

泊沙康唑肠溶片微生物限度检查方法适用性研究

郑露¹ 周剑² 陈洁²△

1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331;

2. 重庆市食品药品检验检测研究院 国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室, 重庆 401121

[摘要] 目的 建立1种经过验证的检测泊沙康唑肠溶片中微生物限度的方法。方法 根据《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1105、1106相关要求,考虑到这种药物对微生物生长可能产生的影响,拟采用两种方法。方法一:常规法取1:10样品供试液直接接种胰酪大豆胨琼脂;方法二:薄膜过滤法,用聚偏氟乙烯(PVDF)膜薄膜冲洗过滤的方式去除抑菌性,将薄膜贴于平板,用来检查需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数;而大肠埃希菌则会采用常规法,取1:10供试液接种至100 ml 胰酪大豆胨液体培养基中进行检查。结果 泊沙康唑对白色念珠菌和黑曲霉有很强的抑制生长作用,但对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的生长抑制并不明显;对大肠埃希菌也没有明显影响。结论 需氧菌总数检查及霉菌和酵母菌总数计数用薄膜过滤法,冲洗液选择 pH 3.8 的生理盐水,滤膜选用 PVDF 滤膜;采用《中华人民共和国药典》2020 年版四部规定的常规法检测大肠埃希菌。本实验结果为泊沙康唑肠溶片提供了微生物限度检查方法的思路。

[关键词] 泊沙康唑;微生物限度;方法学验证;薄膜过滤

[中图分类号] R 975⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616 (2025)05-0041-04

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.10

Research on the applicability of microbial limit test method for posaconazole enteric-coated tablets

ZHENG Lu¹ ZHOU Jian² CHEN Jie²

1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, National Medical Products Administration, Key Laboratory of Quality Monitoring of Narcotic Psychotropic Drugs, Chongqing 401121, China

[Abstract] Objective To establish a validated method to detect the microbial limit test method for posaconazole enteric-coated tablets. **Methods** According to the relevant requirements of *People's Republic of China Pharmacopoeia* (2020 edition), Part IV, 1105 and 1106, considering the possible impacts of this drug on microbial growth, 2 methods were proposed. Method 1 was to take 1:10 samples for test solution by conventional method and directly inoculate tryptone soybean agar (TSA). Method 2 was to use membrane filtration method, in which the antibacterial activity was removed by washing and filtering polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, and the membrane was attached to a flat plate to check the total number of aerobic bacteria, molds and yeasts. However, *Escherichia coli* would be tested by inoculating 1:10 test solution into 100 ml TSA liquid culture medium by conventional method. **Results** Posaconazole had a strong inhibitory effect on *Candida albicans* and *aspergillus niger*, but it had no obvious inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *bacillus subtilis*. Simultaneously, it had no obvious effect on *Escherichia coli*. **Conclusion** The total number of aerobic bacteria is checked, and the total number of molds and yeasts is counted by membrane filtration method. The washing solution is physiological saline with pH 3.8, and the filtration membrane is PVDF filtration membrane. *Escherichia coli* is detected by the conventional method specified in *People's Republic of China Pharmacopoeia* (2020 edition, Part IV). The results of this experiment provide an idea of microbial limit test for posaconazole enteric-coated tablets.

[Key words] Posaconazole; Microbial limit; Methodological verification; Membrane filtration

近年来真菌感染性疾病在临床上的发病率和病死率在逐年升高,因此作为抗真菌感染药物的使用

[基金项目] 重庆市教育委员会科学技术研究计划项目 (KJQN202302803)。

△通讯作者

频率也在升高。抗真菌感染的治疗中,泊沙康唑是常用药,它的常用剂型是口服混悬液和肠溶片。念珠菌属、曲霉属等都为其常见的敏感微生物,在治疗念珠菌感染和侵袭性曲霉感染上有显著疗效^[1-3]。和其他唑类抗真菌药物作用相似,泊沙康唑也是通

过结合甾醇 14 α -去甲基酶,抑制酶的活性,从而干扰真菌麦角甾醇的生物合成,进而破坏真菌细胞膜的合成,从而起到抗真菌作用^[4-6]。因此,在对这类药品进行微生物污染状况合格性检查时,需要找到一种经过验证的合适方法,去除药品本身的抑真菌作用之后再行检查。在查阅相关文献后,未见针对泊沙康唑肠溶片微生物限度检查方法的文献报道。本文在进行泊沙康唑肠溶片的微生物限度方法适用性实验时,参照2020年版《中华人民共和国药典》四部通则^[7]中相关要求开展实验,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品名称 泊沙康唑肠溶片(批号S-POS21039,规格:100 mg)。

1.1.2 培养基 所用培养基[北京三药科技有限公司:TSB,批号211009;TSA,批号2208012;沙氏葡萄糖琼脂培养基,批号220221;沙氏葡萄糖液体培养基,批号201013;0.1%蛋白胨水溶液,批号21060302;pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液,批号220314;麦康凯液体培养基,批号220217;麦康凯琼脂(MAC),批号201229]。

1.1.3 实验菌株 实验所用菌株均来自中国食品药品检定研究院:金黄色葡萄球菌,菌种编号CMCC(B)26003;铜绿假单胞菌,菌种编号CMCC(B)10104;枯草芽孢杆菌,菌种编号CMCC(B)63501;白色念珠菌,菌种编号CMCC(F)98001;黑曲霉,菌种编号CMCC(F)98003;大肠埃希菌,菌种编号CMCC(B)44102。

1.1.4 仪器 电子天平(梅特勒托利多,型号QUINTIX612-1CN);生化培养箱(重庆四达试验设备有限公司,型号SHH-250LD);高压蒸汽灭菌器(日本HIRAYAMA,型号HVA-110);生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司,型号HFsafe-1200)。

1.2 方法建立

1.2.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法学验证菌液制备 金黄色葡萄球菌在35℃的条件下培养24 h,取新鲜培养物制备菌悬液,使其浓度为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml。枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌,也采用同样的方法制备。

先将白色念珠菌在25℃培养后,得到液体培养物。然后,与黑曲霉孢子洗脱液用无菌生理盐水稀释成 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml的浓度,作活菌计数备用。

实验组,方法一(常规法):称取样品10 g,加无菌磷酸盐缓冲液,振摇溶解,混匀,制成1:10供试液。在9.9 ml 1:10供试液中加入0.1 ml含

$10^3 \sim 10^4$ cfu的菌悬液,使单位容积内含菌量不超过100 cfu。用倾注平板法接种1 ml,凝固后,置规定温度培养(需氧菌总数在35℃培养5 d,霉菌和酵母菌计数在25℃培养7 d),观察结果。方法二(薄膜过滤法):首先制成1:10的供试液,取本品10 g加pH 3.8的无菌生理盐水溶液至100 ml制成。然后继续稀释至1:100,取10 ml供试液,混入pH 3.8的无菌生理盐水至100 ml得到。最后,取1:100供试液,静置10 min,取上清液1 ml与100 ml pH 3.8的无菌生理盐水溶液中混匀,采用薄膜过滤(实验膜材质:聚偏氟乙烯PVDF膜)。用700 ml pH 3.8的无菌生理盐水溶液冲洗(每次100 ml),最后一次用100 ml无菌生理盐水冲洗时,加入单位含菌量不超过100 cfu的实验菌。冲洗完成后,将膜贴于平板,置规定温度培养(需氧菌总数在35℃培养5 d,霉菌和酵母菌计数在25℃培养7 d),观察结果。

菌液组:取无菌生理盐水溶液代替供试液操作,置规定温度培养(需氧菌总数在35℃培养5 d,霉菌和酵母菌计数在25℃培养7 d),观察结果。

供试液对照组:取供试品分别按实验组的供试液制备方法,以稀释液代替菌液,置规定温度培养(需氧菌总数在35℃培养5 d,霉菌和酵母菌计数在25℃培养7 d),观察结果。

稀释剂对照组:取稀释液100 ml,加入适宜浓度的菌悬液使每毫升含菌量同实验组,静置10 min,取上层液体代替供试液同供试液对照组操作。

另作阴性、空白对照。

回收率公式:实验组菌落数与对照组的差值与菌落对照组菌落数的比值(以下简称比值)=(实验组菌数-供试液对照组菌数)÷菌液组菌数^[7](各实验菌比值应在0.5~2)。

1.2.2 控制菌大肠埃希菌方法学验证 选用胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养箱温度条件下,经过24 h培养后的培养物大肠埃希菌,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释制成每毫升含不超过100 cfu的菌悬液。

1.3 常规法实验分组

实验组:首先制成1:10供试液,取本品10 g加pH 3.8的无菌生理盐水至100 ml。然后取上述制备好的液体10 ml,加入总菌量不超过100 cfu大肠埃希菌,将混合了大肠埃希菌的10 ml供试液接种至100 ml胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养18~24 h^[7],取上述培养物1 ml转移至100 ml麦康凯液体培养基中,继续在44℃条件下培养48 h。最后取44℃培养物接种MAC培养基平板上,35℃培养72 h。

供试液对照组：取稀释液代替菌液同实验组操作，35℃培养 18 ~ 24 h^[4]，同实验组操作。

阳性对照组：取 0.9% 无菌氯化钠溶液代替供试液同实验组操作，按 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 1106 微生物限度检查法中控制菌大肠埃希菌检查方法检查，35℃培养 18 ~ 24 h^[7]，同实验组操作。

稀释剂对照组：取稀释液 100 ml，加入适宜浓度的菌悬液使每毫升含菌量同实验组，代替供试液同供试液对照组操作，按 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 1106 微生物限度检查法中控制菌大肠埃希菌检查方法检查，35℃培养 18 ~ 24 h^[7]，同实验组平行操作。

阴性对照组：取稀释液替代供试液、菌液，35℃培养 18 ~ 24 h^[7]，后续同实验组平行操作。

2 结果

2.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法学验证

表 1 为需氧菌总数验证结果，表 2 为霉菌和酵母菌总数验证结果。由表 1 和表 2 可以看出泊沙康唑肠溶片对白色念珠菌和黑曲霉有较强抑菌性，因此在检测该药品的需氧菌总数和霉菌酵母菌计数时不宜采用常规法。而方法二，对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的回收率均 >70%，符合国家药典对于计数方法适用性实验中，采用平皿法或薄膜过滤法时，菌数回收率应在 0.5 ~ 2 范围内的要求^[7]。

2.2 控制菌大肠埃希菌检测方法学验证

由表 3 可以看出泊沙康唑肠溶片对控制菌大肠埃希菌采用常规法检测时，没有抑菌作用。见表 3。

3 讨论

泊沙康唑肠溶片按 2020 年版《中华人民共和国药典》四部进行微生物限度方法适用性实验^[7]，结果显示可采用如下方法进行实验：取本品 10 g 加 pH 3.8 的无菌生理盐水溶液混匀，制成 1 : 10 供试液。取 10 ml 上述 1 : 10 供试液，加 pH 3.8 的无菌生理盐水溶液至混匀，作为 1 : 100 供试液。检查样品需氧菌总数时采用的方法为：取 1 : 100 供试液，静置 10 min，取上清液 1 ml 至 100 ml pH 3.8 的无菌生理盐水溶液中，薄膜过滤（实验膜材质：聚偏氟乙烯 PVDF 膜），用 pH 3.8 的 0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗 700 ml（每次 100 ml），最后用无菌生理盐水溶液 100 ml 冲洗一次，依法进行检查；霉菌和酵母菌总数检查方法：取 1 : 100 供试液，静置 10 min，取上清液 1 ml 至 100 ml pH 3.8 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，薄膜过滤（实验膜材质：聚偏氟乙烯 PVDF 膜），

表1 需氧菌总数回收率实验结果

菌种名称	方法	实验组	菌液组	供试液 对照组	回收率 (%)	稀释剂 对照组	回收率 (%)
金黄色 葡萄球菌	方法一	64	78	0	0.82	-	-
	方法二	58	83	0	0.70	60	0.72
	方法一	69	85	0	0.81	-	-
	方法二	57	80	0	0.71	58	0.73
	方法一	62	79	0	0.78	-	-
	方法二	52	72	0	0.72	53	0.74
铜绿假 单胞菌	方法一	61	69	0	0.88	-	-
	方法二	54	73	0	0.74	55	0.75
	方法一	62	71	0	0.87	-	-
	方法二	49	65	0	0.75	51	0.78
	方法一	57	66	0	0.86	-	-
	方法二	48	68	0	0.71	49	0.72
枯草芽 孢杆菌	方法一	36	59	0	0.61	-	-
	方法二	55	63	0	0.87	58	0.92
	方法一	35	62	0	0.56	-	-
	方法二	54	60	0	0.9	56	0.93
	方法一	39	64	0	0.61	-	-
	方法二	57	67	0	0.85	60	0.9
白色 念珠菌	方法一	0	66	0	0	-	-
	方法二	59	69	0	0.86	63	0.91
	方法一	0	70	0	0	-	-
	方法二	57	65	0	0.88	60	0.92
	方法一	0	63	0	0	-	-
	方法二	57	68	0	0.84	60	0.88
黑曲霉	方法一	0	59	0	0	-	-
	方法二	43	60	0	0.72	45	0.75
	方法一	0	53	0	0	-	-
	方法二	44	57	0	0.77	46	0.81
	方法一	0	58	0	0	-	-
	方法二	42	56	0	0.75	44	0.79

注 “-” 为无数据，阴性、空白对照均无菌生长

表2 霉菌和酵母菌总数回收率实验结果

菌种名称	方法	实验组	菌液组	供试液 对照组	回收率 (%)	稀释剂 对照组	回收率 (%)
白色 念珠菌	方法一	0	66	0	0	-	-
	方法二	59	69	0	0.86	63	0.91
	方法一	0	70	0	0	-	-
	方法二	57	65	0	0.88	60	0.92
	方法一	0	63	0	0	-	-
	方法二	57	68	0	0.84	60	0.88
黑曲霉	方法一	0	59	0	0	-	-
	方法二	43	60	0	0.72	45	0.75
	方法一	0	53	0	0	-	-
	方法二	44	57	0	0.77	46	0.81
	方法一	0	58	0	0	-	-
	方法二	42	56	0	0.75	44	0.79

注 “-” 为无数据，阴性、空白对照均无菌生长

表3 大肠埃希菌检测验证实验结果

样品批号	供试液对照组	实验组	阳性对照组	稀释剂对照组	阴性对照组
S-POS21039	-	+	+	+	-
S-POS21039	-	+	+	+	-
S-POS21039	-	+	+	+	-

注“-”表示无菌生长;“+”表示实验菌生长良好

用 pH 3.8 的 0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗 700 ml (每次 100 ml), 最后用 0.9% 无菌氯化钠溶液 100 ml 冲洗一次, 依法进行检查。控制菌大肠埃希菌检查法: 大肠埃希菌检查取 1 : 10 供试液 10 ml, 至 100 ml 胰酪大豆胨液体培养基中, 依法进行检查。均应符合规定。

泊沙康唑肠溶片在常规使用的稀释剂, 包括药典规定的无菌磷酸盐缓冲液、中性环境的生理盐水中都是混悬状态, 在用这些溶液作为薄膜过滤法的稀释剂和冲洗剂时, 由于药物无法被冲洗过滤掉, 对白色念珠菌和黑曲霉的回收率都为 0。查阅相关文献^[8], pH 3.8 的稀释液可以溶解泊沙康唑肠溶片, 且在该 pH 环境中泊沙康唑的稳定性也较好, 因此采用 pH 3.8 的无菌生理盐水作为溶剂和冲洗液。当采用 pH 3.8 的稀释液作为薄膜过滤法的冲洗剂时, 要注意加阳性对照菌的时间。随样品在冲洗前加入白色念珠菌和黑曲霉, 最终阳性对照的回收率不到 0.5, 不符合 2020 年版《中华人民共和国药典》四部要求。因此本次实验是在最后一次冲洗液中加入白色念珠菌和黑曲霉, 回收率符合 2020 年版《中华人民共和国药典》四部规定。对于过滤所采用的薄膜选择, 结合相关文献^[8-11] 研究结果显示, PVDF 膜对于泊沙康唑药物的吸附较小, 而且耐酸碱。因此本次过滤法滤膜的选择没有使用常规的尼龙膜、纤维素膜等吸附性强和不耐酸碱的滤膜^[12-15], 而是选择 PVDF 滤膜。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] 白向荣, 才可新. 临床药师参与泊沙康唑联合两性霉素 B 雾化治疗指状青霉菌感染的药学监护一例 [J]. 临床药物治疗杂志, 2023, 12 (21): 85-87.

[2] 操梅林, 徐燕丽, 张秀群, 等. 泊沙康唑预防侵袭性真菌感染有效性及安全性的荟萃分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15 (14): 309-314.

[3] 黄鑫, 魏晓晨, 陈凡. 泊沙康唑预防侵袭性真菌感染疗效与其稳态血药浓度关系的 Meta 分析 [J]. 天津药学, 2023, 35 (4): 26-34.

[4] 郭天阳, 杜安通, 杨雅骊, 等. 第二代三唑类抗真菌药物的研究进展 [J]. 世界临床药物, 2014, 35 (12): 715-718.

[5] 杨祥龙, 李金凤, 邵伟, 等. 泊沙康唑合成工艺研究进展 [J]. 化工时刊, 2019, 33 (11): 22-28, 37.

[6] 季海涛, 张万年, 周有骏. 抗真菌药物作用靶酶羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (2): 108.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 4 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1105-1106.

[8] 马仕洪, 肖璜, 袁宇, 等. 泊沙康唑注射液无菌检查方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (9): 1568-1572.

[9] 王晨, 薛玲, 林华, 等. 一次性使用输液器的药液过滤器、滤膜过滤性能的研究 [J]. 首都医药, 2011, 18 (20): 4.

[10] Shan Y. Experimental study on the interference of filter membrane adsorption on the dissolution of some oral drugs [J]. Anhui Med Pharm J, 2007, 11 (2): 118.

[11] 白玉国, 张爱琴, 魏娟娟. 丹参酮 II 粤磺酸钠与灯盏花素在一次性滤膜上的吸附性研究 [J]. 医药导报, 2011, 30 (5): 663.

[12] 单亚. 滤膜吸附对部分口服药物溶出度的干扰实验研究 [J]. 安徽医药, 2007, 11 (2): 118.

[13] 李元春, 张爱琴. 一次性使用输液器用药液过滤器滤膜纤维脱落的实验研究 [J]. 北京生物医学工程, 2000, 19 (1): 45.

[14] 武利顺, 孙俊芬, 王庆瑞. 聚偏氟乙烯膜研究进展 [J]. 膜科学与技术, 2004, 24 (5): 63.

[15] 覃辉, 张茜倩. 不同材质滤膜对于加替沙星滴眼液中抑菌剂的吸附性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (14): 1379-1382.

(收稿日期: 2024-05-29)