

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.016

# 三唑类抗真菌药物泊沙康唑注射液无菌检查方法研究

陈青连, 姚 振, 万 超

(杭州澳亚生物技术有限公司, 浙江 杭州 310018)

**摘要:**目的 建立三唑类抗真菌药物泊沙康唑注射液的无菌检查方法。方法 通过无菌检查法的验证试验, 对冲洗液、滤膜材质、冲洗量、阳性对照菌的筛选和优化, 以及加入顺序等全过程的考察, 完成无菌检查法的建立。结果 泊沙康唑注射液的无菌检查选用薄膜过滤法, 以白色念珠菌为阳性对照菌, 冲洗液为 SBED 溶液(pH 3.5), 冲洗总量为 1 000 mL。结论 该方法可行、结果可靠, 可用于泊沙康唑注射液等三唑类抗真菌药物的无菌检查。

**关键词:**三唑类抗真菌药物; 泊沙康唑注射液; 无菌检查; 抑菌性; 集菌仪; 薄膜过滤法

中图分类号: R917; R978.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)17-0063-05

## Sterility Test Method of Triazole Antifungal Drug Posaconazole Injection

CHEN Qinglian, YAO Zhen, WAN Chao

(Hangzhou Ausia Biological Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China 310018)

**Abstract:** Objective To establish a method for sterility test of the triazole antifungal drug posaconazole injection. Methods Based on the verification test of sterility test, the establishment of sterility test method was completed through the whole process of washing solution, filter material, washing quantity, selection of positive control bacteria and adding sequence. Results Membrane filtration method was used for sterility test of posaconazole injection. During the test, *Candida albicans* was used as positive control bacteria, SBED solution (pH 3.5) was used as washing solution, whose total amount was 1 000 mL. Conclusion This method is feasible and reliable for the detection of triazole antifungal drugs such as posaconazole injection.

**Key words:** triazole antifungal drugs; posaconazole injection; sterility test; antibacterial activity; sterility testing system; membrane filtration

三唑类抗真菌药物(如伏立康唑和泊沙康唑)抗真菌谱广, 抗菌效力强<sup>[1]</sup>, 对念珠菌属(包括耐氟康唑的克柔念珠菌、光滑念珠菌和白念珠菌耐药株)具有抗菌作用, 对所有检测的曲霉属真菌均有杀菌作用<sup>[2]</sup>, 属注射剂类制剂。为确保用药安全, 质量标准规定应作无菌检查, 但由于此类药物抗菌活性很强, 因此, 如何消除其抑

菌性, 使检验顺利进行, 建立方法极重要, 也较困难<sup>[3]</sup>。2015年版《中国药典(四部)》对无菌产品控制与国际标准趋于一致, 实现了与国际人用药品注册技术协调会(ICH)的要求统一协调<sup>[4]</sup>。同时, 2015年版《中国药典》编制大纲强调, 要加强药品无菌检查方法的建立与验证方面的标准研究工作<sup>[5]</sup>。本研究中对抗真菌药物制剂泊

第一作者: 陈青连, 女, 大学本科, 高级工程师, 主要从事药品注册和药品研发工作, (电子信箱)chenxw0705@163.com。

- [3] 曹玉兰. 水分活性对控制食品安全和质量的稳定作用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 165-166.
- [4] ROCKLAND LB, NISHI SK. Influence of Water Activity on Food Product Quality and Stability[J]. Food Technology, 1980, 34: 42-51.
- [5] 鲍方名, 沈海英. 水分活度与非无菌药品微生物控制[J]. 中国药事, 2018, 32(7): 913-918.
- [6] 张 滕, 刘 峰, 邹明强, 等. 水活度用于食品质量与安全控制的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 122-126.
- [7] CHRISTIAN JHB. Specific solute effects on microbial water relation[M]. New York: Academic Press. Inc. 1981: 825-854.
- [8] The United States Pharmacopieial Convention. USP 29 - NF24 <1112>[M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2006: 3802.
- [9] 魏金涛, 齐德生. 饲料水分活度及其对霉菌生长和产毒的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(19): 53-55.
- [10] 刁永朝, 陈 倩, 蔡 磊, 等. 中国酸性土壤青霉属、曲霉属

和蓝状菌属的真菌多样性[C]//中国菌物学会 2016 年学术年会论文摘要集. 2016.

- [11] ISO NORM 21807: 2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs: Determination of water activity[S].
- [12] 徐 丹, 孙秀兰, 李永仙, 等. 黑曲霉对黄曲霉生长、产毒及黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(6): 490-492.
- [13] 李 冰, 董征英, 常维山. 黑曲霉对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的降解与应用研究[J]. 饲料博览, 2012(11): 6-10.
- [14] YU LX. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control[J]. Pharmaceutical Research, 2008, 25(4): 781-791.
- [15] HUSSONG D. Water Activity Applications in the Pharmaceutical Industry[M]. USA: Davis Healthcare International Publishing, 2009: 253-257.

(收稿日期: 2019-09-08; 修回日期: 2020-01-28)

沙康唑注射液进行了试验研究,主要针对冲洗液、过滤膜材质、流速、冲洗量、阳性对照菌的选择及加入顺序等全过程进行考察,建立了三唑类抗真菌药泊沙康唑注射液的无菌检查方法,并进行了方法适用性验证。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Class II Type AIB3 型生化培养箱(广东泰宏群科学仪器股份有限公司);DGB330/DGB220 型一次性全封闭菌培养器(浙江泰林生物技术股份有限公司);HTY-2000B 型智能集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司);KB115 E3-1 型低温生化培养箱(德国宾得公司);GSP-9270MBE 型隔水式恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);XG1. DTE-0.6 型脉动真空干燥灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);尼龙膜(上海兴亚净化材料厂);混合纤维素脂膜(上海兴亚净化材料厂);PVDF 膜(上海半岛实业有限公司净化器材厂)。

### 1.2 试剂

泊沙康唑注射液(杭州澳亚生物技术有限公司,批号分别为 19042311,19042511,19042611,规格为每支 16.7 mL:300 mg);硫乙醇酸盐流体培养基(批号为 190429),0.9% 无菌氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80,pH 3.8,批号为 190305),均为杭州澳亚生物技术有限公司自制;胰酪大豆胨液体培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,批号为 20190328);无菌 0.9% 氯化钠溶液(山东齐都药业有限公司,批号为 2A18090803)。

### 1.3 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*[CMCC(B)26 003],铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*[CMCC(B)10 104],大肠埃希菌 *Escherichia coli*[CMCC(B)44 102],枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*[CMCC(B)63 501],生孢梭菌 *Clostridium sporogenes*[CMCC(B)64 941],白色念珠菌 *Candida albicans*[CMCC(F)98 001],黑曲霉 *Aspergillus niger*[CMCC(F)98 003],均购自中国药品生物制品检定所菌种室,按 2015 年版《中国药典(四部)》附录要求将以上 7 种验证菌配制成每 1 mL 含菌数小于 100 cfu 的菌悬液<sup>[6]</sup>。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌液制备和培养基检查

#### 2.1.1 菌液制备

分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大豆胨琼脂培养基中,接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中,30~35℃ 培养 18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄

糖液体培养基中,20~25℃ 培养 24~48 h。上述培养物用无菌 0.9% 氯化钠溶液制成每 1 mL 含菌数小于 100 cfu 的菌悬液。

接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上,20~25℃ 培养 5~7 d,加入 3~5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的无菌 0.9% 氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后采用适宜方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的无菌 0.9% 氯化钠溶液制成 1 mL 含孢子数小于 100 cfu 的孢子悬液。

菌悬液若在室温下放置,应在 2 h 内使用;若保存在 2~8℃ 可在 24 h 内使用。黑曲霉孢子悬液可保存在 2~8℃,在验证过的贮存期内使用。

#### 2.1.2 培养基无菌性和灵敏度检查

培养基无菌性检查:取 2 种培养基,各 5 支,硫乙醇酸盐流体培养基置 30~35℃ 环境下培养,胰酪大豆胨液体培养基置 20~25℃ 环境下培养,均培养 14 d。结果无菌生长,即所用培养基无菌性检查符合验证要求。

培养基灵敏度检查:取每管装量为 12 mL 的硫乙醇酸盐流体培养基 7 支,分别接种小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各 2 支。另 1 支不接种,作为空白对照,培养 3 d。取每管装量为 9 mL 的胰酪大豆胨液体培养基 7 支,分别接种小于 100 cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 支,另 1 支不接种,作为空白对照,培养 5 d。结果空白对照管无菌生长,接种菌液的培养基均生长良好,即所用培养基的灵敏度检查符合验证要求。

### 2.2 无菌检查方法建立

#### 2.2.1 冲洗液选择

取泊沙康唑注射液 1 瓶,加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.1% 无菌蛋白胨水溶液、0.9% 氯化钠注射液、无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80,pH 3.8)和 SBECD 溶液(pH 3.5)。5 种冲洗液各 20 mL,观察混合过程中的性状变化,初步筛选可使用的冲洗液,结果 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.1% 无菌蛋白胨水溶液、0.9% 氯化钠注射液均析出白色絮状物;无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80,pH 3.8),SBECD 溶液(pH 3.5)溶液澄清。

由于泊沙康唑注射液 pH 为 2.0~3.0,pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.1% 无菌蛋白胨水溶液和 0.9% 氯化钠注射液的 pH 接近中性,采用该冲洗液进行冲洗时会使泊沙康唑注射液样品析出,导致析出物残留在膜上,抑制微生物的生长。马仕洪等<sup>[7]</sup>的报道指出,泊沙康唑注射液无菌检查用稀释液 pH 的筛选,pH 在 3.45~3.8 范围内微生物生长良好,故初步选择 pH 3.8 的无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80)和泊

沙康唑注射液处方中的助溶剂辅料磺丁基倍他环糊精钠(调节 pH 至 3.5 ~ 3.8)作为冲洗液进行无菌检查方法学适用性研究。

## 2.2.2 冲洗量选择

预试验方案 1: 供试品组中, 取供试品 20 支, 每 10 支稀释至 500 mL pH 3.8 的无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80)中, 先用约 20 mL pH 3.8 的无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80)润湿集菌管, 吸取供试品置集菌器中, 过滤, 每管先用 900 mL pH 3.8 的无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80)冲洗, 分次冲洗, 每次 100 mL, 再用无菌 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 每管的冲洗量为 100 mL, 分次冲洗, 每次 100 mL, 试验完成后, 在生物安全柜里, 往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的白色念珠菌、黑曲霉菌各 1 mL, 置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。

预试验方案 2: 供试品组中, 取供试品 20 支, 每 10 支稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中, 先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿集菌管, 吸取供试品置集菌器中, 过滤, 每管先用 300 mL SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗, 分次冲洗, 每次 50 mL(每次需振荡 2 min), 再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 每管冲洗量为 700 mL, 分次冲洗, 每次 100 mL, 然后在生物安全柜里, 往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的白色念珠菌、黑曲霉菌各 1 mL, 置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。

预试验方案 3: 供试品组中, 取供试品 20 支, 每 10 支稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中, 先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿集菌管, 吸取供试品置集菌器中, 过滤, 每管先用 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗, 分次冲洗, 每次 50 mL(每次需振荡 2 min), 再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 每管冲洗量为 500 mL, 分次冲洗, 每次 100 mL, 试验完成后, 在生物安全柜里, 往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的白色念珠菌、黑曲霉菌各 1 mL, 置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。

预试验方案 4: 供试品组中, 取供试品 20 支, 每 10 支稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中, 先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿集菌管, 吸取供试品置集菌器中, 过滤, 每管先用 700 mL SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗, 分次冲洗, 每次 50 mL(每次需振荡 2 min), 再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 每管冲洗量为 300 mL, 分次冲洗, 每次 100 mL, 试验完成后, 在生物安全柜里, 往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌(白色念珠菌、黑曲霉菌)各 1 mL, 置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。阳性对照组中, 另取滤管, 不过滤供试液。分别向每个管中加入胰酪大豆胨液体培养基 100 mL, 作为阳性对照。试验完成后, 在生物安全柜里, 往每个滤管加入小于

100 cfu/mL 的试验菌(白色念珠菌、黑曲霉菌)各 1 mL, 将含培养基的容器置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。阴性对照组中, 取相应方案的稀释剂、冲洗液, 同法操作, 然后加入胰酪大豆胨液体培养基 100 mL, 不加对照菌液, 置 20 ~ 25 °C 培养, 培养时间不超过 5 d。

结果分析: 结果见表 1。可见, 方案 1 采用无菌 0.9% 氯化钠溶液(含 0.1% 聚山梨酯 80, pH 3.8)作为冲洗液, 白色念珠菌和黑曲霉菌均未生长; 方案 2 至方案 4 采用不同梯度的 SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗液进行冲洗, 结果显示, SBECD 溶液(pH 3.5)用量越大, 白色念珠菌和黑曲霉菌生长情况越好; 方案 4 为较优选方案, 但白色念珠菌在供试品中的长势略弱于阳性对照组中菌的长势, 故继续对该方法进行优化。

表 1 冲洗量的选择预试验结果

| 方案   | 试验菌株  | 组别    | 观察时间 |     |     |     |     | 阴性 |
|------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|----|
|      |       |       | 1 d  | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d |    |
| 方案 1 | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | -   | -   | -   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|      | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | -   | -   | -   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
| 方案 2 | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | -   | *   | *   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|      | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | *   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
| 方案 3 | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | +   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|      | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | +   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
| 方案 4 | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | *   | +   | +   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|      | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|      |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   | -  |

注: “+”代表长菌; “-”代表不长菌; “\*”代表混浊, 但比阳性弱。表 2 至表 4 同。

## 2.2.3 过滤膜材质选择

### 1) 高效液相色谱(HPLC)法

鉴于泊沙康唑注射液有强烈的抗真菌作用, 无菌检查时如何有效地冲洗掉滤膜上残留的药物, 从而降低抗真菌活性十分关键。滤膜的成分、结构和性能决定了其应用范围, 在 2.2.2 项下预试验方案 4 的基础上, 考察不同材质滤膜对泊沙康唑注射液的吸附性差异, 结果尼龙膜、混合纤维素酯膜和 PVDF 膜过滤后膜上的样品残留量分别为 0.035 7, 0.003 5, 0.117 5 mg/mL。故选择残留量较小的滤膜材质进行无菌检查适用性试验。

### 2) 无菌检查方法学适用性预试验

同步取混合纤维素酯膜、尼龙膜和 PVDF 膜材质的

集菌器进行无菌检查方法学适用性预试验。

供试品组:取供试品 20 支,每 10 支稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中,先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿集菌管,吸取供试品置集菌器(混合纤维素脂膜、尼龙膜和 PVDF 膜)中,过滤,每管先用 700 mL SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗,分次冲洗,每次 50 mL,再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗,每管冲洗量为 300 mL,分次冲洗,每次 100 mL。试验完成后,在生物安全柜里,往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌(白色念珠菌、黑曲霉菌)各 1 mL,置 20~25 °C 培养,培养时间不超过 5 d。

阳性对照组:另取滤管,不过滤供试液。然后分别向每个管中加入胰酪大豆胨液体培养基 100 mL,作为阳性对照。试验完成后,在生物安全柜里,往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌(白色念珠菌、黑曲霉菌)各 1 mL,将含培养基的容器置 20~25 °C 培养,培养时间不超过 5 d。

阴性对照组:取稀释剂、冲洗液,同法操作,然后加入胰酪大豆胨液体培养基 100 mL,不加对照菌液,置 20~25 °C 培养,培养时间不超过 5 d。

### 3) 结果分析

结果见表 2。可见,不同材质的滤膜对泊沙康唑的吸附程度不一致,其中以混合纤维素脂膜材质的滤膜吸附最小,且通过无菌检查方法学适用性验证预试验确认,采用混合纤维素脂膜的结果最优,因此,选用混合纤维素脂膜材质的薄膜过滤器进行正式的方法学适用性验证。

表 2 3 种不同材质滤膜对泊沙康唑注射液方法学适用性预试验结果

| 滤膜材质        | 试验菌株  | 组别    | 观察时间 |     |     |     |     | 阴性 |
|-------------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|----|
|             |       |       | 1 d  | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d |    |
| 混合纤维<br>素脂膜 | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |
|             | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | +   | +   | +   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |
| 尼龙膜         | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | +   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |
|             | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | +   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |
| PVDF 膜      | 白色念珠菌 | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | *   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |
|             | 黑曲霉菌  | 供试品组  | -    | -   | *   | *   | +   | -  |
|             |       | 阳性对照组 | -    | -   | +   | +   | +   |    |

## 2.3 无菌检查方法适用性验证

### 2.3.1 验证方法

供试品阳性对照组(PPC):取 3 批供试品,每批 60 瓶,每 10 瓶供试品稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中,每 10 瓶供试品接种于 1 个集菌管;先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿滤筒,再吸取供试品置集菌器中,每

管用 SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗,冲洗量为 700 mL,分次冲洗,每次 100 mL,再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗,每管冲洗量 300 mL,分次冲洗,每次 100 mL。然后分别向每个管中加入相应培养基(培养细菌的 3 管加入硫乙醇酸盐流体培养基,培养真菌的 3 管加入胰酪大豆胨液体培养基)100 mL。试验完成后,在生物安全柜里,往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌各 1 mL(硫乙醇酸盐流体培养基加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌,胰酪大豆胨液体培养基加枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉),置规定温度(30~35 °C、20~25 °C)培养,培养时间不超过 5 d。

阳性对照组(PC):另取滤管,不过滤供试液。然后分别向每个管中加入相应培养基,作为阳性对照。试验完成后,在生物安全柜里,往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌各 1 mL,将含培养基的容器置规定温度(30~35 °C、20~25 °C)培养,培养时间不超过 5 d。

阴性对照组:另取滤管,不过滤供试液,每管先用 SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗,冲洗量为 700 mL,分次冲洗,每次 100 mL,再用 0.9% 氯化钠注射液进行冲洗,每管冲洗量为 300 mL,分次冲洗,每次 100 mL。然后分别加入硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基各 100 mL,不加对照菌液,将含培养基的容器置规定温度(30~35 °C、20~25 °C)培养,培养时间为不超过 5 d。

冲洗液阳性对照组(PPC):另取滤管,不过滤供试液,每管先用 SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗,冲洗量为 700 mL,分次冲洗,每次 100 mL,再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗,每管冲洗量为 300 mL,分次冲洗,每次 100 mL。然后分别加入硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基各 100 mL,作为冲洗液阳性对照组。试验完成后,在生物安全柜里,往每个滤管加入小于 100 cfu/mL 的试验菌各 1 mL,将含培养基的容器置规定温度(30~35 °C、20~25 °C)培养,培养时间不超过 5 d。

### 2.3.2 结果分析

根据 3 批泊沙康唑注射液和冲洗液方法学适用性试验结果,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌与黑曲霉供试品与阳性对照组中菌的长势一致。结果见表 3 和表 4。取 3 批供试品,每批 60 瓶,每 10 瓶供试品稀释至 500 mL SBECD 溶液(pH 3.5)中,每 10 瓶供试品接种于 1 个集菌管;先用约 20 mL SBECD 溶液(pH 3.5)润湿滤筒,再吸取供试品置集菌器中,每管用 SBECD 溶液(pH 3.5)冲洗,冲洗量为 700 mL,分次冲洗,每次 100 mL,再用 0.9% 氯化钠注射液冲洗,每管冲洗量为 300 mL,分次冲洗,每次 100 mL。然后分别向每个管中加入相应培养基(培养细菌的 3 管加入硫乙醇酸盐流体培养基,培养真菌的 3 管加入胰酪大豆胨液体培养基)100 mL。根据检查结果,金黄色葡萄

表3 3批泊沙康唑注射液无菌检查方法适用性试验检查结果

| 培养时间 | 硫乙醇酸盐流体培养基(30~35℃) |    |       |    |      |    |      | 胰酪大豆胨液体培养基(20~25℃) |     |       |     |     |     |      |
|------|--------------------|----|-------|----|------|----|------|--------------------|-----|-------|-----|-----|-----|------|
|      | 金黄色葡萄球菌            |    | 大肠埃希菌 |    | 生孢梭菌 |    | 阴性对照 | 枯草芽孢杆菌             |     | 白色念珠菌 |     | 黑曲霉 |     | 阴性对照 |
|      | PPC                | PC | PPC   | PC | PPC  | PC |      | PC                 | PPC | PC    | PPC | PC  | PPC |      |
|      | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | -                  | -   | -     | -   | -   | -   | -    |
| 1 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | -     | -   | -   | -   | -    |
| 3 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |
| 4 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |
| 5 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |

注:PPC为供试品阳性对照组,PC为阳性对照组。

表4 冲洗液无菌检查方法适用性试验检查结果

| 培养时间 | 硫乙醇酸盐流体培养基(30~35℃) |    |       |    |      |    |      | 胰酪大豆胨液体培养基(20~25℃) |     |       |     |     |     |      |
|------|--------------------|----|-------|----|------|----|------|--------------------|-----|-------|-----|-----|-----|------|
|      | 金黄色葡萄球菌            |    | 大肠埃希菌 |    | 生孢梭菌 |    | 阴性对照 | 枯草芽孢杆菌             |     | 白色念珠菌 |     | 黑曲霉 |     | 阴性对照 |
|      | PPC                | PC | PPC   | PC | PPC  | PC |      | PC                 | PPC | PC    | PPC | PC  | PPC |      |
| 1 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | -                  | -   | -     | -   | -   | -   | -    |
| 2 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | -     | +   | +   | +   | -    |
| 3 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |
| 4 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |
| 5 d  | +                  | +  | +     | +  | +    | +  | -    | +                  | +   | +     | +   | +   | +   | -    |

注:PPC为冲洗液阳性对照组,PC为阳性对照组。

球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌与黑曲霉供试品与阳性对照中菌的长势一致,故本品可采用该方法进行无菌检查。

## 2.4 无菌检查结果

根据2.2.4项下的验证方法,按2015年版《中国药典(四部)》通则1101无菌检查法薄膜过滤法对泊沙康唑注射液3批样品进行检测,培养14d,均无菌生长,产品符合质量标准要求。

## 3 讨论

本研究结果显示,三唑类抗真菌药对真菌有很强的抑菌作用,对于这类具有较强抗菌活性的药物必须首先摸索处理方式消除其抑菌作用,然后才能顺利进行无菌检查<sup>[8]</sup>,确保检测结果的准确性。

本研究中采用薄膜过滤法,对冲洗液、冲洗量、滤膜的材质、冲洗条件等进行了筛选和优化<sup>[9-10]</sup>,在研究过程中还考虑了样品的过滤速度和冲洗速度对冲洗效果的影响。以自制的SBECD溶液(pH 3.5)作为冲洗液进行冲洗,考虑其pH与样品本身的pH相近,防止样品的析出残留在滤膜上增加抑菌性<sup>[11]</sup>,同时对冲洗液同步进行方法学适用性验证,确保冲洗液本身无抑菌性<sup>[12]</sup>。

在进行泊沙康唑注射液无菌检查方法学适用性预试验时,以2015年版《中国药典(四部)》规定的6种无菌检查试验菌株是否能正常生长为指标,通过一系列的筛选和优化,最终建立了适合泊沙康唑注射液无菌检查的方法。在验证无菌检查方法时,选择敏感菌株白色念珠菌作为阳性菌<sup>[13]</sup>。通过方法学适用性验证试验证明,该方法可行、结果可靠,同时给其他三唑类产品的无菌检查提供了参考。

## 参考文献:

- [1] 张新妹,胡昌勤,赵霞,等.注射用伏立康唑无菌检查法的建立[J].天津药学,2003,15(5):9-11.
- [2] 马培奇.第二代三唑类抗真菌新药伏立康唑[J].国外医药:抗生素分册,2002,23(2):90.
- [3] 刘文杰,江志杰,余立,等.吡咯类抗真菌药物制剂微生物限度检查方法的研究[J].中国医药导报,2008,5(29):28-30.
- [4] 潘震宇,汤茜,李瑞莲.硝酸布康唑栓微生物限度检查方法适用性试验研究[J].中国药事,2017,31(1):43-48.
- [5] 国家药典委员会.《中国药典》2015年版编制大纲[EB/OL].(2013-07-14)[2019-12-20].<http://www.chp.org.cn/cms/about/current/program.html>.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:通则1101.
- [7] 马仕洪,刘鹏,杨利红,等.药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J].药物分析杂志,2018,38(5):877-882.
- [8] 闵红,谢毓华,贾萌,等.注射用甲磺酸左氧氟沙星无菌方法学研究[J].中国药业,2019,28(16):38-41.
- [9] 马仕洪,肖璜,袁宇,等.泊沙康唑注射液无菌检查方法的建立[J].药物分析杂志,2018,38(9):1568-1572.
- [10] 姚华,李秋菲,李惠娥,等.伊曲康唑注射液无菌检查方法研究[J].中国药业,2009,18(3):20-21.
- [11] 夏蕴琼,刘将.盐酸氨溴索葡萄糖注射液无菌检查方法验证[J].安徽医药,2012,16(5):603-604.
- [12] 胡昌勤.药品微生物控制现状与展望[J].中国药学杂志,2015,50(20):1747-1751.
- [13] 杨晓莉,李辉,绳金房,等.2015年版《中国药典》无菌检查法解读[J].中国药业,2015,24(24):7-11.

(收稿日期:2020-03-04)