

## 聚山梨酯 80 对药品微生物限度检查的影响

赵新霞, 杨淑先\*, 王海波, 杨颀

(河南省食品药品检验所, 郑州 450018)

**摘要 目的:**分析不同来源、不同浓度的聚山梨酯 80 对试验菌生长的影响,为聚山梨酯 80 在药品微生物限度检查中的应用提供参考。**方法:**取不同生产厂家、不同批号的聚山梨酯 80,分别加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,制备成 3%、4%、5%、10%、15%、20% 浓度(v/v)的溶液,作为供试液。按照《中国药典》2015 年版四部通则 1105 和 1106,进行需氧菌、霉菌和酵母菌计数方法适用性试验。同时进行控制菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌检查的方法适用性试验。**结果:**不同来源、不同浓度的聚山梨酯 80 对需氧菌计数和控制菌检查试验结果的影响差别较大,对霉菌和酵母菌计数试验结果影响差别不大。**结论:**不同来源、不同浓度的聚山梨酯 80 对试验菌的生长影响不同。药品微生物限度检查中使用聚山梨酯 80 时,需注意聚山梨酯 80 的来源不同对试验结果造成的差异。

**关键词:**聚山梨酯 80;方法适用性试验;微生物限度检查

中图分类号:R 921.2

文献标识码:A

文章编号:1009-3656(2019)-2-0000-0

doi:10.19778/j.chp.2019.03.00?

## Effects of Polysorbate 80 on Microbiological Examination of Drugs

ZHAO Xinxia, YANG Shuxian\*, WANG Haibo, YANG Yang

(He'nan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450018, China)

**Abstract Objective:** To analyze the effects of different sources and concentrations of polysorbate 80 on the growth of test microorganisms and to provide a reference for the application of polysorbate 80 in microbiological examination of drugs. **Methods:** Polysorbate 80 from the different manufacturers and batches were added to pH 7.0 aseptic sodium chloride-peptone buffer solutions to prepare 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% (v/v) test solutions. According to Chinese Pharmacopoeia 2015 Volume IV general chapters 1105 and 1106, the method suitability tests for total aerobic microbial count, and total molds and yeasts count were carried out, and the method suitability tests for specified microorganisms of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were carried out. **Results:** The effects of different sources and concentrations of polysorbate 80 on total aerobic microbial count and tests for specified microorganisms had the big differences, while the effects on molds and yeasts count had less differences. **Conclusion:** The different sources and concentrations of polysorbate 80 have different effects on the growth of the test microorganisms. When polysorbate 80 is used in of drugs, attention should be paid to the differences of test results caused by different sources of polysorbate 80.

第一作者简介:赵新霞,主管药师;研究方向:微生物检验。Tel:18625569127;E-mail:zxxybfq@sohu.com

\* \* 通讯作者简介:杨淑先,副主任药师;研究方向:微生物检验。Tel:18625569136;E-mail:y63388265y@163.com

**Key words:** polysorbate 80; method suitability tests; microbiological examination

聚山梨酯 80 (Polysorbate) 又名吐温 80, 是非离子表面活性剂。聚山梨酯 80 分子中失水山梨醇环和较长的碳链结构具有亲油性, 而聚氧乙烯基具有亲水性, 醚键氧原子也能与水中氢原子生成氢键, 从而使其对亲脂性成分起到助溶作用<sup>[1]</sup>, 作为分散剂、乳化剂、增溶剂等常用于药品微生物限度检查中。另外聚山梨酯 80 还可以对季铵化合物、碘、对羟基苯甲酸类药物起中和作用<sup>[2-3]</sup>, 作为中和剂而使用。对于聚山梨酯 80 的中和作用, 也多有报道及阐述<sup>[4-6]</sup>。但聚山梨酯 80 的使用量以及其本身对药品微生物限度检查的影响却不是很明确。本实验采用不同生产厂家、不同批号及不同浓度的聚山梨酯 80 进行试验, 分析聚山梨酯 80 对试验菌生长的影响, 为聚山梨酯 80 在药品微生物限度检查中的应用提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BD240 培养箱 (BINDER), KB240 培养箱 (BINDER), SQ810C 压力蒸汽灭菌器 (重庆雅马拓科技有限公司), AC2-4S1 生物安全柜 (新加坡 ESCO)。

### 1.2 供试品

聚山梨酯 80 (A 生产厂家, 批号 2018 年 1 月 22 日) (A1), 聚山梨酯 80 (A 生产厂家, 批号 2015 年 12 月 07 日) (A2), 聚山梨酯 80 (B 生产厂家, 批号 2018/01/17) (B1), 聚山梨酯 80 (C 生产厂家, 批号 2018 年 5 月 2 日) (C1), 聚山梨酯 80 (C 生产厂家, 批号 2013 年 11 月 29 日) (C2), 聚山梨酯 80 (D 生产厂家, 批号 2012 年 7 月 23 日) (D1)。

### 1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基 (Soya bean casein digest agar, 简称 TSA) (美国 BD 公司, 批号 7283660); 沙氏葡萄糖琼脂培养基 (Sabouraud-dextrose agar, 简称 SDA) (美国 BD 公司, 批号 6294544); 胰酪大豆胨液体培养基 (Soya bean casein digest broth, 简称 TSB) (美国 BD 公司, 批号 7250969); 甘露醇氯化钠琼脂培养基 (广东环凯微生物科技有限公司, 批号 1069621); 十六烷三甲基溴化铵琼脂培养基 (青岛高科技工业园海博生物技术有限公司, 批号 20170601); 麦康凯液体培养基 (青岛高科技工业园海博生物技术有限公司, 批号 20170405); 麦康凯琼脂培养基 (BD, 批号 6005712)。培养基适用性试验

结果均符合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2015 年版的规定。

### 1.4 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26 003], 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63 501], 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10 104], 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*), 白色念珠菌 (*Candida albicans*) [CMCC(F) 98 001], 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98 003]。以上菌种均来源于中国食品药品检定研究院。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌液制备

取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌, 分别接种至胰酪大豆胨液体培养基中, 32 °C 培养 22 h; 取白色念珠菌, 接种至沙氏葡萄糖液体培养基中, 25 °C 培养 2 d; 以上培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液。取黑曲霉, 接种至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上, 培养 7 d, 加入 5 mL 含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱; 用含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 (注: 因在预试验中 C 生产厂家, 批号为 2018 年 5 月 2 日的聚山梨酯 80 在 10% 浓度时, 各试验菌的回收比值均在 0.5~2 之间, 显示对试验菌无抑制作用; 因此在制备黑曲霉孢子悬液时所用的聚山梨酯 80 为该批号的聚山梨酯 80) 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

### 2.2 供试液制备

取聚山梨酯 80, 分别加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 制备成 3%、4%、5%、10%、15% 及 20% 浓度 (v/v) 的溶液, 作为供试液。

### 2.3 需氧菌总数计数方法适用性试验

**2.3.1 试验组** 取 10 mL 供试液, 加入 0.1 mL 试验菌液, 混匀, 使每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 cfu。立即取 1 mL, 置于平皿中, 立即倾注胰酪大豆胨琼脂培养基约 20 mL, 凝固后培养, 计数, 作为 0 min 时的需氧菌总数。5 min、10 min、15 min 时取供试液与试验菌液的混合溶液 1 mL, 倾注胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA), 培养, 计数, 分别作为 5 min、10 min、15 min 时的需氧菌总数。

**2.3.2 供试品对照组** 取 10 mL 供试液, 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替试验菌液同试

验组操作。

**2.3.3 菌液对照组** 取 10 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 代替供试液, 同试验组操作。

#### 2.4 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

**2.4.1 试验组** 取 10 mL 供试液, 加入 0.1 mL 试验菌液, 混匀, 使每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 cfu。立即取 1 mL, 置于平皿中, 立即倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基约 20 mL, 凝固后培养, 计数, 作为 0 min 时的霉菌和酵母菌总数。15 min 时取供试液与试验菌液的混合溶液 1 mL, 倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA), 培养, 计数, 作为 15 min 时的霉菌和酵母菌总数。

**2.4.2 供试品对照组** 取 10 mL 供试液, 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替试验菌液同试验组操作。

**2.4.3 菌液对照组** 取 10 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 代替供试液, 同试验组操作。

#### 2.5 控制菌检查方法适用性试验

**2.5.1 大肠埃希菌检查** 取供试液 10 mL 及 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的大肠埃希菌悬液, 接种于 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 32 °C 培养 18 h。取上述培养物 1 mL 接种于 100 mL 麦康凯液体培养基中, 43 °C 培养 24 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上, 32 °C 培养 18 h。

**2.5.2 金黄色葡萄球菌检查** 取供试液 10 mL 及 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌悬液, 接种于 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 32 °C

培养 18 h 3。取上述培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上, 32 °C 培养 18 h。

**2.5.3 铜绿假单胞菌检查** 取供试液 10 mL 及 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的铜绿假单胞菌悬液, 接种于 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 32 °C 培养 18 h。取上述培养物划线接种于十六烷三甲基溴化铵琼脂培养基平板上, 32 °C 培养 18 h。

#### 2.6 计算

需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数试验菌的回收比值按如下公式计算:

试验菌回收比值 = (试验组的平均菌落数 - 供试品对照组的平均菌落数) / 菌液对照组的平均菌落数。

#### 2.7 结果

计数方法适用性试验的结果判断为试验组各试验菌的回收比值均应在 0.5 ~ 2 范围内, 控制菌检查适用性试验的结果判断为应能检出所加试验菌的相应反应特征。

**2.7.1 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌回收比值试验结果** 由表 1 结果可知, 金黄色葡萄球菌的回收比值均在 0.5 ~ 2 之间; 铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的回收比值随着聚山梨酯 80 的来源不同、浓度不同以及加入培养基的时间不同而差别较大, 在 20% 浓度时差别尤为明显。示例将表 1 中 20% 浓度时铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的回收比值用折线图更直观地表示, 如图 1 所示。

表 1 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌回收比值

Tab. 1 Recovery ratio of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*

供试品 (sample)	浓度 (concentration)/ %	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )				铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )				枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )			
		0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min
A1	3	0.84	0.72	0.63	0.64	0.66	0.63	0.70	0.51	0.78	0.40	0.36	0.35
	4	0.73	0.66	0.64	0.52	0.67	0.61	0.50	0.34	0.72	0.39	0.35	0.25
	5	0.66	0.61	0.55	0.59	0.64	0.57	0.43	0.34	0.57	0.37	0.20	0.16
	10	0.78	0.71	0.66	0.64	0.59	0.54	0.41	0.18	0.22	0.06	0.06	0.04
	15	0.73	0.73	0.77	0.66	0.54	0.52	0.16	0.04	0.14	0.05	0.04	0.05
	20	0.64	0.63	0.60	0.55	0.52	0.24	0.06	0.02	0.11	0.03	0.02	0.02
A2	3	1.0	1.1	0.93	0.88	1.1	1.2	1.2	1.0	1.2	0.94	1.0	1.0
	4	1.0	1.0	0.97	0.92	1.1	1.3	1.1	1.0	1.0	1.0	0.97	0.80
	5	0.92	0.88	0.90	0.83	1.1	1.2	0.94	0.98	0.99	0.92	0.90	0.73
	10	0.90	0.83	0.91	0.84	1.1	1.2	1.0	0.98	0.95	0.86	0.89	0.53
	15	0.84	0.75	0.75	0.81	0.93	0.91	0.79	0.72	0.64	0.38	0.29	0.25
	20	0.73	0.67	0.68	0.68	0.86	0.90	0.75	0.56	0.57	0.29	0.20	0.16

续表 1 (Tab. 1 continued)

供试品 (sample)	浓度 (concentration)/ %	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )				铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )				枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )			
		0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min
		B1	3	1.1	0.84	0.91	0.78	0.84	0.91	0.69	0.61	0.72	0.70
	4	1.0	0.80	0.84	0.76	0.76	0.72	0.65	0.66	0.71	0.66	0.61	0.55
	5	1.1	0.75	0.82	0.71	0.85	0.81	0.83	0.65	0.66	0.61	0.55	0.57
	10	0.86	0.81	0.69	0.63	0.70	0.63	0.68	0.60	0.60	0.54	0.51	0.41
	15	0.78	0.66	0.67	0.58	0.78	0.64	0.66	0.57	0.40	0.35	0.25	0.28
	20	0.68	0.67	0.66	0.56	0.75	0.63	0.46	0.33	0.38	0.25	0.20	0.21
C1	3	1.2	1.3	1.2	1.0	0.99	1.2	0.99	0.95	1.4	1.3	1.4	1.4
	4	1.3	1.0	1.1	0.97	0.97	1.2	1.0	1.0	1.2	1.2	1.0	1.1
	5	1.1	1.0	1.0	1.1	0.97	1.0	0.87	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0
	10	1.0	0.96	1.0	1.0	1.0	1.0	0.96	0.95	1.2	1.1	1.1	1.0
	15	1.0	0.91	0.89	0.87	0.97	0.95	0.96	0.92	1.2	1.1	1.0	1.0
	20	0.94	0.85	0.77	0.80	0.98	0.93	0.93	0.90	1.3	1.0	1.1	0.98
C2	3	1.0	0.86	1.0	0.81	1.1	0.99	0.93	1.0	0.91	0.83	0.79	0.72
	4	0.91	0.87	0.88	0.91	1.2	0.99	1.0	1.0	0.93	0.86	0.76	0.68
	5	0.86	0.85	0.83	0.81	1.1	1.1	0.97	1.0	0.90	0.79	0.63	0.61
	10	0.90	0.87	0.90	0.71	1.1	1.1	1.0	0.97	0.87	0.75	0.77	0.70
	15	0.87	0.84	0.84	0.84	1.0	1.1	1.0	0.93	0.83	0.64	0.73	0.60
	20	0.89	0.90	0.90	0.86	0.78	0.82	0.74	0.65	0.69	0.64	0.57	0.52
D1	3	0.92	1.1	0.85	0.92	1.3	1.3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.3	1.1
	4	0.87	1.0	0.88	0.77	1.3	1.2	1.2	1.0	1.4	1.2	1.1	1.1
	5	0.82	0.84	0.82	0.67	1.1	1.0	0.93	0.99	1.2	1.1	1.0	1.1
	10	0.87	0.85	0.81	0.84	1.1	1.1	1.0	0.96	0.96	1.0	0.93	0.94
	15	0.76	0.80	0.68	0.60	1.2	1.0	0.98	0.97	0.90	0.86	0.85	0.65
	20	0.75	0.65	0.70	0.63	0.96	1.0	0.95	0.81	0.67	0.70	0.59	0.59

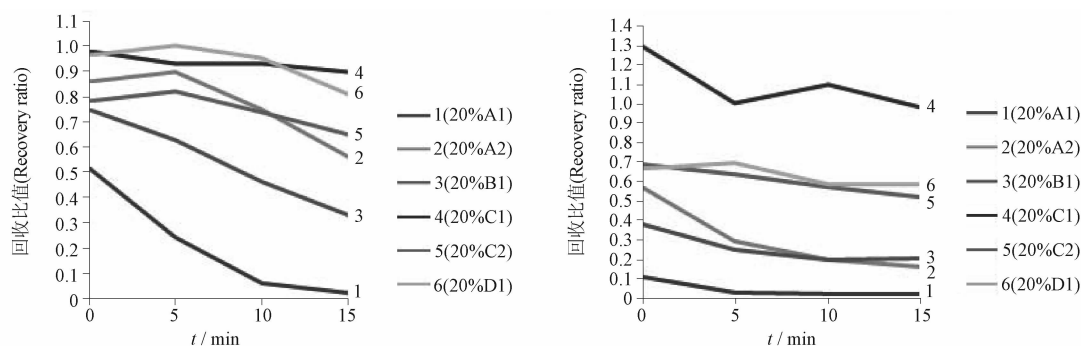


图 1 20% 浓度时铜绿假单胞菌(A)及枯草芽孢杆菌(B)的回收比值折线图

Fig. 1 The recovery ratio of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* at 20% concentration

**2.7.2 白色念珠菌和黑曲霉回收比值试验结果**  
由表 2 结果可知,白色念珠菌和黑曲霉在 TSA 培养基上和 SDA 培养基上的回收比值均在 0.5 ~ 2 之间。

**2.7.3 控制菌检查适用性试验结果** 如表 3 结果,控制菌检查中试验组检出试验菌用“+”表示,未检

出试验菌用“-”表示。由结果可知,A1 聚山梨酯 80,在 15% 和 20% 浓度时对大肠埃希菌有抑制作用,试验组未检出试验菌,其余生产厂家和批号的聚山梨酯 80 试验组均检出试验菌。A1 聚山梨酯 80,在 3% ~ 20% 浓度均对金黄色葡萄球菌有抑制作用,试验组均未检出试验菌;B1 聚山梨酯 80,在

10% ~ 20% 浓度均对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 试验组均未检出试验菌; 其余生产厂家和批号的聚山梨酯 80 试验组均检出试验菌。A1 聚山梨酯 80, 在 5% ~ 20% 浓度均对铜绿假单胞菌有抑制作用,

试验组均未检出试验菌; B1 聚山梨酯 80, 在 20% 浓度对铜绿假单胞菌有抑制作用, 试验组未检出试验菌; 其余生产厂家和批号的聚山梨酯 80, 试验组均检出试验菌。

表 2 白色念珠菌和黑曲霉回收比值

Tab. 2 Recovery ratio of *Candida albicans* and *Aspergillus Niger*

供试品 (sample)	浓度 (concentration)/%	白色念珠菌( <i>Candida albicans</i> )						黑曲霉( <i>Aspergillus niger</i> )					
		TSA			SDA			TSA			SDA		
		15 min	5 min	10 min	15 min	0 min	15 min	0	min	5 min	10 min	15 min	0 min
A1	3	0.93	0.90	0.87	0.78	0.90	0.84	1.4	1.4	1.4	1.3	1.0	0.82
	4	0.93	1.1	0.81	0.76	0.90	0.70	1.3	1.4	1.4	1.3	0.98	0.99
	5	0.91	0.93	0.96	0.83	1.0	0.76	1.4	1.2	1.3	1.0	1.0	0.97
	10	0.90	1.2	1.2	0.85	0.88	0.81	1.1	1.2	1.0	1.0	1.1	1.0
	15	0.84	0.95	1.0	0.85	0.85	0.84	1.1	1.1	0.98	0.95	1.0	0.97
	20	0.88	1.0	0.91	0.81	0.76	0.81	1.1	1.0	1.0	1.1	0.95	0.84
A2	3	1.2	1.1	1.1	0.95	1.1	1.2	1.3	1.3	1.2	1.2	1.4	1.2
	4	1.0	1.2	0.99	1.0	1.3	1.0	1.2	1.1	1.0	0.95	1.2	1.2
	5	0.98	1.0	1.0	0.89	1.3	0.97	1.1	1.1	0.98	1.0	1.0	0.99
	10	0.91	0.87	0.94	0.90	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	0.97	1.0	1.0
	15	0.92	0.89	0.91	0.90	0.94	0.97	1.1	1.2	1.0	1.1	1.1	0.96
	20	0.85	0.81	0.80	0.83	0.96	0.88	1.2	1.1	1.1	0.94	1.0	1.1
B1	3	1.0	0.92	1.0	1.1	1.3	1.1	1.3	1.2	1.2	1.1	1.4	1.3
	4	1.0	1.1	1.1	0.98	1.2	1.0	1.3	1.0	1.1	1.0	1.3	1.1
	5	1.1	0.98	1.0	0.96	1.2	0.94	1.2	1.3	1.0	0.96	1.2	1.0
	10	1.4	1.0	0.91	0.91	1.0	1.0	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0
	15	1.2	1.1	0.87	0.89	0.93	0.95	1.2	1.0	1.2	1.1	0.99	1.0
	20	0.96	0.99	0.96	0.80	0.96	0.93	1.1	1.1	1.0	1.2	1.0	0.97
C1	3	1.2	0.93	0.91	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.3	1.1
	4	1.1	0.91	0.95	1.0	0.97	1.0	1.1	1.2	1.0	0.98	1.0	0.92
	5	1.1	1.0	1.0	0.94	1.1	0.98	1.3	1.1	1.2	1.1	1.2	1.0
	10	0.96	0.88	0.82	0.80	1.0	1.0	1.0	1.1	0.94	0.96	0.97	0.93
	15	0.98	0.87	0.96	0.95	0.95	0.98	1.2	1.0	1.1	1.0	0.98	1.0
	20	0.84	0.78	0.77	0.69	0.90	0.88	0.99	0.95	1.2	1.0	0.96	0.91
C2	3	1.1	0.99	0.94	0.90	0.97	0.91	1.3	1.1	1.0	0.89	1.2	0.99
	4	1.2	1.1	0.93	0.90	1.1	0.93	1.2	1.0	0.97	0.98	1.2	1.3
	5	1.1	1.1	0.94	0.86	0.94	0.92	1.1	1.2	0.95	0.96	1.3	1.1
	10	0.95	0.94	0.86	0.88	1.0	1.0	1.1	1.2	1.2	1.0	0.92	1.1
	15	0.85	0.88	0.83	0.75	0.92	1.0	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	0.97
	20	0.84	0.86	0.78	0.75	0.86	0.81	1.3	1.3	0.95	0.91	1.2	0.88
D1	3	1.0	0.89	0.86	0.86	1.2	1.1	1.2	1.1	1.3	1.1	1.4	1.3
	4	1.1	1.1	0.88	0.90	1.4	1.0	1.1	1.2	1.0	0.95	1.2	1.2
	5	1.0	0.87	0.95	0.86	1.2	1.2	1.2	1.0	1.0	0.89	1.2	0.97
	10	0.93	0.86	0.86	0.88	1.1	1.2	1.1	1.0	0.97	0.99	0.96	1.0
	15	1.0	0.81	0.75	0.76	1.0	0.96	1.2	1.0	0.96	0.92	1.0	1.1
	20	0.98	0.82	0.79	0.67	0.95	0.95	1.0	0.95	1.0	0.90	1.1	0.93

表3 控制菌检查适用性试验结果

Tab.3 Results of suitability test for specified microorganisms

供试品 (sample)	浓度 (concentration)/%	控制菌(specified microorganisms)		
		大肠埃希菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )
A1	3	+	-	+
	4	+	-	+
	5	+	-	-
	10	+	-	-
	15	-	-	-
	20	-	-	-
A2	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	+	+	+
	20	+	+	+
B1	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	10	+	-	+
	15	+	-	+
	20	+	-	-
C1	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	+	+	+
	20	+	+	+
C2	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	+	+	+
	20	+	+	+
D1	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	+	+	+
	20	+	+	+

### 3 讨论

#### 3.1 加入培养基的时间对试验菌回收比值的影响

《中国药典》2015年版四部通则1105“供试品计数方法适用性试验”中,没有要求“立即倾注琼脂培养基”<sup>[7]</sup>。本实验采用在不同的时间加入培养

基,测定各试验菌的回收比值,结果发现加入培养基的时间不同,对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的回收比值影响很大。这也提示我们在进行药品微生物限度检查方法学适用性试验时,要考虑加入培养基时间顺序不同,而造成试验结果不同,试验方法无法

重现的问题。

### 3.2 聚山梨酯 80 对计数方法适用性试验结果的影响

聚山梨酯 80 因来源及浓度不同,对枯草芽孢杆菌的抑菌作用差别较大;对铜绿假单胞菌的抑菌作用随着加入培养基时间的延长出现较明显的差别;对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的生长影响较小;对黑曲霉的生长几乎没有影响。由于需氧菌的方法适用性试验以 5 株试验菌即枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收比值为指示,霉菌和酵母菌的方法适用性试验以白色念珠菌和黑曲霉的回收比值为指示。因此聚山梨酯 80 的来源和浓度的不同,对需氧菌总数计数方法适用性试验结果影响较大,对霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验结果影响较小。

### 3.3 聚山梨酯 80 对控制菌检查的影响

不同来源的聚山梨酯 80 对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生长影响较大,来源不同,对试验菌产生抑制作用的浓度不同;对大肠埃希菌的生长影响相对较小。

### 3.4 聚山梨酯 80 的外观性状与抑菌作用的相关性

本实验通过对比发现,无抑菌作用的聚山梨酯 80 与有抑菌作用的聚山梨酯 80 在颜色上有明显的差异。无抑菌作用的聚山梨酯 80 颜色均呈深黄色,用纯化水稀释 3~4 倍后,颜色与《中国药典》四部通则 0901 中的标准比色液的 Y10(黄色 10 号)相当;而有抑菌作用的聚山梨酯 80,颜色均呈黄绿色,与标准比色液的 YG9(黄绿色 9 号)或 YG10(黄绿色 10 号)相当。从聚山梨酯 80 的颜色上可加以区分。

### 3.5 结语

聚山梨酯 80 系油酸山梨坦和环氧乙烷聚合而成的聚氧乙稀 20 油酸山梨坦,在制备过程中可能会存在环氧乙烷的残留,而环氧乙烷有杀菌的作用;另外聚山梨酯 80 不是单一类型的化学结构,在制备过程中,由于山梨醇的脱水程度及油酸酯化度不同,而

形成的化学组分多样性。不同来源的聚山梨酯 80,其内在的化学组分、含量及增溶作用的强弱都不完全相同<sup>[8]</sup>。因此在药品微生物限度检查中,使用聚山梨酯 80 时,要考虑由于聚山梨酯 80 来源不同所造成的试验结果不同。有时加入聚山梨酯 80 并未达到预期的结果或起到有效的作用甚至还有一定的抑菌作用,可以考虑换用其它来源的聚山梨酯 80 进行试验,比较结果。

### 参考文献

- [1] 聂黎行,何雨晴,戴忠,等. 聚山梨酯 80 质量评价及检测方法的研究概况[J]. 药物评价研究,2017,40(7):1005  
NIE LX, HE YQ, DAI Z, *et al.* Research progress on quality evaluation and assay methods of polysorbate 80 [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(7):1005
- [2] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:142  
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015:142
- [3] USP40-NF35 [S]. 2017:119
- [4] 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  
ZHANG GH, YU L. Neutralization of antibacterial activity of drugs in microbial limit test by polysorbate 80 and lecithin[J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(7):1127
- [5] 廖祥茹,陈晨,李旸,等. 聚山梨酯 80 在微生物限度检查中的应用[J]. 中国药师,2014,17(10):1776  
LIAO XR, CHEN C, LI Y, *et al.* Application of polysorbate 80 in microbial limit test[J]. China Pharm, 2014, 17(10):1776
- [6] 李趣嫦,曾璞,肖建光,等. 50 种中成药微生物限度检查法的适用性试验及结果分析[J]. 药物分析杂志,2017,37(12):2214  
LI QC, ZENG P, XIAO JG, *et al.* Microbial limit test for determination of 50 Chinese patent drugs and results analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(12):2214
- [7] 中华人民共和国药典 2010 年版. 一部[S]. 2010:附录 X III C  
ChP 2010. Vol I [S]. 2010: Appendix X III C
- [8] 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  
ZHANG R, WANG Y, GAO ZS, *et al.* Relationship between the chemical composition of polysorbate 80 and its solubilization effect [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(10):876

(收稿日期:2018-12-06)