

应用滤膜法作抗菌滴眼剂菌数测定的研究

詹云丽¹, 王小慧¹, 李楚云² (1. 广东省惠州市药品检验所, 广东 惠州 516001; 2. 惠州市中心人民医院, 广东 惠州 516001)

摘要:目的 建立抗菌滴眼剂菌数测定的方法。方法 采用常规法和薄膜过滤法, 对抗菌滴眼剂中添加活微生物进行回收验证。结果 常规法微生物回收率为 0, 薄膜过滤法平均回收率大于 65 %。结论 薄膜过滤法能作为抗菌滴眼剂菌数测定的方法。

关键词: 抗菌滴眼剂; 细菌总数; 薄膜过滤

中图分类号: R927.31

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2004)04-0309-03

Study on the detection of bacterial amount in antibiotic eye drops by membrane filtration

ZHAN Yun-li¹, WANG Xiao-hui¹, LI Chu-yun² (1. Guangdong Huizhou Institute for Drug Control, Huizhou 516001, China; 2. Huizhou Centre People's Hospital, Huizhou 516001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a method of detecting the bacterial amount in antibiotic eye drops. **METHOD** Recovery validation of alive microbes added in antibiotic eye drops was fulfilled by routine and by membrane filtration. **RESULTS** The average microbial recovery was 0 by routine and more than 65 % by membrane filtration respectively. **CONCLUSION** The method of membrane filtration can be used to detect bacterial amount for antibiotic eye drops.

KEY WORDS: antibiotic eye drops; bacterial amount; membrane filtration

中国药典 2000 年版二部附录对滴眼剂分为两大类,一类为供角膜创伤或手术用的滴眼剂,照无菌检查法检查;另一类为一般滴眼剂,要求做微生物限度检查,规定每 1 mL 供试品不得检出霉菌和酵母菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌,并且细菌总数不得过 100 个。根据中国药典,含抑菌成分供试品如干扰控制菌检查,必须将供试品处理后依法检查^[1]。对于抑菌作用较强的抗菌滴眼剂,其控制菌检查可采用薄膜过滤法消除抑菌成分的干扰后依法检查;而细菌总数测定采用常规法和培养基稀释法均不能去除抑菌成分,因此不能如实反映检品实际染菌情况。中国药典尚未提供其他方法对供试品的抑菌成分进行处理。本实验采用薄膜过滤操作,探讨抗菌滴眼剂菌数测定的方法。

1 材料和仪器

1.1 仪器

HTY-II 型智能集菌仪,反复使用集菌培养器,微孔滤膜(直径 50 mm,孔径 0.45 μm),均购于杭州高得医疗器械有限公司;WGP-400 隔水式电热恒温培养箱。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104],大肠杆菌[CMCC(B)44102]均由中国药品生物制品检定所提供,用前取相应菌株的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物 1 白金耳,接种至营养肉汤培养基中,在(36 ± 1) °C 培养 18 ~ 20 h,取出后置冰箱可保存一周,临用时用 0.9 % 无菌氯化钠溶液稀释至 1:10⁶,作为对照用菌液。

1.3 培养基

营养琼脂培养基,营养肉汤培养基,均由北京三药科技开发公司生产。

1.4 试剂

氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾均为化学纯,蛋白胨为生化试剂。配成稀释剂:① 0.9 % 氯化钠溶液;② pH7.0 缓冲氯化钠-蛋白胨水(含蛋白胨为 0.1 %)。

1.5 供试品

A 抗炎润睛滴眼液(有效成分为氧氟沙星,加有适量蜂蜜。批号:20011008、20020419);B 复方抗炎润睛滴眼液(在抗炎润睛滴眼液处方中加入醋酸地塞米松。批号:20011113、20020419);A 与 B 由惠州市中医院制剂室提供。C 复方氯霉素滴眼液(批号:020519);D 泰利必妥滴眼液(批

号:020519);E 复方妥布霉素滴眼液(批号:020601);F 妥布霉素滴眼液(批号:020601);G 利福平滴眼液(批号:020519);C 至 G 均由惠州市中心人民医院制剂室提供。H 氯霉素滴眼液(批号:20020510,广州东康药业有限公司;批号:20020529,广州天心药业股份有限公司;批号:20020412,山东正大福瑞达制药有限公司)。

2 方法和结果

2.1 细菌回收试验

2.1.1 常规法 分别取供试品 0.1 mL,加 100 ~ 200 CFU(同时用平皿计数)金黄色葡萄球菌、大肠杆菌或铜绿假单胞菌,注入约 45 °C 的营养琼脂培养基 15 ~ 20 mL,于 30 ~ 35 °C 培养 48 h,结果平皿均无菌落生长,即三种细菌添加回收率均为 0。

2.1.2 滤膜法^[2] 取供试品 1 mL,加入 100 mL 稀释剂中混匀,加 100 ~ 200 CFU(同时用平皿计数)金黄色葡萄球菌,迅速薄膜过滤操作,用稀释剂冲洗滤膜 3 次,每次 100 mL,作为试验组;同时以不加供试品同法操作为对照组,取出滤膜贴于营养琼脂培养基表面,换已灭菌的陶瓦盖于 30 ~ 35 °C 倒置培养 48 h,每组平行作 2 ~ 3 份,计数平均菌落数,以对照组计数为基础,计算试验组的回收率。另取 3 批供试品分别作大肠杆菌和铜绿假单胞菌添加回收试验,分别计算回收率。结果见表 1。

表 1 滤膜法微生物回收试验结果

Tab 1 The results of microbial recovery test by membrane filtration

供试品	回收率(%)					
	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		铜绿假单胞菌	
	稀释剂	稀释剂	稀释剂	稀释剂	稀释剂	稀释剂
	①	②	①	②	①	②
A20011008	95.2	97.0				
B20020419	73.2	75.1	66.3	78.6	70.3	75.3
C020519	87.3	83.6	72.3	82.5	75.2	79.5
D020519	71.4	70.9	65.1	76.5	63.6	78.5
E020601	65.1	67.2				
F020601	71.4	68.7				
G020519	77.8	79.1				
H20020510	87.3	87.3				
平均回收率	78.6	78.6	67.9	79.2	66.4	77.8

2.2 样品测定

取供试品 1 mL,不加菌液,其余同 2.1.2 操作,平行作 2

中国现代应用药杂志 2004 年 8 月第 21 卷第 4 期

~3 份,计数平均菌落数,结果见表 2。

表 2 供试品菌数测定结果

Tab 2 The results of detecting bacterial amount for sample

供 试 品	细菌总数(CFU/ mL)	
	稀释剂 ①	稀释剂 ②
A20011008	5	10
A20020419	2	2
B20011113	17	20
B20020419	8	5
C020519	6	6
D020519	4	3
E020601	3	1
F020601	2	3
G020519	14	13
H20020510	5	4
H20020529	5	3
H20020412	3	2

3 讨论

3.1 由常规法和滤膜法细菌回收试验结果可见,采用薄膜过滤法去除抗菌滴眼剂中抑菌成分的干扰后再进行菌数测定,是非常有意义和必要的。

3.2 实验中,采用正面向上贴膜,贴膜时要注意排尽气泡,

使滤膜紧贴培养基,并加干燥的陶瓦盖倒置培养。结果发现菌落生长饱满凸现,菌落形态、颜色各异,互不干扰,有利于计数和分离。曾经将陶瓦盖换以玻璃盖试验,结果滤膜上细菌菌落蔓延生长,边缘不清,无法计数。这是由于滤膜带有水分,加上培养基表面冷凝水的影响。在减少菌落蔓延生长方面采用陶瓦盖明显优越。

3.3 由于滤膜的直径为 50 mm,菌落少,计数误差则大;菌落多,则难于培养生长和计数。滤膜法计数宜选 30~100CFU/mL。

3.4 如果生长菌落的颜色与滤膜白色背景相似,可进行滤膜染色或培养基中加 TTC。

3.5 实验中滤膜法采用两种稀释剂分别对供试品进行处理,从营养成分来说,pH7.0 缓冲氯化钠-蛋白胨水更有利于受抑制和损伤的细菌修复,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典二部[S]:2000,附录 98。
- [2] 马绪荣,苏德模主编.药品微生物学检验手册[M].北京:科学出版社,2000,3:75。

收稿日期:2002-07-15