

头孢呋辛酯胶囊微生物限度检查方法的验证实验研究

汤杨 (贵州省药品检验所, 贵阳 550004)

摘要:目的 建立头孢呋辛酯胶囊微生物限度检查方法。方法 通过对试验菌活菌数回收测定进行方法选择、确定敏感菌株,采用低速离心沉淀处理供试液与薄膜过滤方法去除头孢呋辛酯的抗菌活性,经验证试验来确认其抑菌活性是否去除。结果 枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌为敏感菌;经验证本方法达到中国药典 2005 年版验证试验的要求。结论 本方法可有效的控制头孢呋辛酯胶囊质量,可作为头孢呋辛酯胶囊的微生物限度检查方法。

关键词:头孢呋辛酯;验证实验;薄膜过滤法;敏感菌株

中图分类号:R927.33 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2009)04-0328-04

Study on Microbial Limit Test of Cefuroxime Axetil Capsule

TANG Yang(*Guizhou Provincial Institute for Drug Control, Guiyang 550004, China*)

ABSTRACT:**OBJECTIVE** To establish a method for microbial limit test of cefuroxime axetil capsule. **METHODS** Based on the viable count of test bacteria to choice method and identify the most sensitive strains, by using low-speed centrifugal precipitation test solution and membrane filtration to remove the antibacterial activity of cefuroxime axetil. It was confirmed whether its antibacterial activity had been removed thoroughly. **RESULTS** The method passed the validation test of Ch. P(2005). The *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were the most sensitive strain. **CONCLUSION** This method can be an effective method for the quality control of

作者简介:汤杨,女,副主任药师 Tel: (0851)6808181 E-mail: ty1954@sina.com

the medicines, and can be used in microbial limit test for cefuroxime axetil capsule.

KEY WORDS: cefuroxime axetil; verification test; membrane filtration method; sensitive strains

头孢呋辛酯为半合成第二代头孢菌素类药物, 广谱抗菌杀菌力强。其作用机制是抑制细菌细胞壁合成使其不能生长繁殖, 对 β -内酰胺酶有内在稳定性。临床主用于急性咽炎、扁桃体炎、急性中耳炎、上颌窦炎、慢支、急支、尿路感染、宫颈炎等; 中国药典 2005 年版二部收载。头孢呋辛酯胶囊为口服制剂, 中国药典 2005 年版二部对受微生物污染的微生物限度标准有明确要求。对具有抗菌活性的药品进行微生物限度检查, 首先应排除抗菌活性, 经验证试验来确认其抑菌活性是否去除而不影响检验结果, 以保证检验结果的准确性。查文献资料目前尚未见有关头孢呋辛酯胶囊微生物限度检查方法完整的研究的报道, 为建立头孢呋辛酯胶囊微生物限度检查方法, 参考了中国药典等^[1-2] 文献, 以试验菌的回收测定为主要方法, 测定头孢呋辛酯胶囊在微生物限度检查条件下对细菌、霉菌、酵母菌的代表菌的抑菌活性, 并进行方法选择试验, 对筛选出的敏感菌选择用离心沉淀与薄膜过滤法联用可消除其抑菌活性, 经选择试验确定供试液浓度及冲洗条件, 并进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的有效性验证, 对方法进行评价。对控制菌检查方法进行了验证试验研究, 根据验证研究结果, 建立头孢呋辛酯胶囊的微生物限度检查方法, 并对方法进行了总结。现报道如下:

1 实验材料及仪器

1.1 仪器

HTY-2000 型智能集菌仪、多次使用集菌器、一次性薄膜过滤器(杭州泰林生物技术设备有限公司); 离心机(800 型沉淀离心机 上海手术器械十厂)。

1.2 样品

头孢呋辛酯胶囊(贵州同济堂制药股份有限公司, 批号: 20060601、20060602、20060603)。

1.3 试验用菌种

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003], 均来源于中国医学细菌保存中心。

1.4 培养基及冲洗液

营养琼脂、营养肉汤、玫瑰红钠琼脂、胆盐乳糖增菌培养基、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基; pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、0.9% 氯化钠溶液, 中国北京三科科技开发公司生产。

2 方法与结果

方法参照中国药典 2005 年版二部附录微生物限度检查法计数方法的验证、控制菌检查方法的验证。

2.1 菌液制备

取经 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 16 ~ 18 h 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌肉汤培养物, 用营养肉汤稀释为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取经 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 培养 24 ~ 28 h 的白色念珠菌的改良马丁液体培养物, 用 0.9% 氯化钠溶液稀释为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取经 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 培养 5 ~ 7 d 的黑曲霉改良马丁斜面培养物, 加适量 0.9% 氯化钠溶液洗下孢子, 取孢子悬液用 0.9% 氯化钠溶液稀释为 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子悬液。

2.2 供试液制备

由于按常规方法制备 1:10 供试液粘性大、沉淀多, 故采用 1:20 供试液。取样品 10 g, 分离囊壳与内容物, 分别加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL 振摇, 两液混合, 即为 1:20 供试液①; 取 10 mL 1:20 供试液①经 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 ~ 5 min(低速离心), 取全部上层液混匀, 为 1:20 供试液②。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌计数方法选择试验及结果

为选择能有效去除头孢呋辛酯抑菌活性的方法, 采用了平皿稀释法、低速离心沉淀处理供试液与平皿稀释法联用^[2] 及与薄膜过滤法联用^[3], 用金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌为细菌代表菌, 白色念珠菌、黑曲霉为真菌代表菌^[1] 进行活菌计数回收试验, 比较几种方法对各菌的回收结果, 确定敏感菌^[4], 并选择出回收率在 70% 以上的方法作为可去除抑菌活性的有效方法。

2.3.1 方法与结果

2.3.1.1 平皿稀释法 平皿中加入 1:20 供试液① 2 mL, 分别各加入试验菌 $50 \sim 100 \text{ cfu}$, 立即倾注琼脂培养基, 每种试验菌平行制备 2 个皿, 作为试验组。不加入供试液, 同时测定相应加入的试验菌数,

为菌液组;不加入试验菌,同法测定供试液 2 mL 中的本底菌数作为空白组;计算回收率:回收率(%)=[(样品组平均菌落数-空白组平均菌落数)÷菌液组平均菌落数]×100%。

2.3.1.2 低速离心沉淀^[2]与平皿稀释方法 取 1:20 供试液① 1 mL、0.2 mL 注皿,以下操作按平皿稀释法。

2.3.1.3 低速离心沉淀与薄膜过滤法 取 1:20 供试液② 10,1,2 mL 分别加入装有约 90 mL 冲洗液的滤器中,过滤,用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 300 mL,在最后一次冲洗液中加入 50~100 cfu 试验菌,过滤,取膜贴于营养琼脂平板,平行制备 2 个膜;同时测定相应加入的试验菌数,作为菌液组及空白组;计算回收率。由于上法枯草芽孢杆菌回收达不到要求,同上法将 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液温度提高至 40~45℃进行冲洗,并增加冲洗次数,作试验比较。

2.3.1.4 结果 平皿稀释法白色念珠菌、黑曲霉回收率为 86%、82%;金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率均为 0;大肠埃希菌采用低速离心沉淀与平皿稀释方法供试液加入 2 mL、0.2 mL 的回收率为 17%、92%。金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌采用低速离心沉淀与薄膜过滤法,结果见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌计数方法选择试验回收率/%

Tab 1 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* selective counting methods of tese recovery/%

供试液/mL	枯草芽孢杆菌			金黄色葡萄球菌	
	冲洗量/mL			冲洗量/mL	
	300	500	300 ¹⁾	300	300 ¹⁾
10	37			10	
1	63	66	102	100	
2			79		88

注:1) 冲洗液温度为 40~45℃,冲洗 300 mL,每次 60 mL
Note:1) Washing temperature of flush fluid was set at 40-45℃,60 mL a time with the total volume of 300 mL

2.4 验证试验方法及结果

根据方法选择试验结果确定各试验菌验证方法。采用可去除抑菌活性的方法对上述各试验菌作 3 个批号样品的验证试验,以确定方法的有效性。

2.4.1 大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉计数回收试验方法及结果 取 1:20 供试液①2 mL 按平皿稀释法作白色念珠菌、黑曲霉回收试验;取 1:20 供试液②0.2 mL 按低速离心沉淀与平皿稀释方法作大肠埃希菌回收试验,结果见表 2。

表 2 白色念珠菌、黑曲霉、大肠埃希菌回收试验结果
Tab 2 Reavery test results of *Candida albicans*, *Aspergillus niger*,*E. coli*

试验	批号	cfu						回收率
		菌液组		空白组		试验组		/%
大肠埃希菌	20060601			0	4	39	31	91
	20060602	40	37	0	0	32	29	79
	20060603			0	0	31	39	91
白色念珠菌	20060601			0	0	66	53	86
	20060602	65	73	0	0	75	70	105
	20060603			0	0	67	65	96
黑曲霉	20060601			0	0	82	71	84
	20060602	101	82	0	0	61	75	74
	20060603			0	0	68	84	83

2.4.2 枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌回收试验方法及结果 试验组取 1:20 供试液② 2 mL 加入 90 mL 40~45℃冲洗液中,过滤,40~45℃冲洗液冲洗 300 mL,60 mL·次⁻¹,最后一次冲洗液中加入 50~100 cfu 试验菌,过滤,取膜贴于营养琼脂平板,平行制备 2 个膜,同时作菌液组,空白组。结果见表 3。

表 3 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌验证回收试验结果
Tab 3 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* recovery test results

试验菌	批号	cfu				试验组
		加菌数		试验组		回收率/%
金黄色葡萄球菌	20060601			40	48	85
	20060602	50	54	38	54	88
	20060603			45	49	90
枯草芽孢杆菌	20060601			71	72	98
	20060602	60	86	73	71	99
	20060603			67	60	87

2.4.3 稀释剂对照组 由于枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌计数方法供试液需经低速离心沉淀处理及采用膜法,为考察供试液在低速离心沉淀处理、过滤中微生物受影响的程度,作稀释剂对照组回收试验。取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别加入试验菌,浓度为 50~100 cfu·mL⁻¹;500 r·min⁻¹离心 4 min,与样品试验组相同量取出上层液混匀,按试验组方法过滤冲洗测定菌数作为试验组;各试验菌同时作菌液组,计算回收率:稀释剂对照组回收率%=试验组平均菌落数÷菌液组平均菌落数×100%。结果金黄色葡萄球菌回收率为 77%,枯草芽孢杆菌回收率为 75%,均能达到 70% 以上。

2.5 控制菌检查验证试验方法及结果:

2.5.1 大肠埃希菌检查方法选择 取 1:20 供试液 20 mL 共 5 份,分别加入 BL 增菌培养基 100 mL(常规法)、200、300 mL(稀释法)中、1 份用 500

$r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取出全部上清液加入 BL 增菌培养基 200 mL(离心法);另 2 份分别用 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取出全部上清液膜法冲洗 300 mL(离心与膜法),取膜加入 BL 增菌培养基 100、200 mL,均加入大肠埃希菌 10~100 cfu,以下按中国药典 2005 年版微生物限度检查法中大肠埃希菌方法验证,进行比较。结果常规法、稀释法、离心法均未检出大肠埃希菌,采用离心与膜法,100、200 mL 均检出大肠埃希菌。

2.5.2 大肠埃希菌检查方法验证试验方法及结果

据方法选择试验结果,取 1:20 供试液 20 mL,用 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取出全部上清液,过滤冲洗 300 mL,100 mL $\cdot$ 次 $^{-1}$,取膜加入 BL 增菌培养基 100 mL,加入大肠埃希菌 10~100 cfu 为试验组,同时作阴性菌对照组加入金黄色葡萄球菌;作 3 个批号的验证试验,结果 3 个批号的试验组均检出大肠埃希菌,阴性菌对照组均未检出金黄色葡萄球菌。

3 讨论

3.1 头孢呋辛酯为广谱抗菌药,该试验研究以中国药典规定的验证用试验菌分别进行活菌数回收,从方法选择试验结果看,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌平皿稀释法、离心沉淀+平皿稀释法均无回收、离心沉淀+薄膜过滤法 1:20 供试液 10 mL 回收率为 37%、10%,可见药物对两种细菌有强抗菌活性;对革兰阴性大肠埃希菌用离心沉淀+平皿稀释法回收才能达到 70%以上,显示有抑菌作用;结果对真菌未显示抑菌活性;因此筛选出枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌为敏感菌进行试验方法、条件的筛选^[4];采用了离心沉淀+薄膜过滤法进行细菌计数、控制菌检查方法验证。

3.2 敏感菌采用离心沉淀与薄膜过滤法,对供试液的量、冲洗量、冲洗温度及冲洗次数对验证试验的影响进行了试验:从表 1 结果中,两株敏感菌取 10 mL 供试液冲洗 300 mL,回收率均小于 70%;取 1 mL 供试液,枯草芽孢杆菌冲洗 300、500 mL 回收率为 63%、66%较前法提高,但仍小于 70%;也说明冲洗量对回收率影响不大;当增加冲洗液温度至 40~45℃、增加冲洗次数至 5 次,每次 60 mL,回收率为 102%,同法金黄色葡萄球菌回收率大于 70%。取 2 mL 供试液,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌按上法冲洗回收率均大于 70%;增加冲洗液温度至 40~45℃及冲洗次数对冲洗效果、排除抑菌活性影响较大,分析是由于头孢呋辛酯难溶于水,膜法过滤冲洗液温度较低时,药物及辅料溶解不充分,造成药物堵塞

滤膜不能冲洗干净。表 3 验证试验结果证实筛选出的方法 3 个批号样品敏感菌回收均在 70%以上,验证了该法排除抑菌活性的有效性。

3.3 控制菌大肠埃希菌检查方法:在计数方法选择试验中已反应出本品对大肠埃希菌的抑菌作用,据方法选择及验证试验结果,采用离心沉淀与薄膜过滤法可有效消除抑菌作用,重复性好。

3.4 该试验研究样品取自同一生产企业产品,供试液制备方法要求囊壳与内容物分离,存在一定局限性,有待于对不同来源的样品进行考察,但该样品 1:10 供试液沉淀较多,不适宜低速离心操作,因此必须采用 1:20 供试液。

4 结论

根据以上验证试验研究的结果,建立头孢呋辛酯胶囊微生物限度检查方法:细菌计数 取样品 10 g,在无菌条件下使囊壳与内容药物分离,囊壳与内容药物分别加入 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,振摇数分钟,两液混合即为 1:20 供试液①。取 1:20 的供试液 10 mL 于 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 4 min,取全部上清液混匀为供试液②,取 2 mL 至 40~45℃pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中混匀过滤,冲洗 300 mL,60 mL $\cdot$ 次 $^{-1}$,平行作 2 个膜,按薄膜过滤法操作、计数。计数结果计算: $X = A \times K$,X 为菌数(cfu $\cdot$ g $^{-1}$);A 为菌落平均数;K=10。霉菌和酵母菌计数:取 1:20 的供试液① 2 mL 注入平皿中,按平皿法操作、计数。

大肠埃希菌检查:取 1:20 供试液② 20 mL,加至 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液的滤器中过滤,冲洗 300 mL,100 mL $\cdot$ 次 $^{-1}$,取膜加至相应的增菌培养基 100 mL 中,按大肠埃希菌相应方法检查。以上建立的方法可有效的控制药品质量,可作为头孢呋辛酯胶囊的微生物限度检查方法。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版·二部)[S]2005: Appendix 93-101.
- [2] YUAN L N, SONG Q. Experiments on the recovery of bacteria and fungi by the method of low speed centrifuge in microbial limit tests[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2007,27(10): 1620-1622.
- [3] Nation institute for the control of drug and biological products. China drug inspection standard operating norms(中国药品检验标准操作规范)[M]. Beijing: China Pharmaceutical Technology Publisher,2005:325.
- [4] LIU P, MA S H. Establishment of microbial limit test of gatifloxacin [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2007, 27(6):881-884.

收稿日期:2008-03-24