

注射用盐酸多西环素几种无菌检查方法的比较研究

王康俊

海南省检验检测研究院海南省药品检验所, 海口 570216

摘要: 目的: 建立更加优化的注射用盐酸多西环素的无菌检查方法。方法: 依据中国药典2020年版四部通则1101的要求, 采用薄膜过滤法, 分别采用以聚山梨酯80-卵磷脂、组氨酸-卵磷脂-聚山梨酯80等分别作为中和剂的冲洗液、培养基中再加入不同浓度的硫酸镁等方法进行无菌方法适用性研究。结果: 以0.15%组氨酸-0.05%卵磷脂-1.5%聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂和冲洗液, 并最后在培养基中加入5ml 10%无菌硫酸镁溶液, 能很好的消除抑菌成分的干扰, 试验菌均生长良好。结论: 通过方法适用性试验, 所建立的方法适用于注射用盐酸多西环素的无菌检查。

关键词: 注射用盐酸多西环素; 无菌检查方法适用性; 薄膜过滤法

Comparative Study on Several Aseptic Testing Methods for Doxycycline Hydrochloride Injection

Wang Kangjun

Hainan Provincial Institute of Inspection and Testing (Hainan Provincial Institute of Drug Control), Haikou, Hainan 570216

Abstract: Objective To establish a more optimized sterile testing method for doxycycline hydrochloride injection. Method: According to the requirements of General Rule 1101 of Part Four of the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia, a membrane filtration method was used to study the applicability of aseptic methods, using flushing solutions and culture media containing polysorbide 80 ovophosphate, histidine ovophosphate polysorbide 80, etc. as neutralizing agents, and adding different concentrations of magnesium sulfate. Result: Using a pH 7.0 sterile sodium chloride peptone buffer with 0.15% histidine -0.05% ovophosphate 1.5% polysorbate 80 as the diluent and rinse solution, and finally adding 5ml of 10% sterile magnesium sulfate solution to the culture medium, the interference of antibacterial components was effectively eliminated, and the experimental bacteria grew well. Conclusion: Through the applicability test of the method, the established method is suitable for sterile testing of doxycycline hydrochloride for injection.

Keywords: doxycycline hydrochloride for injection; applicability of sterile testing methods; membrane filtration method

盐酸多西环素是属于四环素类抗生素, 具有广谱抗病原微生物作用, 通过特异性与核糖体30S亚基结合抑制病原微生物的蛋白质合成。抗菌作用比四环素强2-10倍, 特别是用于对四环素耐药的金葡萄菌有效。临床上主要用于治疗呼吸系统感染、泌尿系统感染、生殖系统感染和胆道感染等^[1]。注射用盐酸多西环素为2023年国家监督检查的品种, 由我所承担, 因无菌检查方法均参照2005年版中国药典的方法, 而2005年版中国药典无菌方法适用性试验要求与2020年版中国药典的要求不一致, 变化较大, 且各个生产厂家的无菌方法均未统一, 为了统一无菌检验方法, 且能满足2020年版中国药典无菌方法适用性的要求, 本文通过采用多种方法研究对比, 并建立更加优化的注射用盐酸多西环素的无菌检查方法, 现报道如下:

一、试验材料

(一) 仪器、试剂与菌株

仪器: HTY22000A集菌仪、一次性全封闭两联/三联集菌培养器(PY220/PY330, 杭州泰林生物技术设备有限公司); 生化培养箱(LRH系列生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司);

试剂: 注射用盐酸多西环素(海口奇力制药股份有限公

司, 批号为20230607; 规格: 0.1g); 硫乙醇酸盐流体培养基(FTM)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、0.1%蛋白胨水溶液、0.9%无菌氯化钠、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司); 组氨酸(国药化学试剂集团有限公司); 卵磷脂(环凯微生物科技有限公司); 聚山梨酯80、无水硫酸镁(西陇科学股份有限公司)。

菌株: 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌

作者简介: 王康俊, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向药品检验

[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]，均来源于中国食品药品检定研究院。

二、方法与结果

(一) 菌液制备

按中国药典2020年版四部通则1101无菌检查法项下方法^[2]配制，菌液浓度每1ml含不大于100cfu，同时做平板计数，结果见表1。

表1 菌落计数结果 (cfu /mL)

编号	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	生孢梭菌	白色念珠菌	黑曲霉
1	69	82	45	70	75	64
2	73	76	42	63	80	68
平均	71	79	44	67	78	66

(二) 方法的初步选择

取一次性全封闭两联集菌培养器 (PY220)，先用少量冲洗液 (同为稀释液) 润湿滤膜，取本品10瓶，用稀释液使样品全部溶解并稀释成含多西环素5mg/mL的溶液，混匀，平均加至两联集菌培养器中过滤 (载药量为0.5g/培养器，100ml/培养器/膜)，用冲洗液冲洗，每培养器每次冲洗100ml，在最后一次冲洗前分别于每个培养器中加入2.1项下的金黄色葡萄球菌菌液及枯草芽孢杆菌菌液各1mL，冲洗完毕后在培养器中加入相应的培养基100mL，作为试验组。另取一次性全封闭的两联集菌培养器，同法操作，以稀释液代替药品，作为阳性对照组。按规定温度培养5d。结果见表2。

表2 不同配方的冲洗液、不同冲洗次数的预试验结果 (100ml/次，盐酸多西环素5mg/ml)

冲洗液 (稀释液)	冲洗次数	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
1、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含3%聚山梨酯80-0.3%卵磷脂)。	6 (10)	+ (+2d)	- (-)
2、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含1%聚山梨酯80-0.3%卵磷脂)。	6 (10)	+ (+2d)	- (-)
3、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含3%聚山梨酯80-0.5%硫酸镁)。	5 (10)	+ (+2d)	- (-)
4、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸)。	5 (10)	+ (+2d)	- (-)
5、0.1%无菌蛋白胨水溶液 (含0.5%硫酸镁)，100ml培养基中加入5ml 0.5%无菌硫酸镁溶液。	5 (10)	- (-)	- (-)
6、0.1%无菌蛋白胨水溶液 (含0.5%硫酸镁)，100ml培养基中加入5ml 0.5%无菌硫酸镁溶液。	8 (10)	- (+6d)	- (-)
7、0.9%无菌氯化钠溶液 (含10%硫酸镁)，100ml培养基加入5ml 10% 无菌硫酸镁溶液。	8	+ (2d)	+ (7d)

冲洗液 (稀释液)	冲洗次数	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
8、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液。(含3%聚山梨酯80-0.3%卵磷脂)，100ml培养基中加入5ml 0.5% 无菌硫酸镁溶液。	8	+ (3d)	+ (7d)
9、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸)，100ml培养基加入5ml 0.5% 无菌硫酸镁溶液。	8	+ (2d)	+ (7d)
10、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含3%聚山梨酯80-0.3%卵磷脂)，100ml培养基中加入5ml 10% 无菌硫酸镁溶液。	5	+ (2d)	+ (7d)
11、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸)，100ml培养基加入5ml 10% 无菌硫酸镁溶液。	5	+ (1d)	+ (2d)

注：+表示有菌生长；-表示无菌生长。

(三) 方法的适用性试验与结果

本试验选择了表2中的“11、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸)”作为稀释液和冲洗液 (以简称为稀释液或冲洗液) 进行方法适用性试验。

1. 试验组 取本品30瓶，按每5瓶用100ml的稀释液溶解后全部溶液置一个培养器 (PY220) 中过滤后 (相当于0.5g/培养器，100ml/培养器/膜)，用冲洗液共冲洗5次，每次冲洗100ml，在最后一次冲洗前分别于每个过滤器中加入“2.1”项下金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液各1ml (一个培养器只加一种菌)，过滤完毕后，在含金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌的培养器中分别加入FTM (100ml/培养器)，同时加入10% 无菌硫酸镁溶液 (5ml/培养器)，轻轻混匀后，置33.5℃培养不超过5天，逐日观察结果，三次独立结果详见表3；在含枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的过滤器中分别加入TSB (100ml/培养器)，同时加入10% 无菌硫酸镁溶液 (5ml/过滤器)，轻轻混匀后，置23.5℃培养不超过5天，逐日观察结果，三次独立试验结果详见表3。

2. 阳性对照组 另取一次性全封闭集菌培养器 (PY220)，用稀释液代替药品，按2.3.1试验组项下方法操作，置规定的温度下培养，不超过5天，逐日观察结果，三次独立试验结果详见表3。

3. 阴性对照组 另取一次性全封闭集菌培养器 (PY220)，按2.3.1试验组项下方法操作，既不加药品，也不加菌，做两个培养器，一个培养器加FTM100ml，同时加入10% 无菌硫酸镁溶液 (5ml/培养器)，另一个培养器加入TSB 100ml，同时加入10% 无菌硫酸镁溶液 (5ml/过滤器)，置规定的温度下培养，不超过5天，逐日观察结果，三次独立试验结果详见表3。

4. 中和剂组 另取一次性全封闭集菌培养器 (PY220)，用冲洗液代替药品，按2.3.1试验组项下方法操作，置规定的温度下培

养，不超过5天，逐日观察结果，三次独立结果详见表3。

5. 结果 试验组中各试验菌与阳性对照组比较，均生长良好，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，上述检查方法可行。

表3方法适用性试验结果

菌株名称	试验组 培养时间 (d)					阳性对照组 培养时间 (d)					中和剂组 培养时间 (d)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
铜绿假单胞菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
生孢梭菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
黑曲霉菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阴性对照组	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

三、讨论

盐酸多西环素对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌两种菌均较敏感，因此选择上述两种菌作为预试验，这样既减少工作量、节约试药，又能提高工作效率^[3]。

文献 [4]中提到采用两套全封闭的集菌培养器串联过滤法，因滤膜的吸附作用、细菌的载菌率不同等^[5]，集菌培养器的导管过长、液体的多次的转移均不利于受损微生物的生长。

利用四环素类抗生素能与金属离子起络合反应，使其失去抑菌性的化学性质。本试验在一定浓度的盐酸多西环素（5ml/ml）下，选择冲洗液中含有两种或两种以上的不同浓度中和剂（聚山梨酯、卵磷脂、组氨酸）的混合作为冲洗液，采用不同的冲洗量、在培养基中加入不同浓度一定量金属镁离子与多西环素起络合反应，从而减少冲洗的次数。

根据中国药典2020年版四部通则1101“薄膜过滤法”的规定每张滤膜每次冲洗量一般为100ml，总冲洗量一般不超过500ml，最高不得超过1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤”的原则。表3的结果表明，对于注射用盐酸多西环素的无菌检查，用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液（含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸）溶解并稀释成5mg/ml的溶液，采用薄膜过滤法处理，用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液（含1.5%聚山梨酯80-0.05%卵磷脂-0.15%组氨酸）进行冲洗（每膜不少于500ml，100ml/次），最后加入相应的培养基100ml（含5ml10% 无菌硫酸镁溶液），依法检查。该方法准确、可靠，操作简单，为四环素类的抗生素无菌检查提供一种思路和方法。

参考文献：

[1] 孙小平、黄文祥. 单剂注射用盐酸多西环素的药动学研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10): 624-626, ·S5 · .
 [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国中国药典（四部）[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 156-160.
 [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 非无菌化学药品及原辅料微生物限度研究技术指导原则（试行），2023年2月发布。
 [4] 肖甜甜、姜儒、刘知源, 等. 注射用盐酸多西环素无菌检查方法学考察 [J]. 中国药师, 2019, 22 (1) : 191-193.
 [5] 简秋瑜、袁海梅. 薄膜过滤法在抗生素类注射剂无菌检查中常见问题及分析 [J]. 生物化工. 2023, 9 (04):112-114.