

## · 研究报告 ·

## 乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液无菌检查方法的建立及验证

刘 栋, 汤长明, 郝 哲 (解放军 153 中心医院药械科, 河南 郑州 450042)

**[摘要]** **目的** 建立乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的无菌检查方法。**方法** 根据《中华人民共和国药典(二部)》2010 年版所列方法,通过增加冲洗液用量和加入中和剂,采用薄膜过滤法进行实验研究。**结果** 以 0.1% 蛋白胨水溶液作为冲洗液,每管冲洗液容量为 700 ml,每次冲洗 100 ml,金黄色葡萄球菌不能正常生长。然而,使用含中和剂的培养基时,冲洗量每管 300 ml,所有阳性对照菌均生长良好。**结论** 本法简单方便,适用于乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的无菌检查。

**[关键词]** 乳酸左氧氟沙星;注射液;无菌检查

**[中图分类号]** R978.1;R927.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)06-0552-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.019

## Establishment and validation of sterility test of levofloxacin lactate and sodium chloride injection

LIU Dong, TANG Changming, HAO Zhe (Department of Pharmacy, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a sterility test of levofloxacin lactate and sodium chloride injection. **Methods** The test was carried out by thin-membrane filtration method with different volume of flushing liquid or adding neutralization into culture medium according to the Appendix of Chinese Pharmacopoeia (2010 edition). **Results** When 0.1% peptone water was used as flushing liquid, *Staphylococcus aureus* gave no evidence of growth until the amount of flushing liquid reached 700 ml per tube (100 ml each time). At the same time, all of the six positive control bacteria grew normally when there was 300 ml flushing liquid in each tube with neutralization as culture medium. **Conclusion** This method was simple and convenient, suggesting that it was suitable for the sterility test of levofloxacin lactate and sodium chloride injection.

**[Key words]** levofloxacin lactate; injection; sterility test

左氧氟沙星为第三代喹诺酮类抗菌药,为氧氟沙星的左旋体,在临床上广泛用于  $G^+$  菌所致的呼吸道、泌尿道等部位的急、慢性感染<sup>[1]</sup>。乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液抗菌活性较强,根据《中华人民共和国药典(二部)》2010 年版所示方法<sup>[2]</sup>,采用增加冲洗液量和在培养基中加入中和剂,考察供试品的抗菌性能否在无菌检查时得到有效消除。中和剂选用能与喹诺酮类药物发生络合反应<sup>[3,4]</sup>的  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$ <sup>[4-9]</sup>。本实验按照《中华人民共和国药典(二部)》2010 年版附录 XI H“无菌检查法”(以下简称:药典“无菌检查法”)中的原则性要求进行实验,确定了乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液无菌检查的具体条件。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 实验菌种 金黄色葡萄球菌 [CMCC (B)

26003]、大肠杆菌 [CMCC (B) 44102]、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]均由中国食品药品检定研究院提供。

**1.2 培养基、冲洗液、中和剂** 硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基、营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、改良马丁琼脂培养基、蛋白胨(北京奥博星生物技术有限责任公司)。氯化镁(天津市瑞金特化学品有限公司)、硫酸锰(天津市化学试剂三厂)均为分析纯。

含  $Mg^{2+}$  培养基:在普通培养基配制过程中加入氯化镁,  $Mg^{2+}$  在培养基中的终浓度为 0.2 mol/L。含  $Mn^{2+}$  培养基:在普通培养基配制过程中加入 5% 的 0.2 mol/L 硫酸锰。

所有培养基、冲洗液均按照药典“无菌检查法”项下要求配制及灭菌。

培养基的适用性检查、无菌性检查、灵敏度检查根据《中华人民共和国药典(二部)》2010 年版附录,

**[作者简介]** 刘 栋, 硕士, 药师, 研究方向: 医院制剂. Tel: (0371) 60653569; E-mail: liudong1367354665@163.com

检查符合要求。

**1.3 仪器** 标准无菌室;全自动数显恒温鼓风干燥箱;全自动数显生化培养箱;全自动数显立式蒸汽灭菌锅;HTY-2000A 型智能集菌仪、全封闭集菌培养器(孔径 0.22  $\mu\text{m}$ )等,由杭州泰林生物技术设备有限公司提供。

**1.4 样品** 乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液(规格:0.5 g/100 ml,某院制剂,批号:1309161、1309162、1309163)。

## 2 方法与结果

**2.1 菌液的制备** 将上述菌种按《中华人民共和国药典(二部)》附录“菌液制备方法”制成所需浓度的菌悬液及孢子悬液,备用。菌液制备结果见表 1。

表 1 菌落计数结果(cfu/ml)

培养基	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	生孢梭菌	白色念珠菌	黑曲霉
稀释级	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
1	86	72	58	70	76	68
2	82	66	55	65	69	66
均值	84	69	56	68	72	67

### 2.2 方法学验证

**2.2.1 方法学验证 I** 按照《中华人民共和国药典(二部)》规定,将样品 9 瓶全量通过全封闭三联集菌培养器,再用 0.1% 蛋白胨水溶液冲洗,每次每管 100 ml,冲洗 3 次,在最后一次冲洗液中加入小于 100 cfu 的实验用菌。在各管中分别加入硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基,每管 100 ml。阳性对照组:另取集菌培养器,不过滤样品,其他操作同上。阴性对照组:另取集菌培养器,过滤 0.1% 蛋白胨水溶液(用量同实验组),分别加入硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基各 100 ml。

以上所得培养基,按各菌种规定温度培养 3~5 d,结果见表 2。

由表 2 可知,当冲洗液为 300 ml/管的 0.1% 蛋白胨水溶液时,阳性对照组各实验菌均生长良好,阴性对照组均无菌落生长。而实验组中金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌均未正常生长,表明 300 ml/管的冲洗量不能消除样品的抑菌活性。当冲洗量增加到 500 ml/管时,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌仍不能生长。将冲洗量增加到 700 ml/管,金黄色葡萄球菌的生长状况仍不如阳性对照组。若进一步增加冲洗量,势必增加滤膜的负担,也会对滤膜上的微生物造成危害。由此可见,需要探索一种

表 2 方法学验证结果(I)

组别	硫乙醇酸盐流体培养基			改良马丁培养基		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
金黄色葡萄球菌						
实验组	-	-	-			
阳性对照组	+	+	+			
大肠杆菌						
实验组	-	-	-			
阳性对照组	+	+	+			
枯草芽孢杆菌						
实验组	-	-	-			
阳性对照组	-	+	+			
生孢梭菌						
实验组	+	+	+			
阳性对照组	+	+	+			
白色念珠菌						
实验组				-	+	+
阳性对照组				-	+	+
黑曲霉						
实验组				-	+	+
阳性对照组				-	+	+
阴性对照组	-	-	-	-	-	-

更为有效、方便快捷的无菌检查方法。

**2.2.2 方法学验证 II** 操作方法同“2.2.1”项,其中,0.1% 蛋白胨水溶液用量为 300 ml/管,最后加入 100 ml 含  $\text{Mg}^{2+}$  培养基,各实验菌同法操作。阳性对照组和阴性对照组使用的培养基均为含  $\text{Mg}^{2+}$  培养基。所得各培养基按各菌种规定温度培养 3~5 d。结果见表 3。

表 3 方法学验证结果(II)

组别	含 $\text{Mg}^{2+}$ 的硫乙醇酸盐流体培养基			含 $\text{Mg}^{2+}$ 的改良马丁培养基		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
金黄色葡萄球菌						
实验组	+	+	+			
阳性对照组	+	+	+			
大肠杆菌						
实验组	+	+	+			
阳性对照组	+	+	+			
枯草芽孢杆菌						
实验组	-	+	+			
阳性对照组	-	+	+			
生孢梭菌						
实验组	+	+	+			
阳性对照组	+	+	+			
白色念珠菌						
实验组				-	+	+
阳性对照组				-	+	+
黑曲霉						
实验组				-	+	+
阳性对照组				-	+	+
阴性对照组	-	-	-	-	-	-

由表3可知,培养基中加入 $Mg^{2+}$ 后,在冲洗液量较少的情况下,实验组与阳性对照组的各实验菌均能良好生长,阴性对照组均无菌落生长,说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或者抑菌作用不影响无菌检查,上述方法可行。

**2.2.3 方法学验证Ⅲ** 操作方法同上,但使用的培养基换作含 $Mn^{2+}$ 的培养基。实验结果显示,实验组的各实验菌生长良好,说明 $Mn^{2+}$ 也能在该检验条件下消除样品的抑菌作用。

预实验过程中发现硫酸锰在培养基中溶解性较差,特别是在改良马丁培养基中因用量稍大容易出现浑浊;另外,金黄色葡萄球菌在含 $Mn^{2+}$ 硫乙醇酸盐流体培养基中的菌落形态不如它在含 $Mg^{2+}$ 的培养基中易于观察。因而,乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的无菌检查使用含 $Mg^{2+}$ 的培养基更为合理。

**2.3 样品的无菌检查** 取本品9瓶,全量通过全封闭三联集菌培养器,然后用0.1%蛋白胨水溶液冲洗,每次每管100 ml,冲洗总量为每管300 ml,最后在各管中分别加入相应的含 $Mg^{2+}$ 的培养基,每管100 ml。同时,分别做阳性对照和阴性对照。将各培养基置规定温度培养14 d,逐日观察。结果显示,供试品管和阴性对照管澄清,阳性对照管(金黄色葡萄球菌)则生长良好,表明供试品无菌检查符合规定。

### 3 讨论

方法学验证Ⅰ参考了柏大为<sup>[10]</sup>和白丽娟<sup>[11]</sup>建立的乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液无菌检查方法,当冲洗量为300 ml/管时,不能有效消除样品的抗菌活性,原因或与样品规格有关。两人所用样品规格为0.2 g/100 ml,而本实验规格为0.5 g/100 ml,在滤膜和滤器上吸附的量必然要高些。这也与江志杰等<sup>[12]</sup>的观点相同,其所用样品为左氧氟沙星注射液(规格:0.75 g/150 ml),经验证需要加大冲洗液的用量,当加入中和剂组氨酸-卵磷脂-聚山梨酯80混合溶液时,冲洗液量大大降低。

方法学验证Ⅱ预实验考察了将中和剂加入冲洗液以消除样品的抑菌性<sup>[13,14]</sup>,结果是冲洗量仍然很大,原因可能是冲洗液过滤速度较快,中和剂与样品作用时间短暂。

比较方法学验证的3种方法可以得出以下结论,通过增加冲洗液量可以消除样品的抑菌性,但会损害滤膜、损伤微生物。而采用加入中和剂的方法,不但能消除抑菌性,而且减少了无菌检查的冲洗量,

缩短无菌检查时间,降低检查过程中的污染概率,特别是当检验量增加时,加入中和剂操作简便、耐用性好。方法学验证Ⅰ显示在不加入中和剂的情况下,实验组中的黑曲霉和白色念珠菌均能正常生长,表明样品对真菌抑菌性较弱或者在该检验条件下已经能消除样品的抑菌性,因此在改良马丁培养基中可以不添加中和剂。

### 4 结论

乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液(0.5 g/100 ml)的无菌检查可以采用如下方法:取规定量供试品,按照薄膜过滤法过滤,然后用0.1%蛋白胨水溶液冲洗(300 ml/管),最后加入含0.2 mol/L  $Mg^{2+}$ 的培养基(改良马丁培养基中可不加中和剂)。

### 【参考文献】

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].17版.北京:人民卫生出版社,2010:97.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版二部[S].北京:化学工业出版社,2010:附录105.
- [3] 尤启东.药物化学[M].北京:化学工业出版社,2005:418.
- [4] 梁月秋,刘涛,朱斌,等.应用于喹诺酮类药物无菌检查金属离子的初步筛选[J].药物分析杂志,2009,29(2):334-336.
- [5] 裴小龙,黎隽,杨晓莉,等.喹诺酮类药物无菌检查中 $Mg^{2+}$ 的应用研究[J].中国药业,2011,20(1):28-29.
- [6] 朱斌,刘涛,蒋受军,等. $Mg^{2+}$ 在药物无菌检查中的应用[J].中国现代应用药学,2010,27(11):1031-1033.
- [7] 张光华,余立,刘文杰.硫酸锰在几种喹诺酮类药物无菌检查中的应用[J].中国药品标准,2008,9(1):35-38.
- [8] 陈莹,邢轶华,卓明,等.代替沙星滴眼液无菌检查方法的建立[J].天津药学,2009,21(4):7-9.
- [9] 王沁馨.甲磺酸培氟沙星注射液无菌检查的方法学验证[J].中国药师,2010,13(9):1361-1362.
- [10] 柏大为.乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的无菌检查方法学研究[J].海峡药学,2012,24(11):29-31.
- [11] 白丽娟.乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的无菌检查方法学研究[J].科学与财富,2014(1):247.
- [12] 江志杰,刘文杰,高春,等.左氧氟沙星注射液无菌检查方法验证[J].中国药品标准,2008,9(4):245-247.
- [13] 江志杰,高春.无菌检查中消除喹诺酮类药物抗菌活性的方法研究[J].中国药业,2013,22(15):52-54.
- [14] 裴小龙,黎隽,杨晓莉,等.盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液无菌检查法 $Mg^{2+}$ 加入方法验证[J].西北药学杂志,2010,25(6):446-447.

【收稿日期】 2014-03-29 【修回日期】 2014-09-01

【本文编辑】 李睿旻