

红霉素眼膏无菌检查方法的适用性试验

王燕敏

国药集团容生制药有限公司 河南 武陟 454900

摘要：目的：通过对红霉素眼膏以2020年版《中华人民共和国药典》四部通则中1101进行无菌检查法的适用性试验，建立科学的、优化的、操作性较强的红霉素眼膏无菌检查方法。**方法：**试验采用薄膜过滤法，对红霉素眼膏进行无菌检查方法研究。**结果：**方法适用性试验结果表明，该方法可用于红霉素眼膏的无菌检测，能够保证结果准确可靠。

关键词：红霉素眼膏；无菌检查；薄膜过滤法；适用性试验

红霉素眼膏是眼部抗菌药物，主要可用于外眼感染性疾病，红霉素眼膏的主要有效成分红霉素。红霉素属于大环内酯类抗生素，主要是经妨碍病原菌合成相应蛋白质这一途径来实现其抗菌效果。红霉素抗菌谱主要针对革兰氏阳性菌以及非典型病原菌，具有较好的抗菌作用。红霉素对葡萄球菌、链球菌以及沙眼衣原体，都具有较好抗菌作用^[1]。由于眼部容易被上述病原菌感染，导致眼部感染，因此红霉素眼膏可以有效治疗眼部感染。红霉素眼膏在临床上主要用于沙眼、眼睑炎、结膜炎等相关眼部感染，可以将其涂于眼部，一般睡前使用会有较好治疗效果^[2-4]。

据现行2020年版《中华人民共和国药典》要求，为了确保药物三性之一的安全性满足临床需要，需要对药物的无菌指标进行检查，同时无菌检查方法在使用前要确保其适用性，以确认该药物适用于该无菌检查方法^[5]。本文采用薄膜过滤法，通过对3个批次产品进行方法适用性试验，为红霉素眼膏建立了一种准确、高效的无菌检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

上海博讯实业有限公司所产的YXQ-LS-50S II型蒸汽灭菌器以及SPX-250B-Z生化培养箱、浙江泰林生物技术股份有限公司生产的EVS330集菌培养器、苏州净化设备有限公司所产的BHC-1300 II A/B2生物洁净安全柜。

1.2 方法适用性试验用菌株

金黄色葡萄球菌（批号：210809-3（4））、大肠埃希菌（批号：210810-3（4））、枯草芽孢杆菌（批号：210823-2（4））、生孢梭菌（批号：210719-3（2））、白色念珠菌（批号：210824-2（4））、黑曲霉（批号：210621-2（3）），试验所用菌株来源：NIFDC，菌种使用前均经过鉴定，确认合格。

1.3 培养基及试液

培养基及试液来源于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司的20210628批沙氏葡萄糖琼脂（SDA）、20191207批胰酪大豆胨琼脂（TSA）、2021022批流体硫乙醇酸盐（FTM）、20210116批液体胰酪大豆胨（TSB）、20201029批pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液、北京奥博星生物技术有限责任公司的20200518批琼脂以及上海展云化工有限公司的190301批十四烷酸异丙酯（肉豆蔻酸异丙酯）。

红霉素眼膏（3批：210801、211001、211002）

2 方法与结果

在B+A洁净区域（B级背景下的A级单向流）下开展试验。依据《中华人民共和国药典》2020年版四部无菌检查法的相关内容，试验环境中的各项指标均需达到无菌检查要求，同时在检验中所有操作要严格按照法规要求，不得造成避免微生物污染^[5]。

2.1 细菌液的制备及菌落的计数

按照现行《中华人民共和国药典》2020年版的第四部中的第1101中有关于无菌检查法培养基的适用性检查方法规定，在液体胰酪大豆胨的培养基（TSB）中分别接种四种新鲜的菌种培养物，如金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌；在流体硫乙醇酸盐的培养基（FTM）中接种相应的新鲜菌种的培养物（生孢梭菌），在适宜温度（30℃~35℃），一定时间（18h~24h）下进行培养；在液体沙氏葡萄糖培养基（SDB）中接种相应的新鲜菌种的培养物（白色念珠菌），在适宜温度（20℃~25℃）下，培养一定时间（2~3天），均采用合适缓冲液（pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液）作为稀释剂，以10倍梯度逐步制备上述各菌种的培养物至适宜浓度（不大于100cfu/ml），作为备用菌悬液；利用沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基（SDA）接

种相应的新鲜菌种的培养物（黑曲霉菌），在适宜温度（20℃~25℃），一定时间（5~7天或者时间持续到产生大量的孢子）下进行培养，将pH7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液以及聚山梨酯80以一定体积比进行混合，组成适量缓冲液对相应菌种孢子开展洗脱操作，然后将其洗脱悬液转移到已灭菌并带橡胶塞的试管中，用此缓冲液以10倍梯度逐步稀释至适宜浓度（含菌落数目 ≤ 100cfu/ml），以制备相应的备用菌悬液，同时分别在适宜培养基中接种1 ml菌悬液进行计数。在胰酪大豆胨琼脂平板培养基

（TSA）上分别接种相应的多种新鲜菌种的培养物（金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌），在硫乙醇酸盐流体平板培养基（含1.5%琼脂）中接种生孢梭菌的菌液，分别在适宜温度（30℃~35℃）下，进行培养一定时间（3天），在沙氏葡萄糖琼脂平板培养基中分别接种相应的多种新鲜菌种的培养物（黑曲霉菌液、白色念珠菌）中，于适宜温度（20℃~25℃）下，培养一定时间（5天）^[5]，观察计数结果见表1。

表1 试验菌菌落计数

菌种	培养基	培养温度	稀释级别	培养号	接种量	计数 (cfu)	平均数 (cfu/ml)	
金黄色葡萄球菌	胰酪大豆胨琼脂培养基	30~35℃	10-6	1	1ml	86	85	
			10-6	2	1ml	84		
大肠埃希菌	胰酪大豆胨琼脂培养基		10-6	1	1ml	83	81	
			10-6	2	1ml	79		
枯草芽孢杆菌	胰酪大豆胨琼脂培养基		10-6	1	1ml	76	79	
			10-6	2	1ml	82		
生孢梭菌	1.5%琼脂硫乙醇酸盐流体培养基		10-5	1	1ml	77	80	
			10-5	2	1ml	83		
白色念珠菌	沙氏葡萄糖琼脂培养基		20~25℃	10-6	1	1ml	76	74
				10-6	2	1ml	72	
	沙氏葡萄糖琼脂培养基	10-5		1	1ml	80	83	
		10-5		2	1ml	86		

2.2 方法适用性试验

取三批红霉素眼膏供试品，每个批次取60支，对每一试验菌逐一进行方法确定。

2.2.1 试验组

按照现行的《中华人民共和国药典》2020年版第四部通则项下薄膜过滤无菌检查法操作过滤^[5]，取每批眼膏30支（4.5g），加入到200ml湿热灭菌处理的十四烷酸异丙酯中，振荡溶解，再加入300ml经湿热灭菌处理的适宜溶液（pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液），振荡使其混匀，静置分层，将下清液过滤至EVS330集菌器中，过滤完毕，取pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液适量，进行振摇冲洗100ml/次/膜，冲洗10次/膜，在集菌的一次性培养器中滤过硫乙醇酸盐流体培养基（300ml），接着分别加入生孢梭菌菌液、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌（其中所含菌落数目均 ≤ 100cfu/ml）。

取眼膏30支（4.5g），200ml湿热灭菌处理的十四烷酸异丙酯作为溶剂，将眼膏加入其中进行振荡溶解，再加入适量缓冲液，振荡混匀，静置分层，将下清液过滤至EVS330集菌器中，过滤完毕，取缓冲液适量，进行振摇冲洗100ml/次/膜，冲洗10次/膜，将胰酪大豆胨液体培

养基（300ml）抽至集菌培养器内，接着分别加入白色念珠菌、枯草芽孢杆、黑曲霉菌菌液（含菌数均 ≤ 100cfu/ml）。

2.2.2 阳性对照组：

取EVS330集菌培养器，分别在集菌的一次性培养器中滤过硫乙醇酸盐流体培养基（300ml），接着各自注入大肠埃希菌、生孢梭菌、金黄色葡萄球菌菌液（含菌数均不大于100cfu/ml）；取EVS330集菌培养器，分别将300ml胰酪大豆胨液体培养基抽至集菌培养器内，接着各自加入白色念珠菌、黑曲霉菌、枯草芽孢杆菌液（含菌数均不大于100cfu/ml）。

2.2.3 阴性对照组

取两只集菌培养器，将缓冲液（300ml）以及湿热灭菌处理的十四烷酸异丙酯（200ml）进行振摇混匀，静置分层，利用薄膜过滤法对下清液进行过滤操作，将适量的胰酪大豆胨液体培养基和硫乙醇酸盐流体培养基滤过集菌培养器中，作为阴性对照组。

另两批次供试品按照上述试验步骤，同法操作。

将加入流体硫乙醇酸盐培养基的一次性集菌培养器于一定时间（5天）、适宜温度（30℃~35℃）下进行培

养；滤过液体胰酪大豆胨培养基的一次性集菌培养器于 日观察结果见下表2，观察培养现象如下图1~6。
一定时间（5天）、适宜温度（20°C~25°C）下培养，逐

表2 方法适用性试验结果

培养基名称	试验菌株	筒名(批号)	培 养 天 数				
			第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
硫乙醇酸盐流体培养基(100ml/筒 30~35°C)	金黄色葡萄球菌	210801	+	+	+	+	+
		阳性对照	+	+	+	+	+
	大肠埃希菌	210801	+	+	+	+	+
		阳性对照	+	+	+	+	+
	生孢梭菌	210801	+	+	+	+	+
		阳性对照	+	+	+	+	+
	阴性对照			—	—	—	—
胰酪大豆胨液体培养基(100ml/筒 20~25°C)	枯草芽孢杆菌	210801	—	—	+	+	+
		阳性对照	—	+	+	+	+
	白色念珠菌	210801	—	+	+	+	+
		阳性对照	—	+	+	+	+
	黑曲霉	210801	—	+	+	+	+
		阳性对照	—	+	+	+	+
	阴性对照			—	—	—	—

备注：“+”号表示有菌生长，“-”号表示无菌生长。



图1~3 第二天培养现象(从左至右依次为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌)



图4~6 第三天培养现象(从左至右依次为黑曲霉、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌)

3 讨论

与对照管结果比较，如试验菌(含供试品的任一容器内)出现生长缓慢或者不生长的现象，则说明在该确认方案设计的试验条件下的供试品具有抑菌作用，则需要消除供试品的抑菌作用，并重新进行无菌检查方法确认，如使用消除供试品抑菌作用的适宜试剂(如中和剂

/灭活剂)、改变冲洗液的量、更换滤膜供应商/和材质、改变培养基的使用量等方法；假如试验菌均出现生长良好的现象，则结果说明在该确认方案设计的试验条件下的供试品无抑菌作用或该供试品可以视同为没有抑菌作用，红霉素眼膏无菌检查方法可操作性强、具有科学可行性，能进行供试品的无菌检查。

按照2020年版《中华人民共和国药典》四部的要求，对红霉素眼膏无菌检查方法适用性试验进行确认。将红霉素眼膏经过预处理后按薄膜过滤法过滤，每筒培养基分别接种各试验菌不大于100cfu。结果各试验菌均生长良好。

无菌检查方法适用性试验结果表明，红霉素眼膏可按2020年版《中华人民共和国药典》四部规定的薄膜过滤法进行无菌检查，取红霉素眼膏30支（4.5g），加入到200ml经湿热灭菌处理的十四烷酸异丙酯中，振摇使其溶解，再加入300ml经湿热灭菌处理的缓冲液，振摇使其混匀，静置分层，取下清液过滤至EVS 330集菌培养器中，采用pH7.0缓冲液进行振摇冲洗操作，冲洗量为1000ml/膜，试验操作过程中的对照菌为金黄色葡萄球菌。采用该方法对红霉素眼膏进行无菌检查，观察无菌检查结果现象如图7。



图7 红霉素眼膏无菌检查14天现象图

参考文献

- [1]王典.红霉素眼膏的临床应用研究进展[J].中国合理用药探索,2019,16(08):172-175.
- [2]史杏丽,钱瑶.撤针围刺联合红霉素眼膏治疗早期外麦粒肿的临床观察[J].中国民间疗法,2020,28(17):35-36. DOI:10.19621/j.cnki.11-3555/r.2020.1717.
- [3]姬立英.红霉素眼膏对全麻手术患者双眼保护的应用[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(36):118.
- [4]张礼敏,陶莉,陈琪,孔令媛.红霉素眼膏致球结膜充血伴轻度水肿1例[J].实用医药杂志,2015,32(03):201. DOI:10.14172/j.cnki.issn1671-4008.2015.03.007.
- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典.2020年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:159.