

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.16.012

注射用甲磺酸左氧氟沙星无菌方法学研究

闵红, 谢毓华, 贾萌, 杨晓莉[△]

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立注射用甲磺酸左氧氟沙星的无菌检查方法。方法 参考2015年版《中国药典(四部)》、第41版《美国药典》、第9版《欧洲药典》、第17版《日本药局方》中的微生物计数法,采用薄膜过滤法结合中和法等方法对注射用甲磺酸左氧氟沙星进行无菌方法学研究。结果 可采用薄膜过滤法,以0.1%蛋白胨水溶液作冲洗液,加入硫酸镁,并以大肠埃希菌为阳性对照菌,进行注射用甲磺酸左氧氟沙星的无菌检查。结论 该方法可为注射用甲磺酸左氧氟沙星的无菌检查提供借鉴。

关键词:注射用甲磺酸左氧氟沙星;无菌检查方法;薄膜过滤法;中和剂;硫酸镁

中图分类号:R917;R978.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)16-0038-04

Aseptic Test Method of Levofloxacin Mesylate for Injection

MIN Hong, XIE Yuhua, JIA Meng, YANG Xiaoli

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish an aseptic test method of Levofloxacin Mesylate for Injection. **Methods** Referring to the microbial counting methods in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV), *United States Pharmacopoeia* (41st edition), *European Pharmacopoeia* (9th edition) and *Japanese Pharmacopoeia* (17th edition), the methods such as membrane filtration combined with neutralization method were adopted for aseptic test methodology of Levofloxacin Mesylate for Injection. **Results** The aseptic test method of Levofloxacin Mesylate for Injection was carried out by the membrane filtration method with taking 0.1% peptone solution as flushing solution, adding magnesium sulfate and taking *Escherichia coli* as positive control bacteria. **Conclusion** This method can provide reference for the aseptic test of Levofloxacin Mesylate for Injection.

Key words: Levofloxacin Mesylate for Injection; aseptic test method; membrane filtration method; neutralizer; magnesium sulfate

注射用甲磺酸左氧氟沙星为喹诺酮类广谱抗菌药物,其为氧氟沙星左旋体,抗菌活性约为氧氟沙星的2倍,抗菌谱广、抗菌作用强,但对厌氧菌抗菌作用较差。2015年版《中国药典(四部)》通则1101无菌检查法^{[1]136-140}规定,药品进行无菌检查前,应首先进行方法适用性试验,以确定其适宜性,避免造成微生物漏检。因为大部分药品对微生物有一定的抑菌性,特别是抑菌性很强的抗菌类药品,受微生物污染后,微生物受其抑菌性的影响不能正常繁殖,细胞受损伤但并未死亡,服

用该药品后,药品在患者体内的抑菌性逐渐减弱,受损微生物逐渐复苏并进行正常繁殖,从而对患者造成危害^[2]。常规方法无法检出药品污染微生物情况,只能通过稀释液或培养基稀释、薄膜过滤、加中和剂或灭活剂等方法消除药品的抑菌性后才可充分检出污染微生物。本研究中参考2015年版《中国药典(四部)》^{[1]140-144}、第41版《美国药典》、第9版《欧洲药典》、2016年版《日本药局方》的微生物计数法对注射用甲磺酸左氧氟沙星进行无菌方法学研究,以提高药品的无菌检出率。现报道如下。

第一作者:闵红,女,博士研究生,副主任药师,研究方向为食品、药品与化妆品微生物检测,(电子信箱)hong-min518@163.com。

[△]通信作者:杨晓莉,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为食品、药品与化妆品微生物检测,(电话)029-62288451(电子信箱)yangxiaoli0206@163.com。

- [3] 杨小春,谢家军,侯泽峰. 盐酸左氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法的建立[J]. 实用医技杂志,2015,22(4):438-440.
- [4] 裴小龙,黎隽,杨晓莉,等. 喹诺酮类药物无菌检查中Mg²⁺的应用研究[J]. 中国药业,2011,20(1):28-29.
- [5] 毛腾霄,熊雯,秦玉花,等. 氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法研究[J]. 中国药房,2015,26(18):2559-2561.
- [6] 郑小玲,李珏,张联珍,等. 西罗莫司胶囊微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药业,2011,20(21):33-34.
- [7] 龙慧,吴鑫,郝雷娜,等. 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,2014,25(33):3146-3148.

- [8] 李芳,刘冬玲,刘浩,等. 氟罗沙星胶囊微生物检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志,2016,41(6):445-447.
- [9] 任安民,杨晓莉,周志云,等. 罗红霉素分散片微生物限度检查法研究[J]. 中国药业,2010,19(22):40-41.
- [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):52-54.
- [11] 胡文红,程春雷,王德利. 应用中和剂对氟喹诺酮类药物微生物学检查方法的影响[J]. 食品与药品,2011,13(11):417-420.

(收稿日期:2019-03-08)

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

仪器:HTY-601型集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司);SHINVLMQC型压力蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);WGP-600型恒水式电热恒温培养箱(重庆万达实验仪器厂);LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);HFsafe-760S型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);PB-10 pH酸度计(德国Sartorius公司);涡旋振荡仪(德国IKA公司);DGB220型薄膜过滤器(杭州泰林生物技术设备有限公司)。

试剂:注射用甲磺酸左氧氟沙星注射剂[陕西博森生物制药股份有限公司,批号为20170428-5,规格为0.3 g(以左氧氟沙星计)]。

培养基与冲洗液:硫乙醇酸盐流体培养基(FTM,批号为20180418),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为20180630),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为180916),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为170316),0.1%蛋白胨水溶液(批号为20170602),均购于北京陆桥技术有限责任公司。

菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003],枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501],生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) [CMCC(B) 64941],大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44102],白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 93001],黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 91003],上述标准菌株均来源于中国医学细菌保藏管理中心,工作菌株为第3代。

1.2 方法

1.2.1 试验菌株制备

将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中,生孢梭菌接种于硫乙醇酸盐液体培养基中,35℃条件下培养24 h;将白色念珠菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基中,25℃条件下培养3 d。上述培养物用无菌0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液;将黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,25℃条件下培养7 d,加入5 mL含0.05%(V/V)聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用相同无菌0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。菌液稀释度及接种量见表1。

1.2.2 无菌方法适用性研究

试验I组:开启集菌仪,取供试品20支,每支以0.1%蛋白胨水溶液约10 mL溶解,取半量导入薄膜过滤器内,用0.1%蛋白胨水溶液冲洗滤膜3次,每次100 mL,最后1次冲洗过程在滤膜内留少量溶液,再分别加菌落数小于100 cfu的6种试验菌,过滤。每个培养管内灌注

表1 菌液稀释度及接种量

试验菌株	代数	菌液稀释度	接种量(mL)	计数结果(cfu/皿)		
				1	2	$\bar{X}$
大肠埃希菌	3	10^{-6}	1	58	64	61
金黄色葡萄球菌	3	10^{-6}	1	78	75	76
生孢梭菌	3	10^{-2}	1	39	43	41
枯草芽孢杆菌	3	10^{-5}	1	45	56	51
白色念珠菌	3	10^{-5}	1	55	57	56
黑曲霉	3	10^{-5}	1	53	44	49

100 mL培养基,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和生孢梭菌采用硫乙醇酸盐流体培养基,白色念珠菌和黑曲霉采用胰酪大豆胨液体培养基。硫乙醇酸盐流体培养基35℃条件下培养,胰酪大豆胨液体培养基25℃条件下培养,均培养5 d。

试验II组:最后一次冲洗过程在滤膜内留少量溶液,后加入2 mL $MgSO_4$ 溶液(1 mol/L),混匀,使其在滤膜上作用3 min,其余操作同试验I组。

试验III组:操作基本同试验II组,仅 $MgSO_4$ 加入量由2 mL增加至4 mL。

试验IV组:操作基本同试验I组,仅冲洗液中加入5%聚山梨酯80,且冲洗滤膜次数由3次增加至6次。

试验V组:操作基本同试验II组,仅冲洗滤膜次数由3次增加至6次。

试验VI组:操作基本同试验III组,仅冲洗滤膜次数由3次增加至6次。

阳性对照组:分别将菌落数小于100 cfu的6种试验菌加入100 mL相应培养基中。

阴性对照组:不加供试液和试验菌,按试验组方法同法操作。

标准规定,与阴性对照组比较,试验组和阳性对照组的试验菌均浑浊或生长良好,可根据此方法进行该供试品的无菌检查。若试验组的试验菌生长微弱、缓慢或不生长,则应采用增加冲洗量、使用中和剂或灭活剂、更换滤膜等方法重新进行无菌方法学研究。

2 结果

结果见表2。可见,当采用0.1%蛋白胨水溶液冲洗滤膜300 mL时(试验I组),6种试验菌均未变浑浊;冲洗量增至600 mL并在冲洗液中添加终体积分数为5%聚山梨酯80时(试验IV组),白色念珠菌和黑曲霉变浑浊,其余4种细菌始终澄清;当采用0.1%蛋白胨水溶液冲洗滤膜300 mL并在最后1次冲洗过程添加2 mL浓度为1 mol/L的 $MgSO_4$ 时(试验II组),金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌和黑曲霉均变浑浊,而大肠埃希菌始终澄清;即使将1 mol/L的 $MgSO_4$ 加入量增至4 mL时(试验III组),或冲洗次数

表2 注射用甲磺酸左氧氟沙星无菌方法适用性试验结果

菌株	天数	试验	试验	试验	试验	试验	试验	阳性	阴性	
		I组	II组	III组	IV组	V组	VI组		S	T
金	1	---	---	+++	---	---	+++	+	-	/
	2	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	3	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	4	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	5	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
大	1	---	---	---	---	---	---	+	-	/
	2	---	---	---	---	---	+++	+	-	/
	3	---	---	---	---	---	+++	+	-	/
	4	---	---	---	---	---	+++	+	-	/
	5	---	---	---	---	---	+++	+	-	/
枯	1	---	---	+++	---	---	+++	+	-	/
	2	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	3	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	4	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	5	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
生	1	---	---	+++	---	---	+++	+	-	/
	2	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	3	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	4	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
	5	---	+++	+++	---	+++	+++	+	-	/
白	1	---	---	---	---	---	---	-	/	-
	2	---	+++	+++	---	+++	+++	+	/	-
	3	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-
	4	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-
	5	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-
黑	1	---	---	---	---	---	---	-	/	-
	2	---	+++	+++	---	+++	+++	+	/	-
	3	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-
	4	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-
	5	---	+++	+++	+++	+++	+++	+	/	-

注:“金”指金黄色葡萄球菌,“大”指大肠埃希菌,“枯”指枯草芽孢杆菌,“生”指生孢梭菌,“白”指白色念珠菌,“黑”指黑曲霉;“阳性”指阳性对照组,“阴性”指阴性对照组;“S”代表硫乙醇酸盐流体培养基,“T”代表胰酪大豆胨液体培养基;“+”表示混浊(有菌),“-”表示澄清(无菌),“/”表示未开展该试验。

增至6次时(V组),也未去除甲磺酸左氧氟沙星对大肠埃希菌的抑菌性;当采用0.1%蛋白胨水溶液600 mL冲洗滤膜并添加4 mL浓度为1 mol/L的MgSO₄时(试验VI组),大肠埃希菌变浑浊。因此,可取规定量供试品,每支同步以0.1%蛋白胨水溶液约10 mL溶解,导入集菌过滤器内,采用薄膜过滤法,用0.1%蛋白胨水溶液600 mL冲洗滤膜,最后1次冲洗过程在滤膜内留少量溶液,加入1 mol/L MgSO₄溶液4 mL,作用20 min,最后在培养管内加入100 mL适宜培养基进行无菌检查,并以大肠埃希菌为阳性对照菌。

3 讨论

无菌检查是有关药品安全性的一种定性试验^[3-4]。无菌检查法是针对无菌工艺产品和最终灭菌产品的无菌性而建立的检验法,药典要求,无菌药品包括各类注射用制剂、眼科用制剂及用于手术、严重烧伤、严重创伤等的产品。即进入人体血液循环系统、植入或埋入肌肉、皮下组织、与创伤部位接触的产品、材料、器械及医学使用上要求无菌的品种,均可按本方法进行无菌检查^[5]。注射用甲磺酸左氧氟沙星直接进入人体血液循环,故应对其进行无菌检查,以确保用药安全。

无菌检查法主要包括薄膜过滤法和直接接种法^[6]。薄膜过滤法将规定量的供试品或供试液通过薄膜过滤处理,使产品中可能存在的微生物被截留于滤膜上,然后接种于适宜的培养基,使滤膜上截留的微生物得以生长繁殖到肉眼能观察到的状态而被检出^[7];有抑菌性的供试品经薄膜过滤后,用适量的冲洗液冲洗滤膜,充分消除残留的抑菌成分,使滤膜上阻留的微生物得以生长繁殖到肉眼能观察到的状态而被检出^[8]。直接接种法将规定量供试品直接接种到适宜的培养基中培养,使供试品中可能存在的微生物得以生长繁殖到肉眼能观察到的状态而被检出^[9]。薄膜过滤法可以检测更大的样品量,以保证所得结果更有统计学意义,对于具有抑菌性的供试品还可通过加大冲洗量去除样品的抑菌成分,是药品首选的无菌检测方法。直接接种法可弥补无法用薄膜过滤法进行无菌检查的供试品。

本研究中采用薄膜过滤法及薄膜过滤结合中和剂法开展无菌方法适用性研究,结果表明,注射用甲磺酸左氧氟沙星的抑菌性对大肠埃希菌很强,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌较强,对白色念珠菌和黑曲霉较弱。在微生物无菌方法适用性研究中,金黄色葡萄球菌代表革兰阳性菌,大肠埃希菌代表革兰阴性菌,枯草芽孢杆菌代表芽孢杆菌,生孢梭菌代表厌氧菌,白色念珠菌代表酵母菌,黑曲霉代表霉菌^[2]。本研究结果显示,喹诺酮类抗菌药物对革兰阴性菌表现出很强的抑菌性,对革兰阳性菌、芽孢杆菌和厌氧菌的抑菌性稍逊,对霉菌和酵母菌的抑菌性较弱。

中和剂或灭活剂可用于消除供试品干扰物的抑菌活性。对于抑菌性较强的药品可通过添加中和剂或灭活剂消除其抑菌性。聚山梨酯80为非离子表面活性剂,作为助溶剂和中和剂被广泛应用于药物无菌检查试验。聚山梨酯80常被添加在冲洗液或培养基中,使药品充分溶解并有效中和其抑菌成分,从而降低药品的抑菌性^[10-11]。本研究在冲洗液中添加体积分数为5%的聚山梨酯80(若添加更高体积分数的聚山梨酯80,在冲洗过程会产生大量泡沫而影响结果观察^[12])作为冲洗液,冲洗量增至