

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.012

# 恩替卡韦分散片微生物限度检查方法适用性研究\*

吴伟平, 陈宇堃, 黄丽华, 梁蔚阳<sup>△</sup>

(广东省药品检验所生物制品室·国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室·广东省药品监督管理局血液制品质量控制研究重点实验室, 广东 广州 510663)

**摘要:**目的 建立恩替卡韦分散片的微生物限度检查方法。方法 参照2015年版《中国药典》《药品微生物检验手册》和《中国药品检验标准操作规程》(2010版)记载的微生物限度检验方法检查恩替卡韦分散片微生物限度。结果 采用1:20的供试液进行试验,计数方法用平皿法(倾注法),各试验菌比值均在0.5~2.0内;控制菌用《中国药典》方法,各阳性试验菌均检出,阴性对照菌均无菌生长。结论 所建立的微生物限度检查方法可行,能有效检出该药品中污染存活的微生物。

**关键词:**恩替卡韦分散片;微生物限度检查法;适用性

中图分类号:R978.7;R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)03-0041-03

## Applicability of Microbial Limit Test Method for Entecavir Dispersible Tablets

WU Weiping, CHEN Yukun, HUANG Lihua, LIANG Weiyang

(Biological Products Office, Guangdong Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory of Quality Control of Blood Products · Key Laboratory of Quality Control and Research of Blood Products, Guangdong Medical Products Administration, Guangzhou, Guangdong, China 510663)

**Abstract: Objective** To establish a microbial limit test method for entecavir dispersible tablets. **Methods** The microbial limit verification test of entecavir dispersible tablets was established according to *Chinese Pharmacopoeia 2015*, *Microbial Inspection Manual of Drugs* and *Standard Operation of Chinese Drug Inspection 2010*. **Results** The test was carried out with the test solution of 1:20, and the counting method was the plate method (pouring method). The ratio of all test bacteria was within the range of 0.5-2.0. The control method was the *Chinese Pharmacopoeia* method; all positive test bacteria were detected, and all negative control bacteria grew aseptically. **Conclusion** The validated method of microbial limit test of entecavir dispersible tablets is feasible and can effectively detect the contaminated microorganisms in drugs.

**Key words:** entecavir dispersible tablets; microbial limit test; applicability

恩替卡韦是一种鸟嘌呤核苷类似物,对慢性乙型病毒多聚酶有强效抑制作用,抗慢性乙型病毒活性强<sup>[1-2]</sup>,是公认的抗病毒效果较强且耐药性低的药物。其于2005年被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于病毒复制活跃,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续升高或肝脏

组织学显示有活动性病变的慢性成人乙型肝炎的治疗<sup>[3]</sup>。恩替卡韦分散片具有崩解时间短、吸收快、生物利用度高等优势<sup>[4]</sup>,且价格较便宜,为患者广泛接受<sup>[5]</sup>。微生物限度检查是评价非终端灭菌制剂受微生物污染程度的有效方法<sup>[6]</sup>,是药品安全性检查的重要项目<sup>[7]</sup>。根据

\*基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目[B2018130、B2018220]。

第一作者:吴伟平,男,大学本科,初级药师,研究方向为药品微生物检验,(电子信箱)18926349@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者:梁蔚阳,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为生物制品评价与质量控制,(电子信箱)38770875@qq.com。

为研究骨碎补毛(鳞片)的保留情况对柚皮苷含量的影响程度,试验还考察了烫制前后骨碎补毛(鳞片)中柚皮苷的含量,结果表明,骨碎补毛(鳞片)中柚皮苷含量为根茎主体的10%左右,烫制后柚皮苷略有上升。因其质量占比较低,故骨碎补毛的保留程度对骨碎补毛烫后造成的影响可忽略不计。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:256.
- [2] 江丽霞,袁瑞娟. 骨碎补总黄酮促进骨膜细胞增殖及对兔骨不连的治疗作用[J]. 中国组织工程研究,2019,23(19):2953-2956.
- [3] 史岩,马秋野,喻一东,等. 骨碎补总黄酮促进骨质疏松性骨折愈合中参与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的初步研究[J].

中医药学报,2018,46(2):49-52.

- [4] 黄晶. 中药骨碎补真伪鉴别与质量控制研究[D]. 长沙:湖南师范大学,2017.
- [5] 欧琴华,欧阳荣. 骨碎补炮制前后所含柚皮苷含量的变化[J]. 国际医药卫生导报,2003,9(8):103-104.
- [6] 杨海玲,吴丽丹,谢鹏,等. UPLC法比较骨碎补不同炮制品中柚皮苷、5-羟甲基糠醛含量[J]. 中药材,2016,39(11):2509-2512.
- [7] 封传华,李刚,张静,等. 烫骨碎补中总黄酮及柚皮苷的含量测定[J]. 中国药业,2016,25(1):63-65.
- [8] 马才敬,方谨,李玲玲,等. 炮制骨碎补的提取及其柚皮苷的纯化研究[J]. 中国药业,2012,21(2):43-44.
- [9] 刘瑞连,杨莹,蒋孟良. 不同炮制法对柚皮苷含量影响的研究[J]. 中南药学,2010,8(5):367-370.

(收稿日期:2019-06-03;修回日期:2019-08-15)

2015年版《中国药典(四部)》要求,供试品检查时,应根据供试品理化特性和微生物限度标准等因素选择计数方法和控制菌检查,所选方法的适用性须经确认<sup>[8]</sup>。本研究中采用1:20的供试液进行平皿法(倾注法)对恩替卡韦分散片的微生物限度检查方法进行了适用性试验,以消除药品中抑菌成分及不溶性颗粒的干扰,并探讨该方法检出药品中污染存活的微生物数量的有效性。现报道如下。

## 1 试药、菌种与仪器

样品:恩替卡韦分散片,样品1(山东鲁抗医药股份有限公司,批号为170101,规格为每片0.5 mg);样品2(苏州东瑞制药有限公司,批号为160517105,规格为每片0.5 mg);样品3(安徽贝克生物制药有限公司,批号为167070058,规格为每片0.5 mg);样品4(海南中和药业股份有限公司,批号为20170101,规格为每片0.5 mg);样品5(正大天晴药业集团股份有限公司,批号为170209101,规格为每片0.5 mg);样品6(江西青峰药业有限公司,批号为20170111,规格为每片0.5 mg)。

菌种:大肠埃希菌[CMCC(B)44102],金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104],枯草芽孢杆菌[CMCC(B)26003],白色念珠菌[CMCC(F)98001],黑曲霉[CMCC(F)98003],均由中国食品药品检定研究院提供,均为第3代。

培养基:胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基(MAC),均由中国食品药品检定研究院提供,按使用说明配制,培养基适用性符合规定。

仪器:CL-40M型高压灭菌器(日本ALP株式会社);GRX-12A型干热消毒箱(上海森信实验仪器有限公司);LRH-250A型生化培养箱(广东省医疗器械厂);MIR-254-PC型恒温培养箱(松下健康医疗器械株式会社);BS323S型电子天平(赛多利斯公司,万分之一)。

## 2 方法与结果

### 2.1 计数方法适用性试验

#### 2.1.1 菌液制备

分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至TSB中,经32℃培养24 h后,培养物用无菌0.9%氯化钠溶液10倍稀释至每1 mL含菌数为不大于 $1 \times 10^4$  cfu的菌悬液,备用。接种白色念珠菌的新鲜培养物至SDB中,经23℃培养48 h后,培养物用无菌0.9%氯化钠溶液制成每1 mL含菌数为不大于 $1 \times 10^4$  cfu的菌悬液,备用。接种黑曲霉的新鲜培养物至SDA斜面培养基中,经23℃培养7 d后,加入5 mL含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液,

将孢子洗脱,吸出孢子悬液置无菌试管内,用含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液制成每1 mL含孢子数不大于 $1 \times 10^4$  cfu的孢子悬液。备用。

#### 2.1.2 供试液制备

称取样品10 g,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,混匀,作为1:10的供试液。取上述供试液50 mL,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL,作为1:20的供试液。

#### 2.1.3 回收比值测定

采用平皿法(倾注法)测定。

试验组:取含菌量不大于 $1 \times 10^4$  cfu/mL的菌悬液0.1 mL分别加至10.0 mL(1:10, 1:20)供试液中,混匀。取上述供试液1.0 mL,置直径为90 mm的平皿中,注入20 mL温度不超过45℃熔化的培养基(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌组倾注TSA,白色念珠菌、黑曲霉组倾注TSA和SDA 2种培养基),每株试验菌每种培养基分别平行制备2组平皿,混匀,凝固。TSA倒置于32℃培养箱培养3 d,SDA倒置于23℃培养箱培养5 d,观察培养结果,并计数。

供试品对照组:取供试液,以pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液,同试验组方法操作。

菌液对照组:取pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液替代供试液,按试验组方法操作加入试验菌液,并进行微生物回收试验。

计算方法:回收比值=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组平均菌落数。

#### 2.1.4 方法适用性试验结果

6个样品的平皿法(1:10供试液,1:20供试液)微生物限度检查计数方法适用性试验结果见表1。可见,供试品对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均有微弱的抑制作用,回收比值范围为0.5~2.0;对黑曲霉未表现出抑菌作用,回收比值均大于0.86。随着供试品浓度的稀释,供试品对5种代表菌株的抑制作用均有不同程度的减弱,回收比值增大,数值稳定。根据计数方法适用性试验结果,确定恩替卡韦分散片微生物限度检查法为需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数均采用1:20的供试品进行平皿法(倾注法)检查。

### 2.2 控制菌检查方法适用性试验

#### 2.2.1 检测依据

恩替卡韦分散片为口服给药制剂,按2015年版《中国药典(四部)》微生物限度要求,应对大肠埃希菌作控制菌检查。

#### 2.2.2 溶液制备

称取样品10 g,加pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至200 mL,混匀,作为1:20的供试液。接种大肠埃

表1 恩替卡韦分散片微生物检查回收比值(1:10供试液/1:20供试液)

组别	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6
金黄色葡萄球菌	0.80/0.94	0.87/0.91	0.77/0.89	0.82/1.04	0.75/1.11	0.84/0.98
铜绿假单胞菌	0.86/0.88	0.96/0.94	0.85/1.05	0.86/0.90	0.83/1.08	0.99/0.94
枯草芽孢杆菌	0.81/1.00	0.83/0.97	0.72/0.90	0.90/0.94	0.88/1.06	0.86/0.93
白色念珠菌(TSA)	0.59/0.87	0.74/0.95	0.89/0.98	0.68/0.91	0.88/1.03	0.75/0.87
黑曲霉(TSA)	0.96/0.91	0.92/0.92	0.96/0.96	0.89/0.95	0.88/0.99	1.03/0.90
白色念珠菌(SDA)	0.77/0.96	0.85/1.12	0.84/0.98	0.79/0.97	0.86/0.93	0.89/1.07
黑曲霉(SDA)	0.86/1.01	0.89/1.09	1.06/1.14	0.93/0.98	1.02/0.96	1.06/0.98

希菌的新鲜培养物至 TSB 中,经 32℃ 培养 24 h 后,培养物用无菌 0.9% 氯化钠溶液 10 倍稀释至每 1 mL 含菌数不大于  $1 \times 10^2$  cfu 的菌悬液,备用。

### 2.2.3 方法适用性试验与结果

试验组:取上述 1:20 供试液 20 mL 及含菌量为不大于  $1 \times 10^2$  cfu/mL 大肠埃希菌的菌悬液 1 mL 加至 200 mL TSB 中,32℃ 培养 24 h 后,取培养物 1 mL 接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中,43℃ 培养 48 h。取麦康凯液体培养物划线接种于 MAC 平板上,32℃ 培养 72 h。

供试品对照组:取制备好的供试液,以 pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液,同试验组方法操作。

菌液对照组:取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液替代供试液,同试验组方法操作。

结果见表 2。可见,6 个样品控制菌试验组与菌液对照组结果均为阳性(+),检出大肠埃希菌,供试品对照组均未检出,表明恩替卡韦分散片可按 2015 年版《中国药典(四部)》控制菌(大肠埃希菌)检查法行大肠埃希菌检查,经方法适用性试验成立。

表2 恩替卡韦分散片控制菌检查方法适用性试验结果

样品	试验组	菌液对照组	供试品对照组	样品	试验组	菌液对照组	供试品对照组
样品1	+	+	-	样品4	+	+	-
样品2	+	+	-	样品5	+	+	-
样品3	+	+	-	样品6	+	+	-

注:“+”为阳性,“-”为阴性。

### 3 讨论

微生物限度检查计数方法适用性试验与控制菌检查方法适用性试验是确认供试品在所采用检查方法和检验条件下,药物抑菌作用尽可能被降低甚至达到无抑菌作用,以保证供试品中被污染的微生物能被检出。具有抑菌成分的药物进行微生物限度检查时,要求供试品

本身在试验条件下有效排除其抑菌作用,使其不干扰染菌的限度检验,结果方属有效<sup>[9]</sup>。

当有几种计数方法回收比值同时达到 0.5~2.0 时,应综合考察结果的稳定性,操作的易行性及观察的直观性,采用风险系数最小的检查方法。

本试验中收集了市面上 6 个药品生产企业生产的恩替卡韦分散片,覆盖面广,有一定代表性。在试验中发现,制备 1:10 的恩替卡韦分散片溶液呈乳白色混悬液,存在不溶性白色颗粒物,对菌落的回收试验产生干扰。选取的 6 个企业生产的恩替卡韦分散片含量及溶出度均符合规定,但对细菌和酵母菌抑制力的不同,提示分散片不同的处方工艺对菌落可产生不同的抑制作用。将供试液进一步稀释成 1:20 时,不溶性颗粒物对菌落回收的干扰大幅减少,6 个企业生产的恩替卡韦分散片对细菌和酵母菌的抑制作用均大幅减少,回收比值趋于稳定,提示可通过提高供试液的稀释级来降低药品的抑菌作用。本试验中建立的恩替卡韦分散片微生物限度检查方法,采用平皿法(倾注法)能真实、准确、有效地反映药品中污染存活的微生物。

### 参考文献:

- [1] 张大维. 恩替卡韦治疗乙型肝炎病毒相关慢加急性肝功能衰竭的临床分析[J]. 中国现代药物应用,2016,10(2):135-136.
- [2] 马科. 恩替卡韦治疗乙型肝炎病毒相关慢加急性肝功能衰竭的临床研究[D]. 武汉:华中科技大学,2012.
- [3] TATSUO K, MASAMI S, HIDEHIRO K, et al. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B[J]. Int J Med Sei,2012,9(1):27-32.
- [4] 王海英,郭瑞衬. 国产与进口恩替卡韦的比较研究[J]. 药学研究,2014,33(2):100-102.
- [5] 李冬梅. 恩替卡韦分散片的制备及质量控制[D]. 张家口:河北北方学院,2013.
- [6] 李玉芹. 浅谈目前无菌检查和微生物限度检查存在的问题[J]. 中国药事,2007,21(12):1011-1012.
- [7] 许华玉,杜 鹃,汤 杨. 药品微生物污染检测方法验证的必要性[J]. 中国药品标准,2005,6(4):46.
- [8] 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,2015:140.
- [9] 黄依玲. 医药制剂微生物限度检查方法的重新验证[J]. 中国现代药物应用,2013,7(9):3-4.

(收稿日期:2019-07-15)

本栏目由  
**重庆赢英康医疗器械有限公司**  
协办