球菌的菌落形态不相同或者没有菌落生长, 判供试品未检出金黄色葡萄球菌。若平板上生长的菌落形态与金黄色葡萄球菌的菌落形态相符或疑似, 做血浆凝固酶试验。

5.2 供试品对照

取2.1项下稀释好的供试液10mL, 加入胰酪大豆胨液体培养基(200mL)中, 摇混, 32℃培养18~24h, 取上述培养物, 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上, 32℃培养24~72h。观察平皿有无菌生长。

5.3 阳性对照组

用缓冲液替代2.1的供试品, 按试验组的方法测定。

5.4 阴性对照组

用缓冲液替代供试液, 按供试品对照操作。不得长菌。

四、接受标准及结果

1.各菌株的菌悬液总加菌量必须控制在不大于100cfu。

2.需氧菌总数、霉菌及酵母菌总数计数方法的验证在3次独立的平行试验中, 回收率均在0.5 ~ 2之间, 符合要求, 该检品可用薄膜过滤法测定需氧菌总数、霉菌和酵母菌计数。

回收率 $d = (b \text{组平均数} - c \text{组平均数}) / a \text{组平均数}$

3.需氧菌总数总数计数方法(铜绿假单胞菌; 金黄色葡萄球菌; 枯草芽孢杆菌; 白色念珠菌; 黑曲霉)

a.菌液组3项结果(cfu/膜)依次为93, 86; 87, 84; 88, 83; 76, 80; 38, 43。

b.试验组结果(cfu/膜): 盐酸林可霉素(批号210437009)结果依次为82, 80; 77, 82; 78, 86; 80, 73; 36, 31。(批号210437010)结果依次为76, 81; 69, 73; 80, 88; 76, 73; 40, 42。(批号210437011)结果

依次为73, 79; 80, 87; 89, 84; 83, 77; 37, 40。

c. 供试品对照组结果均为0cfu/膜。

d. 回收试验结果依次为: (批号210437009) 0.90; 0.93; 0.95; 0.99; 0.83。(批号210437010) 0.88; 0.83; 0.98; 0.96; 1.00。(批号210437011) 0.84; 0.98; 1.01; 1.02; 0.95。

4. 霉菌及酵母菌总数计数方法(白色念珠菌; 黑曲霉)

a. 菌液组结果(cfu/膜)依次为76, 80; 40, 36。

b. 试验组结果依次为(cfu/膜)(批号210437009) 73, 69; 36, 34。(批号210437010) 75, 70; 36, 32。(批号210437011) 80, 74; 39, 36。

c. 供试品对照组结果均为0cfu/膜。

d. 回收试验结果依次为(批号210437009) 0.91; 0.92。(批号210437010) 0.94; 0.89。(批号210437011) 0.99; 1.00。

5. 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的影响试验的验证

试验组和阳性对照组检出阳性试验菌; 供试品对照组未检出菌, 阴性组未检出。故此法可对该供试品进行

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌检查。

结语

不合格的药品, 不但不能治疗患者的疾病还可能对患者造成二次伤害。因此加强完善药品检验方法, 是不可厚非、势在必行的。本研究以确认所采用的方法是否适用于盐酸林可霉素的微生物检测。结果表明此方法适用于盐酸林可霉素的微生物限度检测。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020年版四部. 北京. 中国医药科技出版社. 2020: 160 ~ 170

[2] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范. 2019年版. 北京. 中国健康传媒集团, 中国医药科技出版社. 2019: 437 ~ 468

[3] 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 ~ 587

[4] 刘福强, 孙景涛, 侯明晓. 医师案头用药参考. 中成药、化学药. 中国中医药出版社. 2012.03: 29