

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.01.04

复方阿莫西林乳房注入剂无菌检查方法的优化

韩宁宁, 彭文绣, 王 轩, 赵 晖, 杨秀玉, 戴 青, 赵富华*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 01-0032-06 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 将阿莫西林乳房注入剂无菌检查方法由直接接种法优化为薄膜过滤法。采用肉豆蔻酸异丙酯将样品破乳, 与 pH 6.0 磷酸盐缓冲液混合进行萃取, 取萃取后的水相薄膜过滤, 采用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进行冲洗, 冲洗完毕加入硫乙醇酸盐液体培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 定量加入青霉素酶破坏残余的阿莫西林, 按照规定条件培养。该方法与直接接种法相比, 操作简单, 可靠性增强, 结果判断准确性提高。

[关键词] 复方阿莫西林乳房注入剂; 无菌; 薄膜过滤法; 直接接种法

Optimization of Sterility Test Method of Compound Amoxicillin Intramammary Infusion

HAN Ning-ning, PENG Wen-xiu, WANG Xuan, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu, DAI Qing, ZHAO Fu-hua*

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

Corresponding author: ZHAO Fu-hua, E-mail: 627260859@qq.com

Abstract: The sterility test method of amoxicillin intramammary infusion was optimized from direct inoculation method to membrane filtration method. The sample was demulsified with isopropyl myristate, mixed with pH 6.0 phosphate buffer solution for extraction. The aqueous phase was filtered through membrane after extraction. The membrane was washed with pH 7.0 sterile sodium chloride-peptone buffer solution, added with thioglycollate liquid medium and tryptophan soybean peptone liquid medium after washing, added penicillin enzyme quantitatively to destroy residual amoxicillin, and cultured according to the specified conditions. Compared with the direct inoculation method, the optimized method is simple, reliable and accurate.

Key words: compound amoxicillin intramammary infusion; sterility test; membrane filtration method; direct inoculation method

阿莫西林乳房注入剂是由阿莫西林、舒巴坦、泼尼松龙与矿物油制成的供乳房灌注用灭菌混悬

基金项目: 农业行业(国家)标准项目兽药国家标准制修订计划(2017H060)

作者简介: 韩宁宁, 副研究员, 从事抗生素检验检测和标准制修订工作。

通讯作者: 赵富华。E-mail: 627260859@qq.com

油溶液,用于奶牛泌乳期乳房炎的治疗。 β -内酰胺酶抑制剂舒巴坦与 β -内酰胺类抗生素阿莫西林联用,可起到增效和扩大抗菌谱作用^[1-2],糖皮质激素药物泼尼松龙可增加机体对炎症的耐受性以及降低炎症的血管反应与细胞反应。无菌检查是控制乳房注入剂安全性的重要项目。复方阿莫西林乳房注入剂的质量标准收载于《兽药质量标准汇编》(2013 年版)^[3]中,无菌检查采用直接接种法。经国家兽药基础数据库^[4]查询,目前有 4 家兽药生产企业获得了该品种的批准文号,相应产品执行该标准。2019 年,农业农村部公告第 150 号^[5]批准了该品种的变更注册,并发布了修订后的质量标

准,但无菌检查方法并未发生变更。部分企业在执行该无菌检查标准的过程中反映,供试品接种后呈混悬状态,无法准确判断是否有菌生长,且操作繁琐,易受外源性微生物污染,对人员操作和环境洁净程度要求较高。而薄膜过滤法作为各国药典收载的无菌检查的首选方法^[6-7],可克服上述问题。因此,拟将复方阿莫西林乳房注入剂无菌检查方法进行优化,优先考虑采用薄膜过滤法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试品 共收集到来自 2 家兽药生产企业的 4 批样品,见表 1。

表 1 样品信息

Tab1 Information of samples		
序号	生产企业	产品批号
1	齐鲁动物保健品有限公司(以下简称齐鲁)	1709007
2	佛山市南海东方澳龙制药有限公司(以下简称澳龙)	20170501
3	佛山市南海东方澳龙制药有限公司	20170502
4	佛山市南海东方澳龙制药有限公司	20170503

1.1.2 试验菌种 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]和黑曲霉[CMCC (F) 98003]均购自中国食品药品检定研究院。

1.1.3 培养基 硫乙醇酸盐液体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基均购自北京中海生物科技有限公司。

1.1.4 仪器及耗材 无菌隔离器(HTY-1650G3)和一次性无菌滤器(EVS3、EVS2)均购自浙江泰林生物技术股份有限公司。青霉素酶(30 万单位/mL)购自中国食品药品检定研究院。

1.2 方法

1.2.1 薄膜过滤无菌检查方法的建立

1.2.1.1 萃取溶剂种类的筛选 萃取的油相溶剂采用无抑菌干扰作用且破乳效果良好的肉豆蔻酸

异丙酯。将 10 g 供试品(来源/批号:齐鲁/1709007)置 200 mL 肉豆蔻酸异丙酯中,混匀,得均匀混悬液。采用三种水相溶剂 0.1% 蛋白胨溶液、pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液和 pH 6.0 磷酸盐缓冲液分别对破乳后的混悬液进行萃取,并对水油分离效果进行比较,以选择适宜的水相溶剂。

1.2.1.2 萃取溶剂体积的选择 将收集到的两个生产企业的样品分别采用不同体积的油相溶剂(600 mL 和 200 mL)和水相溶剂(300 mL 和 100 mL)进行萃取,并对水油分离效果进行比较,以选择适宜的萃取溶剂体积。

1.2.1.3 萃取回收率的考察 为保证样品中油相包被的菌均分配至水相中,同时为验证水相溶剂对菌的生长无抑制作用,对萃取回收率进行了考察。取灭菌后的辅料 10 g,置分液漏斗中,加入小于 100 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌菌液 2 mL,加 600 mL 肉豆蔻酸异丙酯,混匀,加入 300 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液,振摇后静置,取水层置二联滤器上过滤。

过滤后取下滤膜置胰酪大豆胨琼脂平板上培养, 32.5 ℃ 培养 24 h 后计数。

1.2.1.4 冲洗液体积的选择 取 10 g 供试品置 600 mL 肉豆蔻酸异丙酯中, 混匀, 加入 300 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液, 振摇后静置, 取水层置三联过滤器上过滤后, 分别用 300 mL/膜、600 mL/膜、900 mL/膜 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液进行冲洗后, 每个滤筒加入约 100 mL 硫乙醇酸盐液体培养基, 再加入小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌, 32.5 ℃ 培养并与阳性对照菌的生长情况进行比较, 以选择适宜的冲洗体积。

1.2.1.5 青霉素酶用量的选择 取 10 g 供试品置 600 mL 肉豆蔻酸异丙酯中, 混匀, 加入 300 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液, 振摇后静置, 取水层置三联过滤器上过滤后, 用 300 mL/膜 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液进行冲洗, 每个滤筒加入约 100 mL 硫乙醇酸盐液体培养基, 重复制备 5 个滤筒, 分别加入 300 万单位/膜、30 万单位/膜、3 万单位/膜、3 千单位/膜、300 单位/膜的青霉素酶, 再加入小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌, 32.5 ℃ 培养并与阳性对照菌的生长情况进行比较, 以选择适宜的青霉素酶用量。

1.2.2 拟建立的薄膜过滤无菌检查法 取混匀后的本品 10 g, 置灭菌的分液漏斗中, 加无菌肉豆蔻酸异丙酯 600 mL, 充分振摇, 再加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 300 mL, 振摇, 静置, 取水层用薄膜过滤法处理, 用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液为冲洗液冲洗滤膜, 每次冲洗 100 mL/膜, 共冲洗 3 次。每膜加入不少于 3 万单位青霉素酶。依法检查(附录 1101), 应符合规定。

1.2.3 方法学验证 按照《中国兽药典》一部附录 1101^[8]的要求, 对上述方法进行验证。

1.2.3.1 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。

取生孢梭菌接种于硫乙醇酸盐流体培养基中, 取白色念珠菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基中, 取黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上, 同法操作。

1.2.3.2 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。取生孢梭菌菌液置于硫乙醇酸盐流体培养基中, 取真菌菌液注入沙氏葡萄糖琼脂培养基中, 同法操作。

1.2.3.3 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。

1.2.3.4 薄膜过滤无菌检查法适用性试验 ①供试品阳性菌试验组: 取供试品 10 支, 挤出内容物, 混匀, 取混合样品 10 g, 置灭菌的分液漏斗中, 照 1.2.2 项操作, 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和 3 万单位青霉素酶, 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阳性菌对照组: 除不加供试品外, 其余同法操作。

③供试品组: 除不加阳性菌外, 其余同法操作。

④阴性对照组: 除不加供试品和阳性菌外, 其余同法操作。

1.2.4 供试品的无菌检查 因上市抽验样品的最少检验数量不包括阳性对照用量, 因此在进行供试品无菌检查实际操作时应增加二分之一的最少检

验数量作阳性对照用,即取供试品 15 支,挤出内容物,混匀。取混合样品 10 g,置灭菌的分液漏斗中,加灭菌肉豆蔻酸异丙酯 600 mL 充分振摇,再加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 300 mL,振摇,静置,取水层。再取混合样品 5 g,置灭菌的分液漏斗中,加无菌肉豆蔻酸异丙酯 300 mL 充分振摇,再加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 150 mL,振摇,静置,取水层。将两次萃取的水层合并,照 1.2.2 项操作。

2 结果与分析

2.1 薄膜过滤无菌检查方法的建立

2.1.1 萃取溶剂种类的筛选 pH 6.0 磷酸盐缓冲液相对常规的无菌检查用溶剂 0.1% 蛋白胨溶液和 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液而言,明显减轻了乳化现象,实现了完全分离,提高了萃取效率(表 2)。

表 2 萃取溶剂种类的选择

Tab 2 Selection of extraction solvent	
萃取溶剂种类	水油两相分离效果
0.1% 蛋白胨溶液	乳化严重,无法完全分离
pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液	乳化严重,无法完全分离
pH 6.0 磷酸盐缓冲液	乳化较轻,通过静置可实现完全分离

2.1.2 萃取溶剂体积的选择 齐鲁与澳龙两家企业的产品黏度差异较大,齐鲁的样品较稀,澳龙的样品较粘稠。因此,在考察了齐鲁的样品的萃取效果后,将供试品换为澳龙的样品。采用上述萃取溶剂进行萃取,结果发现又出现了严重乳化现象。因此将萃取溶剂量进行了增大。采用 600 mL 肉豆蔻酸异丙酯与 300 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液,对上述 2 家企业的各 10 g 供试品进行萃取,均可完全分层(表 3)。

表 3 萃取溶剂体积的选择

Tab 3 Selection of extraction solvent volume		
样品来源/取样量	油相体积/水相体积	水油两相分离效果
齐鲁/10 g	200 mL/100 mL	完全分离
澳龙/10 g	200 mL/100 mL	乳化严重,无法完全分离
澳龙/10 g	600 mL/300 mL	完全分离

2.1.3 萃取回收率的考察 萃取后每膜菌落数/每 1 mL 菌落数 = $(77 + 65) / (63 + 68) = 108\%$,在 50% ~ 200% 的范围内。说明萃取后样品中的菌均分配至水相,且 pH 6.0 磷酸盐缓冲液对菌的生长无抑制作用。

2.1.4 冲洗液体积的选择 结果见表 4,该结果表明即便冲洗 900 mL/膜仍不能消除阿莫西林对菌生长的抑制作用,需要加青霉素酶使阿莫西林降解以消除影响。

表 4 冲洗液体积的选择

Tab 4 Selection of flushing fluid volume				
	18 h	24 h	48 h	72 h
阳性对照	+	+	+	+
300 mL/膜	—	—	—	+
600 mL/膜	—	—	—	+
900 mL/膜	—	—	+	+

“+”表示有菌生长,呈阳性;“—”表示无菌生长,呈阴性;“/”表示未考察。

2.1.5 青霉素酶用量的选择 结果见表 5,该结果表明,3000 单位/膜是可消除阿莫西林抑菌作用的临界青霉素酶浓度。但考虑到不同品牌和种类的滤膜对阿莫西林的截留量存在差异,亦考虑到不同试验人员操作手法有所差异,拟采用青霉素酶的用量为 3 万单位/膜。

表 5 青霉素酶用量的选择

Tab 5 Selection of penicillin enzyme dosage			
	18 h	24 h	48 h
阳性对照	+	+	+
300 万单位/膜	+	+	+
30 万单位/膜	+	+	+
3 万单位/膜	+	+	+
3000 单位/膜	+	+	+
300 单位/膜	—	—	+

2.2 方法学验证

2.2.1 活菌计数 结果见表 6,该结果表明,在各自对应稀释级别下,各检定菌株浓度均在 50 ~ 100 cfu/mL 范围,符合无菌检查阳性菌浓度要求。

表 6 活菌计数结果

Tab 6 Results of living bacteria counts					
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	57
白色念珠菌	3	10 ⁻⁵	92	90	91
黑曲霉	3	10 ⁻⁵	98	97	98

2.2.2 培养基的灵敏度检查 各细菌检定菌株均在 24 h 内生长,各霉菌检定菌株均在 48 h 内生长,符合无菌检查用菌要求。

2.2.3 无菌检查方法适用性试验 薄膜过滤后,含供试品的阳性菌试验组试验菌均生长良好,供试品对菌生长没有影响。

2.3 供试品的无菌检查 4 批供试品进行无菌检查后,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,4 批供试品 14 d 内均澄清,无菌生长,无菌检查结果均符合规定。

3 讨论与小结

3.1 薄膜过滤法与直接接种法的优劣性分析^[9] 在样品有抑菌作用干扰时,直接接种法由于难以排除样品干扰,仅可采用减少取样量的方法进行稀释,因此,样品取样量不可过大,无菌检查结果对整批样品的代表性降低;另外,对于油性基质的样品而言,与培养基混合后会形成混悬液,难以与阳性对照进行区分,结果判断困难,需进一步采用转种的方式进行次代培养,方可准确判断结果,但操作步骤增多又增大了污染的可能性;再者,直接接种法的所有操作均在开放性容器中进行,对人员操作和环境洁净度的要求较为严格。

薄膜过滤法由于可采用冲洗液将样品冲洗去除,取样量较直接接种法可有所增大,结果代表性增强;对于油性基质的样品,可选择采用聚山梨酯 80 等水油互溶性表面活性剂溶解后过滤,但如果

采用上述手段仍无法使样品顺利过膜,可考虑破乳萃取水相的方式,但需注意选择适宜的萃取溶剂以避免乳化;另外,薄膜过滤法可采用全封闭式滤器,避免了外源性微生物的污染,操作更为简便;再者,薄膜过滤法的培养基避免了油相的干扰,结果易于观察。

对于本方法而言,萃取乳化严重的特殊情况导致即便采用薄膜过滤法亦无法较直接接种法^[10]进一步增大取样量,但方法操作更为便捷,方法可靠性增强,结果判断准确性提高。

3.2 萃取用溶剂的选择分析 乳房注入剂用于奶牛乳房炎的治疗时,需向患病乳区灌注药物,药物在乳区局部留置,以充分发挥药效,基于药效设计的乳房注入剂多为油性基质的混悬液或乳膏状半固体^[11]。但对于上述基质的样品而言,无菌的薄膜过滤法如将样品直接过膜往往会因为堵膜而无法进行。对现有乳房注入剂质量标准中无菌检查项方法进行了梳理,发现采用薄膜过滤法的方法大部分将样品进行了萃取,再取水相过膜。萃取用的油相溶剂多采用肉豆蔻酸异丙酯,萃取的水相溶剂多采用附录 1101 推荐的常用溶剂 0.1% 蛋白胨溶液或 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液。但本制剂采用上述常规溶剂萃取乳化现象严重,无法实现两相分离。分析认为乳化现象严重的原因是主药阿莫西林三水合物在 pH 中性的缓冲液中溶解性差,而酸性缓冲液中阿莫西林溶解度提高,可使乳化现象减轻。但酸性过强的缓冲液亦会对菌的生长产生影响,因此,尝试采用弱酸性的 pH 6.0 磷酸盐缓冲液作为萃取的水相溶剂,在解决乳化问题的同时亦避免了溶剂本身对菌的损伤。

本试验采用薄膜过滤法对复方阿莫西林乳房注入剂进行无菌检查。通过萃取溶剂的选择,解决了萃取乳化严重、萃取效率低的问题;通过增大萃取溶剂体积,实现了对不同生产企业制剂的通用性;通过萃取后过滤水相,解决了供试品直接过滤容易堵膜甚至因系统压力过高而崩裂滤器管路的问题;通过青霉素酶加入量的考察,选择适宜的酶加入量,在去除了供试品干扰作用的前提下,实现

了试剂的节约。

参考文献:

[1] Williams J D. β - Lactamases and β - Lactamase inhibitors[J]. *International journal of antimicrobial agents*, 1999, 12 (1): S3 - S7.

[2] 丁宏斌, 李建成, 刘金凤, 等. 半合成青霉素与 β - 内酰胺酶抑制剂对奶牛乳房炎致病菌体外联合药敏的研究[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(8): 87 - 89.
Ding HB, Li JC, Liu JF, *et al.* Study on combined drug sensitivity of semi synthetic penicillin and β - lactamase inhibitor to pathogenic bacteria of cow mastitis *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2009, 45(8): 87 - 89.

[3] 阿莫西林乳房注入剂(泌乳期)[S]. 兽药质量标准汇编(2013 年版).
Compound amoxicillin intramammary infusion (Lactation period)[S]. Collection of veterinary drug quality standards (2013 edition)

[4] 国家兽药基础数据库[DB/OL]. <http://vdt.s. ivdc. org. cn; 8081/cx/#>.
National veterinary drug basic database [DB/OL]. <http://vdt.s. ivdc. org. cn; 8081/cx/#>.

[5] 农业农村部. 第 150 号公告, 2019[S].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Announcement No. 150, 2019[S].

[6] United States Pharmacopeia Commission. < 71 > Sterility test, United States Pharmacopeia, 2020[S].

[7] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典, 2020 年版[S].
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, 2020[S].

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典, 2020 年版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2020[S].

[9] 吴菊华, 张树梅, 等. 直接接种法与薄膜过滤法在小容量注射剂无菌检查中的应用比较[J]. 中国交通医学杂志, 2005, 19(2): 152 - 153.
Wu JH, Zhang SM, *et al.* Comparison of direct inoculation method and membrane filtration method in the sterility test of little capacity injection[J]. *Chin Med J of Communications*, 2005, 19(2): 152 - 153.

[10] 郝利华, 杨秀玉, 宋 洋, 等. 复方阿莫西林乳房注入剂无菌检查方法的确立[J]. 中国兽药杂志 2012, 46(10): 27 - 29.
Hao LH, Yang XY, Song Y, *et al.* Confirmatory experiment of sterility test method for compound amoxicillin intramammary infusion[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46(10): 27 - 29.

[11] 吴文学, 王明明, 王天坤, 等. 奶牛乳房炎的综合防治[J]. 中国兽医杂志[J]. 2020, 56(2): 117 - 120.
Wu WX, Wang MM, Wang TK, *et al.* Comprehensive prevention and treatment of cow mastitis [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(2): 117 - 120.

(编 辑:侯向辉)