

盐酸头孢他美酯干混悬剂微生物限度检查方法的建立

甘永琦*,朱斌[#](广西食品药品检验所,南宁 530021)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1274-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.44

摘要 目的:建立盐酸头孢他美酯干混悬剂的微生物限度检查方法。方法:采用薄膜过滤法进行细菌计数和控制菌检查,采用常规法进行霉菌和酵母菌计数,并应用此法对2个厂家共19批样品进行微生物限度检查。结果:细菌数采用薄膜过滤法,霉菌和酵母菌数采用常规法进行测定,测定结果回收率均>70%,符合2010年版《中国药典》的规定。19批样品的微生物限度检查合格率为100%。结论:盐酸头孢他美酯干混悬剂卫生状况良好。所建立的方法可用于盐酸头孢他美酯干混悬剂的微生物限度检查。

关键词 盐酸头孢他美酯干混悬剂;微生物限度检查;薄膜过滤法;常规法

Establishment of the Method for Microbial Limit Test of Cefetamet Pivoxil Hydrochloride Dry Suspension

GAN Yong-qi, ZHU Bin (Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for microbial limit test of Cefetamet pivoxil hydrochloride dry suspension (CPHDS). METHODS: Membrane filtration method was used for the bacteria counting and control bacteria determination, conventional method was used for counting the molds and yeasts. The microbial limit test of 19 batches samples from 2 manufacturers. RESULTS: Membrane filtration method was used for counting the bacteria and conventional method was used for counting the molds and yeasts, the recovery rate were more than 70%, which was in line with the requirements of 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Microbial limit test of 19 batches samples was detected with the pass rate of 100%. CONCLUSIONS: CPHDS has good hygienic conditions. The method can be used for the microbial limit test of CPHDS.

KEYWORDS Cefetamet pivoxil hydrochloride dry suspension; Microbial limit test; Membrane filtration method; Conventional method

盐酸头孢他美酯是第三代口服广谱头孢菌素类抗生素。其通过抑制细菌细胞壁合成过程中黏肽链的交叉连结,使细菌不能形成完整的细胞壁,从而发挥抗菌作用,且其活性不受细菌产生的 β -内酰胺酶的影响。其对链球菌属、肺炎链球菌等革兰阳性菌及大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、克雷伯菌属、沙门菌属、志贺菌属、淋病奈瑟氏球菌等革兰阴性菌都有很强的抗菌活性,尤其对第一、二代头孢菌素敏感性低的沙雷菌属、吡喹酮阳性变形杆菌、肠杆菌属及柠檬酸菌属的抗菌活性较为显著,但其对假单胞菌、支原体、衣原体、肠球菌等耐药性微生物无效^[1-5]。自1992年上市以来,盐酸头孢他美酯得到了广泛应用,目前国内生产的剂型有干混悬剂、胶囊和片剂3种。2010年版《中国药典》(二部)规定干混悬剂需进行微生物限度检查。为此,笔者根据2010年版《中国药典》(二部)附录XIJ“微生物限度检查法”口服制剂的规定,对盐酸头孢他美酯干混悬剂的微生物限度检查方法进行研究和敏感菌株验证,并用建立的方法对该品种进行细菌、霉菌及酵母菌计数和控制菌检查,以分析其微生物污染状况。

1 材料

1.1 仪器

WGP-500型电热恒温培养箱(上海安亭科学仪器厂);LRH-250A型生化培养箱(广东省医疗器械厂);生物安全柜

* 主管药师,硕士。研究方向:微生物与生化药学。E-mail: jacygan_413@163.com

[#] 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药品检验及质量。E-mail: zhubin1226@sina.com.cn

(新加坡ESCO公司);MSL3768型高压灭菌锅(日本三洋公司等)。

1.2 药品与试剂

盐酸头孢他美酯干混悬剂(浙江普洛康裕制药有限公司,批号:130603、120104、120604、120601、130502、120802、130502、130403;浙江震元制药有限公司,批号:20130103、20121102、20130102、20130102、20130103、20130501、20130503、20120409、20121002、20130502、20121003);pH为7.0的氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司,批号:120331);氯化钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:10019318)。

1.3 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(B)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均由中国医学微生物菌种保藏管理中心提供。

1.4 培养基

营养琼脂培养基(批号:110105)、改良马丁培养基(批号:1202022)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1204102)、营养肉汤培养基(批号:130311)、胆盐乳糖培养基(BL,批号:121127)等均购自北京三药科技开发公司;4-甲基伞形酮葡萄糖苷培养基(MUG,批号:1304172)和靛基质(批号:130305)均购自北京陆桥技术部有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 细菌、霉菌和酵母菌计数方法的建立及验证

2.1.1 菌液的制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌与枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基或营养琼脂培养基中,33℃下培养18~24h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基或改良马丁琼脂培养基中,25℃下培养24~28h。上述培养物以0.9%无菌氯化钠溶液制成每1ml含菌数为50~100CFU的菌悬液(菌悬液制备后应在2h内使用,保存在2~8℃的菌悬液可在24h内使用)。

2.1.2 供试液的制备 取本品10g,加pH为7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100ml,用匀浆仪以1000r/min匀浆30s,混匀,静置5~10min,取上清液作为供试液。

2.1.3 回收率试验 (1)试验组:取供试液1ml,另分别取各试验菌50~100CFU,分别注入同一平皿中,立即倾注琼脂培养基,待凝固后,置于规定温度下,细菌培养3d,白色念珠菌和黑曲霉培养5d,分别平行制备2个平皿,平板计数。(2)菌液组:取试验菌50~100CFU注入平皿中,立即倾注琼脂培养基,待凝固后,置于规定温度下,细菌培养3d,白色念珠菌和黑曲霉培养5d,分别平行制备2个平皿,测定所加入的试验菌数。(3)供试品对照组:取供试液1ml注入平皿中,立即倾注琼脂培养基,待凝固后,置于37℃培养24~48h,测定供试品的本底菌数。

对照组各试验菌的回收菌应不低于70%。回收率=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组的平均菌落数×100%。

2.1.4 细菌计数方法预试验 根据文献报道^[6],选取大肠埃希菌作为敏感菌株,分别采用常规法和薄膜过滤法(冲洗量为100ml)对2个厂家各1批样品进行方法筛选,结果见表1。

表1 大肠埃希氏菌验证试验结果(CFU/平皿)

Tab 1 Verification results of *Escherichia coli* (CFU/plate)

组别	浙江震元(批号:120604)		浙江普洛康裕(批号:20121102)	
	常规法	薄膜法	常规法	薄膜法
试验组	32/34	49/47	0/0	91/89
供试品组	1/3	1/0	0/0	0/0
菌液组	88/77	60/70	88/77	82/92
回收率	37.58%	73.08%	0.00%	103.45%

由表1可见,采用常规法试验,2个厂家生产的盐酸头孢他美酯的大肠埃希菌回收率均未达到70%,不能有效消除盐酸头孢他美酯对细菌的抑制作用,因此采用常规法进行细菌计数不可行;而采用薄膜过滤法试验结果显示,冲洗量为100ml时,大肠埃希菌的回收率>70%,符合要求,因此初步确定采用冲洗量为100ml的薄膜过滤法进行细菌计数。

2.1.5 计数方法的验证 分别对3批样品进行计数方法验证,细菌采用薄膜过滤法,用0.9%无菌氯化钠溶液冲洗100ml,其他菌种采用常规法进行加菌回收率试验,结果见表2。

表2 计数方法验证试验回收率结果(%)

Tab 2 Recovery results of count verification test

样品生产企业	批号	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	黑曲霉	白色念珠菌
浙江震元	120604	93	100	98	93	95
浙江普洛康裕	20121102	114	95	89	111	98
浙江普洛康裕	20130503	111	98	113	85	107

由表2可见,5种规定试验菌的回收率均>70%,符合2010年版《中国药典》(二部)的规定,方法成立。

2.2 控制菌检查方法的建立与验证

2.2.1 菌液的制备 接种大肠埃希菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,培养18~24h,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1

ml含菌数为10~100CFU的菌悬液(菌悬液在室温下放置应在2h内使用,若保存在2~8℃可在24h内使用)。

2.2.2 控制菌检查方法 (1)培养基稀释法:供试品对照组取“2.1.2”项下的供试液10ml,阳性对照组取供试液10ml及大肠埃希菌10~100CFU,阴性对照组取10ml 0.9%无菌氯化钠溶液,均接种至500ml的BL培养基中,培养18~24h。(2)薄膜过滤法:取上述培养基稀释法中各组的试液加入滤膜中,用0.9%无菌氯化钠溶液冲洗100ml,取出膜接种至100ml的BL培养基中,培养18~24h。

取上述培养物0.2ml,接种至含5mlMUG培养基的试管内培养,分别于培养5、24h时置紫外光灯(366nm)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;不呈现荧光,则为MUG阴性。观察后,沿培养管的管壁加入数滴靛基质试液,若液面呈玫瑰红色,为靛基质阳性;呈试剂本色,则为靛基质阴性。本底对照应为MUG阴性和靛基质阴性。

2.2.3 检查方法的验证 大肠埃希菌检查方法验证试验结果见表3(表中“+”表示MUG阳性,“-”表示MUG阴性)。由表3可见,培养基稀释法中,有1批样品的阳性对照组结果呈阴性,表明该方法不能有效消除盐酸头孢他美酯对大肠埃希菌的抑制作用;而薄膜过滤法中,阴性对照及供试组的MUG和靛基质均呈阴性,阳性对照中2批样品的MUG和靛基质均呈阳性,表明采用薄膜过滤法进行大肠埃希菌检查的方法成立。

表3 大肠埃希菌检查方法验证试验结果

Tab 3 Verification results of *Escherichia coli* test

基质	组别	培养基稀释法		薄膜过滤法	
		浙江震元(批号:120604)	浙江普洛康裕(批号:20121102)	浙江震元(批号:120604)	浙江普洛康裕(批号:20121102)
BL	供试组	澄清	澄清	澄清	澄清
	阳性对照组	混浊	澄清	混浊	混浊
	阴性对照组	澄清	澄清	澄清	澄清
MUG	供试组	-	-	-	-
	阳性对照组	+	-	+	+
	阴性对照组	-	-	-	-

上述结果显示,盐酸头孢他美酯干混悬剂对细菌有一定抑制作用,采用薄膜过滤法,加入100ml的冲洗液可以消除其抑制作用。这表明,采用薄膜过滤法可进行细菌计数及大肠埃希菌检查,采用常规法可进行霉菌和酵母菌计数。

2.4 样品检查

根据微生物限度检查法口服制剂规定,采用建立的微生物限度检验方法对2013年国内共19批盐酸头孢他美酯干混悬剂进行检验,结果均未检出大肠埃希菌,部分样品存在少量细菌污染,但未超出限度,且未检出霉菌和酵母菌,合格率为100%。

3 讨论

头孢他美酯是通过口服吸收的有生物活性的头孢他美的酯类前药^[7],其进入肠壁和肝脏中被酯酶水解成头孢他美后发挥其抗菌活性^[8]。头孢他美酯干混悬剂不溶于水,而采用离心沉淀法对供试品进行前处理则对样品本身所含的微生物有一定影响^[9]。因此,本研究采用静置取上清液的方法制备供试液,以避免药渣对薄膜过滤的干扰。在细菌计数和控制菌检查试验中,本品显示了对大肠埃希菌的抗菌活性。该药物本身仅具有较弱的抗菌活性^[10],由于体外缺乏酯酶,在溶液中不能完全水解成头孢他美,导致活性受限。因此,可通过薄膜过

续骨冲和膏的质量标准研究

吴凤荣^{1*}, 曾聪彦^{1#}, 胡玉良¹, 卢建业²(1.广州中医药大学附属中山中医院, 广东 中山 528401; 2.广东药学院中药学院, 广东 中山 528400)

中图分类号 R97.1;R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1276-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.45

摘要 目的:为建立续骨冲和膏的质量标准提供参考。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的大黄、黄柏、赤芍、当归、荆芥、木香等6味药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的大黄素和大黄酚进行含量测定。结果:大黄、黄柏、赤芍、当归、荆芥、木香的TLC图斑点清晰,分离度好;大黄素和大黄酚的质量浓度分别在2.41~38.6、5.45~87.2 μg/ml范围内与峰面积呈良好线性关系(r 均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为99.7%、99.5%,RSD分别为1.9%、1.6%($n=6$)。结论:该法方便快捷,重现性、专属性好,结果稳定、可靠,可作为续骨冲和膏的质量控制方法。

关键词 续骨冲和膏;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;大黄素;大黄酚

Study on Quality Standard for Xugu Chonghe Plasters

WU Feng-rong¹, ZENG Cong-yan¹, HU Yu-liang¹, LU Jian-ye²(1.Zhongshan Hospital of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangdong Zhongshan 528401, China; 2.College of TCM, Guangdong Pharmacy College, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Xugu chonghe plasters. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of Rhei Radix, *Phellodendron chinese*, Paeoniae Radix Rubra, *Angelica sinensis*, *Schizonepeta tenuifolia* and *Aucklandia lappa*, etc. HPLC method was applied for the content determination of emodin and chrysophanol in Xugu chonghe plasters. RESULTS: TLC spots of Rhei Radix, *P. chinese*, Radix Paeoniae Rubra, *A. sinensis*, *S. tenuifolia* and Radix Aucklandiae were clear and well-separated; the linear range were 2.41-38.6 μg/ml for emodin ($r=0.999\ 9$) and 5.45-87.2 μg/ml for chrysophanol ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recoveries were 99.7% (RSD=1.9%, $n=6$) and 99.5% (RSD=1.6%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is convenient, reproducible, specific, stable and reliable, and can be used for the quality control of Xugu chonghe plasters.

KEYWORDS Xugu chonghe plasters; TLC; HPLC; Quality standard; Emodin; Chrysophanol

滤加入100 ml的冲洗液进行细菌计数和控制菌检查。

本研究发现,不同厂家的样品对大肠埃希菌的体外抗菌活性存在差异,说明企业的生产工艺不同,导致产品在水溶液中的稳定性也不同。本研究为国内首个全面报道头孢他美酯干混悬剂微生物限度检查方法学的研究,并对国内2个厂家生产的样品进行了检验,建立了可行、有效、统一的方法,可为该品种微生物限度检查方法的收载提供借鉴。

参考文献

- [1] 张淑华,欧真蓉,陈蜀,等.国产头孢他美酯、头孢他美酯体内外抗菌作用研究[J].中国抗生素杂志,2001,26(2):144.
- [2] 傅颖君.盐酸头孢他美酯体外抗菌作用[J].江西医学院学报,2002,42(3):30.
- [3] 阮邹荣,袁虹,孙凌,王选锭.盐酸头孢他美酯的药代动

力学研究[J].中国临床药理学杂志,2000,16(4):301.

- [4] 周大伟,武海霞.盐酸头孢他美酯的药理和临床应用[J].张家口医学院学报,2003,20(6):46.
- [5] 余泽波,向小琴,王其南,等.国产头孢他美酯片临床观察[J].重庆医学,2000,29(5):458.
- [6] 彭晓姗,唐映红.盐酸头孢他美酯体内和体外抗菌作用研究[J].中国医药科学,2014,4(1):33.
- [7] 俞绍鑫,吴朝倩.盐酸头孢他美酯的药理与临床应用[J].中国抗生素杂志,2001,26(2):153.
- [8] 刘家健,刘敦革,曾晓辉,等.国产盐酸头孢他美酯的制备[J].中国抗生素杂志,2001,26(2):151.
- [9] 周剑,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,2012,23(33):3136.
- [10] 高丽佳,杨俊卿,刘全,等.头孢他美酯的体内抗菌作用研究[J].儿科药学杂志,2001,7(2):7.

(收稿日期:2014-09-10 修回日期:2014-12-09)

(编辑:孙冰)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂。E-mail: ginnyfengrong@126.com

通信作者:主任中药师,硕士生导师。研究方向:医院中药制剂。电话:0760-89980213。E-mail: zszcy@126.com