

分析质控与制剂

阿莫西林胶囊微生物检查方法学研究

闵红 杨晓莉 李翠 周志云

(陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 为了建立有效、操作简单、成本低廉的阿莫西林胶囊微生物限度和控制菌检查方法。**方法** 采用平皿法、稀释法、薄膜过滤法、中和法共 14 种方法对阿莫西林胶囊进行微生物限度方法适用性研究, 比较了稀释法、薄膜过滤法和中和法去除阿莫西林胶囊抑菌性的能力; 考察了聚山梨酯 80、卵磷脂和 β -内酰胺酶作为中和剂去除其抑菌性的能力; 并考察了将中和剂添加于稀释剂、冲洗液、培养基中去除抑菌性的能力。采用直接接种法、中和法共 7 种方法进行了控制菌方法适用性研究。**结果** 建立阿莫西林胶囊微生物限度和控制菌检查方法。**结论** 可采用在稀释剂 TSB 中添加 1115 万单位 β -内酰胺酶的方法对阿莫西林胶囊进行需氧菌总数检查。

关键词: 阿莫西林胶囊; 微生物检查方法; 中和剂; β -内酰胺酶

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

The research on microbial control methods for amoxicillin capsule

Min Hong, Yang Xiao-li, Li Cui and Zhou Zhi-yun

(Shanxi Institute for Food & Drug Control, Xi'an 710065)

Abstract Objective To establish effective, simple, and cheap microbial limit and microbe-controlling test methods. **Methods** A total of 14 kinds of methods, including plate, dilution, membrane filtration, and neutralization, were adopted for the development of microbial limit methodology of amoxicillin capsule. The ability of removing amoxicillin capsule antibacterial activity by dilution methods, membrane filtration methods, and neutralization methods were compared. The ability of removing antibacterial activity by adding neutralizer to diluter, flushing fluid, and culture medium were investigated. A total of 7 kinds of methods including direct inoculation and neutralization were adopted for microbe-controlling methodology. **Results** The microbial limit and microbe-controlling methods of amoxicillin capsule were established. **Conclusion** Adding 11150000 units β -lactamase to diluter can be adopted to examine total aerobic bacteria.

Key words Amoxicillin capsule; Microbial test methods; Neutralizer; β -Lactamase

微生物限度检查法和控制菌检查法是检查非无菌灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的重要方法^[1]。药品检测质量的好坏直接影响到药品使用的安全性。因此, 必需确保药品微生物检查的质量和效率^[2]。

阿莫西林属于半合成类青霉素, 对肺炎链球菌、溶血性链球菌等链球菌属、不产青霉素酶葡萄球菌、

粪肠球菌等需氧革兰阳性菌; 大肠埃希菌、奇异变形菌、沙门菌属、流感嗜血菌、淋病奈瑟菌等需氧革兰阴性菌, 不产 β -内酰胺酶菌及幽门螺杆菌具有良好的抗菌活性。阿莫西林通过抑制细菌细胞壁合成而发挥杀菌作用, 可使细菌迅速成为球状体而溶解、破裂^[3]。

抗生素类药物制剂均具有一定的抑菌性^[4]。微

收稿日期: 2018-02-09

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目 (No. 2013K12-04-05)

作者简介: 闵红, 女, 生于 1980 年, 博士, 副主任药师, 主要从事食品、药品与化妆品微生物检测与研究, E-mail: hong-min518@163.com

生物受到抗生素抑菌性的影响不能生长繁殖,但这些微生物细胞并未死亡,仅仅受到损伤。当药物制剂进入人体内,其抑菌成分在体内被稀释,受损微生物逐渐复苏并进行生长繁殖,从而对人类健康造成危害。如果不去除其抑菌性,直接采用常规法对药物制剂进行检查,就会出现“假阴性”检查结果。微生物适用性研究的目的是为了去除药物制剂的抑菌性,为药物制剂探寻有效和实用的检查方法。

本文采用了平皿法、稀释法、薄膜过滤法、中和法等 14 种方法对阿莫西林胶囊进行微生物限度方法适用性研究,比较了稀释法、薄膜过滤法和中和法去除阿莫西林胶囊抑菌性的能力;考察了聚山梨酯 80、卵磷脂和 β -内酰胺酶作为中和剂去除其抑菌性的能力;并考察了将不同单位 β -内酰胺酶添加于稀释剂、冲洗液、培养基中去除抑菌性的能力。采用了直接接种法和中和法对阿莫西林胶囊进行大肠埃希菌方法适用性研究,建立了阿莫西林胶囊微生物限度与控制菌的检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

生物安全柜(型号:HFsafe-1200 LC,上海力申科学仪器有限公司);电子分析天平(型号:BS2202S,德国赛多利斯公司);水浴恒温振荡器(型号:SHA-C,天津鑫博得有限公司);生化培养箱(型号:LRH-250B,上海一恒科学仪器有限公司);生化培养箱(型号:LRB-250B,上海一恒科学仪器有限公司);全自动微生物鉴定系统(型号:VITEK2,法国Bio-Mérieux有限公司);三目显微镜(型号:OLYMPUS.CH,日本奥林巴斯公司)。

1.2 供试品

阿莫西林胶囊,西安康拜尔制药有限公司,批号:20160103。

1.3 菌种

金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希菌 CMCC(B)44102、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104、枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501、白念珠菌 CMCC(F)98001 和黑曲霉 CMCC(F)98003。上述标准菌株均源于中国医学细菌保藏管理中心,工作菌株为第二代。

1.4 试剂

稀释剂:胰酪大豆胨液体(TSB);中和剂 1:2%卵磷脂和 2%吐温 80;中和剂 2: β -内酰胺酶,2mL/支,

446 万单位/mL,中国食品药品检定研究院生产;冲洗液:0.1%蛋白胨缓冲液。

培养基:胰酪大豆胨琼脂(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂(SDA)、沙氏葡萄糖液体(SDB)、麦康凯液体、麦康凯琼脂、溴化十六烷基三甲胺琼脂、甘露醇氯化钠琼脂。以上试剂除 β -内酰胺酶外,其他均由北京陆桥技术有限公司生产。

2 方法

2.1 菌液制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌分别接种于 TSB 中,35℃培养 24h;将白念珠菌接种于 SDB 中,25℃培养 3d。将黑曲霉接种于 SDA 上,25℃培养 7d,加入 5mL 含 0.05%(mL/mL)聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含 0.05%(mL/mL)聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。采用 10 倍稀释法将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉分别稀释到 10^4 CFU/mL,将大肠埃希菌稀释至不大于 100CFU/mL。

2.2 微生物限度方法适用性

2.2.1 平皿法(1:10 供试液)

供试液制备:取阿莫西林胶囊 10g,分别加 TSB 至 100、200 和 500mL,45℃恒温振荡 15min 使其溶解,分别制成 1:10、1:20 和 1:50 供试液。

试验组制备:取制备好的 1:10 供试液分装于 5 个无菌试管中,每管装量为 9.9mL,再分别加入含菌量不大于 10^4 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌(革兰阳性菌代表)、铜绿假单胞菌(革兰阴性菌代表)、枯草芽孢杆菌(芽孢菌群代表)、白念珠菌(酵母菌代表)、黑曲霉(霉菌代表)5 种试验菌液 0.1mL^[5]。

菌液对照组制备:将 TSB 分装于 5 个无菌试管中,每管装量为 9.9mL,同试验组操作分别加入含菌量不大于 10^4 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌、黑曲霉试验菌液 0.1mL。

供试品对照组制备:取制备好的 1:10 供试液 9.9mL,加入 TSB 0.1mL。

回收率计算^[6]:分别取上述试验组、菌液对照组和供试品对照组 1mL,置于直径 90mm 培养皿中,注入 TSA 或 SDA,混匀,凝固,TSA 平板在 35℃培养 3d,SDA 平板在 25℃培养 5d,计数。供试品 5 种试验菌的回收率均需进行 3 次重复试验,若供试品 5 种试验菌的回收率均在 0.5~2 范围内,供试品的

需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数的方法适用性试验通过。供试品回收率 = (试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数) / 菌液对照组菌落数 $\times 100\%$ 。

2.2.2 稀释法 (1:20 供试液)

稀释法 1: 将 1:20 供试液替代 1:10 供试液, 其余操作同平皿法。

稀释法 2(1:50 供试液): 将 1:50 供试液替代 1:10 供试液, 其余操作同平皿法。

稀释法 4(1:50 供试液结合 150mm 培养皿): 将 1:50 供试液替代 1:10 供试液, 150mm 替代 90mm 培养皿, 其余操作同平皿法。

2.2.3 薄膜过滤法

供试液、试验组、菌液对照组和供试品对照组制备过程同平皿法, 分别取上述制备好的试验组、菌液对照组和供试品对照组 1mL 加入含 50mL 0.1% 蛋白胨溶液的薄膜过滤器中, 过滤, 再用 0.1% 蛋白胨溶液冲洗 5 次, 100mL/ 次, 将滤膜正面朝上贴于 TSA 上培养、计数。

2.2.4 薄膜过滤结合中和法

薄膜过滤结合中和法 1(将中和剂 1 添加于稀释剂): 在供试液制备过程, 用含 2% 卵磷脂和 2% 吐温 80 的 TSB 取代 TSB 作为稀释剂。其余操作同薄膜过滤法。

薄膜过滤结合中和法 2(将中和剂 1 添加于冲洗液): 在冲洗过程, 用含 2% 卵磷脂和 2% 吐温 80 的 0.1% 蛋白胨溶液取代 0.1% 蛋白胨溶液作为冲洗液, 其余操作同薄膜过滤法。

薄膜过滤结合中和法 3(将中和剂 1 添加于培养基): 将含 2% 卵磷脂和 2% 吐温 80 的 TSA 取代 TSA 作为培养基, 其余操作同薄膜过滤法。

2.2.5 中和法

中和法 1(含 2mL 中和剂 2 的 1:20 供试液): 供试液制备: 取阿莫西林胶囊 10g, 加入含 446 万单位 β - 内酰胺酶的 TSB 至 200mL, 45 $^{\circ}$ C 恒温振摇 15min 使其溶解, 制成 1:20 供试液。其余操作同平皿法。

中和法 2(含 2mL 中和剂 2 的 1:50 供试液): 供试液制备: 取阿莫西林胶囊 10g, 加入含 446 万单位 β - 内酰胺酶的 TSB 至 500mL, 45 $^{\circ}$ C 恒温振摇 15min 使其溶解, 制成 1:50 供试液。其余操作同平皿法。

中和法 3(将 2mL 中和剂 2 添加于 1:50 供试液结合 150mm 培养皿): 供试液制备: 取阿莫西林胶囊 10g, 加入含 446 万单位 β - 内酰胺酶的 TSB 至

500mL, 45 $^{\circ}$ C 恒温振摇 15min 使其溶解, 制成 1:50 供试液, 并用 150mm 培养皿替代 90mm 培养皿, 其余操作同平皿法。

中和法 4(含 5mL 中和剂 2 的 1:50 供试液): 供试液制备: 取阿莫西林胶囊 10g, 加入含 1115 万单位 β - 内酰胺酶的 TSB 至 500mL, 45 $^{\circ}$ C 恒温振摇 15min 使其溶解, 制成 1:50 供试液。其余操作同平皿法。

中和法 5(含 5mL 中和剂 2 的 TSA 培养基): 采用 100mL 含 1115 万单位 β - 内酰胺酶的 TSA 替代 TSA, 其余操作同平皿法。

中和法 6(将 5mL 中和剂 2 添加于稀释剂和培养基): 供试液制备: 取阿莫西林胶囊 10g, 加入含 446 万单位 β - 内酰胺酶的 TSB 至 500mL, 45 $^{\circ}$ C 恒温振摇 15min 使其溶解, 制成 1:50 供试液, 并用 100mL 含 1115 万单位 β - 内酰胺酶的 TSA 替代 TSA, 其余操作同平皿法。

2.3 控制菌检查方法适用性研究

2.3.1 直接接种法

供试品制备同平皿法。

大肠埃希菌: 取 1:10 供试液 10mL 分别接种至 100、300 和 500mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 同时接入含菌量不大于 100CFU 的大肠埃希菌, 混匀, 35 $^{\circ}$ C 培养 18h。取上述培养物 1mL 接种至 100mL 麦康凯液体培养基, 42 $^{\circ}$ C 培养 24h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂平板上, 35 $^{\circ}$ C 培养 18h。同步进行阳性、阴性对照试验。用 VITEK2 全自动微生物鉴定系统对典型菌落进行鉴定, 若检出大肠埃希菌, 则供试品的大肠埃希菌检查方法适用性试验通过。

2.3.2 中和法

供试品制备同平皿法。

大肠埃希菌: 取 1:10 供试液 10mL 分别接种至含 223、446 和 892 万单位的 β - 内酰胺酶的 TSB 100mL, 其余操作同直接接种法。

3 结果

3.1 微生物限度方法适用性研究

3.1.1 采用平皿法进行需氧菌总数方法适用性研究

阿莫西林胶囊采用平皿法 (1:10 供试液) 进行需氧菌总数 (表 1)、霉菌和酵母菌总数 (表 2) 方法适用性研究, 发现白念珠菌和黑曲霉的回收率均在 0.5~2 范围内, 符合药典要求。结论: 可采用平皿法 (1:10 供试液) 对阿莫西林胶囊进行霉菌和酵母菌总数检查。

表 1 采用平皿和稀释法进行需氧菌总数方法学研究的回收率

Tab. 1 Recovery rate of total amount of aerobe methodology by plate and dilution methods

方法	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
平皿法	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3	1.0	1.1	1.0	0.9	1.1
稀释法 1	0	0	0	0.7	0.7	0.8	0	0	0	-	-	-	-	-	-
稀释法 2	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
稀释法 3	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-

注：“-”表示回收率已经在 0.5~2 范围内，无需进行下一步试验

表 2 采用平皿法进行霉菌和酵母菌总数方法学研究回收率

Tab. 2 Recovery rate of total amount of molds and yeast methodology by plate methods

方法	白念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3
平皿法	0.8	1.0	0.7	0.8	1.0	0.8

当增大稀释剂 TSB 的体积，采用 1:20 供试液时（稀释法 1），铜绿假单胞菌的回收率均大于 0.7，但是金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率仍为 0；而采用 1:50 供试液，甚至结合采用 150mm 较大培养皿的方式（稀释法 2 和 3），金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率始终为 0。因此，不可采用平皿法和稀释法对阿莫西林胶囊进行需氧菌总数检查。结果揭示了阿莫西林胶囊对革兰阳性菌和芽孢杆菌类具有较强抑制作用，对革兰阴性菌具有较弱的抑菌作用，对霉菌和酵母菌无抑菌作用。

3.1.2 采用薄膜过滤结合中和法进行需氧菌总数方法适用性研究

阿莫西林胶囊采用薄膜过滤法（冲洗 500mL/膜）进行需氧菌总数（表 3）方法学研究，发现金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率仍为 0。聚山梨酯 80 是一种非离子型表面活性剂，在药剂中起到增溶和乳化的作用^[7-8]，聚山梨酯 80 和卵磷脂联用能有效去除药物制剂的抑菌活性，对微生物生长无毒副作用^[9-10]。聚山梨酯 80 和卵磷脂是中国药典中涉及的药品微生物方法学研究中常用中和剂。本研究分别在稀释剂 TSB、培养基 TSA、稀释剂结合培养基分别添加了 2% 的卵磷脂和 2% 的聚山梨酯 80（中和剂 1），发现

将中和剂 1 添加于稀释剂 TSB 中（薄膜过滤结合中和法 1），金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率仍为 0，表明采用薄膜过滤法无法去除该供试品的抑菌性，将卵磷脂和聚山梨酯 80 加入稀释剂 TSB 也无法消除该供试品的抑菌活性；将中和剂 1 添加于培养基 TSA（薄膜过滤结合中和法 2）、稀释剂 TSB 和培养基 TSA 中（薄膜过滤结合中和法 3），试验组和供试品对照组菌落均成片生长，无法计数。将成片生长的“菌落”接种于 TSA 平板，发现无菌落生长，证明了该成片生长的白色物质并非细菌。卵磷脂在培养基 TSA 中的不充分溶解是造成培养基上有类似菌落物质出现的原因。因此，不可采用薄膜过滤法、薄膜过滤结合中和法（2% 的卵磷脂和 2% 的聚山梨酯 80）对阿莫西林胶囊进行需氧菌总数检查。

3.1.3 采用中和法（β-内酰胺酶）进行需氧菌总数方法适用性研究

阿莫西林胶囊采用中和法进行需氧菌总数（表 4）方法适用性研究，将 446 万单位 β-内酰胺酶添加到 1:20（中和法 1）、1:50 供试液（中和法 2）及 1:50 供试液结合 150mm 培养皿（中和法 3），金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌回收率均未达到药典要求的 0.5~2.0 范围内，并且中和法 1、2 和 3 的回收率并无显著性差异。将 1115 万单位的 β-内酰胺酶添加于 1:50 供试液中（中和法 4），其回收率显著性提高，金黄色葡萄球菌平均回收率为 1.2，枯草芽孢杆菌为 0.9，符合药典要求。表明对于阿莫西林胶囊，添加 β-内酰胺酶的剂量恒定，增加稀释剂的体积不能有效提高试

表 3 采用薄膜过滤结合中和法进行需氧菌总数方法学适用性研究的回收率

Tab. 3 Recovery rate of total amount of aerobe methodology by membrane filtration and neutralization methods

方法	金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌		
	1	2	3	1	2	3
薄膜过滤法	0	0	0	0	0	0
薄膜过滤结合中和法 1	0	0	0	0	0	0
薄膜过滤结合中和法 2	试验组和供试品对照组“菌落”成片生长无法计数			试验组和供试品对照组菌落成片生长无法计数		
薄膜过滤结合中和法 3	试验组和供试品对照组“菌落”成片生长无法计数			0	0	0

表 4 采用中和法进行需氧菌总数方法学研究回收率

Tab. 4 Recovery rate of total amount of aerobe methodology by neutralization methods

方法	金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌		
	1	2	3	1	2	3
中和法 1	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
中和法 2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
中和法 3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.3
中和法 4	1.4	1.2	0.9	0.6	0.7	1.3
中和法 5	0	0	0	0	0	0
中和法 6	0.9	1.0	1.2	1.3	0.9	0.8

验菌的回收率；而稀释剂的体积恒定，增加 β- 内酰胺酶的剂量能有效提高试验菌的回收率。

将 β- 内酰胺酶添加于培养基 TSA 中（中和法 5），回收率均为 0，分析原因可能由于 β- 内酰胺酶在 TSA 中与供试品作用的时间较短，没有与抑菌性物质充分反应，固体培养基就冷却凝固，因此不能有效去除供试品的抑菌性；将稀释剂和培养基中同时添加 β- 内酰胺酶（中和法 6）与仅仅在稀释剂中添加 β- 内酰胺酶（中和法 4）的回收率均符合药典要求，但无显著性差异，进一步证明将 β- 内酰胺酶添加到培养基的作用微乎其微。因此，可采用在稀释剂 TSB 中加 1115 万单位 β- 内酰胺酶的方法对阿莫西林胶囊进行需氧菌总数检查。

3.2 控制菌检查方法适用性研究

3.2.1 采用直接接种法进行大肠埃希菌检查方法适用性研究

阿莫西林胶囊采用直接接种法 (TSB 分别为 100、200 和 500mL) 进行大肠埃希菌方法学适用性研究 (表 5)，试验组均未检出大肠埃希菌。因此，不可取 1:10 供试液 10mL 直接接种至胰酪大豆胨液体培养基 100、200 和 500mL，进行该供试品的大肠埃希菌检查。

3.2.2 采用中和法进行大肠埃希菌检查方法适用性研究

阿莫西林胶囊采用中和法 (中和剂分别为 223、446、892 万单位的 β- 内酰胺酶) 进行大肠埃希菌方法学适用性研究 (表 6)，试验组均检出大肠埃希菌。因此，可取 1:10 供试液 10mL 接种至分别含 223、446、892 万单位 β- 内酰胺酶的胰酪大豆胨液体培养基 100mL，进行该供试品的大肠埃希菌检查。研究结果表明，阿莫西林胶囊对大肠埃希菌具有一定的抑制作用，针对 β- 内酰胺类抗生素通过增加稀释剂 TSB 的体积不能有效去除该供试品的抑菌性，仅通过在稀释剂中添加适量 β- 内酰胺酶才能有效去除抑菌成分。

4 讨论

微生物计数法系用于能在有氧条件下对供试品

表 5 采用直接接种法进行大肠埃希菌方法学适用性试验结果

Tab. 5 Results of microbe-controlling methodology test by direct inoculation methods

组别	试验菌和培养基	第一次试验	第二次试验	第三次试验
试验组	大肠埃希菌试验菌浓度 (10 ⁻⁴ 稀释级 1mL/ 皿)	81CFU/mL	72CFU/mL	69CFU/mL
	麦康凯琼脂培养基平板 (直接接种法, TSB 为 100mL)	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长
	麦康凯琼脂培养基平板 (直接接种法, TSB 为 300mL)	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长
	麦康凯琼脂培养基平板 (直接接种法, TSB 为 500mL)	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长
阴性对照	麦康凯琼脂培养基平板	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长

表 6 采用中和法进行大肠埃希菌检查方法适用性试验结果

Tab. 6 Results of microbe-controlling methodology test by neutralization methods

组别	培养基	第一次试验	第二次试验	第三次试验	
试验组	大肠埃希菌试验菌浓度 (10 ⁻⁴ 稀释级 1mL/ 皿)	81CFU/mL	72CFU/mL	69CFU/mL	
	中和剂为 223 万单位 β- 内酰胺酶	麦康凯琼脂培养基平板	均为鲜桃红色圆形菌落，中心呈深桃红色		
		革兰染色镜检	革兰阴性菌		
		确认试验	VITEK2 全自动鉴定系统，确认为大肠埃希菌		
	中和剂为 446 万单位 β- 内酰胺酶	麦康凯琼脂培养基平板	均为鲜桃红色圆形菌落，中心呈深桃红色		
		革兰染色镜检	革兰阴性菌		
		确认试验	VITEK2 全自动鉴定系统，确认为大肠埃希菌		
	中和剂为 892 万单位 β- 内酰胺酶	麦康凯琼脂培养基平板	均为鲜桃红色圆形菌落，中心呈深桃红色		
		革兰染色镜检	革兰阴性菌		
确认试验		VITEK2 全自动鉴定系统，确认为大肠埃希菌			
阴性对照	麦康凯琼脂培养基平板	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长	

生长的嗜温细菌和真菌计数^[6]。当供试品有抑菌活性时,可以采用下列方法减弱或消除供试液的抑菌活性,再依据确认的方法对该产品进行检验。

(1) 增加稀释剂或培养基体积^[6]。取规定量供试液,至较大体积稀释剂或培养基中,通过对抑菌成分的稀释,减弱或消除供试液的抑菌活性^[6]。研究结果表明:对于 β -内酰胺类抗生素,增大稀释剂和培养基的体积不能有效去除其抑菌性。

(2) 采用薄膜过滤法^[6]。通过薄膜过滤法可将供试品中抑菌物质的过滤掉,达到减弱和消除抑菌活性的作用。一般对于抑菌性弱的药物制剂,建议采用稀释法,对于抑菌性强的药物制剂,采用薄膜过滤法^[11]。本研究中阿莫西林胶囊对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有较强的抑菌作用,而采用薄膜过滤法不能有效去除其抑菌性,试验菌的回收率仍为0。

(3) 加入适宜的中和剂或灭活剂。中和剂或灭活剂可用于消除干扰物的抑菌活性^[12],可将其添加到稀释剂、冲洗液或培养基中钝化、中和其抑菌活性。该研究在阿莫西林胶囊的稀释剂中添加了2%的卵磷脂和2%的聚山梨酯80,金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率为0,在冲洗液和培养基中添加后无法计数,充分证明 β -内酰胺类抗生素不能采用聚山梨酯80和卵磷脂作为中和剂进行需氧菌总数的检查。

β -内酰胺酶是耐药菌产生的具有水解青霉素、头孢菌素等 β -内酰胺类抗生素活性的酶^[13]。本研究考察了 β -内酰胺酶添加于稀释剂、培养基、稀释剂与培养基同时添加3种方式对阿莫西林胶囊抑菌性的去除效果,发现在稀释剂中添加446万单位的 β -内酰胺酶不能有效去除其抑菌性,添加1115万单位可有效去除其抑菌性,而将1115万单位 β -内酰胺酶添加于培养基中,由于作用时间较短而不能达到相应的效果。

总而言之,对于 β -内酰胺类抗生素,采用稀释法、薄膜过滤法均无法有效去除其抑菌性,应首选中和法;中和剂聚山梨酯80和卵磷脂的添加也不能有效去除其抑菌性,中和剂应首选 β -内酰胺酶;将 β -

内酰胺酶添加于培养基中也无法去除其抑菌性,应首选添加于稀释剂;在稀释剂中添加446万单位的 β -内酰胺酶不能有效去除其抑菌性,添加1115万单位可有效去除其抑菌性。

微生物方法学研究的目的是,首先为药物制剂寻求一个可行性好的微生物检查方法,更重要是该方法操作简单、成本低廉、污染风险低,可满足企业微生物检验的常态化和规范化。抗生素类药物制剂的抑菌性非常强,稀释法一般无法去除其抑菌性,薄膜过滤法操作复杂,成本较高,那么,为抗生素类药物制剂探寻适宜的中和剂成为其微生物检验的一个方向和难点。下一步计划对不同类型抗生素筛选出适宜的中和剂,并优化其加入量、加入方式等因素,提高检验检测技术水平,确保人民群众的用药安全。

参考文献

- [1] 吴鑫,龙慧,鄢雷娜,等. 硝呋太尔制霉素阴道软胶囊微生物限度检查法的方法学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(2): 116-119.
- [2] 罗恩妮. 浅谈薄膜过滤法在药品微生物限度检查中的重要性及应用[J]. 科技创新导报, 2015, (14): 234.
- [3] 秦迪堂. 阿莫西林双氯西林钠胶囊与阿莫西林胶囊疗效的对比分析[J]. 中国当代医药, 2010, 19(17): 66-67.
- [4] 李芳,刘冬玲,刘浩,等. 氟罗沙星胶囊微生物检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 445-447.
- [5] 苏德模,马绪荣. 药品微生物学检验技术[M]. 北京: 华龄出版社, 2007: 218-220.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015年版四部[S]. 中国医药科技出版社, 2015: 140-150.
- [7] 张锐,王玉,高正松,等. 聚山梨酯80的化学组分与其增溶作用的关系研究[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(10): 876-880.
- [8] The United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia[S]. 34th Edition. NF29. Maryland: USP Press, 2011: Appendix. Antimicrobial effectiveness testing.
- [9] 姬俊,刘婷婷,牛萌萌,等. 卵磷脂和聚山梨酯-80联用在中药制剂抑菌活性中的中和作用[J]. 中国药师, 2017, 3(20): 586-588.
- [10] 张光华,余立. 聚山梨酯80和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1127-1130.
- [11] 闵红,周志云,杨晓莉,等. 洗发、护法化妆品微生物检查方法学研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 5(36): 103-107.
- [12] Dorman H J D, Deans S G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils[J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 88(2): 308-316.