

青霉素V钾胶囊微生物限度检查法的方法学研究

龙慧^{1*}, 吴鑫^{2#}, 鄢雷娜², 陈希², 章瑛², 王庆全²(1. 南昌市疾病预防控制中心, 南昌 330038; 2. 江西省食品药品检验所, 南昌 330029)

中图分类号 R927.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1621-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.28

摘要 目的: 建立青霉素V钾胶囊的微生物限度检查方法。方法: 分别采用平皿法、培养基稀释法和薄膜过滤法(每膜100、300、500 ml+青霉素酶)对青霉素V钾胶囊进行微生物限度检查法的研究及控制菌的检查(每膜100、200 ml)。结果: 细菌检查采用薄膜过滤法(每膜500 ml、大于300万u青霉素酶), 霉菌和酵母菌采用平皿法, 控制菌采用薄膜过滤法(每膜200 ml)时, 细菌、霉菌和酵母菌回收率均大于70%。结论: 采用薄膜过滤法检查青霉素V钾胶囊中的细菌, 平皿法检查霉菌及酵母菌, 薄膜过滤法检查控制菌, 结果可靠。

关键词 青霉素V钾胶囊; 微生物限度检查; 方法学验证

Methodology Research of Microbial Limit Test for Penicillin V Potassium Capsules

LONG Hui¹, WU Xin², YAN Lei-na², CHEN Xi², ZHANG Ying², WANG Qing-quan²(1. Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, China; 2. Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a microbial limit test method for Penicillin V potassium capsules. METHODS: Microbial limit test for Penicillin V potassium capsules was researched by using plating method, culture medium diluted method and membrane-filter method (100, 300, 500 ml per membrane+penicillinase), and control bacteria was tested (100, 200 ml per membrane). RESULTS: Membrane-filter method was used for bacterial detection (500 ml per membrane, $>3 \times 10^6$ u penicillinase); plating method was for the detection of fungus and yeast fungus; membrane-filter method was used for control bacterial detection (200 ml per membrane). Recoveries of bacteria, fungus and yeast fungus were greater than 70%. CONCLUSIONS: It is reliable to adopt membrane-filter method to detect bacteria in Penicillin V potassium capsules, use plating method to detect fungus and yeast fungus and membrane-filter method to detect control bacteria.

KEYWORDS Penicillin V potassium capsules; Microbial limit test; Methodology validation

青霉素V钾属 β -内酰胺类抗生素^[1], 抗菌谱与青霉素相同, 其作用机制是抑制细菌细胞壁的合成, 使细菌迅速破裂溶解。根据2010年版《中国药典》(二部)微生物限度检查法有关规定^[2], 应建立青霉素V钾胶囊微生物限度检查法并对其进行验证。为此, 笔者建立了相关方法并进行了方法学验证, 以为

产品的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1384 BSC生物安全柜(美国热电赛默飞世尔科技公司); HTY-2000集菌仪(杭州市泰林医疗器械厂); T601-L电子天

ties-procedures[EB/OL]. (2013-02-01) [2014-02-16]. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/c233_final.pdf.

[5] U.S. Pharmacopeial Convention. *Postponed the official dates of <232> elemental impurities-limits and <233> elemental impurities-procedures*[EB/OL]. (2012-11-15) [2014-02-16]. <http://www.usp.org/usp-nf/official-text/revision-bulletins/elemental-impurities-limits-and-elemental-impurities-procedures>.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年

* 技师。研究方向: 微生物检验。电话: 0791-86363255。E-mail: wxooss@tom.com

通信作者: 主管技师, 硕士。研究方向: 微生物检验。电话: 0791-88158796。E-mail: jxyjwx@163.com

版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录67.

[7] 张弓, 黄剑林, 李海涛, 等. ICP-MS法测定青海地区常用40种藏药材中8种重金属[J]. 中成药, 2012, 12(34): 2391.

[8] 施晓光, 赵庄, 陆敏仪, 等. 微波消解ICP-MS法测定黄芪注射液中5种重金属元素含量[J]. 中国药师, 2013, 16(4): 494.

[9] 施丽飞, 薛大方, 徐恒, 等. ICP-MS测定三种抗肿瘤中成药中铅镉汞砷含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2007(5): 38.

[10] 国家对外贸易经济合作部. 药用植物及制剂进出口绿色行业标准[S]. 2007-01.

[11] 张俊清, 刘明生, 符乃光, 等. 中药材微量元素及其重金属研究的意义与方法[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(3): 48.

(收稿日期: 2014-02-19 修回日期: 2014-03-03)

平(北京 Sartorius 仪器系统有限公司);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)。

1.2 药品与试剂

药品均为2012年青霉素V钾口服制剂抽验药品青霉素V钾胶囊[目前国内共3个厂家生产,本次试验选取9批,分别为A厂20111201、20120305、20120402,B厂120202、111002、111001,C厂110706、110201、110508,规格:均为每支0.236g(40万u);pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司)。

1.3 培养基

胆盐乳糖培养基(批号:120508)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:130205)、营养琼脂培养基(批号:121223)、营养肉汤培养基(批号:121218)、改良马丁培养基(批号:121215)、改良马丁琼脂培养基(批号:130103)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(批号:120911)、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基(批号:120607)均来自北京三药科技开发公司。

1.4 验证菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003](中国医学菌种中心提供)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

参照2010年版《中国药典》附录^[9]方法,接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中33℃培养20h,接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中25℃培养24h,然后分别用0.9%无菌氯化钠溶液10倍递增稀释,制成50~100 CFU/ml的菌悬液;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基中培养6d,加入5ml含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液至无菌试管中,用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液10倍递增稀释,制成50~100 CFU/ml的孢子悬液,备用。

稀释剂为pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液。

2.2 供试液制备

取供试品(包括胶囊)10g,置于锥形瓶中,加稀释液至100ml,45℃水浴混匀,静置5min,取上清液作为1:10供试液。

2.3 细菌计数测定

分别采用平皿法、培养基稀释法和薄膜过滤法进行试验。

2.3.1 试验组处理。①(平皿法):取1:10供试液1ml,50~100 CFU/ml试验菌1ml同时加入平皿中,立即注入15~20ml营养琼脂培养基中,待凝固后,置于30~35℃培养24~72h,逐日观察结果,统计菌落数。②(培养基稀释法):分别取1:10供试液0.5、0.2、0.1ml与50~100 CFU/ml试验菌1ml同时加入平皿中,立即注入15~20ml营养琼脂培养基中,待凝固后,置于30~35℃培养24~72h,逐日观察结果,统计菌落数。③(薄膜过滤法):取1:10供试液1ml,注入薄膜过滤器中,分别用稀释剂100、300、500ml冲洗,在最后一次加100ml冲洗液前加入1ml青霉素酶(大于300万u/ml)、50~100 CFU/ml试验菌1ml同时加入(将试验菌加入最后一次冲洗液中),立即贴膜于倾注了营养琼脂培养基的平皿内,置于30~35℃培养箱

培养24~72h,逐日观察结果,统计菌落数。

2.3.2 菌液组处理。以1ml稀释剂替代供试液,照“2.3.1”项下③方法处理后,立即贴膜于倾注了营养琼脂培养基的平皿内,置于30~35℃培养箱培养24~72h,逐日观察结果,测定每一菌株所加的试验菌数。

2.3.3 供试品对照组处理。取1:10供试液1ml,照“2.3.1”项下③方法处理后(不加试验菌),立即贴膜于倾注了营养琼脂培养基的平皿内,置于30~35℃培养箱培养24~72h,逐日观察结果,计数。

2.4 霉菌及酵母菌计数测定

采用平皿法进行试验。

2.4.1 试验组处理。取1:10供试液1ml与50~100 CFU/ml试验菌1ml同时加入平皿中,立即注入15~20ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于30~35℃培养24~72h,逐日观察结果,计数。

2.4.2 菌液组处理。取稀释剂1ml与50~100 CFU/ml试验菌1ml同时加入平皿中,立即注入15~20ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于30~35℃培养24~72h逐日观察结果,测定每一菌株所加的试验菌数。

2.4.3 供试品对照组处理。取1:10供试液1ml,立即注入15~20ml玫瑰红钠琼脂培养基中,待凝固后,置于30~35℃培养24~27h逐日观察结果,测定供试品本底菌数。

2.5 回收率的计算

按如下公式计算试验组的回收率,各试验结果见表1。

试验组回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数)/菌液组的平均菌落数×100%。

表1 不同方法试验菌平均回收率结果(% , n=10)

Tab 1 Bacterial recoveries of different microbial limit test methods(% , n=10)

菌种	平皿法	培养基稀释法			薄膜过滤法		
		0.5 ml	0.2 ml	0.1 ml	100 ml	300 ml	500 ml
金黄色葡萄球菌	0	0	0	0	26	53	89
大肠埃希菌	-	-	-	-	-	-	91
枯草芽孢杆菌	-	-	-	-	-	-	93
白色念珠菌	82	-	-	-	-	-	-
黑曲霉	84	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示未试验

note:“-” means not tested

从表1结果可以看出,采用薄膜过滤法(每膜500ml)后,3种细菌菌株的回收率均大于70%;采用平皿法,白色念珠菌及黑曲霉的回收率均大于70%,平行3次试验结果均符合要求。因此,细菌检查可采用薄膜过滤法(每膜500ml)测定,酵母及霉菌检查可采用平皿法测定。

2.6 控制菌检查方法的验证

因样品为口服给药制剂,故应对大肠埃希菌进行控制菌验证试验^[2]。

2.6.1 供试液的制备。同“2.2”项下方法。

2.6.2 试验组处理。取供试液(批号:120202)10ml注入薄膜过滤器中,分别用稀释剂100、200ml冲洗,每次100ml,加入50~100 CFU大肠埃希菌试验菌(将试验菌加入最后一次冲洗液中),取膜加入100ml的胆盐乳糖增菌液中,置于35℃培养24h。取上述培养物0.2ml,接种至含5ml的MUG培养基的试管内,培养,分别于5、24h后在366nm波长紫外线下观察,

同时用未接种的MUG培养基作本底对照,平行2管。观察后,沿管壁加入数滴靛基质试液,再观察。同时取胆盐乳糖培养基的培养物划线接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基,培养18~24 h,平行2管,观察有无典型菌落生长。

2.6.3 阴性对照组处理。取稀释剂10 ml照“2.6.2”试验组方法处理(不加试验菌)。

2.6.4 验证试验结果。见表2。

表2 大肠埃希菌检查方法学验证试验结果

Tab 2 Methodology validation of *Escherichia coli*

大肠埃希菌检查	试验组		阴性对照组
	100 ml	200 ml	
胆盐乳糖增菌培养基	-	+	-
MUG 靛基质试验	--	++	--
曙红亚甲蓝琼脂平板	无菌落生长	典型菌落生长	无菌落生长
加入菌数(CFU)	66,60		

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性

note: “+” meas positive; “-” meas negative

从表2结果可以看出,青霉素V钾胶囊控制菌(大肠埃希菌)检查采用薄膜过滤法时,若用稀释液100 ml冲洗,试验组MUG未现荧光,MUG呈阴性反应,靛基质试液液面呈试剂本色,未检出所加入的大肠埃希菌,说明不能消除该药物的抑菌成分;而采用稀释剂200 ml冲洗,每次100 ml,试验组MUG呈现荧光,MUG呈阳性反应,靛基质试液液面呈玫瑰红色,结果检出大肠埃希菌,说明可以消除该药物的抑菌成分,可以用于控制菌的检查。

2.7 样品检查

本文首先对1家企业生产的青霉素V钾胶囊进行微生物方法学验证,方法建立后应用于其他厂家样品的微生物方法学验证,结果见表3。

表3 3个厂家9批次样品的微生物限度检查结果

Tab 3 Results of microbial limit test for 9 batches of Penicillin V potassium capsules from 3 manufacturers

厂家	剂型	批号	回收率,%					大肠埃希菌检查	
			金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉	试验组	阴性对照组
A	胶囊	20111201	91	91	85	87	84	+	-
	胶囊	20120305	89	91	91	92	88	+	-
	胶囊	20120402	86	85	82	81	93	+	-
B	胶囊	120202	81	81	88	90	88	+	-
	胶囊	111002	86	85	90	87	91	+	-
C	胶囊	111001	92	90	93	87	86	+	-
	胶囊	110706	90	89	89	88	88	+	-
	胶囊	110201	92	87	89	89	86	+	-
	胶囊	110508	85	86	93	92	91	+	-

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性

note: “+” meas positive; “-” meas negative

从表3可以看出,本文建立的青霉素V钾胶囊微生物检查方法即细菌检查可采用薄膜过滤法(每膜500 ml,加入1 ml青霉素酶),霉菌和酵母菌检查可采用平皿法,控制菌采用薄膜过滤法(每膜200 ml),可以满足国内厂家生产的青霉素V钾胶囊的微生物限度检查,具有普遍的适用性。

3 讨论

(1)周建等^[9]报道的供试液处理方法是采用萃取法以及离心沉淀法处理样品并对8种标准菌株进行回收率试验。笔者采用45℃水浴法也能成功将样品胶囊溶化,振荡混匀溶解样

品,静置5 min后,不溶于稀释剂的辅料沉于底部,取上清液进行试验。

(2)青霉素V钾属β-内酰胺类抗生素^[4],抗菌谱与青霉素相同,对多数革兰阳性菌、革兰阴性球菌、个别革兰阴性杆菌(如嗜血杆菌属)、螺旋体和放线菌均有抗菌活性。因此笔者首先选取金黄色葡萄球菌作为敏感菌株进行试验,当试验方法确定后再选取枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌进行验证。

(3)在对具有抗菌活性的药品进行微生物限度检查时,应首先消除其抗菌活性。王艳等^[9]采用平皿法考察了阿莫西林口服制剂微生物限度检查,彭洁等^[6]采用薄膜过滤法考察了3个品种β-内酰胺类抗生素药品的试验菌回收率。笔者为了有效去除青霉素V钾胶囊的抑菌成分,采用薄膜过滤法,考察了不同冲洗量对药物抑菌性的作用:用100、300 ml的稀释液每次100 ml进行冲洗,在最后一次加100 ml冲洗液前加入1 ml青霉素酶(大于300万 u/ml),均不能消除该药物对敏感菌株金黄色葡萄球菌的抗菌作用,回收率试验均低于70%;最后用稀释液500 ml分5次冲洗,在最后一次加100 ml冲洗液前加入1 ml青霉素酶(大于300万 u/ml),结果可消除该药物对3种试验菌的抗菌作用。

(4)β-内酰胺类抗生素具有较强的抗菌活性,单纯采用薄膜过滤法,不能去除β-内酰胺类抗生素的抗菌活性,β-内酰胺酶能与β-内酰胺类抗生素的羰基碳的酰胺键相互作用,使β-内酰胺类抗生素失活^[7-9]。如酶的加入量过小,不能完全消除药物的抗菌活性;而酶的加入量过大,会造成不必要的浪费,容易污染^[9]。因此,在最后一次加100 ml冲洗液前加入1 ml青霉素酶,可消除青霉素V钾胶囊的抑菌作用。

综上所述,本文采用薄膜过滤法检查青霉素V钾胶囊中的细菌,平皿法检查霉菌及酵母菌,薄膜过滤法检查控制菌,结果可靠。

参考文献

- [1] 李家泰,吕媛,王普玉,等.对10 374例青霉素V片剂安全性评价的多中心研究[J].中国新药与临床杂志,1999,18(3):142.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XIJ.
- [3] 周建,李霞.药品微生物限度检查法中几种样品前处理方法的可行性研究[J].中国药房,2012,33(23):3 136.
- [4] 李玉芹.浅谈目前无菌检查和微生物限度检查存在的问题[J].中国药事,2007,21(12):1 011.
- [5] 王艳,李晓平.阿莫西林口服制剂微生物限度检查方法学验证研究[J].中国药房,2011,29(22):2 758.
- [6] 彭洁,梁桂霞,林丽英,等.口服β-内酰胺类抗生素药品的微生物限度检查方法[J].中国医药工业杂志,2009,40(5):375.
- [7] 李霜,李咏梅.β-内酰胺酶及超广谱β-内酰胺酶的研究进展[J].吉林医药学院学报,2006,27(3):171.
- [8] 李金钟,刘力平.β-内酰胺酶与治疗抗生素选择[J].国际检验医学杂志,2007,28(6):566.
- [9] 钱文静,蔡美明.酶处理与薄膜过滤联合应用于β-内酰胺类抗生素的无菌检查[J].江苏药学与临床研究,2004,12(5):70.

(收稿日期:2013-08-02 修回日期:2013-10-16)