

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.012

小规格高浓度奥硝唑注射液无菌检查方法学研究*

贾萌, 贺聪莹, 周志云, 杨晓莉[△]

(陕西省食品药品监督检验研究院·药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立适宜的小规格高浓度(3 mL:0.5 g)奥硝唑注射液无菌检查方法。方法 参考2015年版《中国药典(四部)》通则1101无菌检查法,采用薄膜过滤-中和剂-稀释-中和联合法探索。结果 阳性对照组培养管均混浊;试验I组中6种试验菌培养管均未出现混浊;试验II组和试验III组中白色念珠菌和黑曲霉培养管均混浊,而其余菌均未生长;试验IV组中枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉培养管均混浊,其余菌均未生长;试验V组中枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉培养管明显混浊,但金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌由于过滤过程中产生泡沫不易观察;试验VI组中试验菌培养管均混浊(生孢梭菌培养管在第5天出现混浊),浊度较阳性对照组轻;试验VII组中试验菌培养管均混浊(生孢梭菌培养管第3天变混浊),浊度与对照组相近;试验VIII组试验菌培养管均混浊(生孢梭菌培养管第2天混浊),该组方法较试验VII组更合理。结论 所建立的稀释-中和剂薄膜过滤法适用于小规格(3 mL:0.5 g)奥硝唑注射液的无菌检查。

关键词:奥硝唑注射液;薄膜过滤法;无菌检查法;聚山梨酯80

中图分类号:R978.1;R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0047-05

Establishment of Aseptic Test Method for Small-Scale and High-Concentration Ornidazole Injection

JIA Meng, HE Congying, ZHOU Zhiyun, YANG Xiaoli

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control · Key Laboratory of Pharmaceutical Microbiology Testing Technology, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish an appropriate aseptic test method for small-scale and high-concentration ornidazole injection of 3 mL:0.5 g. **Methods** Referring to the General Principle 1101 "aseptic test method" in Chinese Pharmacopoeia(2015 edition,

*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2019SF-062]。

第一作者:贾萌,女,大学本科,执业药师,研究方向为食品、药品与化妆品微生物检测,(电子信箱)562841380@qq.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。

93/44 mmHg,血氧饱和度96%。13:55,血压恢复至132/68 mmHg,生命体征平稳。次日停用烟酸组,继续使用重组人脑利钠肽、托拉塞米,未再出现相关不良反应症状。10月9日,CT示肺部肿瘤样病变可能性大,当日转入肿瘤科继续治疗,转入后给予支持、对症等处理,病情有所好转。11月12日,患者及家属要求回家疗养,自动办理出院。

2 讨论

2.1 不良反应关联性评价

按《药品不良反应报告和监测管理办法》的标准^[3],对2例患者的药品不良反应进行关联性评价。患者均是在用药后短时间开始出现过敏症状,有合理的时间先后关系;查阅文献,未见注射用烟酸致过敏的资料,但有口服用烟酸致过敏的报道^[4-6]和烟酸注射液致过敏性休克的报道^[7];鉴于过敏反应的风险性,不可能再次使用注射用烟酸;2例患者再次使用其他合并用药,均未再出现过敏及相关症状;分析症状也不能用患者的疾病进行解释。因此,注射用烟酸与过敏性休克的关联性评价为很可能。过敏性休克很可能是注射用烟酸新的严重药品不良反应。

2.2 用药合理性

注射用烟酸药品说明书用法中指出,静脉缓慢注

射,每次25~100 mg,1日2次或多次,但未明确溶剂。本研究中注射用烟酸的用量为75 mg,每日1次,输注滴速约30~40滴/分,均在药品说明书用法用量要求范围内。

烟酸通过降低血浆中脂蛋白α水平,增加前列环素的释放,从而扩张血管、抑制血小板聚集,防止血栓形成^[1-2],其不仅具有直接调血脂,防治动脉粥样硬化的作用,而且还可能通过抗氧化作用防治动脉粥样硬化及其并发症(心脑血管疾病)。2例患者均有冠心病,有使用注射用烟酸的合理性,但痛风、高尿酸血症和不稳定型心绞痛患者需慎用烟酸^[7]。本研究中2例医学诊断患者均有不稳定型心绞痛,提示注射用烟酸的合理性有待商榷。

2.3 烟酸致过敏性休克

烟酸的过敏反应可表现为皮肤红斑、瘙痒、荨麻疹、哮喘等^[7-8]。DUNBAR等^[4]研究发现,烟酸可致皮肤不良反应;王永生等^[5]、薛军^[6]发现口服烟酸可致过敏的不良反应,但均无过敏反应的原因分析。进一步探讨发现,注射用烟酸药品说明书提示,甘露醇为其注射液的辅料,以“甘露醇”“过敏性休克”为关键词查阅文献,搜索中国知网、万方、维普、大医数据库,检索2000年至2020年的文献16篇,经阅读全文、剔除重复报道及重复病例,纳入12例患者使用甘露醇发生过敏性休克。甘

Volume IV), the combined method membrane filtration - neutralizer, dilution - neutralization was used to explore the aseptic test method of small - scale high - concentration ornidazole injection. **Results** The culture tubes of the positive control group were turbid. The culture tubes of the six test bacteria in test group I did not appear turbid. The culture tubes of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* in test group II and test group III were turbid, while the remaining bacteria did not grow. The culture tubes of *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were all turbid in test group IV, and the remaining bacteria were not growing. The culture tubes of *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were obviously turbid in test group V, but *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes* were difficult to observe due to the foam generated during the filtration process. The culture tubes of *Clostridium sporogenes* in test group VI were turbid on the 5th day, and the turbidity was lighter than that in the positive control group. In test group VII, the culture tubes of the test bacteria were all turbid and the *Clostridium sporogenes* culture tube became turbid on the 3rd day, and the turbidity was similar to that of the control group. The culture tubes of test bacteria in group VIII were turbid, and the culture tube of *Clostridium sporogenes* were turbid on the 2nd day; the method of this group was more reasonable than that in group VIII.

Conclusion The established aseptic test method is suitable for the aseptic check of small - scale (3 mL : 0.5 g) ornidazole injection.

Key words: ornidazole injection; membrane filtration method; aseptic test method; polysorbate 80

奥硝唑为第3代硝咪唑类衍生物,其抗菌机制是通过分子中的硝基在无氧或少氧环境中被还原成氨基,从而抑制病原细胞DNA的合成,并使已合成的DNA降解,破坏DNA的双螺旋结构,阻断转录及复制,使病原细胞彻底死亡^[1-2]。其5位上的硝咪唑环决定了这类药物具有较强的抗菌和抗原虫作用,尤其是具有较强的抗厌氧菌作用,如本研究中涉及的生孢梭菌。经调研,目前国内医药市场及西安市内三级甲等医院^[3]所用奥硝唑注射液的规格为每瓶100 mL : 0.5 g,每支10 mL : 0.5 g或每支5 mL : 0.5 g,而每支3 mL : 0.5 g规格的奥硝唑注射液将来可能会在西安市内各大医院使用,故对该规

格奥硝唑注射液无菌检查方法的研究势在必行。从该药新规格处方配比来看,其药效和稳定性都大大提高,说明其抑菌性更强,无菌检查方法的建立难度也随之提升。本研究中拟探索出更科学高效的小规格高浓度奥硝唑注射液的无菌检查方法,以便后期对医药企业建立该规格样品的无菌检查方法时提供参考。现报道如下。

1 仪器、试剂与菌株

1.1 仪器

Steritest Symbio LFH型智能集菌仪(德国Merck公司);SX-500型蒸汽灭菌器(Tomy公司);LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);WGP-600

露醇可作为小分子抗原物质,进入体内后可与体内肥大细胞等的IgE类抗体结合,刺激细胞释放大量组织胺和缓激肽等炎性因子,提高了全身毛细血管的通透性,致使血浆外渗造成供血欠缺,累及多脏器衰竭,促使发生过敏性休克,甚至死亡^[9]。因此,推断注射用烟酸过敏原可能为烟酸注射液的辅料甘露醇,而烟酸本身的扩张血管作用更加剧了血压的下降,导致休克发生。

2.4 建议

临床医护人员应强化学习烟酸的相关药物知识,尤其医师要详细阅读药品说明书,熟悉其用法用量、适应证、禁忌证,确保在临床工作中正确开具医嘱、合理用药。2例注射用烟酸引起的过敏性休克患者均为速效型,与陈国庆^[10]的报道一致。建议临床工作中参考输血规范,在输注烟酸15 min内,速度宜慢,且加强巡视;生产厂家应在禁忌证中纳入甘露醇致过敏;输入过程中保证相关抢救药品及设备到位,一旦出现过敏性休克,立即停止使用,更换输液管道,保留静脉通道,并进行抗炎、抗休克、抗过敏治疗。

参考文献:

[1] 邓凤君,王斌,潘朝旺.药理学[M].武汉:华中科技大学出版社,2016:162.

- [2] 郭绪昆.现代动脉粥样硬化的基础与诊疗学[M].天津:天津科技翻译出版公司,2012:20.
- [3] 中华人民共和国国家健康委员会.药品不良反应报告和监测管理办法(卫生部令第81号)[EB/OL](2011-05-04)[2019-12-01] <http://www.nhc.gov.cn/wjw/bmgz/201105/b442a66fc52b4793a57160002ac2a1a9.shtm-l>.
- [4] DUNBAR RL, GOEL H, TUTEJA S, et al. Measuring niacin - associated skin toxicity (NASTy) stigmata along with symptoms to aid development of niacin mimetics[J]. Journal of Lipid Research, 2017, 58(4): 783 - 797.
- [5] 王永生, 马秉刚, 宋福军. 口服烟酸致过敏反应1例[J]. 解放军医药杂志, 2010, 2(2): 131.
- [6] 薛军. 口服烟酸引起过敏反应1例[J]. 中华护理杂志, 1989, 24(8): 492.
- [7] 张传煥. 心血管病最新药物查询手册[M]. 北京:人民军医出版社, 2011: 215.
- [8] 宋澄清. 临床合理用药指南[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2008: 302.
- [9] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 198 - 200.
- [10] 陈国庆. 烟酸注射液致过敏性休克1例[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2864.

(收稿日期:2020-02-17)

型隔水式电热恒温培养箱(重庆万达实验仪器厂); HFsafe-760S型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); PB-10 pH计(德国 Sartorius 公司); 涡旋振荡仪(德国 IKA 公司); 单项溶解组件(双针头溶解组件)、KSF220型一次性全封闭集菌培养器^[4]均购自浙江泰林生物技术设备有限公司。

试药:奥硝唑注射液(规格为每支 3 mL:0.5 g 供试品,研制品); 硫乙醇酸盐流体培养基(FTM,批号为 180830),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为 180524),胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为 180427),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为 180731),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为 180518),0.1%蛋白胨水溶液(批号为 181028),均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*[CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*[CMCC(B)10104],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)98001],黑曲霉 *Aspergillus niger*[CMCC(F)98003],均购自中国医学细菌保藏管理中心,工作菌株为第3代^[5]。

2 方法与结果

2.1 试验菌制备

分别将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌接种于 TSB 培养基中,35℃条件下培养 24 h;生孢梭菌接种于 FTM 培养基中,35℃条件下培养 24 h;白色念珠菌接种于 SDB 培养基,25℃条件下培养 48 h;黑曲霉接种于 SDA 培养基中,25℃条件下培养 7 d。上述菌株均分别加入含 0.05%聚山梨酯 80 的无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,采用 10 倍稀释法制得每 1 mL 含菌数小于 100 cfu 的菌悬液^[5-6]。加入菌株稀释级及含菌数计数结果见表 1。

表 1 菌株稀释级及含菌计数结果

试验菌	稀释级	计数结果(cfu/皿)		
		1	2	$\bar{X}$
金黄色葡萄球菌	10^{-7}	77	81	79.0
大肠埃希菌	10^{-7}	72	79	75.5
生孢梭菌	10^{-4}	56	51	53.5
枯草芽孢杆菌	10^{-5}	46	53	49.5
白色念珠菌	10^{-5}	59	60	59.5
黑曲霉	10^{-5}	52	48	50.0

注:各菌株均为第3代,每皿接种量均为 1 mL。

2.2 无菌方法适用性研究

试验 I 组:取供试品 20 支,无菌操作,开启集菌仪,

先用 0.1%蛋白胨水溶液 50 mL 润洗滤膜,再将供试品导入集菌过滤器内,每支供试品接入每种培养基的量为 1.5 mL(即半量接入),每膜接种供试品 30 mL(20 支)。按薄膜过滤法过滤,用 0.1%蛋白胨水溶液冲洗 5 次,每次 100 mL,最后 1 次冲洗液预留少许加入含菌量小于 100 cfu 的试验菌株,过滤,在每个培养管内灌注培养基 100 mL。金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌接种于 FTM 培养基中,35℃条件下培养 5 d,枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉接种于 TSB 培养基中,25℃条件下培养 5 d^[7]。

试验 II 组:仅冲洗液中加入 0.5%聚山梨酯 80,其余操作同试验 I 组^[7]。

试验 III 组:仅最终的 FTM 和 TSB 培养基中加入 0.5%聚山梨酯 80,其余操作同试验 I 组。

试验 IV 组:在冲洗液及最终的 FTM 和 TSB 培养基中加入 0.5%聚山梨酯 80,其余操作同试验 I 组。

试验 V 组:仅冲洗液中加入 1%聚山梨酯 80,其余操作同试验 I 组。

试验 VI 组:冲洗液中加入 1%聚山梨酯 80,冲洗后再用 0.1%蛋白胨水溶液 200 mL(每次 50 mL)冲洗 4 次,去除泡沫,其余操作同试验 I 组。

试验 VII 组:仅冲洗次数增至 8 次,其余操作同试验 VI 组。

试验 VIII 组:取供试品 20 支,无菌操作,开启集菌仪,用无菌的单项溶解组件将供试品(每支半量)导入含 1%聚山梨酯 80 的 0.1%蛋白胨水溶液(每瓶 200 mL)中,混匀,待用。用 0.1%蛋白胨水溶液润膜,将上述制备好的稀释样液按薄膜过滤法过滤,用含 1%聚山梨酯 80 的 0.1%蛋白胨水溶液冲洗 5 次,每次 100 mL,再用 0.1%蛋白胨水溶液 200 mL 冲洗,4 次,每次 50 mL,去除泡沫,其余操作同试验 I 组。

阳性对照组:不加入供试品,以生孢梭菌为阳性对照菌,操作同试验 I 组。

阴性对照组:取相应稀释液、冲洗液同试验 I 组操作,不加入供试品和试验菌。

2015 年版《中国药典(四部)》通则 1101 无菌检查法项规定,与阴性对照组培养管比较,各试验组与阳性对照组的试验菌均生长良好或培养管混浊,则说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可忽略不计,按此法进行供试品的无菌检查。若试验组的试验菌生长微弱、缓慢或不生长,则说明该供试品的该检验量在该检验条件下的抑菌作用未消除,应采取增加冲洗量、使用中和剂或灭活剂、更换滤膜品种等方法,重新进行方法适用性试验^[5-6]。

2.3 试验结果

结果见表 2。阳性对照组中均生长良好(全部培养

管均混浊);试验 I 组中 6 种试验菌株的培养管中均未出现混浊;试验 II 组和试验 III 组中白色念珠菌和黑曲霉培养管均混浊,而其余菌均未生长;试验 IV 组中枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉培养管均混浊,其余菌均未生长;试验 V 组中由于过滤过程中产生泡沫,最后灌注培养基后金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌培养管不易观察,枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉混浊很明显;试验 VI 组中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉培养管均混浊,生孢梭菌培养管在第 5 天出现混浊,浊度较阳性对照组轻;试验 VII 组培养管均混浊(生孢梭菌培养管第 3 天变混浊),浊度与阳性对照组相近;试验 VIII 组培养管均混浊(生孢梭菌培养管第 2 天混浊)。

表 2 小规格(3 mL:0.5 g)奥硝唑注射液无菌检查方法学试验结果

菌株	天	试验 I 组	试验 II 组	试验 III 组	试验 IV 组	试验 V 组	试验 VI 组	试验 VII 组	试验 VIII 组	阳性对照组	阴性对照组
金黄色葡萄球菌	1	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	3	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	4	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	5	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
大肠埃希菌	1	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	3	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	4	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
	5	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
生孢梭菌	1	-	-	-	-	0	-	-	-	+	-
	2	-	-	-	-	0	-	-	+	+	-
	3	-	-	-	-	0	-	+	+	+	-
	4	-	-	-	-	0	-	+	+	+	-
	5	-	-	-	-	0	+	+	+	+	-
枯草芽孢杆菌	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
白色念珠菌	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
黑曲霉	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注:“+”表示混浊,有菌生长;“-”表示澄清,无菌生长;“0”表示有泡沫干扰,无法观察结果。

3 讨论

抗菌药物无菌检查方法学的建立重点在于抑菌性的去除,而不同类别的抗菌药物由于其药理机制不同,对不同敏感菌的抑制作用也各不相同^[8]。不同规格的同种抗菌药物其抑菌作用也千差万别^[9],建立合适的无菌检查方法对于医药企业的检验工作可起到事半功倍的效果。本次供试品规格属于新药,其对厌氧菌的抑制能力强于其他规格。

试药处方:本次供试品处方仅含奥硝唑主药、无水乙醇及丙二醇^[2],处方中无水乙醇及丙二醇可增强奥硝唑在有机溶剂中的稳定性。丙二醇是一种无色黏稠状透明液体,在进行薄膜过滤法无菌检查方法学研究时,对比了直接吸取过滤和稀释供试品后再过滤对试验过程及结果的影响^[10],经过 8 组试验结果的确认,最终选择稀释法进行样品的前处理,既降低了供试品的抑菌性,又方便了过滤。

中和剂选择:奥硝唑为第 3 代硝咪唑类化合物,其分子结构中的硝咪唑环决定了其抑菌能力,5 位上硝咪唑环中的氮原子属季铵化合物,铵根离子(NH₄⁺)中的 4 个 H 均被其他基团替代。由于其含有季铵结构,可选用聚山梨酯类非离子表面活性剂为中和剂。聚山梨酯 80 是多元醇型非离子表面活性剂,亲水性强,常用作增溶剂和稳定剂^[11]。经试验确定,中和剂选择聚山梨酯 80。

中和剂用量:在使用过程中,由于薄膜过滤器内部压力和聚山梨酯 80 所处环境温度的影响(当环境温度低于其自身昙点温度时会有不稳定的起泡现象发生),加入中和剂的冲洗液在过滤过程中有较多泡沫产生^[7],为了后期便于观察,最后需用不含聚山梨酯 80 的 0.1% 蛋白胨水溶液冲掉泡沫的干扰。试验过程中比较了不加中和剂、加入 0.5% 聚山梨酯 80 和加入 1% 聚山梨酯 80 对试验结果的影响,结果显示,冲洗液中加大中和剂的浓度可适当降低奥硝唑的抑菌性,但聚山梨酯 80 的含量超出 1% 后滤管内会产生大量泡沫,导致不易观察和操作,因此在无菌检查方法的建立中,选用冲洗液中和剂的用量^[12]为 1% 聚山梨酯 80。试验 VII 组与试验 VIII 组的结果均满足奥硝唑注射液无菌检查方法学的要求,但试验 VII 组在样品黏稠问题上未得到合理解决,试验过程中由于样品黏稠不易过滤,极易导致交叉污染的风险,且 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1101 无菌检查法项下薄膜过滤法部分明确规定,每张滤膜每次冲洗量一般为 100 mL,且总冲洗量不得过 1 000 mL,以避免滤膜上的微生物受损^[5-6]。因此,选择试验 VIII 组条件为最终方案。

综上所述,本研究中建立的稀释-中和剂薄膜过滤