

葡萄糖酸依诺沙星注射液无菌检查方法的建立及验证

刘 栋*, 汤长明(解放军第153中心医院药械科, 郑州 450042)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1263-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.40

摘要 目的:建立和验证葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法。方法:根据2010年版《中国药典》,采用薄膜过滤法,以0.1%蛋白胨水溶液为冲洗液,考察在不同冲洗液量和在培养基中加入中和剂时,6种阳性对照菌的生长情况。结果:在冲洗液量为每管300 ml、每次冲洗100 ml,使用含0.2 mol/L Mg^{2+} 的培养基时,所有阳性对照菌均生长良好。结论:最终确立的葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法为以大肠埃希菌为阳性对照菌,采用0.1%蛋白胨水溶液冲洗3次(每次100 ml),经薄膜过滤后加入含 Mg^{2+} 培养基。本法简便、冲洗量相对较少,是葡萄糖酸依诺沙星注射液一种较为理想的无菌检查方法。

关键词 葡萄糖酸依诺沙星注射液;无菌检查;方法验证;阳性对照菌;中和剂

Establishment and Validation of the Method of Sterility Test for Enoxacin Gluconate Injection

LIU Dong, TANG Chang-ming (Dept. of Pharmacy, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish and validate the method of sterility test for Enoxacin gluconate injection. METHODS: According to *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), membrane filtration method was used and 0.1% peptone water was used as flushing liquid. The growth of 6 positive control bacteria was observed and investigated with different volumes of flushing liquid or adding neutralization into culture medium. RESULTS: All of 6 positive control bacteria grew normally with 300 ml flushing liquid in each tube (100 ml each time) and culture medium containing 0.2 mol/L Mg^{2+} . CONCLUSIONS: The sterility test for Enoxacin gluconate injection was finally established with the positive bacteria of *Escherichia coli*, flushing three times by 0.1% peptone solution (100 ml each time) and adding medium containing Mg^{2+} after membrane filtration. The method is simple with less flushing liquid relatively. It is an ideal method for the sterility test of Enoxacin gluconate injection.

KEYWORDS Enoxacin gluconate injection; Sterility test; Method validation; Positive control; Neutralization

依诺沙星为第三代喹诺酮类药物,在临床上广泛用于敏感菌所致的咽喉、支气管、肺、尿路、前列腺等部位感染^[1]。由于葡萄糖酸依诺沙星注射液抑菌活性较强,去除其抑菌活性成为无菌检查的关键步骤。笔者严格按照2010年版《中国药典》(二部)附录XI H“无菌检查法”中的原则性要求进行试验^[2],采用

增加冲洗液量和在培养基中加入能与喹诺酮类药物发生络合反应的中和剂(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})的方法去除供试品的抑菌活性^[2-11],并分别进行了验证,从而建立一种适用于葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法。

1 材料

样品为根、茎混用,根、茎中各成分所占比例不同也可能导致结果出现差异,具体原因有待以后进一步研究探讨。

综上所述,该方法准确、灵敏,可为岗梅的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准: 第一册[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 111-113.
- [2] 何蓉蓉, 栗原博, 宝丽, 等. 王老吉凉茶对应激小鼠糖代谢机能及体内过氧化状态的影响[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1111.
- [3] 黄锦茶, 陈丰连, 陈海明, 等. HPLC法测定不同产地岗梅药材中坡模酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 679.

- [4] 何文江, 赵钟祥, 林朝展, 等. 梅叶冬青根的化学成分研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(1): 51.
- [5] 朱伟群, 晏桂华, 李沛波. 岗梅水提取物抗炎作用的实验研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 304.
- [6] 何少璋, 张一萍, 喻丽元. 岗梅对微生物的作用研究[J]. 现代医院, 2008, 8(5): 12.
- [7] 廖清贵. 齐墩果酸天然药物的开发[J]. 四川林业科技, 1999, 20(4): 68.
- [8] Subbaramaiah K. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 69(9): 2399.
- [9] 郭淑英, 冯波. HPLC法同时测定夏枯草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2537.

(收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-03-05)

(编辑: 孙冰)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 医院制剂研发与质量控制。
E-mail: liudong13673546650@163.com

1.1 仪器

HTY-2000A 型智能集菌仪,配有全封闭集菌培养器(孔径为 0.22 μm)(杭州泰林生物技术设备有限公司);隔水式恒温培养箱、百级净化工作台、高压蒸汽灭菌器等。

1.2 药品

葡萄糖酸依诺沙星注射液(某院自制制剂,批号:1312171、1312172、1312173,规格:100 ml:0.2 g)。

1.3 培养基及试剂

硫乙醇酸盐流体培养基(批号:20131102)、改良马丁培养基(批号:20130808)、营养肉汤培养基(批号:20130105)、营养琼脂培养基(批号:20130428)、改良马丁琼脂培养基(批号:20130612)、蛋白胨(批号:20130108)均由北京奥博星生物技术有限责任公司生产;氯化镁(天津市瑞金特化学品有限公司,批号:20121016)、硫酸锰(天津市化学试剂三厂,批号:20090208)均为分析纯。

含 Mg^{2+} 培养基:细菌、真菌培养基配制过程中加入氯化镁,使其浓度为 0.2 mol/L。含 Mn^{2+} 培养基:细菌、真菌培养基配制过程中加入 0.2 mol/L 的硫酸锰溶液,加入量为 5%。

所有培养基、冲洗液(0.1%蛋白胨水溶液)均按照 2010 年版《中国药典》(二部)附录 XI H“无菌检查法”项下要求配制及灭菌,培养基的无菌性和灵敏度检查也均符合要求。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、生孢梭菌[CMCC(B)64941]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

在建立样品的无菌检查方法前,先进行方法学验证。考虑到样品的抑菌活性,本试验通过增加冲洗液量的方法学验证 I 和加入中和剂的方法学验证 II,来考察样品的抑菌活性能否得到有效去除。试验过程及结果如下:

2.1 菌液制备

按照 2010 年版《中国药典》(二部)附录 XI H“无菌检查法”项下要求配制对照菌液,菌液浓度为每 1 ml 含菌数 10~100 CFU,同时做平板计数,计数结果见表 1。

表 1 6 种对照菌液菌落计数结果(CFU/ml)

Tab 1 Results of 6 kinds of positive control bacteria colonies (CFU/ml)

培养基	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	生孢梭菌	白色念珠菌	黑曲霉
1	72	58	52	59	58	86
2	68	54	56	64	53	82
均值	70	56	54	62	56	84

由表 1 可知,所制得的各种对照菌悬液均符合药典要求,可以用于无菌验证及检查。

2.2 方法学验证 I

试验组:取样品 9 瓶,全量通过一次性全封闭三联集菌培养器,随后用 0.1% 蛋白胨水溶液冲洗,每次每筒过滤冲洗液 100 ml,冲洗 6 次;在最后一轮的冲洗液中分别加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌菌悬液(菌落数为 10~100 CFU),再向 3 个筒内各加入硫乙醇酸盐流体培养基 100 ml。另取样品 9 瓶,同法操作,在最后一轮的冲洗液中分别加入生孢梭菌、白色念珠菌和黑曲霉菌悬液(菌落数为 10~100

CFU),然后向加入生孢梭菌悬液的筒内加入硫乙醇酸盐流体培养基,向加入白色念珠菌和黑曲霉菌悬液的筒内加入改良马丁培养基,加入量都是 100 ml。

阳性对照组:取一次性全封闭三联集菌培养器,不加样品,其余操作按照试验组方法,最后得到 6 筒培养基作为阳性对照。

阴性对照组:取一次性全封闭三联集菌培养器,过滤 0.1% 蛋白胨水溶液,每次每筒过滤冲洗液 100 ml,冲洗 6 次,然后分别加入硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基各 100 ml,作为阴性对照。

以上所得培养基均置于规定温度下培养 3~5 d,逐日观察,记录各培养基上菌落生长情况,结果见表 2(表中“+”表示有菌落生长,“-”表示无菌落生长下表同)。

表 2 方法学验证 I 结果

Tab 2 Results of methodology validation I

菌种	组别	硫乙醇酸盐流体培养基			改良马丁培养基		
		1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
金黄色葡萄球菌	试验组	-	+	+			
	阳性对照组	+	+	+			
大肠埃希菌	试验组	-	-	-			
	阳性对照组	+	+	+			
枯草芽孢杆菌	试验组	-	+	+			
	阳性对照组	-	+	+			
生孢梭菌	试验组	+	+	+			
	阳性对照组	+	+	+			
白色念珠菌	试验组				-	+	+
	阳性对照组				-	+	+
黑曲霉	试验组				-	+	+
	阳性对照组				-	+	+
	阴性对照组	-	-	-	-	-	-

由表 2 可知,当冲洗液为 600 ml/膜时,阳性对照组各对照菌生长良好,阴性对照组均未有菌落生长,而试验组中大肠埃希菌未能正常生长,表明样品的抑菌作用仍未完全去除,需要进一步采取措施去除其抑菌活性。而若继续增加冲洗量,每张滤膜的液体过滤量会超过 1 000 ml,需要进一步验证冲洗量对滤膜质量的影响;同时,冲洗量过大势必损伤滤膜上的微生物。因此,需要探索一种针对该样品的更为有效、快捷、方便的去除抑菌活性的方法。

由表 2 可知,在同等条件下,大肠埃希菌对样品的抑菌活性最为敏感,因此可将大肠埃希菌确定为葡萄糖酸依诺沙星注射液的敏感菌株,在无菌检查时作为阳性对照菌。

2.3 方法学验证 II

试验组:取样品 9 瓶,全量通过一次性全封闭三联集菌培养器,随后用 0.1% 蛋白胨水溶液冲洗,每筒过滤冲洗液 100 ml,冲洗 3 次;在最后一轮的冲洗液中分别加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌菌悬液(菌落数为 10~100 CFU),再向 3 个筒内各加入含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+}) 的硫乙醇酸盐流体培养基 100 ml。另取样品 9 瓶,同法操作,在最后一次冲洗液中分别加入生孢梭菌、白色念珠菌和黑曲霉菌悬液(菌落数为 10~100 CFU),然后向加入生孢梭菌悬液的筒内加入含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+}) 硫乙醇酸盐流体培养基,向加入白色念珠菌和黑曲霉菌悬液的筒内加入含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+}) 的改良马丁培养基,加入量都是 100 ml。

阳性对照组:取一次性全封闭三联集菌培养器,不加样

品,其余操作按照试验组方法,6个筒内最后加入的培养基也是含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+})的培养基,作为阳性对照。

阴性对照组:取一次性全封闭三联集菌培养器,过滤0.1%蛋白胨水溶液,每次每筒过滤冲洗液100 ml,冲洗3次,然后分别加入含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+})硫乙醇酸盐流体培养基和含 Mg^{2+} (或 Mn^{2+})改良马丁培养基各100 ml,作为阴性对照。

以上所得培养基均置于规定温度下培养3~5 d,逐日观察,记录各培养基上菌落的生长情况,结果见表3。

表3 方法学验证II结果

Tab 3 Results of methodology validation II

菌种	组别	含中和剂的硫乙醇酸盐流体培养基			含中和剂的改良马丁培养基		
		1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
金黄色葡萄球菌	试验组	+	+	+			
	阳性对照组	+	+	+			
大肠埃希菌	试验组	+	+	+			
	阳性对照组	+	+	+			
枯草芽孢杆菌	试验组	-	+	+			
	阳性对照组	-	+	+			
生孢梭菌	试验组	+	+	+			
	阳性对照组	+	+	+			
白色念珠菌	试验组				-	+	+
	阳性对照组				-	+	+
黑曲霉	试验组				-	+	+
	阳性对照组				-	+	+
	阴性对照组	-	-	-	-	-	-

由表3可知,当在培养基中加入中和剂(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})时,试验组及阳性对照组的细菌均能生长正常,说明该方法有效地去除了样品的抑菌作用。与方法I相比,方法II减少了无菌检查的冲洗量,缩短了无菌检查时间,降低了检查过程中的污染几率;另外,当样品的检验量增加时,在培养基中加入中和剂更具优越性。因此,方法II适用于葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查。

2.4 样品的无菌检查

取本品9瓶,全量通过一次性全封闭三联集菌培养器,用0.1%蛋白胨水溶液冲洗,每筒冲洗3次,每次100 ml;冲洗完毕,2筒加入含 Mg^{2+} 硫乙醇酸盐流体培养基各100 ml(其中1筒加入大肠埃希菌作为阳性对照),1筒加入含 Mg^{2+} 改良马丁培养基100 ml。另取一套全封闭过滤器,过滤0.1%蛋白胨水溶液3次,每次每筒100 ml,然后分别加入含 Mg^{2+} 硫乙醇酸盐流体培养基和含 Mg^{2+} 改良马丁培养基各100 ml,作为阴性对照。将各培养基均置于规定温度培养14 d,逐日观察。3批样品无菌检查结果均显示供试品组和阴性对照组澄清,阳性对照菌则生长良好,表明供试品无菌检查符合规定。

3 讨论

培养基中中和剂的浓度是通过预试验确定的。其中, Mg^{2+} 的浓度为0.2 mol/L时,既不影响试验菌的生长,又能在使用较少冲洗液的情况下去除样品抑菌活性;而 Mn^{2+} 的加入量除了考虑以上两个方面,还顾及到 Mn^{2+} 在培养基中的溶解度。

在方法学验证II的预试验过程中发现,硫酸锰在培养基中的溶解性很差,特别是在改良马丁培养基中用量稍大即出现浑浊;另外,金黄色葡萄球菌在含 Mn^{2+} 硫乙醇酸盐流体培养基中的菌落形态也不及其在含 Mg^{2+} 培养基中便于观察。综合考虑,笔者认为葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查使用含

Mg^{2+} 的培养基更为合理。

方法学验证II参考了解翠珠等^[12]关于注射用葡萄糖酸依诺沙星的无菌检查方法,笔者在预试验过程中也曾将中和剂加入冲洗液中,但发现效果不是很理想,原因可能同冲洗液过滤速度相对较快、与滤器中的样品残留相互作用时间短暂有关;而只将中和剂加入培养基中,因其中和作用时间较长,已经可以达到很好的效果,因此简化了操作步骤,只将中和剂加入培养基中。

很多研究者都采用在培养基中加入 Mg^{2+} 来去除门冬氨酸洛美沙星^[9]、盐酸莫西沙星^[10]、盐酸左氧氟沙星^[11]等喹诺酮类药物在无菌检查中的抑菌活性,但将 Mg^{2+} 作为中和剂消除葡萄糖酸依诺沙星注射液的抑菌活性还未见报道。考虑到不同喹诺酮类药物的抑菌活性有很大差异,且滤器的滤膜对不同喹诺酮类药物的吸附作用也有差异,故笔者对 Mg^{2+} 去除葡萄糖酸依诺沙星注射液的抑菌活性进行了研究。

方法学验证I结果显示,在不使用中和剂的情况下,试验组中的黑曲霉和白色念珠菌均能在改良马丁培养基里正常生长,表明样品对真菌抑菌活性较弱或者在该检验条件下已经能消除样品的抑菌活性,因此在改良马丁培养基中也可以不添加中和剂。

4 结论

本试验所建立的葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法为:以大肠埃希菌为阳性对照菌、采用0.1%蛋白胨水溶液冲洗3次(每次100 ml),经薄膜过滤后加入含 Mg^{2+} 培养基。本方法简便、冲洗量相对较少,是葡萄糖酸依诺沙星注射液一种较为理想的无菌检查方法。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].17版.北京:人民卫生出版社,2010:97-98.
- [2] 国家药典委员会,中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XIH.
- [3] 尤启东.药物化学[M].北京:化学工业出版社,2005:418.
- [4] 梁月秋,刘涛,朱斌,等.应用于喹诺酮类药物无菌检查金属离子的初步筛选[J].药物分析杂志,2009,29(2):334.
- [5] 裴小龙,黎隽,杨晓莉,等.喹诺酮类药物无菌检查中 Mg^{2+} 的应用研究[J].中国药业,2011,20(1):28.
- [6] 朱斌,刘涛,蒋受军,等. Mg^{2+} 在药物无菌检查中的应用[J].中国现代应用药学,2010,27(11):1 031.
- [7] 张光华,余立,刘文杰.硫酸锰在几种喹诺酮类药物无菌检查中的应用[J].中国药品标准,2008,9(1):35.
- [8] 陈莹,邢轶华,卓明,等.加替沙星滴眼液无菌检查方法的建立[J].天津药学,2009,21(4):7.
- [9] 王沁馨.甲磺酸培氟沙星注射液无菌检查的方法学验证[J].中国药师,2010,13(9):1 361.
- [10] 江志杰,高春.无菌检查中消除喹诺酮类药物抗菌活性的方法研究[J].中国药业,2013,22(15):52.
- [11] 裴小龙,黎隽,杨晓莉,等.盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液无菌检查法 Mg^{2+} 加入方法验证[J].西北药学杂志,2010,25(6):446.
- [12] 解翠珠,赵军.注射用葡萄糖酸依诺沙星无菌检查方法的验证[J].中国药业,2008,17(12):40.

(收稿日期:2014-03-12 修回日期:2014-06-07)

(编辑:周 箐)