

哌拉西林原料药新版药典微生物限度检查方法的验证

易巧, 涂明珠, 刘绪平* (江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

摘要 目的: 建立哌拉西林原料药微生物限度检查法并进行方法学验证。**方法:** 按《中国药典》2015 年版四部制剂通则 1105、1106、1107 项下要求进行试验。需氧菌总数检查、霉菌和酵母菌检查采用薄膜过滤法 (每筒冲洗量 500 mL, 150 万单位青霉素酶), 大肠埃希菌检查采用薄膜过滤法 (每筒冲洗量 500 mL, 150 万单位青霉素酶), 采用上述方法对哌拉西林原料药各试验菌进行回收试验测试及对控制菌检查方法进行验证。**结果:** 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数验证试验中各菌的回收比值均符合《中国药典》2015 年版规定, 控制菌检查方法可行。**结论:** 该方法适用于哌拉西林原料药的微生物限度检查。

关键词: 哌拉西林; 原料药; 微生物限度; 薄膜过滤法; 方法学验证

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)10-1165-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.10.012

Validation of Microbial Limit Test for Piperacillin Raw Material According to Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition

Yi Qiao, Tu Mingzhu, Liu Xuping* (Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

Abstract Objective: To establish and validate microbial limit test for piperacillin raw material. **Methods:** The test was carried out according to the requirements of provision 1105, 1106 and 1107 of rules of preparation in volume IV of *Chinese Pharmacopoeia* 2015 edition. The membrane filtration method was used to detect the total viable aerobic bacteria count, total combined yeasts and molds count (500 mL per membrane, 1.5×10^6 IU penicillinase). This method was also used to control *Escherichia coli* (500 mL per membrane, 1.5×10^6 IU penicillinase). The above-mentioned method was used to test the bacteria, fungi or yeasts in piperacillin raw material and was also validated. **Results:** The validation results showed that the recovery ratios of all the tested bacteria, fungi or yeasts were in accordance with the acceptance criteria of the *Chinese Pharmacopoeia* 2015 edition and the method for specified bacteria test was reliable. **Conclusion:** The method is suitable for the microbial limit test for piperacillin raw material.

Keywords: piperacillin; raw material; microbial limit; membrane filtration method; method validation

《中国药典》2015年版微生物检查法更加关注生产过程中的微生物控制。在药品生产、储藏和流通各个环节中,药品生产企业均应严格遵循GMP的指导原则。制剂、原料及辅料的微生物限度均应符合药典的规定。本文按照《中国药典》2015年版的操作要求及指导原则,对哌拉西林原料药微生物限度检查法进行研究及验证,以确定适宜、有效的检查方法。

哌拉西林又称为氧哌嗪青霉素,是第三代半合成青霉素,为广谱抗生素。对阴性杆菌,尤其对大肠杆菌、变形杆菌、克氏肺炎杆菌、绿脓杆菌、流感杆菌和沙雷氏杆菌等具有强大的抗菌作用。该药抗菌谱广、杀菌能力强,适用于敏感菌所致泌尿系统、呼吸道、胆道、腹腔、盆腔以及皮肤、软组织等感染,是临床上使用率较高的一类抗生素。目前临床上哌拉西林制剂有哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、哌拉西林/舒巴坦3种。为了有效地保证哌拉西林制剂的质量,本文针对哌拉西林制剂的原料,根据《中国药典》2015年版四部1105微生物计数法、1106控制菌检查法,建立微生物限度检查法。

《中国药典》2015年版四部1105微生物计数法中采用金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌3株细菌和白色念珠菌、黑曲霉2株真菌进行验证检查。在样品溶液中分别加入相应浓度的5株菌,制备回收试验用供试液。分别对所制备的回收供试液采用胰酪大豆胨琼脂培养基平板、沙氏葡萄糖琼脂培养基平板进行平板计数,与相同浓度5株菌的阳性对照平板计数相比,若回收比值在0.5~2,则方法可行。《中国药典》2015年版四部1107非无菌药品微生物限度标准中,“表3非无菌药用原料及辅料的微生物限度标准”对药用原料及辅料的控制菌未做统一标准。考虑哌拉西林原料为抗生素制剂,不含药材原粉或中药提取物,因此控制菌只检查大肠埃希菌。微生物限度检查可采用平皿法、薄膜过滤法或MPN法。由于哌拉西林抗菌作用强,抗菌谱广,如采用平皿法、MPN法,很难达到规定的回收比值。为了消除其抗菌活性,计划采用薄膜过滤法,对加入样品的薄膜进行冲洗,同时在样品中加入青霉素酶进行检查。青霉素酶能破坏 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环,使其

失去抗菌活性。控制菌大肠埃希菌的检查同样采用薄膜过滤法同时加入青霉素酶的方法进行前处理,以消除哌拉西林对大肠埃希菌的抗菌活性。实验结果均符合药典规定。

1 仪器与材料

1.1 仪器

YXQ-LS-50S II型高压蒸汽灭菌器(上海博讯实业医疗器械有限公司);格兰仕D8523CTL-2W微波炉(顺德格兰仕微波炉电器有限公司);Sartorius T601-L电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);SW-CJ-2D净化工作台(苏州净化有限公司);Heal Force-900C生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);PYX-DHS细菌培养箱(上海跃进医疗器械厂);MJ-160B霉菌培养箱(上海跃进医疗器械厂);HH.W21.600S电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);HTY-2000B集菌仪(浙江泰林生物技术股份有限公司);薄膜过滤器(浙江泰林生物技术股份有限公司)。

1.2 试药

哌拉西林原料药(批号:Z068-1601001、Z068-1601002、Z068-1601003,江西富祥药业股份有限公司)。

0.9%无菌氯化钠溶液(批号:C16100601,江西科伦药业有限公司),青霉素酶(批号:130441-201502,中国食品药品检定研究院)。

1.3 菌种

枯草芽孢杆菌[CMCC(B) 63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B) 10104]、大肠埃希菌[CMCC(B) 44102]、白色念珠菌[CMCC(F) 98001]、黑曲霉[CMCC(F) 98003],以上菌种均购自中国食品药品检定研究院。

1.4 培养基

胰酪大豆胨液体培养基(批号:160119)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:160128)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:160119)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号:151222)、麦康凯琼脂培养基(批号:151124)、麦康凯液体培养基(批号:151102)、pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:151208),以上培养基均来源于北京陆桥技术有限责任公司。

1.5 试剂试液

40%氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠40 g,加水

100 mL溶解, 即得。

无菌磷酸二氢钾缓冲液: 称取34 g磷酸二氢钾, 置于500 mL水中, 完全溶解后, 用40%氢氧化钠溶液调节pH至8.2, 置于高压蒸汽灭菌锅中灭菌后, 冷却至室温。

2 验证方法

2.1 试验菌株菌液制备

(1) 取35 ℃培养24 h的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌新鲜培养物1 mL, 用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-7}$, 做活菌计数备用。

(2) 取25 ℃培养24 h的白色念珠菌新鲜培养物1 mL, 用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-4}$, 做活菌计数备用。

(3) 取25 ℃培养7 d的黑曲霉新鲜培养物, 加5 mL 0.9%无菌氯化钠溶液洗下黑曲霉孢子, 吸取出孢子悬液1 mL, 用0.9%无菌氯化钠溶液适量稀释, 用标准比浊管比浊, 其浊度与标准比浊管相比后, 取1 mL稀释后的孢子悬液, 用0.9%无菌氯化钠溶液10倍稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-4}$, 做活菌计数备用。

2.2 供试液制备

取供试品10 g, 置于无菌锥形瓶中, 加无菌磷酸二氢钾缓冲液100 mL, 使供试品完全溶解。移取该溶液10 mL, 置于无菌锥形瓶中, 加入90 mL无菌0.9%氯化钠溶液, 加入150万单位青霉素酶, 混匀, 静置5 min, 即得1:100供试液, 备用。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌数计数验证试验

2.3.1 试验组

(1) 需氧菌计数: 取1:100供试液100 mL, 按照《中国药典》2015年版四部通则1105非无菌产品微生物限度检查项下的薄膜过滤法进行过滤, 每筒用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液500 mL冲洗, 在最后100 mL冲洗液中加入不大于100 cfu的相应试验菌, 冲洗后取出滤膜, 菌面朝上, 立即贴膜于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上, 置规定温度下培养24~72 h, 逐日观察结果。

(2) 霉菌和酵母菌计数: 取1:100供试液100 mL, 按照《中国药典》2015年版四部通则1105非无菌产品微生物限度检查项下的薄膜过滤法进行过滤, 每筒用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白

胨缓冲液500 mL冲洗, 在最后100 mL冲洗液中加入不大于100 cfu的相应试验菌, 冲洗后取出滤膜, 菌面朝上, 立即贴膜于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上, 置规定温度下培养24~120 h, 逐日观察结果。

2.3.2 供试品对照组

取1:100供试液100 mL, 以稀释液代替菌液, 同试验组操作, 测定供试品本底菌数。

2.3.3 菌液对照组

取稀释液代替供试液, 按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

2.3.4 回收比值的计算

$$\text{试验组的加菌回收比值} = \frac{\text{试验组的平均菌落数} - \text{供试品对照组的平均菌落数}}{\text{菌液对照组的平均菌落数}}$$

2.3.5 判断标准

试验组的加菌回收比值应在0.5~2。3次独立试验结果见表1。

2.4 控制菌检查方法的验证

2.4.1 试验组

取1:100的供试液100 mL, 按照《中国药典》2015年版四部通则1106进行试验, 采用薄膜过滤法, 每筒用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液500 mL冲洗, 在最后100 mL冲洗液中加入不大于100 cfu的大肠埃希菌1 mL, 冲洗后取出滤膜, 加至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中, 置35 ℃培养18~24 h, 取上述培养物1 mL接种至100 mL麦康凯液体培养基中, 42 ℃培养24~48 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂平板上, 35 ℃培养18~72 h。取麦康凯琼脂平板上菌落经纯化后的培养物, 接种至含5 mL MUG培养基的试管内, 培养, 于5 h、24 h在366 nm紫外线下观察, 同时用未接种的MUG培养基作本底对照。若管内培养物呈现荧光, 为MUG阳性; 反之, 则为MUG阴性。沿管壁加入数滴靛基质试液, 液面呈玫瑰红色, 为靛基质阳性; 呈试剂本色, 为靛基质阴性。本底对照应为MUG阴性和靛基质阴性。

2.4.2 阴性对照组

取稀释液1 mL, 照大肠埃希菌检查法操作。结果见表2。

表1 哌拉西林原料药微生物限度试验回收比值

方法	供试液浓度	试验次数	阳性菌	菌种代数	菌液组菌数/cfu	试验组菌数/cfu	供试品对照组菌数/cfu	试验组加菌回收比值
需氧菌总数：薄膜过滤法（500 mL/筒冲洗）	1 : 100	1	铜绿假单胞菌	2	77	65	0	0.8
			枯草芽孢杆菌	3	80	78	0	1.0
			金黄色葡萄球菌	2	80	83	0	1.0
			白色念珠菌	2	78	71	0	0.9
			黑曲霉	2	72	68	0	0.9
		2	铜绿假单胞菌	2	78	66	0	0.8
			枯草芽孢杆菌	3	88	85	0	1.0
			金黄色葡萄球菌	2	79	75	0	0.9
			白色念珠菌	2	72	65	0	0.9
			黑曲霉	2	85	77	0	0.9
		3	铜绿假单胞菌	2	84	81	0	1.0
			枯草芽孢杆菌	3	65	58	0	0.9
			金黄色葡萄球菌	2	72	60	0	0.8
			白色念珠菌	2	79	70	0	0.9
			黑曲霉	2	83	86	0	1.0
霉菌和酵母菌总数：薄膜过滤法（500 mL/筒冲洗）	1 : 100	1	白色念珠菌	2	78	72	0	0.9
			黑曲霉	2	85	77	0	0.9
		2	白色念珠菌	2	78	74	0	0.9
			黑曲霉	2	83	78	0	0.9
		3	白色念珠菌	2	91	76	0	0.8
			黑曲霉	2	85	79	0	0.9

表 2 控制菌检查方法学验证试验结果

培养基及试液	试验组 (供试液 + 大肠埃希菌)		阴性对照组 (供试液 + 稀释液)
胰酪大豆胨液体培养基	+		—
麦康凯液体培养基	+		—
麦康凯琼脂平板	典型菌落生长		无菌落生长
MUG 靛基质试验	+	+	/
加入菌数 / ($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)	72, 81		/

注: + 表示试验呈阳性; — 表示试验呈阴性; / 表示未进行试验。

3 结果判断

3.1 需氧菌、霉菌及酵母菌计数方法学验证结论

在3次独立的需氧菌计数方法平行试验中, 铜绿假单胞菌的回收比值分别为0.8、0.8、1.0, 枯草芽孢杆菌的回收比值分别为1.0、1.0、0.9, 金黄色葡萄球菌的回收比值分别为1.0、0.9、0.8, 白色念珠菌的回收比值分别为0.9、0.9、0.9, 黑曲霉的回收比值分别为0.9、0.9、1.0, 5株需氧菌的回收比值均符合药典规定, 因此, 可照此方法测定哌拉西林的需氧菌总数。

在3次独立的霉菌和酵母菌计数方法平行试验中, 白色念珠菌的回收比值分别为0.9、0.9、0.8, 黑曲霉的回收比值分别为0.9、0.9、0.9, 2株真菌的回收比值均符合药典规定, 因此, 可照此方法测定哌拉西林的霉菌和酵母菌总数。

3.2 控制菌检查方法学验证结论

在一次独立的试验中, 试验组检出阳性试验菌, 阴性对照组无菌生长。因此, 可照此方法进行哌拉西林的控制菌检查。

4 结论及讨论

4.1 结论

哌拉西林微生物限度的方法学: 取本品10 g, 照《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限度: 微生物计数法 (通则1105), 控制菌检查法 (通则1106), 置锥形瓶中, 加无菌磷酸二氢钾缓冲液100 mL, 使供试品完全溶解。移取该溶液10 mL, 置无菌锥形瓶中, 加入90 mL无菌0.9%氯化钠溶液, 加入150万单位青霉素酶, 混匀, 静置5 min, 即得1:100供试液。细菌、霉菌和酵母菌检查, 均取1:100供试液100 mL薄膜过滤, 每筒用

pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液500 mL冲洗, 将滤膜分别贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板、沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上。大肠埃希菌检查, 样品处理同上, 将滤膜置于100 mL胰酪大豆胨液体培养基, 依据控制菌检查法 (通则1106) 检查。

4.2 新旧药典微生物检验对比

在药品的微生物控制方面, 与2010年版《中国药典》相比, 2015年版药典做了一定幅度的改变。菌落计数与控制菌检查分别列为一个通则。菌落计数分为需氧菌计数、霉菌和酵母菌计数。需氧菌计数所使用的培养基为胰酪大豆胨琼脂培养基, 霉菌和酵母菌计数使用沙氏葡萄糖琼脂培养基。在需氧菌计数的验证方法中, 采用金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌这3株菌进行方法验证, 其中铜绿假单胞菌替换了2010年版《中国药典》中的大肠埃希菌。培养温度上也有变化, 需氧菌计数培养温度由35℃~37℃调整为30℃~35℃, 霉菌和酵母菌计数培养温度由25℃~28℃变为20℃~25℃。

4.3 新版药典对原辅料微生物控制的探讨

随着2015年版《中国药典》的实施, 对原料及辅料的微生物限度控制也越来越严格。《中国药典》2010年版附录XIJ 微生物限度检查法中对“原料及辅料”的微生物限度的描述为“参照相应制剂的微生物限度标准执行”。而《中国药典》2015年版四部1107非无菌药品微生物限度标准中, 第5点明确规定了“非无菌药用原料及辅料的微生物限度标准”。其中, 需氧菌总数限度为 $10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 或 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 霉菌和酵母菌总数限度为 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 或 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 控制菌未做统一规定, 需要根据原辅料

及其制剂的特性和用途、制剂的生产工艺等因素检查具有潜在危害的微生物。由于哌拉西林为抗生素原料药,是不含药材原粉及脏器提取物的口服给药制剂,结合《中国药典》2015年版四部1107表1“非无菌化学药品制剂、生物制品制剂、不含药材原粉的中药制剂的微生物限度标准”,试验设计控制菌只检查大肠埃希菌。

4.4 青霉素酶浓度的选择

哌拉西林为半合成青霉素类抗生素,为了消除其强抑菌性,保证微生物方法的可行性,在制备供试品溶液时,加入了青霉素酶,以催化水解青霉素 β -内酰胺环,抑制青霉素活性。在预试验中,分别配制了青霉素酶浓度分别为150、300、600、1500和3000万单位 $\cdot g^{-1}$ 的供试品溶液进行试验,结果表明当酶浓度为150万单位 $\cdot g^{-1}$ 时,7株菌的回收比值均能达到0.7以上,即能有效消除哌拉西林供试品溶液的抑菌性。

参考文献:

- [1] 郭玲,徐育仁,周素荷.氧哌嗪青霉素酶抗菌作用的研究[J].药理与临床,1981,6(6):34-38.
- [2] 程国印.哌拉西林与哌拉西林复方制剂不良反应的差异性分析[J].中国医院用药评价与分析,2011,11(2):174-176.
- [3] 中国药典:四部[S].2015:362-382.
- [4] 中国药典:二部[S].2010:附录107-115.
- [5] 刘晓霞,郭旭玲,刘希君.哌拉西林的应用研究及进展[J].齐鲁药事,2005,24(6):360-362.
- [6] 刘鹏,戴翠,马仕洪,等. β -内酰胺类抗生素口服制剂微生物限度检查方法的建立[J].药物分析杂志,2010,(4):673-676.
- [7] 冯震,范一灵,杨美成.《中华人民共和国药典》(2015年版)》(四部)中微生物检验相关通则的增、修订情况介绍[J].上海医药,2016,(7):11-15.
- [8] 杨晓莉,李辉,马英英.中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J].药物分析杂志,2016,36(6):1101-1107.
- [9] 杨晓莉,李辉,马英英.《中国药典》2015年版非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法解读与对策[J].中国药师,2016,19(4):748-752.
- [10] 李雪.药品在微生物限度检验中的误差影响因素[J].中国药物经济学,2016,(3):12-14.
- [11] 王伟萍,李海芳,朱毅忠,等.8种头孢类抗菌药物无菌检查的方法学验证研究[J].中国药房,2010,21(37):3532-3534.
- [12] 张晓明,杜海娟,何晓英,等.抗菌素粉针剂无菌检查的最佳冲洗量及冲洗方法的实验研究[J].中国药品标准,2004,5(1):56-59.
- [13] 朱文娟.大肠菌群检查与胆汁耐受阴性菌检查比较研究[J].中国医药指南,2012,10(34):109-111.
- [14] 郑小玲,杨丹燕,李钰,等.现代菌种鉴定技术在药品控制菌检查中的比较[J].中国卫生检验杂志,2015,25(5):658-660.
- [15] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规程2010年版[M].北京:中国医药科技出版社,2010:362-382.
- [16] 徐伟东,许华玉,范一灵,等.胰酪胨大豆培养基和改良马丁培养基的微生物促生长能力考查[J].中国药品标准,2013,14(4):271-271.
- [17] 刘洪祥,曹晓云.《美国药典》35版附录“非无菌产品微生物检查:控制菌检查法”中两个问题的探讨[J].天津药学,2013,25(5):9-12.

(收稿日期 2016年6月27日 编辑 王雅雯)