

0.5% 左氧氟沙星滴眼液微生物计数法抗菌活性的去除

刘晓婵

江苏艾苏莱生物科技有限公司

摘要: 本研究旨在消除 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抗菌活性, 并开发一种用于 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的微生物计数方法, 以评估该滴眼液样品的微生物计数方法的适用性。研究方法包括采用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 无菌滤膜对 0.5% 左氧氟沙星滴眼液供试液进行薄膜过滤, 随后用 500 mL pH 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进行冲洗, 每次冲洗液用量为 50 mL。在最后一次冲洗液中加入金黄色葡萄球菌菌液, 进行过滤、贴膜和培养计数。研究结论表明, 通过使用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 无菌滤膜过滤 0.5% 左氧氟沙星滴眼液供试液, 可获得较高的微生物回收率 (111%), 有效消除了 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抗菌活性。因此, 该方法适用于 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的微生物计数方法适用性试验。

关键词: 微生物计数方法; 抗菌活性; 左氧氟沙星滴眼液; 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 无菌滤膜

1 引言

0.5% 左氧氟沙星滴眼液是一种广谱抗菌滴眼液。左氧氟沙星的化学式为 $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, 属于喹诺酮类药物, 在水中微溶。体外试验表明, 左氧氟沙星对多种革兰阳性菌和革兰阴性菌展现出显著的抗菌活性。具体而言, 它对葡萄球菌属、链球菌属 (包括肺炎球菌)、细球菌属、肠球菌属、棒状杆菌属等革兰阳性菌, 以及假单胞菌属 (包括绿脓杆菌)、流感嗜血杆菌、莫拉氏菌属、沙雷氏菌属、克雷白氏菌属、变形杆菌属、不动杆菌属、肠杆菌属等革兰阴性菌均具有较强的抗菌作用。

根据《中国药典》四部 1105 表 2, 针对常见干扰物的中和剂或灭活方法, 喹诺酮类抗生素的中和剂可选用镁或钙离子^[1]。龙慧^[2]等人正在进行盐酸左氧氟沙星片微生物限度检查法的方法学研究时, 选用硫酸镁作为中和剂, 以进行盐酸左氧氟沙星片的微生物测

试。万进^[3]等人正在进行盐酸左氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法验证时, 采用钙离子 (Ca^{2+}) 来中和喹诺酮类抗菌药物的抗菌活性。舒静^[4]等人正在进行盐酸左氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法学验证时, 联合使用离心沉淀集菌法、薄膜过滤法及中和法, 以去除盐酸左氧氟沙星胶囊的抑菌活性。孙伟^[5]等人以 β 环糊精作为中和剂, 采用薄膜过滤法对喹诺酮类抗生素药品进行微生物限度方法学研究。

上述研究均采用中和剂来消除左氧氟沙星的抗菌活性, 但中和剂的配置过程较为复杂, 且在方法适用性试验中需要增设中和剂对照组, 这使得方法适用性试验和后续供试品的测试操作较为复杂, 增加了工作量。本文提出了一种新的试验方法, 通过将常用的混合纤维素膜 (MCE) 无菌滤膜更换为聚偏二氟乙烯 (PVDF) 无菌滤膜, 有效消除了左氧氟沙星的抗菌活性。该方法操作简便, 试验结果良好, 不仅提升了试验

效率, 还减少了因操作步骤复杂可能导致的微生物污染风险。

2 消除抑菌活性的方法

在微生物测试方法适用性试验中, 供试品的抑菌活性是一个难点。目前, 常用的消除抗菌活性的方法包括稀释法、薄膜过滤法、化学中和法和离心沉淀法。对于抑菌性较强的供试品, 可以联合使用上述方法以更有效地去除抗菌活性。为便于比较, 表 1 汇总了各消除抗菌活性方法的特点。

3 试验程序

本部分将详细介绍进行试验的具体步骤和方法, 以确保试验的准确性和可重复性。下文会提供一系列的指导原则和操作流程, 帮助实验者理解并遵循正确的试验程序, 从而获得稳定和一致的试验结果。

3.1 样品信息

在试验开始之前, 需要对样品进

表 1 抗菌活性的去除或灭活

方法	原理	适用范围	优势	不足
稀释法	通过增高稀释级或使用增加培养基体积的方法，减弱或消除供试液的抑菌活性	溶解性良好，抑菌活性较低样品	操作简便，对设备的要求不高	若样品本身混浊，会干扰计数结果；由于接种量限制，试验灵敏度有限
薄膜过滤法	采用孔径不大于 0.45 μm 的滤膜，过滤去除供试品中抑菌成分，微生物截留于滤膜上，同时可使用冲洗液冲洗滤膜上残留的供试品，将滤膜取出贴于培养基平板上培养，减弱和消除供试品抗菌活性	各类药品	大体积检验量，检验灵敏度较好；样品中的抑菌成分可被滤除；中和试剂可用在冲洗液中	操作相对复杂，有一定的测试设备要求；不适用于无法溶解的样品
化学中和法	中和剂或灭活剂可用于钝化、中和供试品的抑菌活性	抑菌活性较强且不易消除的样品	针对性地消除不同种类抑菌成分的抑菌活性	需要确认化学中和剂的浓度、加量及其他试验条件。操作复杂，增加工作量
离心沉淀法	利用沉降系数差异分离供试液中的供试品和悬浮其中的微生物	供试液中有不易溶解的沉淀物的样品	可去除供试液中不易溶解的沉淀物	供试液中的样品颗粒大小、粘稠度及污染的微生物大小等直接影响着样品中微生物的回收，存在检验结果不能真实反应供试品的污染情况的风险

行详细的记录和分类，包括样品的来源、类型、名称等关键信息，如表 2 所示。这些信息为试验的顺利进行提供了有力的数据支持。

3.2 试验仪器和材料

在进行科学试验或技术测试时，选择恰当的试验仪器和材料至关重要。试验仪器涵盖了各种精密测量设备、分析仪器等，它们对于准确获取试验数据、确保试验结果的可靠性和可重复性起着决定性作用。同时，试验材料的选择也极为重要。试验材料包括试验过程中使用的试剂、样品、耗材等，其纯度、稳定性和一致性直接关系到试验的准确性和有效性。关于主要设备、耗材、培养基和试剂、试验菌株的详细信息，请参见表 3、表 4、表 5 和表 6。

3.3 方法开发试验

3.3.1 试验步骤

取 1 mL 0.5% 左氧氟沙星滴眼液样品，转移至 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中，充分混匀，制备成 1:10 的供试品溶液。

首先，使用适量的冲洗液对过滤器的滤膜进行预冲洗，确保滤膜充分润湿。随后，将上述制备好的 1:10 供试品溶液进行过滤。用 1000 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜，每次冲洗液用量为 50 mL。在最后一

表 2 样品信息

样品名称	产品批号	来源
0.5% 左氧氟沙星滴眼液	CV1921	参天制药（中国）有限公司

表 3 主要设备

仪器设备	设备型号	仪器编号
生物安全柜	BSC-1004II A2	LE-2003
电子天平	XP6002S	LE-2139
移液器	10-100 μL	LE-2063
移液器	100-1000 μL	LE-2065
移液器	1000-10000 μL	LE-2069
生化培养箱	LRH-150	LE-2013
培养箱	MJ-150- II	LE-2016
微生物限度检测仪	EZ-Fit	LE-2141
涡旋振荡器	Vortex 3000	LE-2037

表 4 耗材

耗材	厂家	批号
一次性无菌培养皿	青岛海博	20191103
无菌滤杯（MCE）	默克	F0DB55437C
无菌滤杯（PVDF）	默克	F0AB26038
试管	国药	N/A
剪刀	国药	N/A
镊子	国药	N/A

表 5 培养基和试剂

培养基 / 试剂	厂家	批号
胰酪大豆胨琼脂 (TSA)	青岛海博	20191030
氯化钠	沪试	20200306
蛋白胨	青岛海博	20190726
无水磷酸氢二钠	沪试	20200414
磷酸二氢钾	科密欧	20190110
硫酸镁	国药	20200525

表 6 试验菌株

菌种名称及编号	英文名称及编号	厂家
金黄色葡萄球菌 CMCC(B) 26003	<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) CMCC(B) 26003	浙江泰林

次冲洗中加入 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 的金黄色葡萄球菌菌液 100 μ L，继续过滤。过滤完成后，将滤膜贴到 TSA 平板上，将平板倒置于 30 ~ 35 $^{\circ}$ C 的环境中培养，时间不超过 3 天。

3.3.2 不同试验条件的对比

使用不同浓度的含中和剂的 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液、含中和剂的 TSA 平板、MCE 无菌滤膜和 PVDF 无菌滤膜，按照上述步骤进行试验。具体的试验组合方式和试验结果详见表 7 和表 8。

由表 7 和表 8 可知，使用含 0.1 mol/L 硫酸镁中和剂的 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液和含 0.1 mol/L 硫酸镁中和剂的 TSA 平板，并未能有效去除 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抗菌活性。然而，将 MCE 无菌滤膜更换为 PVDF 无菌滤膜后，试验结果显示出明显的差异；在不使用硫酸镁中和剂的情况下，仅通过将滤膜由 MCE 无菌滤膜更换为 PVDF 无菌滤膜，0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抗菌活性得到了有效去除，且微生物生

长状况优于使用硫酸镁中和剂的试验组。

常规供试品薄膜过滤通常选用混合纤维素膜（MCE）无菌滤膜。MCE 滤膜由硝酸纤维素和醋酸纤维素制成，具有孔隙率高，孔径分布均匀，微孔阻力小，截留效果好，滤速快等特点，广泛应用于分析和研究领域。然而，MCE 无菌滤膜不耐有机液体和强酸碱溶液。

聚偏二氟乙烯（PVDF）无菌滤膜具备诸多优异性能：高机械强度和韧性、抗真菌性、高耐磨性、高渗透性、良好的热稳定性和阻燃性，以及耐化学腐蚀性和抗氧化性。此外，它还具有最低的蛋白吸附和优秀的化学兼容性，确保了结构的完整性。

使用 MCE 无菌滤膜时，0.5% 左氧氟沙星滴眼液中的左氧氟沙星无法被完全过滤，会在滤膜中残留，从而抑制微生物的生长。而 PVDF 无菌滤膜具有较低的吸附性，能够有效地过滤供试品溶液中的左氧氟沙星抑菌剂，消除左氧氟沙星的抑菌性能，使得微

生物能够良好生长。

3.4 试验步骤

3.4.1 试验组

取 1 mL 0.5% 左氧氟沙星滴眼液样品，转移至 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中，充分混匀，制备成 1:10 的供试品溶液。

首先，使用适量的冲洗液对过滤器的滤膜进行预冲洗，确保滤膜充分润湿。随后，将上述 1:10 的供试品溶液进行过滤。接着，依次使用 500 mL、800 mL、1000 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗滤膜，每次冲洗液用量为 50 mL。在最后一次冲洗液中加入 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 的金黄色葡萄球菌菌液 100 μ L，继续过滤。过滤完成后，将滤膜贴到 TSA 平板上。

3.4.2 供试品对照组

取 1 mL 0.5% 左氧氟沙星滴眼液样品，转移至 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中，充分混匀，制备成 1:10 的供试品溶液。

首先，使用适量的冲洗液对过滤器的滤膜进行预冲洗，确保滤膜充分润湿。随后，将上述 1:10 的供试品溶液进行过滤。接着，依次使用 500 mL、800 mL、1000 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗滤膜，每次冲洗液

表 7 方法开发试验 1 组

试验组	含 0.1 mol/L 硫酸镁 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液						
	0.1%	0.2%	0.5%		1.0%	2.5%	5.0%
含 0.1% 0.1 mol/L 硫酸镁 TSA 平板	MCE 滤膜	MCE 滤膜	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
含 0.5% 0.1 mol/L 硫酸镁 TSA 平板	N/A	N/A	MCE 滤膜	PVDF 滤膜	MCE 滤膜	MCE 滤膜	MCE 滤膜
试验组生长状况	无菌生长	无菌生长	无菌生长	有菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长

表 8 方法开发试验 2 组

试验组	含 0.1 mol/L 硫酸镁 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液				
	0.0%	0.1%	0.2%	0.5%	1.0%
含 0.5% 0.1 mol/L 硫酸镁 TSA 平板	PVDF 滤膜	PVDF 滤膜	PVDF 滤膜	PVDF 滤膜	PVDF 滤膜
试验组生长状况	生长良好	有菌生长	有菌生长	有菌生长	有菌生长

用量为 50 mL。在最后一次冲洗液中加入 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液 100 μ L，继续过滤。过滤完成后，将滤膜贴到 TSA 平板上。

3.4.3 菌液对照组

取 1 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液加入至 9 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中，充分混匀，制得 1:10 的样品溶液。

首先，使用适量的冲洗液对过滤器的滤膜进行预冲洗，确保滤膜充分润湿。随后，过滤上述制备的样品溶液。接着，分别用 500 mL、800 mL、1000 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗滤膜，每次冲洗液用量为 50 mL。在最后一次冲洗液中加入 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml 的金黄色葡萄球菌菌液 100 μ L，然后进行过滤。过滤结束后，将滤膜贴到 TSA 平板上。

3.4.4 阴性对照组

取 1 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液加入至 9 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中，充分混匀，制得 1:10 的样品溶液。

首先，使用适量的冲洗液对过滤器的滤膜进行预冲洗，确保滤膜成分润湿。随后，过滤上述制备的样品溶液。接着，用 1000 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液分次对滤膜进行冲洗，每次冲洗液用量为 50 mL。过滤结束后，将滤膜贴到 TSA 平板上。

3.4.5 培养

贴膜后的 TSA 平板应倒置于 30 ~ 35℃ 的培养环境中，时间不超过 3 天。

3.4.6 结果解释

在试验中，试验组的回收率在 50% ~ 200% 的范围内，且阴性对照组无菌生长。

回收率计算公式为：

回收率 = $\frac{\text{试验组} - \text{供试品对照组}}{\text{菌液对照组}} \times 100\%$

3.5 数据结果和分析

表 9 试验数据结果和分析

冲洗量	500 mL	800 mL	1000 mL
试验组	70	60	59
供试品对照组	0	0	0
菌液对照组	63	61	60
回收率 (%)	111	98	98
阴性对照		0	

根据上述试验数据，使用 PVDF 无菌滤膜薄膜过滤，并分别采用 500 mL、800 mL 和 1000 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液进行冲洗，每次冲洗液用量为 50 mL。在最后一次冲洗液中加入金黄色葡萄球菌菌液，能够获得较高的微生物回收率，有效地消除了 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抑菌性。试验结果（见表 9）显示，使用 500 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗时，微生物回收率为 111%，符合试验组回收率在 50% ~ 200% 范围内的要求。考虑到尽量减少冲洗量以降低对微生物生长的潜在影响，最终选择 500 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液作为 0.5% 左氧氟沙星滴眼液微生物计数法的冲洗量，以进行方法适用性试验。

4 结论

使用 PVDF 无菌滤膜薄膜过滤，配合 500 mL pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗，每次冲洗液用量为 50 mL，在最后一次冲洗液中加入金黄色葡萄球菌菌液进行过滤。过滤结束后，将滤膜贴到 TSA 平板上进行倒置培养和计数。此方法能够获得较高的微生物回收率（111%），有效地消除 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的抗菌活性，因此该方法适用于 0.5% 左氧氟沙星滴眼液的微生物计数方法适用性试验。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中国药典 2020 年版·二部 [Z], 2020.
[2] 龙慧, 吴鑫, 郝雷娜, 陈芳. 盐

酸左氧氟沙星片微生物限度检查法的方法学研究 [J]. 中国药房, 2014 年.

[3] 万进, 林蒙, 谢委, 王文清. 盐酸左氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法验证 [J]. 医药导报, 2015 年.

[4] 舒静, 谢艳娇, 邝少轶, 张丽. 盐酸左氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法学验证 [J]. 健康必读 (中旬刊), 2013.

[5] 孙伟, 刘文杰, 崔颖, 牛振东, 高春. β -环糊精在喹诺酮类抗生素药品微生物限度检查方法建立中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2013.