

唑来膦酸及其制剂的微生物学检查方法研究

李冬梅, 王钰宁, 刘永利, 冯丽(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立唑来膦酸的微生物限度检查方法以及唑来膦酸注射液的无菌检查方法。方法 按中国药典 2015 年版四部要求进行方法适用性试验。结果 唑来膦酸微生物限度检查法采用薄膜过滤法, 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验 5 种试验菌回收率比值均在 0.5~2 之间; 控制菌大肠埃希菌检查试验组可检出大肠埃希菌。唑来膦酸注射液无菌检查方法采用薄膜过滤法, 6 种试验菌均能检出。结论 唑来膦酸的微生物限度检查方法及唑来膦酸注射液的无菌检查方法均宜采用薄膜过滤法。

关键词: 唑来膦酸; 唑来膦酸注射液; 微生物限度检查法; 无菌检查法; 方法适用性试验; 薄膜过滤法

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-1021-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.020

引用本文: 李冬梅, 王钰宁, 刘永利, 等. 唑来膦酸及其制剂的微生物学检查方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 1021-1024.

Study on Microbiological Examination Methods of Zoledronic Acid and Zoledronic Acid Injection

LI Dongmei, WANG Yuning, LIU Yongli, FENG Li(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method of microbial limit test of zoledronic acid and the method of sterility test of zoledronic acid injection. **METHODS** The method validation was conducted by microbial limit test from appendixes in Chinese Pharmacopeia(Edition 2015). **RESULTS** Microbial limit test of zoledronic acid was using membrane filtration method, the recoveries of the total number of aerobic bacteria, molds and yeasts were between 0.5 and 2, *Escherichia coli* could be detected in the *Escherichia coli* test group. The sterility test of zoledronic acid injection was using membrane filtration, and the six test bacteria could be detected. **CONCLUSION** The microbiological examination methods of zoledronic acid and zoledronic acid injection is used membrane filtration method.

KEY WORDS: zoledronic acid; zoledronic acid injection; microbial limit test; sterility test; applicability of method; membrane filtration method

唑来膦酸是一种特异性的作用于骨的二磷酸化合物, 能抑制破骨活性增加导致的骨吸收^[1-2], 其制剂唑来膦酸注射液(规格为 100 mL : 5 mg)主要用于骨质疏松症、变形性骨炎等^[3]。中国药典 2005 年版开始引入微生物检查方法验证试验, 文献报道也较多^[4-7], 发展到中国药典 2015 年版微生物学检验在培养基体系、加菌方式、培养条件、检验方法等方面都有了重大变化^[8-9], 因此微生物学检查方法适用性试验日益受到重视, 提升到了一个新高度^[10]。

本研究以唑来膦酸原料药及其制剂为研究对象, 通过对微生物限度与无菌检查的方法适用性试验进行系统研究, 阐明中国药典 2015 年版微生物学检验方面的新变化。在研究初期发现唑来膦酸注射液(100 mL : 5 mg)抑菌性较小, 而唑来膦酸原料药有很强的抑菌性, 且 1 : 10 供试液呈过饱和状态, 因此不宜采用平皿法计数, 经试验认为

采用薄膜过滤法更适合。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

IPP 260 培养箱(德国 3M 公司); KB 240 培养箱(德国 BINDER 公司); 集菌仪(美国 Millipore 公司); 洁净工作台、BSC-1000 II A2 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); PL602-L 电子天平(瑞士 METTLER 公司); 一次性集菌器(浙江泰林生物技术有限公司); SX-700 高压蒸汽灭菌器(日本 TOMY 公司); 101-3AB 电热恒温干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 样品

唑来膦酸原料药(批号分别为 20140501, 20140502, 20140601)和唑来膦酸注射液(批号分别为 20140701, 20140702, 20140703, 规格为 100 mL : 5 mg)各 3 批均购自东仁堂药房。

作者简介: 李冬梅, 女, 副主任药师 Tel: (0311)89892091 E-mail: lidongmei_2016@126.com

1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(tryptose soya agar, TSA, 批号: 140424)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(sabourauds agar, SDA, 批号: 141030)、胰酪大豆胨液体培养基(批号: 140922)、麦康凯液体培养基(批号: 140219)均购自北京陆桥技术股份有限公司。沙氏葡萄糖液体培养基(北京三药科技开发公司, 批号: 140918); 麦康凯琼脂培养基[碧迪医疗器械(上海)有限公司, 批号: 3228219]; pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号: 140424)、硫乙醇酸盐流体培养基(北京陆桥技术股份有限公司, 批号: 140630)均在验证合格的灭菌程序下灭菌, 适用性试验均符合要求。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌 [*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, CMCC(B)63501]、大肠埃希菌 [*Escherichia coli*, CMCC(B)44102]、生孢梭菌 [*Clostridium sporogenes*, CMCC(B)64941]、白色念珠菌 [*Candida albicans*, CMCC(F)98001]、黑曲霉 [*Aspergillus niger*, CMCC(F)98003]均由中国食品药品检定研究院提供。

1.5 试验环境

符合中国药典 2015 年版的要求, 环境洁净度 B 级背景下的 A 级单向流空气区域内进行。无菌室、洁净工作台及生物安全柜洁净度经监测符合相关要求。每次试验洁净工作台沉降菌监测记录均符合规定。

2 方法

2.1 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至 10 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 33 °C 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, 24 °C 培养 48 h。上述培养物用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的菌悬液。

接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面上, 24 °C 培养 5 d, 加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯-80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 将孢子洗脱, 过滤菌丝吸出孢子悬液至无菌试管内, 用含 0.05% 聚山梨酯-80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的孢子悬液。接种生孢

梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中, 33 °C 培养 24 h。上述培养物用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成适宜浓度的菌悬液。

2.2 微生物限度检查用供试液的制备

取本品 10 g, 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 1 000 mL, 振摇使溶解, 制成 1:100 的供试液。3 批样品分别进行试验。

2.3 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

2.3.1 样品组 取 1:100 的供试液 10 mL, 滤过, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 滤过, 取下滤膜, 贴于已制备好的胰酪大豆胨琼脂培养基平板上, 33 °C 培养 5 d; 或贴于已制备好的沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上, 24 °C 培养 5 d。3 批样品分别进行试验。

2.3.2 试验组 取 1:100 的供试液 10 mL 3 份, 滤过, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 在最后一次冲洗液中分别加入 ≤ 100 cfu 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌, 滤过, 取下滤膜, 贴于已制备好的胰酪大豆胨琼脂培养基平板上, 33 °C 培养 3 d; 取 1:100 的供试液 10 mL 2 份, 滤过, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 在最后一次冲洗液中分别加入 ≤ 100 cfu 白色念珠菌、黑曲霉, 滤过, 取下滤膜, 贴于已制备好的胰酪大豆胨琼脂培养基平板上, 33 °C 培养 5 d; 取 1:100 的供试液 10 mL 2 份, 滤过, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 在最后一次冲洗液中分别加入 ≤ 100 cfu 白色念珠菌、黑曲霉, 滤过, 取下滤膜, 贴于已制备好的沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上, 24 °C 培养 5 d。3 批样品分别进行试验。

2.3.3 菌液组 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL 7 份, 滤过, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 在最后一次冲洗液中加入 ≤ 100 cfu 试验菌, 其他同“2.3.2”项下方法操作, 5 种试验菌逐一进行试验。

2.3.4 阴性组 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL 代替供试液, 其他同“2.3.1”项下方法操作。

2.3.5 计算 回收率比值分别按下列公式进行计算:

$$\text{回收率比值} = \frac{\text{试验组菌落数} - \text{样品组菌落数}}{\text{菌液组菌落数}}$$

2.4 控制菌大肠埃希菌检查方法适用性试验

2.4.1 样品组 取1:100供试液100 mL, 滤过, 用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗3次, 每次100 mL, 滤过, 取下滤膜, 加至胰酪大豆胨液体培养基100 mL中, 混匀, 置33 °C培养18 h。取上述培养物1 mL接种至100 mL麦康凯液体培养基中, 43 °C培养24 h, 取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上, 33 °C培养18 h, 观察是否有疑似菌落。3批样品分别进行试验。

2.4.2 试验组 取1:100供试液100 mL, 滤过, 用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗3次, 每次100 mL, 在最后一次冲洗液中加入 ≤ 100 cfu 大肠埃希菌, 其他同“2.4.1”项下方法操作。3批样品分别进行试验。

2.4.3 阴性组 以pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL代替供试液, 其他同“2.3.1”项下方法操作。

2.5 唑来膦酸注射液无菌检查方法适用性试验

2.5.1 试验组 取样品30袋, 每10袋分别平均过滤于2个滤筒, 共6个滤筒, 每膜用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL冲洗1次, 在冲洗液中分别加入 <100 cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉, 滤过, 加金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌的滤筒分别加入100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 置33 °C培养5 d, 每日观察, 记录结果, 加枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的滤筒分别加入100 mL 胰酪大豆胨液体培养基, 置24 °C培养5 d, 每日观察, 记录结果。3批样品分别进行试验。

2.5.2 样品组 取样品10袋, 平均过滤于2个滤筒, 每膜用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL冲洗1次, 过滤, 分别加入100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 置规定温度培养5 d, 每日观察, 记录结果。3批样品分别进行试验。

2.5.3 阴性组 取PY220集菌器一套, 每膜用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液100 mL冲洗1次, 滤过, 分别加入100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 置规定温度培养5 d, 每日观察, 记录结果。

2.5.4 阳性组 取装有同体积培养基的容器, 加入等量试验菌作为对照。6种试验菌分别进行试验, 置规定温度培养5 d, 每日观察, 记录结果。

3 结果

3.1 唑来膦酸需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数验证结果

根据中国药典2015年版四部规定: 若各试验菌回收率比值均在0.5~2, 可认为该供试液制备方法和计数方法可用于该样品的菌落计数; 若该比值 <0.5 , 可认为该供试液制备方法和计数方法不能用于该样品的菌落计数。计算试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值, 结果均在0.5~2之间, 认为该供试液制备方法和计数方法适用于该样品的微生物计数, 结果见表1。

表1 各验证菌的回收率比值

Tab. 1 Recovery of validation strains

批号	回收率比值				
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌 TSA/SDA	黑曲霉 TSA/SDA
20140501	0.9	0.9	0.9	0.9/0.9	0.9/0.8
20140502	0.9	0.9	0.9	0.9/0.8	0.8/0.9
20140601	0.8	1.0	0.9	0.9/0.9	0.8/1.0

3.2 唑来膦酸大肠埃希菌验证结果

样品组和阴性组均未检出大肠埃希菌, 试验组均检出大肠埃希菌, 可认为该供试液制备方法和检查方法适合于本品大肠埃希菌检查, 结果见表2。

表2 大肠埃希菌试验组验证结果

Tab. 2 Results of validation *Escherichia coli* in experimental group

批号	麦康凯液体培养基	麦康凯琼脂平板
20140501	+	+
20140502	+	+
20140601	+	+

3.3 唑来膦酸注射液无菌验证结果

样品组和阴性组均无菌生长, 与阳性组比较, 试验组各容器中试验菌均生长良好, 对6种试验菌的敏感程度无差异, 敏感菌可采用金黄色葡萄球菌, 供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计, 可照此检查方法进行本品的无菌检查, 结果见表3。

4 讨论

本研究表明, 制剂抑菌性不强, 不代表其原料的抑菌性不强, 可能会因为原料药限度检查所用供试液浓度大, 使得采用常规法检验会呈现出很强的抑菌性。另一方面, 原料药抑菌性不强, 也不代表其制剂的抑菌性不强, 可能会因为制剂

表 3 无菌验证结果

Tab. 3 Results of sterility test validation

培养	阳性对照菌	管别	验证结果					
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
硫乙醇酸盐流体培养基 33.0 ℃	金黄色葡萄球菌	试验组	20140501	+	+	+	+	+
			20140502	+	+	+	+	+
			20140601	+	+	+	+	+
			阳性组	+	+	+	+	+
	大肠埃希菌	试验组	20140501	+	+	+	+	+
			20140502	+	+	+	+	+
			20140601	+	+	+	+	+
			阳性组	+	+	+	+	+
	生孢梭菌	试验组	20140501	+	+	+	+	+
20140502			+	+	+	+	+	
20140601			+	+	+	+	+	
		阳性组	+	+	+	+	+	
胰酪大豆胨液体培养基 24.0 ℃	枯草芽孢杆菌	试验组	20140501	+	+	+	+	+
			20140502	+	+	+	+	+
			20140601	+	+	+	+	+
			阳性组	+	+	+	+	+
	白色念珠菌	试验组	20140501	-	+	+	+	+
			20140502	-	+	+	+	+
			20140601	-	+	+	+	+
			阳性组	-	+	+	+	+
	黑曲霉菌	试验组	20140501	-	+	+	+	+
20140502			-	+	+	+	+	
20140601			-	+	+	+	+	
		阳性组	-	+	+	+	+	

在工艺过程中添加辅料、渗透压调节剂、pH 值调节剂、增溶剂、助溶剂、抗氧剂、抑菌剂、乳化剂、助悬剂等改变其抑菌性，必须通过方法适用性试验研究来考察其抑菌性的大小，制定适合产品的微生物学检查方法。

由于唑来膦酸在 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨、水等稀释剂中溶解度较小，常规取样 10 g 的供试品，加 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨至 100 mL，远不能完全溶解，而 1 : 100 的供试液恰能完全溶解，从而使得薄膜过滤法成为可能，并能有效去除其抑菌性。故供试品的理化性质是制备供试液时要考虑的必要因素。

一般说来，平皿法计数操作简单，但是对于某些有抑菌性、溶解度较差、限度标准数值较低的样品，配制一个较低浓度的供试液，采用薄膜过滤法进行微生物计数，有着平皿法无可比拟的优越性。

REFERENCES

[1] GAO L, REN Y, GAO H Z. Effect of zoledronic acid on bone mass in osteoporotic patients [J]. Chin J Osteoporosis(中国骨质疏松杂志), 2015, 21(1): 72-74.
 [2] HOU S G, DU P, WANG S T. Effects of zoledronic acid on

bone mineral density and indexes of bone metabolism in elderly male patients with osteoporosis [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2015, 34(7): 537-540.
 [3] REN X L, ZHAN Y Q, LIU Y, et al. Safety of zoledronic acid injection in the treatment of osteoporosis [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(14): 1673-1676.
 [4] LIU G Z, HU W H, XU X J, et al. Establishment of microbial limit test for Fufang Huangliansu tablets and the analysis of the test results [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(1): 64-70.
 [5] LIU P, ZHAN H L, YAN Q Q, et al. Analysis of the correlation of microbial contamination of oral preparations of Chinese patent medicine and crude drugs [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(6): 1068-1072.
 [6] HUANG J X, XIE C J, WANG L, et al. Methodology validation for microbial limit test of liquid preparation of pantoprazole sodium for injection before filtration sterilization [J]. Chin Pharm(中国药房), 2013, 24(45): 4307-4309.
 [7] HONG L, LU Q H. Establishment and validation of methodology for microbial limit test of cefprozil APIs [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1119-1122.
 [8] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 1105-1107.
 [9] HONG X X, XU H Y, SHANG Y, et al. Brief introduction of Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition Volume IV [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2015, 50(20): 1782-1786.
 [10] CHEN Z Y, XIA J, XI S D. Result analysis and evaluation of microbiological examination of Bazhen pills by ChP 2015 method [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(3): 418-425.

收稿日期: 2016-12-05
 (本文责编: 蔡珊珊)