

头孢克肟分散片微生物限度检查的方法学验证

肖全英, 江劲, 吴丽梅, 曾环想*, 李小清, 刘芳(深圳致君制药有限公司, 广东 深圳 518110)

摘要: 目的 建立头孢克肟分散片的微生物限度检查方法, 并对其方法进行方法学验证。方法 细菌计数采用薄膜过滤法, 霉菌及酵母菌计数采用平皿法, 根据中国药典 2005 年版二部分别使用 5 种实验菌验证。通过 3 次独立的平行试验, 分别计算各试验菌每次试验的回收率。控制菌检查采用薄膜过滤法。结果 各试验菌的回收率均高于 70%, 稀释液回收率也均高于 70%, 控制菌检查具有专属性, 满足中国药典 2005 版验证试验的基本要求。结论 本品的微生物限度检查方法有效可行, 可用于头孢克肟分散片的微生物限度检查。

关键词: 头孢克肟分散片; 微生物限度检查; 方法学验证

中图分类号: R927.33

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)08-0732-04

Establishment and Validation of Methodology for Microbial Limit Test of Cefixime Dispersible Tablets

XIAO Quanying, JIANG Jing, WU Limei, ZENG Huanxiang*, LI Xiaoqing, LIU Fang (Shenzhen Zhijun Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for microbial limit test of cefixime dispersible tablets, and carry out the verification of methodology. **METHODS** The method for microbial limit test of cefixime dispersible tablets was established by a membrane filtration method of total aerobic microbial count and the plate-count method of the total yeasts and moulds and a membrane filtration method of control of bacterial and the method validation was performed according to the Chinese Pharmacopoeia 2005 version. Negative product control and negative diluent control were proceeded with the test of the product. **RESULTS** The recoveries above 70% were obtained when comparing the product challenge to its corresponding inoculum control, and no growth was observed in the negative diluent controls. The method could pass the validation test of Chinese pharmacopoeia 2005 version. **CONCLUSION** The method can be used in microbial limit test of cefixime dispersible tablets.

KEY WORDS: cefixime dispersible tablets; microbial limit test; validation

头孢克肟(cefixime)是第三代头孢类抗生素, 对链球菌、肺炎球菌、淋球菌、大肠杆菌等有良好的抗菌作用, 临床广泛应用于敏感菌所致的肺炎、支气管炎、泌尿道炎、淋病、胆囊炎、胆管炎、猩红热、中耳炎、副鼻窦炎等^[1-3]。为保证临床应用的安全性, 中国药典规定必须对上市药品进行无菌检查或微生物限度检查^[4-6]。笔者采用薄膜过滤法及平皿法建立了头孢克肟分散片的微生物限度检查方法, 并根据中国药典 2005 年版验证试验要求进行了方法学验证。

1 仪器与试剂

蒸汽灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司); 电热鼓风干燥箱(重庆市永生实验仪器厂); 电热恒温培养箱(重庆市永生实验仪器厂); 生化培养箱(重庆市永生实验仪器厂)。

头孢克肟分散片(深圳致君制药有限公司, 规

格: 100 mg, 批号: 20081001)。

试验用菌株: 黑曲霉菌(*aspergillus niger*) [ATCC 16404](广东省微生物研究所); 大肠埃希菌(*escherichia coli*) [CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌(*bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]、金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]及白色念珠菌(*candida albicans*) [CMCC(F)98001]均来自中国药品生物制品检定所。

培养基及稀释液: 营养琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、胰酪胨大豆肉汤培养基、改良马丁培养基、真菌琼脂培养基、胆盐乳糖增菌液、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基、pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液均为北京三药科技有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备

分别取表 1 中培养好的金黄色葡萄球菌、大

作者简介: 肖全英, 女, 副主任药师 Tel: (0755)82433448
研究员 Tel: (0755)82433448 E-mail: zenghxg@tom.com

E-mail: xiaoquanying@szzhijun.com *通信作者: 曾环想, 男, 博士, 研

肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌菌液各 1 mL, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液分别稀释成 3 个连续 10 倍的菌悬液。选择菌落总数 50~100 cfu 的稀释度为最佳稀释度。将最佳稀释度的菌液置于 2~8 °C 保存不可超过 24 h。

表 1 试验用菌、编号及菌液的准备

Tab 1 Preparation and use of test microorganisms

试验用菌	菌种编号	菌液的准备
金黄色葡萄球菌	CMCC(B)26003	胰酪胨大豆肉汤培养基, 30~35 °C, 18~24 h
大肠埃希菌	CMCC(B)44102	胰酪胨大豆肉汤培养基, 30~35 °C, 18~24 h
枯草芽孢杆菌	CMCC(B)63501	胰酪胨大豆肉汤培养基, 30~35 °C, 18~24 h
白色念珠菌	CMCC(F)98001	改良马丁培养基, 23~28 °C, 2~3 d
黑曲霉	ATCC16404	改良马丁琼脂培养基, 23~28 °C, 5~7 d 或直到有好的孢子形成

于黑曲霉的斜面中加入 3~5 mL pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液轻轻将孢子洗脱, 取孢子洗脱液 1 mL, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 3 个连续 10 倍的菌悬液。选择菌落总数 50~100 cfu 的稀释度为最佳稀释度。将最佳稀释度的菌液置于 2~8 °C 保存不可超过 24 h。

2.2 供试品溶液的制备

取研碎粉末供试品 10 g, 加入 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液至 100 mL, 混匀, 静置 5~10 min, 分层, 取上清液作为 1:10 的供试液。

2.3 细菌回收率测定(薄膜过滤法)

2.3.1 供试品对照组 取 1 mL 1:10 的供试液至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 分别用 100, 200, 300 mL 的 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次、2 次、3 次冲洗, 冲洗完取出滤膜正面朝上贴于备妥的营养琼脂培养基平板上, 平行制备 2 个平皿, 于 30~35 °C 培养 48 h, 计算菌落数, 结果见表 2。

2.3.2 试验组(供试品+试验菌) 取 1 mL 1:10 的供试液加至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 用 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次冲洗, 冲洗至剩余约 50 mL 冲洗液时加入金黄色葡萄球菌最佳稀释度的菌液 1 mL(50~100 cfu·mL⁻¹)继续过滤, 过滤完取出滤膜

菌面朝上贴于备妥的营养琼脂培养基平板上, 平行制备 2 个平皿, 于 30~35 °C 培养 48 h, 计算菌落数, 同法处理 200, 300 mL 冲洗量。大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌同上处理。结果见表 2。

2.3.3 菌液组 取金黄色葡萄球菌最佳稀释度的菌液 1 mL 加至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 取出滤膜正面朝上贴于备妥的营养琼脂平板上, 平行制备 2 个平皿, 于 30~35 °C 培养 48 h, 计算菌落数, 结果见表 2。

大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌采用同法处理。

2.3.4 阴性对照组 取 100 mL pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液代替样品溶液, 薄膜过滤, 取出滤膜正面朝上贴于营养琼脂平皿上, 于 30~35 °C 培养 48 h, 计算菌落数, 结果见表 2。

2.3.5 稀释液对照组 取 100 mL pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液, 用 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次冲洗, 冲洗至剩余约 50 mL 冲洗液时加入金黄色葡萄球菌最佳稀释度的菌液 1 mL(50~100 cfu·mL⁻¹)继续过滤, 过滤完取出滤膜菌面朝上贴于备妥的营养琼脂培养基平板上, 平行制备 2 个平皿, 于 30~35 °C 培养 48 h, 计算菌落数。大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌同上处理。结果见表 2。

2.3.6 回收率的计算

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{试验组平均菌落数} - \text{供试品对照组平均菌落数}}{\text{菌液组平均菌落数}} \times 100\%$$

2.4 霉菌及酵母菌回收率测定(平皿法)

2.4.1 试验组 取 1:10 供试液 1 mL 分别加白色念珠菌、黑曲霉菌已制备好的菌液各 1 mL (50~100 cfu·mL⁻¹)注入平皿后, 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 每种菌液平行制备 2 个平皿, 于 23~28 °C 培养 3 d, 计算菌落数, 结果见表 2。

2.4.2 菌液组溶液的配制 取上述试验菌液各 1 mL 注入平皿后, 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 每种菌液平行制备 2 个平皿, 于 23~28 °C 培养 3 d, 计算菌落数, 结果见表 2。

2.4.3 供试品对照组 取 1:10 供试液 1 mL 注入平皿后, 立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基, 平行制备 2 个平皿, 于 23~28 °C 培养 3 d, 计算菌落数, 结果见表 2。

2.4.4 同时做阴性对照 同时做稀释液对照和培养基阴性对照。

表 2 菌落数及回收率检测数据表

Tab 2 The microbial limit test data and recovery of total aerobic microbial count, yeasts and moulds count

测试项目	冲水量/ mL	金黄色葡萄球菌(10^{-7})			大肠埃希菌(10^{-7})			枯草芽孢杆菌(10^{-5})			白色念珠菌(10^{-5})			黑曲霉(10^{-5})		
		第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次	第1次	第2次	第3次
试验组菌落数	100	35	40	38	33	30	28	31	26	23	66	72	68	52	53	51
	200	73	72	71	64	63	56	64	55	60						
	300	75	74	72	65	66	54	61	60	58						
供试品对照组菌落数								均无微生物生长								
稀释液对照组菌落数		72	75	72	66	64	55	75	62	64	66	70	69	51	54	52
菌液组菌落数		77	79	78	70	69	61	78	65	69	70	78	75	60	59	57
培养基、稀释剂 阴性对照								均无微生物生长								
回收率/%	100	45	51	49	47	43	46	40	40	33						
	200	95	91	91	91	91	92	82	85	87	94	90	91	85	92	91
	300	97	94	92	93	96	88	78	92	84						
稀释液回收率/%		94	95	92	91	93	90	96	95	93	94	92	92	87	90	89

2.5 控制菌(大肠埃希菌)检验(薄膜过滤法)

2.5.1 供试品对照组 取 1:10 的供试液 10 mL 加至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 用 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次冲洗。取出滤膜, 直接置 100 mL 胆盐乳糖增菌液中, 35~37 °C 培养 18~24 h 后做 MUG 试验及靛基质试验。

同上处理 200, 300 mL 冲洗量, 结果见表 3。

2.5.2 试验组(供试品+大肠埃希菌) 取 1:10 的供试液 10 mL 加至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 用 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次冲洗。冲洗至剩余约 50 mL 时加入大肠埃希菌最佳稀释度的菌液

1 mL($50\sim100\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)继续过滤, 取出滤膜, 直接置 100 mL 胆盐乳糖增菌液中, 置 35~37 °C 培养 18~24 h 后做 MUG 试验及靛基质试验。同上处理 200, 300 mL 冲洗量, 结果见表 3。

2.5.3 阴性菌对照组(供试品+金黄色葡萄球菌) 取 1:10 的供试液 10 mL, 加至 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀后过滤, 用 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液分 1 次冲洗。最后一次冲洗至剩余约 50 mL 时加入金黄色葡萄球菌最佳稀释度的菌液 1 mL($50\sim100\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)继续过滤, 取出滤膜, 直接置 100 mL 胆盐乳糖增菌液中, 置 35~37 °C 培养 18~24 h 后做 MUG 试验及靛基质试验。同上处理 200, 300 mL 冲洗量, 结果见表 3。

表 3 控制菌(大肠埃希菌)检测数据表

Tab 3 The microbial limit test data of control for bacterial (Escherichia coli)

冲洗量		供试品对照组(供试品)			试验组(供试品+大肠埃希菌)			阴性菌对照 (供试品+金黄色葡萄球菌)			阴性对照
		100 mL	200 mL	300 mL	100 mL	200 mL	300 mL	100 mL	200 mL	300 mL	
胆盐乳糖 增菌液 (BL)	第 1 次	清	清	清	清	浊	浊	清	清	清	均无微生物 生长
	第 2 次	清	清	清	清	浊	浊	清	清	清	
	第 3 次	清	清	清	清	浊	浊	清	清	清	
MUG 培养 基	第 1 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	
	第 2 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	
	第 3 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	
靛基质 试验	第 1 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	
	第 2 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	
	第 3 次	—	—	—	—	+	+	—	—	—	

注: “清”表示无微生物生长, “浊”表示微生物生长良好, “+”表示阳性反应, “—”表示阴性反应

Note: “Clear” expressing nogrowth, “Unclear” expressing growth well, “+” expressing active, “—” expressing negative

2.6 微生物限度检查方法的验证

2.6.1 细菌计数回收率 从表 2 可见, 供试液(1:10)冲水量为 200 mL 和 300 mL 时, 3 次细菌计数回收率均>70%, 稀释液 3 次回收率均>70%。因此, 供试液(1:10)冲水量为 200 mL 和稀释液的回收率均高于 70%, 满足中国药典 2005 版验证试验的基本要求。

2.6.2 霉菌及酵母菌计数回收率 从表 2 可见, 供试液(1:10) 3 次回收率均>70%, 稀释液 3 次回收率均>70%。因此, 供试液(1:10)和稀释液的回收率均高于 70%, 满足中国药典 2005 版验证试验的基本要求。

2.6.3 阴性对照 从表 2 可见, 稀释液对照和培养基阴性对照均无微生物生长, 满足中国药典 2005 版验证试验的基本要求。

2.6.4 控制菌验证 采用薄膜过滤法检测控制菌(大肠埃希菌)。从表 3 可见, 供试液(1:10)冲洗量为 200 mL 和 300 mL 时, 阴性菌未检出, 阳性对照菌大肠埃希菌检出, 阴性对照呈无微生物生长, 满足中国药典 2005 版验证试验的基本要求。本试验选用的滤膜孔径为 0.45 μm , 能保证供试品及其溶剂不影响微生物的充分被截流。

3 讨论

头孢克肟分散片是一种口服抗菌素药物制剂, 为保证其临床应用的安全性, 本试验建立了

其微生物限度检查方法。细菌计数采用供试液 1 mL 加入 100 mL 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 薄膜过滤, 冲水量为 200 mL; 霉菌及酵母菌计数采用平皿法检测, 控制菌大肠埃希菌采用供试液(1:10)10 mL 加入 100 mL 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 薄膜过滤, 冲水量为 200 mL。该方法经 5 种实验菌验证, 符合中国药典 2005 年版附录 XIJ 微生物限度检查法的基本要求, 可作为头孢克肟分散片的微生物限度检查方法。

REFERENCES

- [1] LU D, YOU X Q. Cefixime tablets prepared by direct compression [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2000, 31(11): 488-490.
- [2] WANG L, BAI S H, ZENG H X, et al. The research and preparation of cefixime granules[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(1): 55-57.
- [3] LIN S G, ZENG H X, WANG L, et al. Preparation and quality evaluation of cefixime capsules [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2005, 14(4): 444-446.
- [4] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版. 二部)[S]. 2005: Appendix X VA 93-101.
- [5] SU D M, HU C Q, MA Y. Simple analyse about microbial Limits in USP, BP and EUP [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2005, 6(3): 20-29.
- [6] YANG J. Analysis of factors influencing the results of the microbial limit test of drugs [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2008, 22(12): 1095-1096.

收稿日期: 2009-08-24