

# 头孢克洛干混悬剂微生物限度检查方法的建立及验证

余晓霞\*,刘春霞#,严慧明(中山大学孙逸仙纪念医院药学部,广州 510120)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1612-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.24

**摘要** 目的:建立头孢克洛干混悬剂微生物限度检查方法并进行方法验证。方法:根据2010年版《中国药典》二部附录微生物限度检查方法中的常规法和薄膜过滤法,对头孢克洛干混悬剂进行方法验证,通过比较回收率来确定适宜的计数方法,通过比较对供试液一般处理和加入 $\beta$ -内酰胺酶进行处理的试验结果来确定控制菌检查方法。结果:采用常规法试验,样品对细菌的回收率为0,对霉菌及酵母菌的回收率均高于70%;采用薄膜过滤法试验,加入pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液400 ml、每次100 ml进行冲洗,细菌的回收率均大于80%;采用薄膜过滤加入 $\beta$ -内酰胺酶的方法,控制菌生长良好,可有效消除头孢克洛干混悬剂的抑菌作用。结论:头孢克洛干混悬剂可采用常规法测定霉菌和酵母菌数;用薄膜过滤法测定细菌数;用薄膜过滤加入 $\beta$ -内酰胺酶的方法进行控制菌检查。

**关键词** 头孢克洛干混悬剂;微生物限度;方法验证;常规法;薄膜过滤法; $\beta$ -内酰胺酶

## Establishment and Validation of Microbial Limit Test Method of Cefaclor Suspension

YU Xiao-xia, LIU Chun-xia, YAN Hui-ming (Dept. of Pharmacy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish microbial limit test for Cefaclor suspension and to carry out the validation of methods. METHODS: According to appendix II of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), microbial limit test which contained routine test and membrane-filter method was adopted to validate Cefaclor suspension. Recoveries of two methods were compared to make sure the suitable calculation method. Test results of the test liquid processed generally or processed with  $\beta$ -lactamase were compared to determine the checking method of controlled bacteria. RESULTS: In routine test, recoveries of bacteria were 0 and those of mould and yeast were higher than 70%. In membrane-filter method, recoveries of bacteria were higher than 80% by washing in pH 7.0 sterile sodium chloride-peptone buffer solution 400 ml, with 100 ml each time. By membrane-filter method, with  $\beta$ -lactamase, controlled bacteria grew well. The method could effectively eliminate the bacteriostatic action of Cefaclor suspension. CONCLUSIONS: The count of mold and yeast in Cefaclor suspension can be determined by routine method; bacterial count can be determined by membrane-filter method; controlled bacteria can be determined by membrane-filter method with  $\beta$ -lactamase.

**KEYWORDS** Cefaclor suspension; Microbial limit test; Method validation; Routine test; Membrane-filter method;  $\beta$ -lactamase

头孢克洛为头孢菌素类广谱抗菌药,对革兰阳性菌和阴性菌都具有抗菌作用,其制剂有胶囊、片剂、颗粒剂等。目前未见有头孢克洛干混悬剂的微生物限度检查方法的报道。对该品种进行微生物限度检查时需要消除样品的抑菌性,才能真实地反映其微生物污染的情况。根据2010年版《中国药典》(二部)微生物限度检查法的有关规定<sup>[1]</sup>,通过对常规法和薄膜过滤法的比较,以及不同冲洗量和加入 $\beta$ -内酰胺酶等不同试验条件的筛选,笔者建立了适合头孢克洛干混悬剂微生物限度检查的方法并对其进行了验证,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HTY-2000B集菌仪(杭州泰林医疗器械厂);NS01-75D1薄膜过滤器(北京牛牛基因技术有限公司);超净工作台(苏净集团安泰公司);303A-1生化培养箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。

### 1.2 药品、试剂与培养基

头孢克洛干混悬剂(礼来苏州制药有限公司,批号:

\* 主管药师。研究方向:药品检验。电话:020-81332427。E-mail: xiaoxiao1979@21cn.com

# 通信作者:副主任药师。研究方向:药品检验。电话:020-81332427。E-mail: lcxgz@163.com

C163211、C165226、C169490,规格:每袋0.125 g);水为纯化水。

营养琼脂培养基(批号:121220)、胆盐乳糖增菌培养基(批号:120309)、营养肉汤培养基(批号:121214)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:130108)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(EMB,批号:120911)、改良马丁培养基(批号:130109)、稀释剂pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:130128)、青霉素酶(批号:20120713,活性: $>300$ 万u/ml,无菌检查时每1 ml青霉素酶可水解青霉素80万u)均来源于北京三药科技开发公司。

### 1.3 试验菌种

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]均来源于中国食品药品检定研究院,为第0代菌种。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌液的制备<sup>[1]</sup>

分别接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基,经30~35℃培养18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基,经23~28℃培养24~48 h;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面

培养基上, 23~28 °C 培养 5~7 d, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液洗脱孢子。上述培养物或孢子液分别用 0.9% 无菌氯化钠溶液按 10 倍递增稀释, 制成 50~100 CFU/ml 的菌悬液, 备用。

## 2.2 稀释剂的选用

选用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作稀释剂。

## 2.3 供试液的制备<sup>[2]</sup>

称取头孢克洛干混悬剂样品 10 g, 加稀释剂至 100 ml, 混匀, 制成 1:10 供试液。

## 2.4 回收率的计算<sup>[1]</sup>

试验组的加菌回收率 = (试验组平均菌落数 - 供试品对照组平均菌落数) / 菌液组平均菌落数 × 100%; 稀释剂对对照组加菌回收率 = 稀释剂对照组平均菌落数 / 菌液组平均菌落数 × 100%。试验组和稀释剂对照组的菌数回收率应均不低于 70%。

## 2.5 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证试验

2.5.1 常规法。①试验组: 取“2.3”项下 1:10 供试液 1 ml, 分别加入“2.1”项下 5 株代表试验菌 1 ml, 平行制备 2 个平皿。②菌液组: 取“2.1”项下 5 株代表试验菌 1 ml, 分别注入平皿中, 每株试验菌平行制备 2 个平皿。③供试品对照组: 取供试液 1 ml, 分别注入平皿中, 平行制备 2 个平皿。④稀释剂对照组: 取稀释剂 1 ml, 分别加入各试验菌 1 ml。上述各组细菌计数检查项注入营养琼脂培养基, 霉菌及酵母菌计数检查项注入玫瑰红钠琼脂培养基, 分别置于 30~35 °C 培养 3 d 和 23~28 °C 培养 5 d, 计算菌落数。按“2.4”项下公式计算回收率, 见表 1。

表 1 常规法菌回收率结果 (%)

Tab 1 Bacterial recovery of routine test (%)

组别	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 第1次	0	0	0	84.2	82.5
第2次	0	0	0	82.1	90.6
第3次	0	0	0	90.3	85.7
稀释剂对照组	95.3	92.0	93.9	88.7	89.1

由表 1 可见, 采用常规法检查头孢克洛干混悬剂供试品, 5 株试验菌中, 白色念珠菌、黑曲霉的回收率均高于 70%, 证明常规法可用于本品的霉菌及酵母菌的计数检查; 而金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌回收率均为 0, 表明本品对细菌具有很强抑制作用, 常规法不能用于本品的细菌检查。

2.5.2 薄膜过滤法。取 1:10 供试液 1 ml 至 100 ml 稀释剂中, 混匀后滤过, 分别用稀释剂 200、300、400 ml, 每次 100 ml 进行冲洗, 在最后一次冲洗液中分别加入金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌与枯草芽孢杆菌 50~100 CFU, 滤过后取出滤膜正面朝上, 贴于营养琼脂培养基上, 平行制备 2 份膜, 置于 30~35 °C 培养 3 d, 计算菌落数。按“2.4”项下公式计算回收率, 见表 2。

表 2 薄膜过滤法菌回收率结果 (%)

Tab 2 Bacterial recovery of membrane-filter method (%)

菌种	冲洗量 200 ml (n=3)			冲洗量 300 ml (n=3)			冲洗量 400 ml (n=3)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
金黄色葡萄球菌	33.0	29.8	29.5	52.9	44.3	49.5	92.5	90.3	86.1
大肠埃希菌	89.3	85.6	85.6	90.7	80.1	85.1	87.0	80.5	94.5
枯草芽孢杆菌	41.2	35.1	43.6	66.6	57.4	55.9	100	81.6	85.5

由表 2 可见, 当用 400 ml 稀释剂每次 100 ml 进行冲洗时, 回收率均高于 80%, 说明此方法可消除供试品对 3 种试验菌的抑制作用, 可用于头孢克洛干混悬剂的细菌数检查。

## 2.6 控制菌检查方法验证

本品为口服制剂, 控制菌必须检查大肠埃希菌, 验证方法如下: 取 3 份 1:10 供试液 10 ml 分别加入到 A、B、C 3 瓶 100 ml 稀释剂中, A 瓶和 B 瓶分别用稀释剂 300、500 ml, 每次 100 ml 进行冲洗; C 瓶加入 2 ml 无菌 β-内酰胺酶 (每 1 ml 大于 300 万 u), 薄膜滤过。滤过后将滤膜放入 100 ml 胆盐乳糖培养基中, 摇匀, 30~35 °C 培养 18~24 h, 取 0.2 ml 接种至 5 ml 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸 (MUG) 培养基试管内, 培养 5、24 h 时, 置于 366 nm 紫外光下观察, 然后沿培养管的管壁加入数滴靛基质试液, 反应结果见表 3 (表中“-”表示 MUG 未呈现荧光, 靛基质试液液面呈试剂本色, 反应呈阴性; “+”表示 MUG 呈现荧光, 靛基质试液液面呈玫瑰红色, 反应呈阳性)。

表 3 控制菌验证方法试验结果

Tab 3 Validation results of controlled bacteria

瓶号	MUG	靛基质试液	结果
A	-	-	未检出
B	-	-	未检出
C	+	+	检出

由表 3 可见, 只有 C 瓶 (即加入 2 ml β-内酰胺酶后薄膜过滤, 无冲洗) 中检出了大肠埃希菌, 说明该方法可以作为控制菌大肠埃希菌的检查方法。

## 2.7 样品微生物限度检查

取 3 批供试品, 细菌计数采用薄膜过滤法检查, 稀释剂 400 ml, 每次 100 ml 进行冲洗; 霉菌及酵母菌计数采用常规法检查; 控制菌大肠埃希菌检查采用加 2 ml β-内酰胺酶后薄膜过滤的方法, 检查结果见表 4 (表中“-”表示结果为阴性)。

表 4 样品微生物限度检查结果 (CFU/g)

Tab 4 Results of microbial limit tests of samples (CFU/g)

菌种	样品批号		
	CI63211	CI65226	CI69490
细菌	0	0	0
霉菌及酵母菌	0	0	0
大肠埃希菌	-	-	-

## 3 讨论

(1) 计数方法验证试验中, 由表 1 可见, 头孢克洛干混悬剂对细菌有很强的抑制作用, 对霉菌及酵母菌则无明显抑制作用。刘鹏等<sup>[3]</sup>认为“薄膜过滤法是去除药品中抗菌成分的最有效方法”。亦有文献报道, 对抑菌活性强的品种采用薄膜过滤法能取得最好的滤菌效果<sup>[4-5]</sup>。因此, 本试验采用了薄膜过滤法对头孢克洛干混悬剂进行细菌回收率试验, 而未选择培养基稀释法。由表 2 可见, 当用 400 ml 稀释剂, 每次 100 ml 进行冲洗时, 可有效消除供试品对细菌的抑制作用, 故薄膜过滤法可用于头孢克洛干混悬剂的细菌数检查。

(2) 控制菌检查方法的验证试验中, 由于供试液的取样量为 10 ml, 远大于回收率试验的取样量, 则试验浓度需要增加, 但同时其对细菌的抑菌能力也相应增加。因此, 控制菌的检查只选择薄膜过滤法, 不再进行常规法试验。表 3 的结果表明, 当用 500 ml 稀释剂每次 100 ml 进行冲洗时, 仍不能消除供试品的抑菌活性。供试液的浓度增大使得薄膜过滤法必须用大量的冲洗液除去抗菌成分。但大量的冲洗, 不仅影响滤膜的孔径, 使截留在膜上的细菌滤过, 而且还使污染的细菌受到损伤, 从而降低阳性检出率, 影响试验结果的准确性<sup>[6]</sup>。因此, 试验不再考虑增加冲洗量。有文献报道, β-内酰胺类抗生素口

# RP-HPLC法测定水飞蓟宾原料药的含量和有关物质

岑菁\*,许瑞祥,夏培元,吕珊,陈勇川\*(第三军医大学第一附属医院药学部,重庆 400038)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1614-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.25

**摘要** 目的:建立测定水飞蓟宾原料药含量和有关物质的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为XDB-C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-1%冰乙酸水溶液(51:49, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,检测波长为287 nm。结果:水飞蓟宾检测质量浓度线性范围为0.012 04~0.481 6 mg/ml( $r=0.999 9$ )。水飞蓟宾低、中、高质量浓度平均回收率分别为100.65%、100.10%、100.69%,RSD分别为0.41%、0.71%、0.24%( $n=3$ ),检测限、定量限分别为16、53 ng/ml。测得3批样品水飞蓟宾含量分别为99.47%、99.53%、99.38%,有关物质分别为1.32%、1.25%、1.27%。结论:本方法操作简单、灵敏度高、重复性好,可用于水飞蓟宾原料药含量和有关物质的测定。

**关键词** 反相高效液相色谱法;水飞蓟宾;原料药;含量测定;有关物质

## Determination of Content and Related Substance of Silybin Raw Material by RP-HPLC

CEN Jing, XU Rui-xiang, XIA Pei-yuan, LYU Shan, CHEN Yong-chuan (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of silybin raw material and its related substance. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on XDB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-1% acetic acid solution (51:49, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was set at 35℃, and the detection wavelength was set at 287 nm. RESULTS: The linear range of silybin was 0.012 04-0.481 6 mg/ml ( $r=0.999 9$ ). The recoveries of low, medium and high concentrations were 100.65% (RSD=0.41%,  $n=3$ ), 100.10% (RSD=0.71%,  $n=3$ ) and 100.69% (RSD=0.24%,  $n=3$ ), respectively. The limits of detection and quantification were 16 ng/ml and 53 ng/ml, respectively. The contents of 3 batches of silybin were 99.47%, 99.53% and 99.38%, respectively; those of related substances were 1.32%, 1.25% and 1.27%, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, reproducible, and can be used for the content determination of silybin raw material and related substances.

**KEYWORDS** RP-HPLC; Silybin; Raw material; Content determination; Related substance

服制剂微生物限度检查方法可采用薄膜过滤并在培养基中加入 $\beta$ -内酰胺酶的计数方法,其原理是 $\beta$ -内酰胺酶可破坏本类药物的 $\beta$ -内酰胺环,使其失去抗菌活性<sup>[9]</sup>。所以此方法可以减少冲洗液的用量,提高阳性菌检出率。故由表3可见,当加入 $\beta$ -内酰胺酶后薄膜过滤,结果呈阳性,本次试验也验证了上述观点。

(3)有文献报道,如果单一采用酶处理而不用薄膜过滤法,需要大量的 $\beta$ -内酰胺酶(酶的加入量约为青霉素单位的3~4倍)<sup>[7]</sup>。但是酶处理与薄膜过滤联用的方法,既可减少酶的加入量、降低污染几率,又可减少冲洗液的用量、提高阳性菌的检出率。另外,如果 $\beta$ -内酰胺酶的加入量过小,不能完全消除药物的抗菌活性; $\beta$ -内酰胺酶加入量过大,又容易污染。钱文静等<sup>[6]</sup>的试验表明,加入2 ml的 $\beta$ -内酰胺酶联合薄膜过滤法可达到试验的要求。下一步可试验探讨对于头孢克洛干混悬剂 $\beta$ -内酰胺酶的最佳加入量。

本试验建立了头孢克洛干混悬剂的微生物限度检查方法:平皿法测定霉菌和酵母菌数;薄膜过滤法(即加入稀释剂400 ml,每次100 ml进行冲洗)测定细菌数;用薄膜过滤的同时

加入2 ml  $\beta$ -内酰胺酶的方法可进行控制菌检查。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 桑国卫.中国药品检验标准操作规范[S].2005年版.北京:中国医药科技出版社,2005:325.
- [3] 刘鹏,戴翠,马仕洪,等. $\beta$ -内酰胺类抗生素口服制剂微生物限度检查方法的建立[J].药物分析杂志,2004,30(4):673.
- [4] 韦曦,邱双成,王翠荣.29种医院制剂微生物限度检查方法验证[J].中国药房,2008,19(1):52.
- [5] 李近磊,王嘉怡,迟丹怡,等.复方克林霉素凝胶微生物限度检查法的方法验证研究[J].中国药房,2010,21(25):2680.
- [6] 钱文静,蔡美明.酶处理与薄膜过滤联合应用于 $\beta$ -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.
- [7] 苏德模,马绪荣.药品微生物学检查技术[M].北京:华龄出版社,2007:265.

(收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-02-08)

\*药师,硕士。研究方向:医院药学。E-mail:zimengwenxin@126.com

#通信作者:副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:医院药学。电话:023-68754462。E-mail:zwmcy@163.com