注射用甲磺酸培氟沙星无菌检查方法学研究

李霞,周剑(重庆市药品检验所,重庆 401121)

摘要:目的 对注射用甲磺酸培氟沙星无菌检查的方法进行研究。方法 对普通的薄膜过滤冲洗法和培养基中加中和剂处理的方法进行对比研究,同时研究确定中和剂的最佳加入量。结果 在培养基中加入适量中和剂处理的方法优于普通的薄膜过滤冲洗法,其中和剂的最适加入量为 3 mL 的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnSO_4 溶液。结论 在培养基中加入适量中和剂处理的方法可有效地降低冲洗剂的用量,该法适用于注射用甲磺酸培氟沙星的无菌检查。

关键词:注射用甲磺酸培氟沙星;无菌检查;中和剂

中图分类号:R927.33 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2009)04-0317-04

Study on Sterility Test of Pefloxacin Mesylate for Injection

LI Xia,ZHOU Jian (*Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To verify the sterility test of pefloxacin mesylate for injection. **METHODS** Make sure of the best neutralizer dose added into the culture medium at the same time of comparing the membrane filtration method with the method of adding the neutralizer into the culture medium. **RESULTS** The method of adding $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of manganese sulfate solution as neutralizer

作者简介:李霞,女,副主任药师 Tel:(023)86072729 E-mail:cqlx9257@yahoo.com.cn

into the culture medium was better than the membrane filtration method, and the best dose was 3 mL. **CONCLUSION** The method of adding the neutralizer into the culture medium reduces the flushing dose effectively and can be used in the sterility test of pefloxacin mesylate for injection.

KEY WORDS: pefloxacin mesylate for injection; sterility test; neutralizer

注射用甲磺酸培氟沙星为甲磺酸培氟沙星的无菌冻干品,属于喹诺酮类抗感染药物,临床主要用于治疗敏感菌所致感染。现全国有许多厂家均生产,规格分别为0.2 g和0.4 g。笔者采用涵盖各种配方工艺的有代表性的20个生产厂家2个规格的产品进行了无菌检查方法学研究,现将试验结果报告如下。

1 材料与仪器

1.1 试药

注射用甲磺酸培氟沙星:武汉人福药业有限责任公司、海南卫康制药(潜山)有限公司、黑龙江迪龙制药有限公司、西南药业股份有限公司、蚌埠市宏业生化制药厂、浙江杭康海洋生物药业有限公司、苏州三叶制药有限公司、浙江亚太药业有限公司、常州金远药业制造有限公司、开封康诺药业有限公司、江苏奥赛药业有限公司,以上公司产品规格均为0.4 g,共11个批次;华北制药集团制剂有限公司、成都天台山制药有限公司、江西赣南海欣药业股份有限公司、江苏吴中医药集团有限公司苏州第六制药厂、浙江贝得药业有限公司、宜昌人福药业有限责任公司、哈尔滨松鹤制药有限公司、山东凤凰制药股份有限公司、吉林马应龙制药有限公司,以上公司产品规格均为0.2 g,共9个批次。硫乙醇酸盐流体培养基(批号:060118)、改良马丁培养基(批号:050706)、营养肉汤培养基(批号:060322),以上培养基均由中国药品生物制品检定所提供,经灵敏度实验符合中国药典2005年版规定^[1]。

1.2 试验菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、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],以上菌株均由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 仪器

KDGB330 一次性使用全封闭集菌器(杭州泰林生物技术设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞

菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,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24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,23~28℃培养48 h,上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成每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改良马丁琼脂斜面培养基上,23~28℃培养7 d,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 mL含孢子数小于100 cfu的孢子悬液。上述菌悬液每次试验前新鲜配制,备用。

2.2 好氧菌、厌氧菌检查方法选择

2.2.1 普通薄膜过滤法冲洗量考察

取单个滤筒15个,分成3组,每组5个,将规定量的供试品(武汉人福产品,规格:0.4 g)按每5瓶溶于50 mL 0.1%蛋白胍水溶液的方法进行溶解,薄膜过滤,每一滤筒中过滤5瓶供试品制成的溶液,再用pH 7.0氯化钠-蛋白胍缓冲液冲洗滤膜,每次冲洗量为100 mL,每组滤筒每膜冲洗总量分别为300, 500, 700 mL。冲洗完毕后,加入5种试验菌液各1 mL。同时另取5个装有同体积培养基的容器,分别加入5种试验菌液1 mL,作为阳性对照。于适宜条件下培养2~7 d,结果各种试验菌采用每管冲洗500 mL和700 mL冲洗量时于接种后48 h均生长良好,但采用每管300 mL冲洗量时,只有金黄色葡萄球菌和生孢梭菌48 h生长良好,铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌均接种后第5天才生长良好,而大肠埃希菌需在接种后第7天才生长良好。

2.2.2 加入中和剂处理的试验方法的初步考察

根据文献^[2-3]介绍,在培养基中加入适量的硫酸锰溶液可使其抑菌活性降低,故进行了以下试验:取单个滤筒5个,将规定量的供试品(武汉人福产品,规格:0.4 g)按每5瓶溶于50 mL 0.1%蛋白胍水溶液的方法进行溶解,薄膜过滤,每一滤筒中过滤5瓶供试品制成的溶液,再用pH 7.0氯化钠-蛋白胍缓冲液冲洗滤膜,每次冲洗量为100 mL,每膜冲洗总量为200 mL,冲洗完毕后,将硫乙醇酸盐培养基加至滤筒中,再在5个滤筒中分别加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌5种试验菌液各1 mL。取5个装有同体积培养基的容器,分别加入5个试验菌液1 mL,作为阳

性对照。同时另取 5 个装有同体积培养基的容器,加入等量试验菌,再加入 5 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液,作为中和剂对照。培养 2~7 d,逐日观察记录,结果各试验菌试验管、阳性对照管和中和剂对照管均于 48 h 内生长良好。

上述 2 个试验结果显示,采用普通的薄膜过滤法,冲洗量每膜至少要 500 mL 以上,而在培养液中加入适量硫酸锰可以有效减少冲洗剂用量,故初步确定了冲洗量 200 mL 及培养基中加入 5 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液的试验方法,并进行了下面的确认试验。

2.2.3 加入中和剂处理的试验方法的初步确认

对 20 批样品采用冲洗量 200 mL 及培养基中加入 5 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液的方法进行了试验。根据“2.2.1”项下的考察试验显示,甲磺酸培氟沙星对大肠埃希菌的生长影响最大,故选用了大肠埃希菌作为试验菌,结果:20 批样品中有 10 批样品试验菌于 48 h 内生长良好,但另外 10 批样品(分别为苏州三叶、浙江亚太、浙江贝得、常州金远、开封康诺、宜昌人福、哈尔滨松鹤、山东凤凰、江苏奥赛、吉林马应龙产品)均出现不同程度的生长缓慢(4~7 d 后试验菌才出现生长),说明上述方法并不成熟,需进一步改进。

2.2.4 加入中和剂处理的试验方法的进一步改进

2.2.4.1 增加冲洗量和增加中和剂用量方法的比较 采用“2.2.3”试验中试验菌生长缓慢的 10 批样品进行试验,试验菌同样选用大肠埃希菌,其中 6 批样品(宜昌人福、哈尔滨松鹤、浙江亚太、常州金远、江苏奥赛、吉林马应龙)加大冲洗量至 400 mL,另外 4 批样品(浙江贝得、开封康诺、山东凤凰、苏州三叶)增加中和剂($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液)用量至 10 mL。结果加大冲洗量至 400 mL 的 6 批样品除 2 批样品试验菌 48 h 内生长良好外,其余 4 批样品(浙江亚太、常州金远、江苏奥赛、吉林马应龙)还是出现试验菌生长缓慢的现象(4~6 d 后试验菌才出现生长);增加中和剂用量的 4 批样品中 3 批样品试验菌 48 h 内生长良好,但也有 1 批样品(苏州三叶)试验菌生长缓慢。同时对该用量中和剂对 5 种细菌的生长影响情况也进行了考察,结果均无影响。上述结果显示,2 种方法均不能完全改进试验效果,但增加中和剂用量的方法相比较而言对试验效果的改变要优于增加冲洗量的方法,故最终考虑从改变中和剂用量来着手方法学改进。

2.2.4.2 中和剂对试验菌株的生长影响

前面在

方法摸索中也对部分用量的中和剂对试验菌株的生长影响进行了考察,但为了选到一个最佳的中和剂用量,笔者进行了下面比较系统的考察。将中和剂的浓度由原来的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,取装有“2.2.2”项下试验中同体积培养基的容器 15 个,分为 3 组,每组均分别加入 5 种试验菌液各 1 mL,再按组分别加入 2,3,4 mL 的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液,作为实验组;另取 5 个装有同体积培养基的容器,分别加入 5 个试验菌液 1 mL,作为阳性对照。按规定条件培养 2~7 d,逐日观察,结果在中和剂用量为 2 mL 及 3 mL 时,各标准菌株均于 48 h 内生长良好;用量为 4 mL 时,金黄色葡萄球菌生长迟缓(6~7 d 试验菌才出现生长),对其他菌株生长无影响。

2.2.4.3 中和剂用量的选择 根据“2.2.4.2”项下的试验结果, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液 2 mL 和 3 mL 对菌株生长均无影响,“2.2.4.1”项下的试验结果则显示,加入中和剂 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液 10 mL(相当于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 mL)进行试验的 4 批样品中只有 1 批样品出现试验菌生长缓慢的现象。由于试验时冲洗的方式对试验结果有一定的影响,同时也为了寻找最佳中和剂加入量,笔者用 7 批样品(宜昌人福、哈尔滨松鹤、浙江亚太、常州金远、江苏奥赛、吉林马应龙、苏州三叶)对冲洗剂用量 200 mL、中和剂($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液)用量 2 mL 和 3 mL 分别进行了考察,试验菌选用了金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌。结果对加入 3 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液的样品各试验菌生长良好;而加入 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液的样品,试验菌均出现不同程度的生长缓慢情况。综合上述试验结果,最终确定好氧菌、厌氧菌的实验方法为采用每膜 200 mL 冲洗,再在培养基中加入 3 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液作为中和剂的方法。

2.2.5 加入中和剂处理的试验方法的最终确认

采用“2.2.4.3”项下的 7 批样品,对冲洗量 200 mL,加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4$ 溶液 3 mL 的实验方法进行了进一步考察,试验菌选用金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌 5 种试验菌,结果各菌均于 48 h 内生长良好。

2.3 真菌检查方法研究

根据报道,喹诺酮类对真菌类无抑菌作用,故采用了下述方法采用“2.2.4.3”项下的 7 批样品对真菌检查方法进行了考察:将样品溶于 50 mL 0.1% 蛋白胨水溶液中,薄膜过滤后,直接接种试验菌(白色

念珠菌、黑曲霉),结果各管在 72 h 内均生长良好。

3 结论

试验结果显示,甲磺酸培氟沙星对细菌中的大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌生长有明显抑制作用,尤其对大肠埃希菌的生长影响明显。通过对其方法学进行研究,显示采用薄膜过滤法,用适量冲洗液冲洗,再在培养基中加入适量中和剂(硫酸锰溶液),阳性对照菌选用大肠埃希菌的方法是可行的。由此,建立的注射用甲磺酸培氟沙星无菌检查方法如下:将规定量样品溶于 150 mL 0.1% 蛋白胨水溶液中,薄膜过滤后,真菌培养管直接加入适宜的培养基;好氧菌、厌氧菌培养管及阳性对照管每膜采用不少于 200 mL 的冲洗液冲洗后,再加入适宜的培养基,同时在两管培养基中分别加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸锰溶液 3 mL,以大肠埃希菌作为阳性对照菌,依法进行无菌检查。

4 讨论

4.1 喹诺酮类药物属于高效、速效、广谱的抗菌药,对包括厌氧菌在内的 G 阳性菌和 G 阴性菌都有很强的广谱抗菌能力,并对衣原体也有良好的抗菌作用。由于其抗菌谱广,抗菌作用强,故在无菌检查过程中往往需 1 000 mL 以上的冲洗液进行少量多次反复冲洗,才能完全灭活其抗菌活性^[4],笔者在普通薄膜过滤法冲洗量考察试验的结果证实了这一点。而在培养基中加入适量硫酸锰溶液作为中和剂,可明显降低薄膜的冲洗剂用量,这一点已有文献进行了报道,本试验结果也证实了这一点。但试验中也发现,同一品种的注射用甲磺酸培氟沙星,不同厂家的产品所需中和剂的量或冲洗剂的用量又存在着较大差别。根据各厂家提供的资料,注射用甲磺酸培氟沙星的处方工艺大致有 5 大类:①只有主药,无辅料;②主药 + 甘露醇;③主药 + 甘露醇 + 依地酸二钠;④主药 + 甘露醇

+ 焦亚硫酸钠;⑤主药 + 甘露醇 + 亚硫酸氢钠。在对加入中和剂 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸锰溶液 2 mL 处理的试验方法的初步确认试验中,出现 20 批样品有 10 批样品加入的试验菌均出现了不同程度的生长抑制。而另 10 批试验菌生长良好的样品经处方分析,涵盖了上述 5 种配方,显然表示并不是处方中加入的其他辅料(如赋型剂、金属络合剂、抗氧化剂)所产生的影响,导致其中和剂的效能降低。同时,对试验菌生长有影响的 10 批样品和试验菌生长良好的 10 批样品中,均存在 2 种规格(0.2 g 和 0.4 g),说明规格对其冲洗剂和中和剂的用量并无太大关联。故该品种无菌检查时,不同厂家的产品出现冲洗剂用量和中和剂用量不同的原因应该与处方组成及规格无关,其原因有待进一步的研究。

4.2 本试验结果显示,一定量的硫酸锰可使甲磺酸培氟沙星的抗菌活性有效降低,但超过一定量后,硫酸锰溶液本身则具有一定的抑菌作用,中和剂用量考察试验显示,其对金黄色葡萄球菌的生长影响尤为明显,故硫酸锰溶液的用量一定要适量。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: Appendix XI H.
- [2] LIU P, MA S H, DAI H, et al. Establishment of method for microbial limit test of gatifloxacin [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27(6): 881-884.
- [3] MA Y H, MA W J. Study on gatifloxacin for injection sterilizing test method [J]. Chin Mag Clin Med Prof Res (中华临床医学研究杂志), 2007, 13(10): 1377-1378.
- [4] QIAN W J, ZHANG M. Discussion on flushing dose of sterilizing test of common antibiotic [J]. Jiangsu Pharm Clin Res (江苏药学与临床研究), 2005, 13(3): 63-65.

收稿日期:2008-01-24