

中和剂消除增效复合胺消毒剂抑菌活性的研究

张玥莉^{1,2}, 王 芸^{1,2*}

1. 上海绿谷制药有限公司, 上海 201707

2. 上海复方中药(绿谷)工程技术研究中心, 上海 201707

摘要: 目的 选择合适的中和剂消除增效复合胺消毒剂的抑菌作用, 避免样品中微生物限度检查造成假阴性。方法 参照《中国药典》2020年版四部微生物限度有关规定, 联合薄膜过滤法, 分别采用3种中和剂配方去除季铵盐类消毒剂抗菌活性。结果 采用组合配方中和剂(聚山梨酯、皂苷、卵磷脂、组氨酸比例 30:30:3:1)并联合薄膜过滤法可消除季铵盐类消毒剂中的抑菌活性。结论 该方法所用中和剂组方经济易得, 可为季铵盐类消毒剂微生物限度检查方法的建立提供依据。

关键词: 中和剂; 增效复合胺消毒剂; 季铵盐类消毒剂; 微生物限度; 抑菌活性

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)03-0457-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.03.007

Bacteriostatic activity of neutralizing agent to eliminate synergistic serotonin disinfectant

ZHANG Yue-li^{1,2}, WANG Yun^{1,2}

1. Shanghai Green Valley Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201707, China

2. Shanghai Engineering Research Center of Compound Chinese Medicine (Green Valley), Shanghai 201707, China

Abstract: Objective To select the appropriate neutralizing agent to eliminate the bacteriostatic effect of synergistic serotonin disinfectant and avoid false negative caused by microbial limit test in the sample. **Methods** Three neutralizer formulation were used to remove the antibacterial activity of quaternary ammonium salt disinfectant according to the applicability test of microbial limit count method provide by *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition) volume IV and combined with the filtration and verification method. **Results** The method by using neutralizer formulation (Tween, saponin, lecithin, and histidine with proportion of 30:30:3:1) and filtration and verification method could eliminate the antibacterial activity of quaternary ammonium salt disinfectant. **Conclusion** The neutralizer formulation is economically and easily available, which can provide a basis for the establishment of microbial limit test method for quaternary ammonium salt disinfectants.

Key words: quaternary ammonium salt disinfectant; microbial limit test method

消毒剂是制药企业洁净区保障环境卫生、控制微生物污染的重要物料, 其中季铵盐类消毒剂最早报道于1915年。季铵盐类消毒剂具有低浓度有效、无刺激性、毒性低、使用安全、性质稳定等优势, 经过不断的更新换代, 升级为复合型消毒剂而被广泛使用^[1]。任何一种消毒剂抗菌谱都不可能完全覆盖所有微生物, 在使用过程中, 依旧存在微生物污染、耐药性产生的可能^[2-3], 因此对消毒剂中的微生物限度进行检查可为制药企业环境污染偏差调查提供有效依据, 为稀释后消毒剂有效期制定提供验

证参考, 并对进一步消毒剂污染菌耐药性研究提供检验参考。增效复合胺消毒剂主要成分是月桂胺二亚丙基二胺、双链季铵盐, 弥补了普通季铵盐类消毒剂抗菌谱小的缺点, 但同时因为其抑菌活性较高, 在微生物限度检查容易因方法不当造成假阴性, 因此本研究通过筛选验证中和剂配方, 建立季铵盐类消毒剂微生物限度的检查方法。

1 仪器与材料

BSC-1300IIA2X 生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司); XG1.GMX-0.36D 脉动真空灭菌器

收稿日期: 2020-11-04

作者简介: 张玥莉(1988—), 女, 天津人, 硕士, 研究方向为中药现代化与开发。E-mail: barjane@qq.com

*通信作者: 王 芸(1991—), 女, 上海人, 本科, 从事药品生产质量管理。E-mail: miliyayi@163.com

(山东新华医疗器械股份有限公司); MJ-250F-I 霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、XP105 电子天平(瑞士 Mettler Toledo)、HTY-30B 隔膜泵及 HTY-300 微生物检测过滤支架(浙江泰林生物技术股份有限公司)、80 L 消毒液配置罐(温州天龙机械科技有限公司)。

增效复合胺消毒浓缩液(德国舒美有限公司, 批号分别为 1536003、1275960、1143061); 注射用水(上海绿谷制药有限公司, 批号 191011); 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液(上海中科昆虫生物技术开发有限公司, 批号分别为 190424、191113、190927); 铜绿假单孢菌株、金黄色葡萄球菌株、枯草芽孢杆菌株、白色念珠菌株、黑曲霉菌株(北京三药科技开发公司, 1×10^3 cfu/颗, 批号分别为 190801、191025、190705、190903、191011); 肉膏(德国默克, 批号 1.03979.0500)、聚山梨酯 80(国药集团化学试剂有限公司批号, 批号 20191114)、皂苷(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20180420)、卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20181208)、组氨酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20181019)

2 方法

2.1 供试液的制备

取复合胺消毒浓缩液, 加入注射用水配制成 0.5% 的消毒液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤芯除菌滤过后待用。

2.2 培养基、缓冲液的制备

按照《中国药典》2020 年版四部有关内容进行培养基配制和适用性检查^[4], 经检查合格且在经验证的有效期限内方可使用。将制备好的培养基、缓冲液冷却至室温后于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 温度下保存。

2.3 菌悬液的制备

将 0.9% 无菌氯化钠 1.1 mL 加入定量菌株瓶中, 盖上瓶盖, 静置 30 s, 混匀, 根据所需菌数溶解或稀释。菌株溶解后, 在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下可保存 8 h。

2.4 中和剂的制备

中和剂 A: 称取 30 g 聚山梨酯 80、3 g 肉膏至 1 L pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 溶解, 分装、经 121°C 、20 min 湿热灭菌。

中和剂 B: 称取 30 g 聚山梨酯 80、3 g 卵磷脂至 1 L pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 溶解, 分装、经 121°C 、20 min 湿热灭菌。

中和剂 C: 称取 30 g 聚山梨酯 80、30 g 皂苷、

3 g 卵磷脂、1 g 组氨酸至 1 L 纯化水中, 溶解、分装、经 121°C 、20 min 湿热灭菌

2.5 试验操作

2.5.1 试验组 取 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 50 mL 润湿滤膜, 滤过; 取上述供试液 0.8 mL, 分别加至 3 种中和剂 9 mL 中, 混匀, 作用 10 min, 再加入 0.1 mL 试验菌液(使每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于 100 cfu) 混匀滤过, pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 100 mL 滤过, 将滤膜菌面朝上贴于相应培养基上, 每株试验菌平行制备两张滤膜。

2.5.2 菌液对照组 取 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液, 不加中和剂, 同 2.5.1 项下方法操作。

2.5.3 供试品对照组 取制备好的供试液, 以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液, 同 2.5.1 项下方法操作。

2.5.4 阴性对照组 取制备好的 pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液代替供试液, 不加试验菌液, 同 2.5.1 项下方法操作。

2.5.5 中和剂对照组 取相应量 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替供试液, 同 2.5.1 项下方法操作。

2.6 计数方法

按照《中国药典》2020 年版四部有关规定, 在适宜温度下对各培养基进行倒置培养, 培养结束后点计菌落数, 计算回收率。按照中国药典计数方法适用性结果判断的要求接受标准: 所有试验组比值、中和剂组菌比值均应在 $0.5 \sim 2.0$, 且阴性对照均无菌生长。

试验组比值 = (试验组平均回收菌数 - 供试品对照组平均回收菌数) / 菌液对照组平均回收菌数

中和剂组比值 = 中和剂对照组平均菌落数 / 菌液对照组平均菌落数

3 结果

3.1 中和剂 A 组试验

结果表明, 采用中和剂 A 所有试验组比值、中和剂组比值均能达到药典的要求, 试验组菌落形态与菌液对照组形态一致。但其中对铜绿假单孢菌的回收比值为临界下值, 且肉膏为进口材料, 价格较高, 且容易出现因贸易政策等导致的供应渠道不稳定的情况, 不作为最优选择。见表 1。

3.2 中和剂 B 组试验

结果表明, 单纯将药典推荐用中和剂组分卵磷

脂替代肉膏进行试验,金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的回收率不能达到药典的要求,中和剂 B 无法全面消除季铵盐类消毒剂中的抑菌活性。见表 2。

3.3 中和剂 C 组试验

进一步采用组合配方中和剂 C 进行试验。结果表明,所有试验组比值均能达到药典的要求,试验组菌落形态与菌液对照组形态一致,表明采用组合配方中和剂(聚山梨酯、皂苷、卵磷脂、组氨酸比例 30:30:3:1)并联合薄膜过滤法可消除季铵盐

类消毒剂中的抑菌活性;中和剂组菌比值也符合要求,表明中和剂本身对微生物无毒性。该方法操作简便,中和剂组方经济易得,可用于季铵盐类消毒剂的微生物限度检测。见表 3。

3.4 验证试验

采用组合配方中和剂 C(聚山梨酯、皂苷、卵磷脂、组氨酸比例为 30:30:3:1)并联合薄膜过滤法对 3 批 0.5% 的复合胺消毒液进行方法学验证,结果见表 4,均符合要求。

表 1 中和剂 A 各菌种平板培养计数结果

Table 1 Counting results of plate culture for each strain of neutralizer A

培养基	菌种	计数/(cfu·皿 ⁻¹)					试验组比值	中和剂组比值
		试验组 A	中和剂对照	菌液对照	供试品对照	阴性对照		
TSA	铜绿假单胞	16	17	29	0	0	0.5	0.6
TSA	金黄色葡萄球	51	50	49	0	0	1.0	1.0
TSA	枯草芽孢杆	35	31	34	0	0	1.0	0.9
TSA	白色念珠	24	26	20	0	0	1.2	1.3
TSA	黑曲霉	31	30	24	0	0	1.3	1.3
SDA	白色念珠	28	33	29	0	0	1.0	1.1
SDA	黑曲霉	34	37	35	0	0	1.0	1.1

表 2 中和剂 B 各菌种平板培养计数结果

Table 2 Counting Results of Plate Culture for Each Strain of Neutralizer B

培养基	菌种	计数/(cfu·皿 ⁻¹)					试验组比值	中和剂组比值
		试验组 B	中和剂对照	菌液对照	供试品对照	阴性对照		
TSA	铜绿假单胞	18	24	15	0	0	1.2	1.6
TSA	金黄色葡萄球	19	59	56	0	0	0.3	1.1
TSA	枯草芽孢杆	21	39	40	0	0	0.5	1.0
TSA	白色念珠	4	42	46	0	0	0.1	0.9
TSA	黑曲霉	27	21	31	0	0	0.9	0.7
SDA	白色念珠	1	23	27	0	0	0.0	0.8
SDA	黑曲霉	13	14	14	0	0	0.9	1.0

表 3 中和剂 C 各菌种平板培养计数结果

Table 3 Counting Results of Plate Culture for Each Strain of Neutralizer C

培养基	菌种	计数/(cfu·皿 ⁻¹)					试验组比值	中和剂组比值
		试验组 C	中和剂对照	菌液对照	供试品对照	阴性对照		
TSA	铜绿假单胞	23	26	24	0	0	0.9	1.1
TSA	金黄色葡萄球	77	74	77	0	0	1.0	1.0
TSA	枯草芽孢杆	54	50	53	0	0	1.0	0.9
TSA	白色念珠	65	61	70	0	0	0.9	0.9
TSA	黑曲霉	38	32	29	0	0	1.3	1.1
SDA	白色念珠	25	26	30	0	0	0.8	0.9
SDA	黑曲霉	18	18	15	0	0	1.2	1.2

表 4 中和剂 C 各菌种平板培养验证试验结果
Table 4 Results of Plate Culture of Each Strain in Validation Test

培养基	菌种	试验组比值			中和剂组比值
		1536003	1275960	1143061	
TSA	铜绿假单胞	1.1	0.9	1.2	1.0
TSA	金黄色葡萄球	0.9	1.1	1.0	1.0
TSA	枯草芽孢杆	1.1	1.1	1.0	1.2
TSA	白色念珠	0.9	0.9	0.9	0.9
TSA	黑曲霉	1.1	1.1	1.2	1.0
SDA	白色念珠	0.9	0.9	1.0	1.3
SDA	黑曲霉	0.9	1.1	1.0	0.9

3 讨论

洁净区是制药厂核心生产空间, 直接关系到药品质量, 关乎患者的生命健康, GMP 法规对其洁净程度要求十分严格^[5]。在消毒过程中, 消毒剂的使用效果、日常质量控制十分重要, 同时消毒剂不仅应用于制药厂洁净区, 还被广泛应用于食品制造、医院、临床、家庭日常使用等多个方面, 不正确的使用方式如配制错误、效期过长、滥用、消毒剂残留等问题均会造成抑菌效果差的影响, 容易引发二次污染^[6]。此时, 利用微生物限度检查方法监测消毒剂自身的污染情况显得尤为重要, 但由于消毒剂本身的抗菌性质, 对检验结果准确性有较大的干扰。通过各种处理, 确定消除供试品的抑菌性再进行微生物限度检查是药典检验方法筛选的基本原则, 也是检查方法适用性试验的重点和难点^[7], 其中中和法是最快速、最常用的去除方法, 故而中和剂的合理选择十分重要^[8]。通过回收率可反映中和剂的有效性和无毒性。消毒剂出厂检验所采用的中和剂虽然配制简单但成本较高, 国内尚无替代产品, 容易出现供应断裂的风险。研究表明卵磷脂联合聚山梨酯 80 对药物制剂抑菌活性抑制有较好的作用^[9-10]。对于抑菌活性更高的消毒剂, 本实验在组方中加入表面活性剂皂苷和环境领域常用中和剂组氨酸^[11], 获得较好的抑菌效果, 同时因作用机制、检验原理相同, 本实验中和剂配方的成功筛选也可以为季铵盐类消毒剂无菌检查和进一步的消

毒剂效力检查提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁建生. 季铵盐类消毒剂及其应用 [J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(2): 129-131.
- [2] 张艳娇, 刘海锋, 廖小微, 等. 临床金黄色葡萄球菌对消毒剂耐药性研究 [J]. 生物化工, 2019, 5(5): 110-112.
- [3] 杨 柳, 许 欣. 细菌对消毒剂抗性的研究进展 [J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21(6): 676-679.
- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 160-165.
- [5] 胡小凤, 刘 江. 药厂洁净室污染控制措施探讨 [J]. 科技与创新, 2018(7): 89-90.
- [6] 赵美丽. 国内外化学消毒剂应用的研究进展 [J]. 社区医学杂志, 2011(9): 8-12.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 567-568
- [8] 董 锟, 胡晓宁, 张慧敏, 等. 31 种消毒剂中和剂鉴定试验分析 [J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(5): 411-413.
- [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, 20(3): 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] 张 灿, 刘文君, 史 云, 等. 化学消毒的中和剂对水中内毒素活性检测的影响 [J]. 环境科学, 2015, 36(5): 1674-1677.

【责任编辑 解学星】