

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)12-0095-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.12.017



6种头孢菌素类药品微生物限度适用性考察*

庄彩静, 符策奕[△]

(海南省检验检测研究院, 海南 海口 570216)

摘要:目的 建立6种第1-3代不同剂型的头孢菌素类药品微生物限度检查法。方法 根据头孢羟氨苄片、头孢丙烯干混悬剂、头孢克洛干混悬剂、头孢克肟胶囊、头孢地尼胶囊、头孢托仑匹酯颗粒的理化性质和抗菌活性,按2025年版《中国药典(四部)》通则方法,分别采用薄膜过滤法、薄膜过滤法联合中和法、平皿法及中和法的微生物限度方法进行适用性试验。结果 6种制剂的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉回收比均在0.87~1.20范围内;控制菌适用性试验中试验组和阳性对照组均能检出大肠埃希菌,供试品溶液组和阴性对照组均未检出该菌。结论 所建立的方法适用于6种头孢菌素类药品的微生物限度检查,可有效解决假阴性及难过滤的问题。

关键词: 头孢菌素酶; 头孢菌素; 薄膜过滤法; 微生物限度检查

Examination of Suitability for Microbial Limit Testing of Six Cephalosporin Drugs

ZHUANG Caijing, FU Ceyi[△]

(Hainan Institute for Inspection and Testing, Haikou, Hainan 570216, China)

Abstract: Objective To establish microbial limit testing methods for six different dosage forms of first - to third - generation cephalosporin drugs. **Methods** Based on the physicochemical properties and antibacterial activities of Cefadroxil Tablets, Cefprozil for Suspension, Cefaclor for Suspension, Cefixime Capsules, Cefdinir Capsules, and Cefditoren Pivoxil Granules, and following the general rule of the *Chinese Pharmacopoeia* (Volume IV, 2025 edition), suitability tests were conducted for microbial limit methods using membrane filtration method, membrane filtration combined with neutralization method, pour plate method, and neutralization method. **Results** The recovery ratios of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger* for six preparations ranged from 0.87 to 1.20. *Escherichia coli* was detected in both the test group and the positive control group in the suitability tests for specified microorganisms, while no such microorganism was detected in the test solution group or the negative control group. **Conclusion** The established methods are suitable for the microbial limit testing of the six cephalosporin drugs, effectively resolving issues of false negatives and filtration difficulty.

Key words: cephalosporinase; cephalosporins; membrane filtration; microbial limit testing

头孢菌素是临床广泛使用的抗菌药物,抗菌谱涵盖了革兰阳性菌、革兰阴性菌及部分厌氧菌,能有效应对多种细菌感染性疾病,其口服剂型包括片剂、胶囊、干混悬剂、颗粒等^[1]。头孢菌素类药品进行微生物限度检查时,受自身抑菌活性影响,可能会掩盖药物真实染菌情况,干扰检查结果的准确性^[2-7]。此外,不同代数头孢菌素因结构差异对不同细菌活性的影响不同,第1代的头孢羟氨苄片,主要对革兰阳性菌展现出较强的抗菌活性;第2代的头孢丙烯干混悬剂、头孢克洛干混悬剂,不仅保留了对革兰阳性菌的作用,还显著增强了对革兰阴性菌的抗菌能力;第3代的头孢克肟胶囊、头孢地尼胶囊、头孢托仑匹酯颗粒,对革兰阴性菌的抗菌活性进一步提升,且对多种 β -内酰胺酶更稳定^[1,8]。因此不同代数的头孢菌素对微生物限度检查方法干扰类型、范围和强度均存在差异。微生物限度检查时针对抑

菌活性强的药物常使用表面活性剂中和或酶解的方式来消除或减弱药物抑菌性^[9-11]。头孢菌素酶是一种 β -内酰胺酶,能特异性水解头孢菌素的 β -内酰胺环,使药物失去抗菌活性,因此将其应用于微生物限度检查时可消除或减弱头孢菌素对微生物计数结果的影响,提高检查准确性^[12-14]。受药物抑菌能力影响,头孢菌素酶在不同头孢菌素中的使用效果存在差异。本研究拟通过建立6种第1-3代不同剂型头孢菌素类药品微生物限度检查法,探讨不同头孢菌素酶的应用和检查方法的差异。现报道如下。

1 仪器、试药与菌种

仪器:FLS-1000型立式压力蒸汽灭菌器(日本TOMY公司);LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);BSC-1300IIA2型、BSC-1300IIB2型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);PTC-6型

*基金项目:海南省自然科学基金[821MS0816]。

第一作者:庄彩静,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品、化妆品微生物检验,(电子信箱)caijing0709@126.com。

[△]通信作者:符策奕,男,硕士研究生,副主任技师,研究方向为药品、化妆品检验,(电子信箱)525397907@qq.com。

超级恒温水浴锅(山西海金沙科技有限公司);HTY - APL01型集菌仪(浙江泰林生物科技股份有限公司)。

试剂:头孢菌素酶(杭州北望生物技术有限公司,批号为7042431D,酶活性 ≥ 200 万单位/支);头孢羟氨苄片(企业A,批号为AY3221101,规格为每片含1g,编号A);头孢克洛干混悬剂(企业B,批号为TK220601,规格为每袋含0.125g,编号B);头孢丙烯干混悬剂(企业C,规格为每袋2.5g,批号为20240701,编号C);头孢克肟胶囊(企业D,批号为S0323051,规格为每粒含0.1g,编号D);头孢地尼胶囊(企业E,批号为20221001,规格为每粒含0.1g,编号E);头孢托仑匹酯颗粒(企业F,批号为20230402,规格为每袋含50mg,编号F);大豆卵磷脂(批号为240812B10),pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(PB,批号为240604K10),胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为240822A10),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为240628A10),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为240725A20),均购自广东环凯生物技术有限公司;0.1%蛋白胨水溶液(PW,批号为230925A40),麦康凯液体培养基(MCB,批号为240702),麦康凯琼脂培养基(MCA,批号为230302),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA,批号为220610),均购自北京三药科技有限公司;聚山梨酯80(西陇科学股份有限公司,批号为240130A1);氯化钠(广东光华科技股份有限公司,批号为2020321)。

菌种:金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均购自中国食品药品检定研究院。黑曲霉试验用菌株为第3代,其余5种试验用菌株均为第4代。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

菌液:按2025年版《中国药典(四部)》通则方法^[15],取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌各适量,置TSB中,30~35℃下培养18~24h;取白色念珠菌适量,置SDA中,20~25℃下培养2d;将上述培养物分别用0.9%无菌氯化钠溶液制成 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^4$ CFU/mL和 ≤ 100 CFU/mL的菌液。取黑曲霉适量,置PDA中,20~25℃下培养5d,加入含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱至无菌试管中,以含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^4$ CFU/mL和 ≤ 100 CFU/mL的菌液。大肠埃希菌制备成 ≤ 100 CFU/mL的菌液。

供试品溶液:取样品A、B、C各10g,置250mL无菌锥形瓶中,分别加入PB至100mL;取样品D和E各

10g,置250mL无菌锥形瓶中,分别加入含0.5%聚山梨酯80的PB至100mL;取样品F10g,置250mL无菌锥形瓶中,加入含0.1%卵磷脂和0.5%聚山梨酯80的PB至100mL。均置40℃水浴中分散溶解,摇匀,静置5min,取上清液或将其倒入侧边带滤网的无菌均质袋中,取续滤液作为1:10(V/V)的供试品溶液A-F;取供试品溶液A、F各适量,加相应稀释液制成1:50(V/V)的供试品溶液A-1、F-1。

2.2 需氧菌总数计数方法适用性预试验

平皿法试验组:取供试品溶液A-1 9.9mL,各3份,各加入 $\leq 10^4$ CFU/mL的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的菌液各0.1mL,混匀,取1.0mL,加入无菌平皿中,注入15~20mL温度不超过45℃熔化的TSA,混匀,凝固,33.5℃下倒置培养不超过3d,逐日观察。

预混菌再过滤法试验组:分别取供试品溶液A-B 9.9mL,各3份,各加入 $\leq 10^4$ CFU/mL的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的菌液各0.1mL,混匀,取1.0mL,分别加入含20mL PW的薄膜过滤器中,过滤,用100mL PW冲洗(重复3次),滤干,取出滤膜,取出滤膜菌面朝上贴于TSA平板上,33.5℃下倒置培养不超过3d,逐日观察。

薄膜过滤法试验组:分别取供试品溶液A-D 1.0mL,各加入含20mL PB/PW的薄膜过滤器中,过滤,各用100mL冲洗液冲洗滤膜(分别重复2,3,4,5次),并在最后一次冲洗液中加入1.0mL ≤ 100 CFU/mL的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌的菌液,滤干,取出滤膜,取出滤膜菌面朝上贴于TSA平板上,33.5℃下倒置培养不超过3d,逐日观察。

薄膜过滤法联合中和法试验组:分别取供试品溶液A-F/F-1 10mL,加入10万、20万、40万、100万、120万、150万、200万单位的头孢菌素酶,反应15min/30min,取1.0mL,分别加入含20mL的pH 7.0 PB/PW的薄膜过滤器中,过滤,各用100mL冲洗液冲洗滤膜(分别重复2,3,4,5,6,8次),并在最后一次冲洗液中加入1.0mL ≤ 100 CFU/mL的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的菌液,滤干,取出滤膜,取出滤膜菌面朝上贴于TSA平板上,33.5℃下倒置培养不超过3d,逐日观察。

结果:金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌预试验结果见表1。可见,最适方法为取供试品A-E及F-1进行后续试验。除供试品A采用薄膜过滤法外,其余均需采用薄膜过滤法联合中和法。当供试品液A冲洗量为300mL;供试品B添加40万单位头孢菌素酶(冲洗量400mL);供试品C和供试品D添加20万单位头孢菌素酶(冲洗量300mL);供试品E添加150万单位头孢菌素酶(冲洗量600mL);供试品溶液F-1添加100万单

表1 需氧菌总数计数预试验结果 (n = 3)

Tab. 1 Preliminary test results for total aerobic microbial count (n = 3)

供试品 编号	方法	稀释级	加酶量 ($\times 10^4$ U / mL)	反应时间 (min)	冲洗量 (mL)	回收比			冲洗液	过滤器 材质
						金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌		
A	平皿法	1:50				0	0	0.93		
	预混菌再过滤法	1:10			300	1.05	0.81	0.92	PW	MCE
	薄膜过滤法	1:10			200	0.42	0.53	0.96	PW	MCE
					300	1.00	0.91	1.10	PW	MCE
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	1.0	30	200	1.10	1.00	1.09	PW	MCE
					300	1.10	1.10	1.02	PW	MCE
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	30	200	0.92	0.95	0.91	PW	MCE
				300	1.10	0.94	0.95	PW	MCE	
B	预混菌再过滤法	1:10			300	0	0	0.97	PW	MCE
	薄膜过滤法	1:10			300	0	0	1.10	PW	MCE
					400	0	0	0.97	PW	MCE
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	30	400	0.57	0.75	0.96	PW	MCE
		1:10	4.0	30	400	1.00	1.20	0.94	PW	MCE
		1:10	4.0	15	400	1.20	1.00	0.89	PW	MCE
		1:10	4.0	30	400	0.87	0.91	0.90	PW	MCE
C	薄膜过滤法	1:10			400	0	1.20	0.60	PB	MCE
		1:10	2.0	30	300	1.00	0.94	0.90	PB	MCE
					400	0.93	1.20	0.98	PB	MCE
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	15	300	1.00	1.10	0.88	PB	MCE
		1:10	2.0	30	300	0.96	1.10	0.89	PB	MCE
		1:10	4.0	30	300	0.94	1.10	0.89	PB	MCE
		1:10	4.0	30	400	0.98	1.10	0.81	PB	MCE
D	薄膜过滤法	1:10			400	0.61	0.94	0.83	PB	MCE
		1:10			500	1.00	1.10	0.86	PB	MCE
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	30	200	0.32	0.38	0.77	PB	MCE
		1:10	2.0	30	300	1.10	1.00	0.88	PB	MCE
		1:10	2.0	15	300	0.89	0.88	0.85	PB	MCE
		1:10	2.0	30	300	1.01	0.89	0.89	PB	MCE
		1:10	4.0	30	200	0.87	1.07	0.88	PB	MCE
E	薄膜过滤法联合中和法	1:10	12.0	30	400	0.02	0.38	0.89	PW	MCE
		1:10			600	0.58	0.80	0.95	PW	MCE
		1:10	15.0	30	400	0.54	0.86	0.98	PW	MCE
		1:10			600	1.00	1.00	1.10	PW	MCE
		1:10	15.00	15	600	1.10	0.92	1.20	PW	MCE
		1:10	15.00	30	600	0.95	0.92	1.10	PW	MCE
		1:10	20.00	30	300	0.94	0.97	0.96	PW	MCE
		1:10	20.00	30	400	0.93	1.20	1.10	PW	MCE
F	薄膜过滤法联合中和法	1:10	10.00	30	800	0	0.06		PB	MCE
		1:10				0.04	0.75		Δ	MCE
		1:10	15.00	30	800	0.03	0.27		PB	MCE
		1:10				0.25	1.00		Δ	MCE
		1:10	20.00	30	600	0	0.34		PB	MCE
		1:10				0.54	0.74		Δ	MCE

续表1 需氧菌总数计数预试验结果($n = 3$)

continued Tab.1 Preliminary test results for total aerobic microbial count ($n = 3$)

供试品 编号	方法	稀释级	加酶量 ($\times 10^4$ U / mL)	反应时间 (min)	冲洗量 (mL)	回收比			冲洗液	过滤器 材质
						金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌		
		1:10	20.00	30	600	0.75	0.63		Δ	N66
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	200	30	600	0	0.87	0.73	PW	MCE
		1:10	200	30	800	0	0.88	0.75	PW	MCE
		1:50	100	30	400	1.00	1.00	0.99	PW	MCE
		1:50	100	30	600	1.10	0.94	0.94	PW	MCE
		1:50	100	15	400	0.91	1.20	0.92	PW	MCE
		1:50	100	30	400	1.00	0.93	1.10	PW	MCE
		1:100	100	30	600	1.02	0.88	1.10	PW	MCE

注: Δ 为含0.1%卵磷脂和0.5%吐温80的pH 7.0无菌PB;MCE为亲水性混合纤维素酯滤膜;N66为尼龙66膜。

Note: Δ indicates sterile pH 7.0 sodium chloride - peptone buffer containing 0.1% lecithin and 0.5% Tween 80;MCE indicates hydrophilic mixed cellulose ester membrane;N66 indicates nylon 66 membrane.

位头孢菌素酶(冲洗量400 mL)时,需氧菌总数计数回收比均在0.87~1.20范围内,效果适宜。

2.3 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性预试验

由于头孢菌素对霉菌和酵母菌抑菌作用不明显,因此采用平皿法对霉菌和酵母菌总数进行预试验。

试验组:分别取供试品溶液A-F 9.9 mL,各2份,各加入0.1 mL $\leq 10^4$ CFU / mL的白色念珠菌液和黑曲霉孢子液,混匀,吸取2.0 mL,注入含温度 ≤ 45 °CSDA的平皿中,冷凝,于23.5 °C倒置培养,不超过5 d,逐日观察。

供试品溶液组:以供试品溶液代替菌液,其余操作同试验组。

阴性对照组:以稀释液代替供试品溶液和菌液,其余操作同试验组。

菌液对照组:以稀释液代替供试品溶液,其余操作同试验组。

结果:霉菌和黑曲霉预试验回收比见表2。可知,最适方法为供试品溶液A-F的霉菌和酵母菌总数均采用平皿法进行后续试验,计数回收比均在0.89~1.10范围,符合《中国药典》规定。

2.4 控制菌(大肠埃希菌)适用性预试验

培养基稀释法联合中和法试验组:取头孢菌素酶适量,分别置含10 mL供试品溶液A-F中,接种至TSB中,各加入1.0 mL ≤ 100 CFU / mL的大肠埃希菌液,混匀,33.5 °C下培养18~24 h,取1 mL,置100 mL MCB

表2 霉菌和酵母菌总数计数预试验结果($n = 2$)

Tab.2 Preliminary test results for total combined yeasts and molds count ($n = 2$)

供试品编号	白色念珠菌	黑曲霉	供试品编号	白色念珠菌	黑曲霉
A	1.10	0.99	D	1.00	0.92
B	0.96	1.00	E	0.97	1.10
C	1.10	1.10	F	0.98	1.10

中,43.0 °C下培养24~48 h。取培养物划线接种于MCA上,33.5 °C下培养18~72 h,逐日观察。

薄膜过滤法或薄膜过滤法联合中和法试验组:分别取供试品溶液A-F 10 mL,加入含50 mL的PB/PW的薄膜过滤器中,混匀,过滤,冲洗滤膜,在最后一次冲洗液中加入1.0 mL ≤ 100 CFU / mL的大肠埃希菌液,取出滤膜,接种至100 mL的TSB或含适量头孢菌素酶的TSB中,混匀,33.5 °C下培养18~24 h,取1 mL,置100 mL MCB中,43.0 °C下培养24~48 h。取培养物划线接种于MCA上,33.5 °C下培养18~72 h,逐日观察。

按2.3项下方法制备供试品溶液组、阴性对照组及阳性对照组,按2.4方法检查大肠埃希菌。

结果:控制菌方法适用性预试验结果见表3。可见,最适方法为供试品A-F均取10 mL,均以TSB(100 mL)培养。供试品A采用薄膜过滤法,冲洗量为200 mL;供试品B、C均采用直接法(中和法),添加20万单位的头孢菌素酶;供试品D-F均采用薄膜过滤法联合中和法,供试品D添加20万单位的头孢菌素酶(冲洗量300 mL),供试品E添加80万单位的头孢菌素酶(冲洗量200 mL),供试品F添加50万单位的头孢菌素酶(冲洗量200 mL),结果试验组均检出阳性菌,符合《中国药典》规定。

2.5 验证试验

根据上述结果确定的最适方法重复进行3次独立实验,回收率均符合《中国药典》要求,方法可行。结果见表4至表6。

由表4可见,供试品A-E稀释级为1:10,供试品F稀释级为1:50,除供试品A采用薄膜过滤法外,其余均采用薄膜过滤法联合中和法。当供试品A冲洗量为300 mL;供试品B添加40万单位头孢菌素酶(冲洗量400 mL);供试品C和供试品D添加20万单位头孢菌素酶(冲洗量300 mL);供试品E添加150万单位头孢菌素

表3 控制菌方法适用性预试验结果(试验组/阳性对照组/供试品溶液组/阴性对照组)

Tab. 3 Preliminary test results for the suitability of specified microorganism testing methods (test group / positive reference group / test solution group / negative reference group)

供试品编号	TSB体积(mL)	加酶量($\times 10^4$ U/mL)	冲洗量(mL)	方法	结果	供试品编号	TSB体积(mL)	加酶量($\times 10^4$ U/mL)	冲洗量(mL)	方法	结果
A	100		200	薄膜过滤法	+ / + / - / -	E	100		300	薄膜过滤法	- / + / - / -
		1.0		直接法(中和法)	- / + / - / -			2.0	300	薄膜过滤法联合中和法	+ / + / - / -
		5.0			- / + / - / -			8.0	200	薄膜过滤法联合中和法	+ / + / - / -
B	100	1.0		直接法(中和法)	+ / + / - / -	10.0	200				+ / + / - / -
		2.0			+ / + / - / -	200	15.0		直接法(中和法)		- / + / - / -
		4.0			+ / + / - / -	300	10.0				- / + / - / -
C	100	1.0		直接法(中和法)	- / + / - / -	300	30.0				- / + / - / -
		2.0			+ / + / - / -	500	25.0				+ / + / - / -
		4.0			+ / + / - / -	F	100	5.0	200	薄膜过滤法联合中和法	+ / + / - / -
	400	薄膜过滤法	+ / + / - / -	200	5.0			薄膜过滤法联合中和法	+ / + / - / -		
D	100	10.0		直接法(中和法)	- / + / - / -		200	5.0		直接法(中和法)	+ / + / - / -
	200	15.0			- / + / - / -		8.0			+ / + / - / -	
	300	15.0			- / + / - / -		10.0			+ / + / - / -	
	500	10.0			- / + / - / -	300	3.0		直接法(中和法)	+ / + / - / -	

注: + 为试验菌生长良好; - 为无菌生长。表6同。

Note: + indicates good growth of the test microorganism; - indicates no microorganism growth(for Tab. 3 and Tab. 6).

表4 需氧菌总数方法适用性试验结果

Tab. 4 Suitability test results for total aerobic microbial count

供试品编号	方法	稀释级	加酶量($\times 10^4$ U/mL)	反应时间(min)	冲洗量(mL)	回收比														
						金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌			铜绿假单胞菌			白色念珠菌			黑曲霉		
						1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	薄膜过滤法	1:10			300	0.96	0.89	0.91	0.93	0.95	0.90	0.95	1.1	0.92	1.00	0.95	1.10	0.99	0.94	0.97
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	1.0	30	200	0.93	0.98	0.95	0.90	0.91	0.93	0.91	0.88	0.94	1.10	0.96	1.00	0.93	0.89	0.96
B	薄膜过滤法联合中和法	1:10	4.0	30	400	0.98	1.10	0.89	0.92	0.89	0.92	0.93	0.92	0.89	0.95	0.91	0.88	1.10	0.89	0.88
C	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	30	300	0.94	1.00	0.98	0.95	1.10	0.96	0.99	0.87	0.89	0.89	0.95	0.94	1.10	0.94	0.95
D	薄膜过滤法	1:10			500	1.00	0.92	0.89	1.10	0.98	0.95	0.96	0.87	0.88	0.98	0.95	0.93	0.98	0.98	0.96
	薄膜过滤法联合中和法	1:10	2.0	30	300	0.95	0.90	1.00	0.98	0.92	0.94	0.88	0.92	0.95	0.93	0.97	0.96	0.95	0.99	0.97
E	薄膜过滤法联合中和法	1:10	15.0	30	600	0.97	1.00	0.99	0.99	0.93	0.97	0.95	1.10	0.99	0.96	0.89	0.91	1.20	1.10	0.96
F	薄膜过滤法联合中和法	1:50	10.0	30	400	1.00	0.91	0.96	0.94	0.88	0.92	0.98	0.97	0.95	0.95	0.97	0.93	0.92	1.10	0.96

表5 霉菌和酵母菌总数方法适用性试验结果

Tab. 5 Suitability test results for total combined yeasts and moulds count

供试品编号	方法	稀释级	回收比					
			白色念珠菌			黑曲霉		
			1	2	3	1	2	3
A	平皿法	1:10	0.92	0.97	0.95	0.99	1.10	0.90
B		1:10	0.96	0.99	0.93	1.00	0.89	0.91
C		1:10	1.10	0.96	0.93	1.10	0.92	0.95
D		1:10	1.00	0.91	0.98	0.92	0.97	0.96
E		1:10	0.97	0.96	0.94	1.10	0.90	0.98
F		1:10	0.98	0.93	0.99	0.89	0.94	0.95

酶(冲洗量 600 mL);供试品 F 添加 100 万单位头孢菌素酶(冲洗量 400 mL)时,需氧菌总数计数回收比均在 0.87~1.20 范围内,效果适宜。

表6 控制菌方法适用性试验结果

Tab. 6 Suitability test results for specified microorganism testing methods

供试品编号	TSB体积(mL)	加酶量(万单位/10 mL)	冲洗量(mL)	检测方法	试验组	阳性对照组	供试品溶液组	阴性对照组
A	100		200	薄膜过滤法	+	+	-	-
B	100	20		直接法(中和法)	+	+	-	-
C	100	20		直接法(中和法)	+	+	-	-
D	100		400	薄膜过滤法	+	+	-	-
	100	20	300	薄膜过滤法联合中和法	+	+	-	-
E	100	80	200	薄膜过滤法联合中和法	+	+	-	-
	500	250		直接法(中和法)	+	+	-	-
F	100	50	200	薄膜过滤法联合中和法	+	+	-	-
	200	50		直接法(中和法)	+	+	-	-
	300	30		直接法(中和法)	+	+	-	-

由表5可见,供试品A-F稀释级为1:10,采用平皿法。霉菌和酵母菌总数计数回收比均在0.89~1.10范围内。

由表6可见,供试品A采用薄膜过滤法(稀释级为1:10),冲洗量200 mL,TSB体积100 mL;供试品B和供试品C采用直接法(中和法),TSB(100 mL)中添加20万单位的头孢菌素酶;供试品D-F均采用薄膜过滤法联合中和法,供试品D的TSB(100 mL)中添加20万单位的头孢菌素酶(冲洗量300 mL);供试品E的冲洗量为TSB(100 mL)中添加80万单位的头孢菌素酶(冲洗量200 mL);供试品F的TSB(100 mL)中添加50万单位的头孢菌素酶(冲洗量200 mL),结果试验组和阳性对照组均检出大肠埃希菌,供试品溶液组和阴性对照组均未检出该菌。

3 讨论

本研究针对6种第1-3代口服头孢菌素类药物的微生物限度检查方法进行系统优化,围绕稀释液、滤膜、酶解时间、加菌方式、冲洗量及头孢菌素酶用量等关键条件开展对比考察,为该类药物微生物限度检查方法的建立提供科学依据。

在稀释液与滤膜选择上,第1代的头孢羟氨苄及第2代的头孢克洛、头孢丙烯抗菌活性较弱、溶解性较好,采用PB即可满足试验需求^[13]。第3代的头孢克肟、头孢地尼溶解度低且抗菌活性强,在上述缓冲液中添加0.5%聚山梨酯80可改善溶解性并消除部分抑菌作用^[12-14];头孢托仑匹酯结构复杂、疏水性强,在上述缓冲液中联用0.1%大豆卵磷脂与0.5%聚山梨酯80可提升分散性与酶解效果^[5,12-14]。滤膜筛选结果显示,MCE与N66对头孢托仑匹酯颗粒回收比相近,鉴于成本因素选用MCE。控制菌检查时,将冲洗液温度控制在40℃左右可减轻堵膜现象,提高过滤效率^[15-16]。

酶解时间考察表明,供试品A-C、供试品E在15 min与30 min酶解反应条件下回收比无明显差异,而供试品D、F在30 min时结果更优,因此统一采用30 min作为酶解反应时间。以供试品A-B为考察对象,对加菌方式进行考察,结果显示,预混菌后过滤仅适用于抗菌活性较弱的第1代头孢,对第2代及以上头孢适用性较差,因此后续试验均采用末次冲洗液加菌的方式进行方法适用性试验^[17-18]。

冲洗量与头孢菌素酶用量是消除头孢类药物抑菌活性的关键因素。随着药物代际升高,抗菌活性与结构复杂度增加,对试验菌抑制作用增强,所需酶用量与冲洗量需同步增加,才能有效消除抑菌干扰,保证微生物计数结果准确可靠。

当前部分企业在头孢菌素类药品微生物限度检查研究中仍存在供试液堵膜、酶解不完全、酶过量使用及盲目提高稀释级等问题,反映出方法研究的科学性与

合理性有待提升。本研究明确了不同代际头孢药物在微生物限度检查中的关键影响因素与优化方向,可为建立规范、适用的微生物限度检查方法提供技术参考,助力提升头孢菌素类药品质量控制水平。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知(化学药和生物制品卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1.
- [2] 胡昌勤. 药品微生物控制体系建设现状与展望[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(5): 513-519.
- [3] 张琳, 杨倩, 刘海玲, 等. 头孢地尼口服固体制剂的质量分析与评价[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(3): 267-275.
- [4] 简敏骞, 张景森, 曾敏珊. 头孢妥仑匹酯片微生物限度检查方法的研究[J]. 中国药品标准, 2021, 22(1): 80-83.
- [5] 李伟, 鲁瑞娟, 曹晓云. 盐酸头孢卡品酯颗粒微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. 天津药学, 2023, 35(1): 10-13.
- [6] 杨丽, 赖焯才, 伍双茜, 等. 头孢克肟片微生物限度检查方法研究[J]. 中国医药科学, 2023, 13(3): 71-74.
- [7] 陶明, 杨淑光, 周艳梅. 进口与国产头孢克洛干混悬剂的微生物限度检查方法及影响因素分析[J]. 中国药物评价, 2019, 36(6): 423-426.
- [8] 孙样, 王宇驰, 张春然, 等. 头孢菌素类抗生素的发现与发展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2014, 35(4): 154-158.
- [9] 张丹, 卫延明, 杨静, 等. 头孢地尼胶囊微生物限度检查方法的验证[J]. 安徽医药, 2012, 16(3): 304-306.
- [10] 何军芳, 彭欢, 任党培, 等. 盐酸头孢他美酯原料药微生物限度检查方法研究[J]. 精细化工中间体, 2021, 51(2): 46-49.
- [11] 王凯, 董子阳, 张敏, 等. 头孢比罗对金黄色葡萄球菌抗菌活性及临床应用进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2025, 35(7): 1115-1120.
- [12] 姬俊, 刘婷婷, 牛萌萌, 等. 卵磷脂和聚山梨酯-80联用在中药制剂抑菌活性中的中和作用[J]. 中国药师, 2017, 20(3): 586-588.
- [13] 张光华, 余立. 聚山梨酯80和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1127-1130.
- [14] 李翠, 闵红, 谢毓华, 等. 莫匹罗星软膏微生物限度检查方法适用性研究及水分活度测定[J]. 中国药业, 2022, 31(5): 76-79.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2025: 231-242.
- [16] 庄彩静, 符策奕, 王康俊, 等. 不同生产企业环吡酮胺乳膏微生物限度检查方法适用性研究[J]. 工业微生物, 2025, 55(2): 68-72.
- [17] 马仕洪, 刘鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877-882.
- [18] 庞云娟, 刘康连, 梁晓玲, 等. 药品微生物限度检查方法适用性的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(8): 1285-1292.

(收稿日期:2025-05-23;修回日期:2025-12-27)