

◇ 药物分析 ◇

注射用单磷酸阿糖腺苷无菌检查方法适用性研究

余凡¹, 王自义², 高翔³, 李秋菲³

(1. 杨凌示范区药品检验监测评价中心, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省医疗器械质量监督研究院, 陕西 西安 712046; 3. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立注射用单磷酸阿糖腺苷无菌检查方法标准。方法 按照 2015 年版《中国药典》规定, 采用薄膜过滤法, 对 14 家企业生产的注射用单磷酸阿糖腺苷进行无菌方法适用性研究。结果 确定了规格为 0.1 g 注射用单磷酸阿糖腺苷的无菌检查方法。14 家企业(共 111 批次)无菌检验方法均为: 取样品 60 支, 采用薄膜过滤法, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗, 每次 100 mL, 共冲洗 2 次。结论 通过对 14 家企业生产的注射用单磷酸阿糖腺苷的方法验证资料进行整理、归纳、分析、试验, 最终确定严谨统一的无菌检查方法。

关键词:注射用单磷酸阿糖腺苷; 无菌检查法; 方法适用性

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.12.007

Applicability of the sterility test method of adenine arabinoside monophosphate for injection

SHE Fan¹, WANG Ziyi², GAO Xiang³, LI Qiufei³

(1. Yangling Demonstration Area Drug Testing and Evaluation Center, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Institute of Medical Device Quality Supervision and Inspection, Xi'an, Shaanxi 712046, China;

3. Shaanxi Food and Drug Monitoring and Testing Research Institute, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

Abstract: Objective To set up the standards for the sterility test of adenine arabinoside monophosphate for injection. Methods According to Chinese pharmacopoeia (2015), the sterility tests on adenine arabinoside monophosphate for injection from 14 producers were performed by membrane-filtration procedure. Results The sterility test on 0.1 g adenine arabinoside monophosphate for injection was confirmed. The sterility tests of all 14 producers (111 batches) were carried out as follows: 60 samples were filtered by membrane-filtration procedure, and washed twice by pH 7.0 sodium chloride peptone buffer, 100 mL each time. Conclusions A strict and unified sterility test has been confirmed by reorganizing, concluding, analyzing and testing of the data on the adenine arabinoside monophosphate for injection from the 14 producers.

Key words: Adenine arabinoside monophosphate for injection; Sterility test; Applicability of the measure

注射用单磷酸阿糖腺苷常用于治疗疱疹病毒感染所致的口炎、皮炎、脑炎, 也用于治疗免疫抑制患者的带状疱疹和水痘感染, 但对巨细胞病毒无效。注射用单磷酸阿糖腺苷治疗儿科呼吸道病毒感染、小儿手足口病、小儿病毒性脑炎、病毒性肺炎, 疗效明显, 能迅速缓解患儿临床症状, 改善患儿的生活质量^[1-4]。为确保临床用药安全, 建立相应的质量控制标准很有必要。无菌是注射剂质量控制的一个重要指标, 根据 2015 年版《中国药典》四部要求, 进行产品无菌检查时, 应进行方法适用性试验, 以确认所采用的方法适合于该产品的无菌检

查, 避免对检验结果的误判^[5]。对不同厂家生产的同品种、同规格注射用单磷酸阿糖腺苷无菌检查方法适用性进行合理统一, 既避免资源的浪费, 也方便了检验。

1 仪器与试剂

1.1 样品 14 家企业生产的规格 0.1 g 的注射用单磷酸阿糖腺苷共计 111 批次, 生产企业(每家企业随机抽取一个批次进行方法适用性试验), 提供的无菌方法学验证实验统计见表 1。

1.2 仪器与设备 压力蒸汽灭菌器(上海华成医用核子仪器公司); HFsafe-760S 型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); WGP-600 型恒水式电热恒温培养箱(重庆万达实验仪器厂); LRH-250 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); HTY-

表 1 14 家企业无菌检查方法验证统计表

序号	生产企业	批号	取样数量/支	冲洗液	冲洗量/mL
1	企业 A(16 批)	150506	60	0.1% 蛋白胨水溶液	500
2	企业 B(3 批)	B15011405	120	pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	300
3	企业 C(6 批)	1504011	120	0.9% 氯化钠溶液	400
4	企业 D(15 批)	1504111	30	0.1% 蛋白胨水溶液	300
5	企业 E(7 批)	20150601	120	溶解于 0.9% 氯化钠溶液 500 mL 中过滤	不冲洗
6	企业 F(9 批)	1501031	60	直接接种法	不冲洗
7	企业 G(6 批)	2015011002	30	薄膜过滤法	不冲洗
8	企业 H(14 批)	20150401	60	0.1% 蛋白胨水溶液	200
9	企业 I(4 批)	201503011	60	pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	200
10	企业 J(4 批)	150402	60	0.1% 蛋白胨水溶液	100
11	企业 K(5 批)	20150302-1	60	pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	300
12	企业 L(2 批)	20141203	120	0.9% 氯化钠溶液	200
13	企业 M(18 批)	20150108	60	pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	300
14	企业 N(2 批)	2015010303	60	pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液	300

601 型集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司);集菌培养器(杭州泰林生物技术设备有限公司,型号:DGB220,批号:20150323、DGB330、20150402);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-2F)。

1.3 培养基及冲洗液 胰酪大豆胨液体培养基(批号:150922);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:160204);沙氏葡萄糖液体培养基(批号:150801);沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:150602)硫乙醇酸盐流体培养基(批号:150922),以上培养基由北京路桥技术有限责任公司生产,培养基的适用性检查符合《中国药典》2015 版四部无菌检查法的要求。冲洗液:pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京路桥技术有限责任公司生产,批号:150801);0.9% 无菌氯化钠溶液(氯化钠分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:20150716)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备 将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中,生孢梭菌的新鲜培养物接种至硫乙醇酸盐流体培养基中,33 ℃ 培养 24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中,23 ℃ 培养48 h。上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液,计数备用;接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂培养基上,23 ℃ 培养 7 d,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液计数备用。

2.2 方法适用性试验

2.2.1 试验方法思路 注射用单磷酸阿糖腺苷为

抗病毒药,经查阅相关文献,抗病毒药一般无抑菌作用^[6-7]。方法适用性试验优先选择薄膜过滤法^[8-9]。选取验证方法有代表性的 7 家生产企业(直接接种法 1 家;不同取样量、不同冲洗液、不同冲洗量,薄膜过滤法 6 家),按照药典规定 6 株菌进行试验,选用不同冲洗量进行冲洗,以确定适宜的冲洗量。根据药品成分筛选试验方法,确定试验条件后再进行全面验证的思路^[10],以保证试验方法的有效性。

2.2.2 供试液制备 按照《中国药典》2015 年版四部无菌检查法的要求,接种每种培养基的检验数量为 20 支,每支接入每种培养基的最少量为 50 mg。按无菌操作法处理,每支用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲液 5 mL 溶解,备用。

2.2.3 冲洗量的确定 7 家企业生产规格 0.1 g 取规定量供试品,每膜接种量为 1 000 mg,按薄膜过滤法过滤,用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,每次 100 mL,冲洗量分别为每膜 100、200、300 mL,于最后一次冲洗液中加入小于 100 CFU 的试验菌,同时做阳性对照管。不同冲洗量试验结果见表 2。结果显示:生产企业 A 和生产企业 N 冲洗 100 mL 后,试验管金黄色葡萄球菌与阳性对照管比较,生长缓慢;7 家生产企业在冲洗 200、300 mL 后,金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌,生孢梭菌各试验管与阳性对照管比较 24 ~ 48 h 内均生长良好;冲洗 100、200、300 mL 后各试验管黑曲霉和白色念珠菌与阳性对照管比较 24 ~ 48 h 内均生长良好。确定方法适用性试验适宜冲洗量为每膜 200 mL。无菌检查选择金黄色葡萄球菌为阳性对照菌。

表 2 7 家生产企业不同冲洗量试验结果

菌种	企业 A(试验管)				企业 C(试验管)				企业 F(试验管)				企业 G(试验管)			
	冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
金黄色葡萄球菌	100	—	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+
大肠埃希菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+
生孢梭菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+
枯草芽孢杆菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+
白色念珠菌	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+
	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+
	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+
黑曲霉	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+
	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+
	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+

菌种	企业 I(试验管)				企业 L(试验管)				企业 N(试验管)				阳性对照管			
	冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d			冲洗量/mL	培养天数/d		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
金黄色葡萄球菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	—	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+
大肠埃希菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+
生孢梭菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	100	+	+	+	100	+	+	+	100	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	200	+	+	+	200	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	300	+	+	+	300	+	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+	—	+	+	+
	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+	—	+	+	+
	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+	—	+	+	+
黑曲霉	100	—	+	+	100	—	+	+	100	—	+	+	—	+	+	+
	200	—	+	+	200	—	+	+	200	—	+	+	—	+	+	+
	300	—	+	+	300	—	+	+	300	—	+	+	—	+	+	+

注：“+”表示浑浊，“—”表示澄清。

2.2.4 方法适用性试验 供试液制备同“2.2.2”项:(1)试验组:取制备好的供试液 20 支,用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液润洗滤膜,再将供试液导入集菌过滤器内,每膜接种量为 1 000 mg,按薄膜过滤法

过滤,每个滤筒用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,每次 100 mL,冲洗 2 次,于最后一次冲洗液中加入小于 100 CFU 的试验菌,每个滤筒灌注培养基 100 mL。置规定条件下培养(硫乙醇酸盐流体培养

基 33 ℃ ,胰酪大豆胨液体培养基 23 ℃),并逐日观察其结果;(2)阳性对照组:同试验组操作,不加供试液,加入同体积培养基,并接种等量试验菌;(3)阴性对照组:以等量稀释剂代替等量供试液,不接种试验菌,其他操作同试验组。14 家企业样品无菌检查方法适用性试验结果见表 3。结果显示:与阳性对照管比较,含金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各试验管,24 h 内生长良好;含白色念珠菌、黑曲霉各试验管与阳性对照管比较 24 ~48 h 内均生长良好,说明供试品的该检验量在该检验条件下其抑菌作用可以忽略不计,方法适用性试验通过。

2.2.5 结果判断 与阳性对照组比较,如含供试品各容器中的试验菌均生长良好,则说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用,照此检查方法和检查条件进行供试品的无菌检查。如含供试品的任一容器中的试验菌生长微弱、缓慢或不生长,则说明供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用,则需采取适宜的方法消除供试品的抑菌作

用,并重新进行方法适用性试验。
2.2.6 方法适用性结果 通过对 14 家企业,不同批次,相同规格 0.1 g 注射用单磷酸阿糖腺苷的方法适用性进行试验,每批样品 60 支,检验方法为薄膜过滤法,接种量为每膜 1 000 mg,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,每次 100 mL,共冲洗 2 次,以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌,进行无菌检查。

3 样品无菌检查

取供试品 60 支,每支用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 5 mL 溶解,采用薄膜过滤法,于集菌仪上通过 DGB330 集菌培养器,接种量为每膜 1 000 mg,以 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液为冲洗液,冲洗量为每膜 200 mL,在两管泵入各 100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基,其中一管接种小于 100 CFU 的金黄色葡萄球菌为阳性对照;另一管泵入 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基。另取 DGB220 集菌培养器,取上述冲洗液同法操作,不接种供试品,分别泵入硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基各 100 mL,作为阴性对照,置规定温度培养 14 d,逐日观察记录。

表 3 14 家样品无菌方法适用性试验结果

菌种	培养 时间	试验组														阳性 对照	阴性 对照
		企业 A	企业 B	企业 C	企业 D	企业 E	企业 F	企业 G	企业 H	企业 I	企业 J	企业 K	企业 L	企业 M	企业 N	对照	对照
金黄色葡萄球菌	1 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
大肠埃希菌	1 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
生孢梭菌	1 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
枯草芽孢杆菌	1 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
白色念珠菌	1 d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
黑曲霉	1 d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注:“+”表示浑浊;“-”表示澄清。

国家监督抽检样品,注射用单磷酸阿糖腺苷 14 家企业共计 111 批次(规格 0.1 g)进行无菌检查,结果供试品管和阴性对照管培养 14 d 后均澄清,阳性对照管金黄色葡萄球菌 24 h 内生长良好,无菌检查结果均符合规定。

4 讨论

建立无菌检查法,可用直接接种法或薄膜过滤法,只要供试品性状允许,应采取薄膜过滤法^[11]。收集到验证资料,同品种、同规格,因各企业试验水平不同,不同的企业其验证资料的无菌检查法不一样,1 家企业采用直接接种法,13 家企业采用薄膜过滤法(14 家企业均采用金黄色葡萄球菌为阳性对照菌),但在检验数量、冲洗液种类及冲洗量方面,各企业的方法验证差别比较大。检验方法不统一,同品种同规格药品无菌检查用不同检验方法,影响到药品无菌检查的工作质量和评判标准。不同企业用不同检查方法,这给日常检验带来较大的麻烦,另外还有失公平公正之嫌。同品种同规格应该归纳出统一无菌检查方法,可以按从严方式来归纳^[12]。

由于方法不统一,不规范产生的误差,导致药品检验报告书权威性存在问题,所以确定科学合理检验方法至关重要^[13]。建立准确、可信、可行的方法适用性试验,为进一步规范无菌检查,提供科学依据。2015 年版《中国药典》编制大纲也突出强调,要加强药品无菌与微生物限度检查方法的建立与验证方面的标准研究工作^[14]。同一品种的药物无菌检查法可简化、统一,形成标准操作规范,其它各类药品无菌检查,经长期的,大量的系统方法学研究也可逐步规范和统一,形成正式的药品标准^[15]。建立统一方法适用性试验,可避免生产企业重复多次的验证造成方法不统一和验证资料不规范等问题,同时节约了大量的人力和物力,便于企业参考和运用,实现了资源共享。

pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.1% 无菌蛋白胨水溶液、0.9% 无菌氯化钠溶液均可作为药品无菌检查时的稀释液和冲洗液,但作用机制不同。0.1% 无菌蛋白胨水溶液含有提供碳源、氮源等营养物质的蛋白胨有利于微生物的恢复生长;pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液除还有与 0.1% 无菌蛋白胨

水溶液含量相同的蛋白胨外,还含有磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、氯化钠等无机盐和矿物质元素,其稳定的 pH 环境与营养物质更有利于微生物的复苏;0.9% 无菌氯化钠溶液仅提供稳定的渗透压,避免细胞破裂^[16-17],所以选择 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液作为稀释液和冲洗液更有利于本品微生物的检出。

参考文献

- [1] 丁增林,陈东英.注射用单磷酸阿糖腺苷治疗小儿手足口病 50 例疗效观察[J].中国中西医结合儿科学,2013,5(2):143-144.
- [2] 王桂敏.单磷酸阿糖腺苷联合喜炎平注射液治疗小儿病毒性脑炎的临床疗效[J].世界临床医学,2016,10(6):162,164.
- [3] 许春霞.单磷酸阿糖腺苷联合热毒宁治疗小儿病毒性肺炎疗效观察[J].中国中西医结合儿科学,2016,8(4):454-456.
- [4] 王超.注射用单磷酸阿糖腺苷治疗呼吸道病毒感染患儿的临床疗效[J].中国药物经济学,2015(12):71-73.
- [5] 国家药典委员会.中国药典(四部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015;附录 136-140.
- [6] 缪红.利巴韦林注射液无菌检查方法的验证[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,32(16):2629-2630.
- [7] 陈新颜.阿昔洛韦缓释片微生物限度检查供试液制备及方法适用性验证[J].海峡药学,2014,26(12):15-16.
- [8] 李亚东.薄膜过滤法在药品检验中的应用[J].北方药学,2016,13(3):9.
- [9] 徐全华,单天炎,李忠辉,等.注射用丹参多酚酸盐无菌检查方法学验证[J].安徽医药,2014,18(2):250-254.
- [10] 胡昌勤.药品微生物控制现状与展望[J].中国药学杂志,2015,50(20):1747-1751.
- [11] 徐全华.论药品检验中薄膜过滤法的应用[J].中国药物经济学,2013(7):41-42.
- [12] 钟长鸣,陈希,吴燕红.微生物限度和无菌检查方法验证中存在的问题[J].中国药品标准,2011,12(1):12-13.
- [13] 罗书香.方法验证资料对药品无菌检查的影响[J].首都食品与医药,2015(16):95-97.
- [14] 国家药典委员会.关于《中国药典》2015 年版实施公告有关问题的解读[J].中国药品标准,2015,16(6):458.
- [15] 罗丹.注射用头孢噻肟钠无菌检查方法的适用性试验探讨[J].北方药学,2016,13(9):129-131.
- [16] 李颖,关国华.微生物生理学[M].北京:科学出版社,2013:61-62.
- [17] 陈丽萍,杨晓莉,李辉.伊曲康唑注射液无菌检查法的建立及方法优化研究[J].药物生物技术,2016,23(1):62-64.

(收稿日期:2017-04-05,修回日期:2017-04-18)