

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.08

马波沙星注射液无菌检查方法的建立

赵富华,于晓辉,杨星,龚旭昊,马秋冉,董玲玲*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2021-05-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0058-04 [中图分类号] S859.83

[摘要] 对马波沙星注射液的无菌检查方法进行适用性研究。按《中国兽药典》2015 年版一部附录 1101 进行试验,采用薄膜过滤法对马波沙星注射液进行无菌检查。结果:马波沙星注射液经用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗滤膜,每膜每次 100 mL,冲洗 6 次后,试验组菌生长良好,与阳性对照组一致。结果表明,薄膜过滤法可用于马波沙星注射液的无菌检查。

[关键词] 马波沙星注射液;无菌检查;方法适用性;薄膜过滤法

Validation on Sterility Test Method for Marbofloxacin Injection

ZHAO Fu-hua, YU Xiao-hui, YANG Xing, GONG Xu-hao, MA Qiu-ran, DONG Ling-ling*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: DONG Ling-ling, E-mail: dll_lynn@163.com

Abstract: To analyze the applicability of sterility test method for marbofloxacin injection, according to the Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015 Edition One Appendix 1101), the sterility test for marbofloxacin injection was conducted by membrane filtration. The microbes in the test group grew well after marbofloxacin injection washed with 0.1% sterile peptone aqueous solution at 100 mL/membrane, after washing for 6 times, which was consistent with the results of positive control group. The results indicated that the membrane filtration method could be used for sterility test for marbofloxacin injection

Key words: marbofloxacin injection; sterility test; validation; membrane filtration

马波沙星作为第三代喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广,消除半衰期长,生物利用度高的特点,在兽药市场具有良好的发展前景,国内企业自 2014 年起陆续申报马波沙星及其制剂,拟在《中国兽药典》2020 年版中制定马波沙星及制剂的质量标准。为控制产品质量,需对马波沙星注射液进行无菌检

查方法的研究^[1-2]。马波沙星具有抑菌作用,所以拟采用薄膜过滤法对马波沙星注射液的无菌检查进行方法学研究^[3-5]。

1 材料与仪器

1.1 样品 马波沙星注射液(河北远征药业有限公司生产,规格:100 mL:10 g,批号为 16B180301、

作者简介:赵富华,副研究员,从事兽药检验工作。

通讯作者:董玲玲, E-mail: dll_lynn@163.com

16B180302、16B180303)。

1.2 稀释剂及培养基 0.1% 无菌蛋白胨水溶液、硫乙醇酸盐流体培养基(批号 20180710)、胰酪大豆胨液体培养基(批号 20180710)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号 20180710)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号 20180710)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号 20180710),均由北京中海生物科技有限公司提供。

1.3 菌种 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],均购自中国药品生物制品检定研究院。

1.4 试验仪器 HTY-1650AG3 型无菌隔离器(浙江泰林生物技术股份有限公司)、无菌试验集菌培养器(浙江泰林生物技术股份有限公司,型号:EV3,批号:20170812)、生物安全柜(美国 Nuair 公司)、SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、GI7-2 型恒温培养箱(美国 Shellab 公司)。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备 分别取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的新鲜培养物 1 白金耳,接种于 10 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,经 30~35℃ 培养 18~24 h,取 1 mL 分别加入 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,作为 10⁻¹管,逐管 10 倍稀释至小于 100 cfu/mL,活菌计数备用。

取生孢梭菌的新鲜培养物 1 白金耳,接种于 10 mL 硫乙醇酸盐流体培养基中,经 30~35℃ 培养 18~24 h,取 1 mL 加入 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,作为 10⁻¹管,逐管 10 倍稀释至小于 100 cfu/mL,活菌计数备用。

取白色念珠菌的新鲜培养物 1 白金耳,接种于 10 mL 沙氏葡萄糖液体培养基中,经 20~25℃ 培养 24~48 h,取 1 mL 加入 9 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,作为 10⁻¹管,逐管 10 倍稀释至小于 100 cfu/mL,活菌计数备用。

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 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液至无菌试管内,取 1 mL 加入 9 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,作为 10⁻¹管,逐管 10 倍稀释至小于 100 cfu/mL,活菌计数备用。

2.2 活菌计数 分别取上述细菌菌液 1 mL 加入培养皿,每种菌液做 2 个平皿,注入胰酪大豆胨琼脂培养基约 18 mL,置 30~35℃ 培养 24~48 h。取生孢梭菌菌液 1 mL,置于 200 mL 硫乙醇酸盐流体培养基中,置 30~35℃ 培养 24~48 h。分别取上述真菌菌液 1 mL 加入培养皿,每种菌液做 2 个平皿,注入沙氏葡萄糖琼脂培养基约 18 mL,置 20~25℃ 培养 48~72 h。计数结果见表 1。

表 1 活菌计数结果

Tab 1 viable bacteria count results					
菌种	代数	稀释级	菌落数/(cfu/mL)		
			1	2	平均值
金黄色葡萄球菌	3	10 ⁻⁷	72	74	73
大肠埃希菌	3	10 ⁻⁷	68	72	70
枯草芽孢杆菌	3	10 ⁻⁴	64	68	66
铜绿假单胞菌	3	10 ⁻⁶	60	62	61
生孢梭菌	3	10 ⁻⁵	55	58	56.5
白色念珠菌	3	10 ⁻⁵	92	90	91
黑曲霉	3	10 ⁻⁵	98	97	97.5

2.3 培养基的灵敏度检查 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。另取每管装量为 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。以空白对照管应无菌生长,加菌的培养基管生长良好来判定该培养基的灵敏度检查符合规定。试验结果见表 2。

表 2 培养基灵敏度检查结果

Tab 2 test results of medium sensitivity						
培养基	菌种	培养基灵敏度结果				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
硫乙醇酸盐 流体培养基	金黄色葡萄球菌	1	+	+	+	/
		2	+	+	+	/
	铜绿假单胞菌	1	+	+	+	/
		2	+	+	+	/
	生孢梭菌	1	+	+	+	/
		2	+	+	+	/
	空白对照	1	-	-	-	/
胰酪大豆胨 液体培养基	枯草芽孢杆菌	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	白色念珠菌	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	黑曲霉	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	空白对照	1	-	-	-	-

“+”表示有菌生长,呈阳性;“-”表示无菌生长,呈阴性;“/”表示未考察。

经检查,空白对照管均无菌生长,加菌培养基生长良好,该培养基的灵敏度检查符合规定。

2.4 无菌检查方法适用性试验(薄膜过滤法)

2.4.1 供试品阳性菌试验组 取供试品 10 支,每支取 20 mL,用封闭式薄膜过滤器过滤后,用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗滤膜,每膜每次 100 mL,冲洗 6 次,在最后一次冲洗液中分别加入小于 100 cfu/mL 的菌液 1 mL,过滤后,每个滤筒内灌注培养基,其中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌在硫乙醇酸盐流体培养基中,30~35℃ 条件下培养 5 d,枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉在胰酪大豆胨液体培养基中,20~25℃ 条件下培养 5 d,各 2 组。

2.4.2 阳性菌对照组 取封闭式滤筒,其中三滤筒加入硫乙醇酸盐流体培养基,分别接种小于 100 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌各 1 mL,30~35℃ 条件下培养 5 d;另三筒加入胰酪大豆胨液体培养基,分别接种小于 100 cfu/mL 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 1 mL,20~

25℃ 条件下培养 5 d。

2.4.3 供试品阴性组 取供试品 10 支,每支取 20 mL,用封闭式薄膜过滤器过滤后,用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗滤膜,每膜每次 100 mL,冲洗 6 次,再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,置规定温度下培养 5 d。

2.4.4 阴性对照组 取封闭式滤筒 2 个,用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗,冲洗次数与冲洗量与试验组相同,向滤筒中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,置规定温度下培养 5 d。

2.4.5 方法适用性试验结果 结果表明(表 3、表 4),本品采用薄膜过滤后,含供试品的阳性菌试验组冲洗 6 次时试验菌均生长良好,表明冲洗 6 次后,供试品对细菌生长没有影响。

表 3 供试品阳性菌试验组与阳性菌对照组试验结果

Tab 3 test results of test sample positive bacteria						
test group and positive bacteria control group						
菌种		培养时间/d				
		1	2	3	4	5
金黄色葡萄球菌	供试品阳性菌试验组	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	阳性菌对照组	1	+	+	+	+
大肠埃希菌	供试品阳性菌试验组	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	阳性菌对照组	1	+	+	+	+
生孢梭菌	供试品阳性菌试验组	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	阳性菌对照组	1	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	供试品阳性菌试验组	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	阳性菌对照组	1	+	+	+	+
白色念珠菌	供试品阳性菌试验组	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	阳性菌对照组	1	-	+	+	+
黑曲霉	供试品阳性菌试验组	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	阳性菌对照组	1	-	+	+	+

表 4 供试品阴性组与阴性对照组试验结果

Tab 4 test results of test sample negative group and negative control group

试验组	培养基	培养时间/d				
		1	2	3	4	5
供试品 阴性组	硫乙醇酸盐流体培养基	-	-	-	-	-
	胰酪大豆胨液体培养基	-	-	-	-	-
阴性对照组	硫乙醇酸盐流体培养基	-	-	-	-	-
	胰酪大豆胨液体培养基	-	-	-	-	-

2.4.6 供试品无菌检查 取三批供试品,按照验证过的无菌检验方法进行检查。结果显示,阳性对照菌在 24 h 内生长良好,阴性对照 14 d 内均澄清,无菌生长,供试品 14 d 内均澄清,无菌生长,无菌检查结果符合规定。

3 讨论与结论

本试验依据《中国兽药典》2015 年版一部附录 1101 无菌检查法方法适用性试验的要求^[6](亦符合《中国兽药典》2020 年版一部附录 1101 的要求),对马波沙星注射液无菌检查方法进行验证,因马波沙星具有抑菌作用,故采用薄膜过滤法,考察冲洗次数,用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗滤膜,每膜每次 100 mL,冲洗 3、4、5 次,结果冲洗 3、4、5 次时,除白色念珠菌和黑曲霉供试品阳性生长外,其他供试品阳性菌均无菌生长,说明冲洗 5 次时供试品还有抑菌作用,根据预实验结果,确定冲洗 6 次,结果与阳性菌对照组相比,供试品阳性菌试验组生长情况均良好,说明该条件下能够有效清除药物自身的抑菌活性且不影响试验菌的生长,而供试品阴性对照组与阴性对照组中均无细菌生长,说明前处理及操作过程中不会引入其他细菌的污染。最终确立检查方法为:取本品,经薄膜过滤法处理,依法检查(附录 1101),应符合规定。具体操作步骤:供试品取 10 支,每支取 20 mL,用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液冲洗滤膜,每膜每次 100 mL,冲洗 6 次,该方法科学、可靠,在该无菌检查条件下可去除药物的抑菌干扰。

薄膜过滤法可用于马波沙星注射液的无菌检查。在做马波沙星注射液无菌检查时,一定要注意冲洗次数,否则易致试验失败(供试品阳性菌不生长)。

参考文献:

[1] 李东娟, 张晓楠, 普冰清, 等. 注射用舒尼铂(冻干)无菌检查方法研究[J]. 上海医药, 2021, 42(7): 76-80.

Li D X, Zhang X N, Pu B Q, et al. Study on sterility test method of suniplatin (lyophilized) for injection [J]. Shanghai Pharmaceutical, 2021, 42(7): 76-80.

[2] 戴青, 韩宁宁, 赵晖, 等. 盐酸头孢噻唑乳房注入剂无菌检查方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 629-636.

Dai Q, Han N N, Zhao H, et al. Establishment of sterility test method for ceftiofur hydrochloride breast injection [J]. Chinese animal husbandry and veterinary medicine, 2020, 47(2): 629-636.

[3] 项伟. 注射液的无菌检查方法验证的研究概况[J]. 海峡药学, 2018, 30(6): 68-70.

Xiang W. Research overview of sterility test method validation of injection [J]. Strait pharmacy, 2018, 30(6): 68-70.

[4] 高锦, 程洋, 嵇扬, 等. 甲氧苄啶注射液无菌检查方法学研究[J]. 中国药事, 2010, 24(10): 968-971.

Gao J, Cheng Y, Ji Y, et al. Study on the methodology of sterility test of Trimethoprim Injection [J]. China Pharmaceutical, 2010, 24(10): 968-971.

[5] 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.

Yang X L, Li H, Sheng J F, et al. Interpretation of sterility test method in Chinese Pharmacopoeia 2015 [J]. China pharmaceutical industry, 2015, 24(24): 7-11.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 附录 1101.

China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2015 edition, Volume I [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2016: appendix 1101.

(编辑:侯向辉)