

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.014

# 阿法替尼和塞瑞替尼微生物限度检查方法验证

张光华,李玉立,刘文杰,牛振东,江志杰<sup>△</sup>

(北京市药品检验所中药成分分析与生物评价北京市重点实验室,北京 102206)

**摘要:**目的 建立并验证阿法替尼片和塞瑞替尼胶囊的微生物限度检查方法。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则1105,1106,1107项下方法进行微生物限度检查方法适用性试验,采用常规法和稀释法筛查药品的抑菌性,利用稀释和中和的原理改进供试液的制备,在稀释剂和培养基里添加3%吐温80和0.3%卵磷脂,消除药品的抑菌性。结果 稀释法和中和法联用消除了阿法替尼片和塞瑞替尼胶囊对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑菌作用,各试验菌的计数回收比值均在0.5~2.0范围内,控制菌阳性对照生长良好。结论 建立的微生物限度检查方法准确可行,可用于阿法替尼片和塞瑞替尼胶囊的质量控制,为口服替尼类抗癌药物的微生物限度检查提供了参考。

**关键词:**阿法替尼;塞瑞替尼;微生物限度;方法适用性试验;吐温80;卵磷脂

中图分类号:R917;R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0055-05

## Methodology Validation of Microbial Limit Test for Afatinib and Ceritinib

ZHANG Guanghua, LI Yuli, LIU Wenjie, NIU Zhendong, JIANG Zhijie

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

**Abstract: Objective** To establish and validate a method for microbial limit test of afatinib tablets and ceritinib capsules. **Methods** According to the General Chapters 1105, 1106 and 1107 of volume IV of Chinese Pharmacopoeia (Edition 2015), the methodology validation of microbial limit test method was conducted. The antibiotic effect of the drug was screened by conventional method and medium dilution method. Based on the principle of dilution and neutralization, 3% Tween-80 and 0.3% lecithin were added into the diluent and medium to eliminate the bacteriostatic effect of the drug. **Results** It showed that the combination of dilution method and neutralization method eliminated the bacteriostatic effect of afatinib tablets and ceritinib capsules against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*, and the counting recovery ratio of each test bacterium was in the range of 0.5-2.0. The validation test for specified microorganisms was positive. **Conclusion** An accurate and feasible microbial limit test method is established for afatinib tablets and ceritinib capsules by adding neutralizer, which can be used for the quality control of these products, and provide reference for the study of microbial limit test method for oral teicide anticancer drugs.

**Key words:** afatinib; ceritinib; microbial limits; methodology validation; Tween-80; lecithin

阿法替尼是新一代口服小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI),可关闭癌细胞信号通路、抑制肿瘤生长,主要用于非小细胞肺癌(NSCLC)的治疗。塞瑞替尼是间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂,用于一线治疗 ALK+转移性 NSCLC。2015年版《中国药典(四部)》通则1107<sup>[1]</sup>非无菌药品微生物限度标准规定,口服片剂、胶囊剂需氧菌总数不得超过 $10^3$  cfu/g,霉菌和酵母菌总数不得超过 $10^2$  cfu/g,1 g中不得检出大肠埃希菌。本研究中按照2015年版《中国药典(四部)》通则1105和通则1106<sup>[1]</sup>的要求,综合考虑消除抑菌性及简便易操作等因素,建立了适合阿法替尼片、塞瑞替尼胶囊的微生物限度检查

方法,并对3批产品进行方法适用性试验。现报道如下。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器

LRH-250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);XG1.DMXD-0.36型电热脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);1300SERIESA2型生物安全柜(Thermo Fisher Scientific公司);ML1602型电子天平(梅特勒公司,精度为0.01 g);SHKE 6000-1CE型恒温摇床(Thermo Scientific公司)。

#### 1.2 药品

阿法替尼片(S1,Boehringer Ingelheim Pharma GmbH

第一作者:张光华,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品的微生物检查方法,(电子信箱)zhangguanghua2014@126.com。

<sup>△</sup>通信作者:江志杰,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品的微生物检查方法,(电子信箱)jiangzhijie@126.com。

- [15] 王 燕,王 芸,孙文基. 气相色谱内标法同时测定土木香中土木香内酯、异土木香内酯的含量[J]. 武警医学院学报, 2010,19(7):527-529.
- [16] 王 真,周洪雷. 冠心苏合丸GC指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(1):79-81.

- [17] 丁旭光,回瑞华,侯冬岩,等. 气相色谱-质谱法分析冠心苏合丸中挥发性组分[J]. 质谱学报,2005,26(3):160-163.
- [18] 王世宇,彭 颖,夏厚林,等. 苏合香挥发性化学成分 GC-MS 研究[J]. 中国药房,2012,23(15):1392-1394.

(收稿日期:2020-01-13)

& Co. KG 公司, 批号分别为 202525U, 306342, 305921B, 编号分别为 1, 2, 3, 规格为每片 50 mg); 塞瑞替尼胶囊(S2, Novartis Pharma Stein AG 公司, 批号分别为 S0009D, S0011, S0010A, 编号分别为 1, 2, 3, 规格为每粒 150 mg)。

### 1.3 试验菌种

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*[CMCC(B)63501], 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*[CMCC(B)10104], 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*[CMCC(B)26003], 大肠埃希菌 *Escherichia coli*[CMCC(B)44102], 白色念珠菌 *Candida albicans*[CMCC(F)98001], 黑曲霉 *Aspergillus niger*[CMCC(F)98003], 均购自中国食品药品检定研究院, 菌株传代数为第 3 代。

### 1.4 培养基和试剂

胰酪大豆胨液体培养基(TSB), 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA), 沙氏葡萄糖液体培养基(SDB), 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA), 均购自美国 BD 公司; pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 麦康凯液体培养基, 麦康凯琼脂培养基, 均购自北京奥博星生物技术有限公司; 吐温 80 (国药集团化学试剂有限公司); 卵磷脂(Sigma 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

#### 2.1.1 菌液制备

按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1105<sup>[1]</sup>微生物计数法制备菌液。

#### 2.1.2 供试液制备

取供试品 S1 和 S2 各 10 g, 分别置 100 mL 锥形瓶中, 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至刻度, 充分振摇, 制成 1:10 的供试液 S1A 和 S2A。取 1:10 的供试液 1 mL, 置 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL 中, 即得 1:100 的供试液 S1A 和 S2A。

取供试品 S1 和 S2 各 10 g, 分别置 100 mL 锥形瓶中, 加入含有 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无

菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至刻度, 充分振摇, 制成 1:10 的供试液 S1B 和 S2B。取 1:10 的供试液 1 mL, 置含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL 中, 即得 1:100 的供试液 S1B 和 S2B。

### 2.2 培养基适用性检查

培养基均在验证合格的灭菌程序下灭菌, 按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1105<sup>[1]</sup>微生物计数法中培养基的适用性检查方法进行, 结果均符合要求。

### 2.3 微生物计数方法抑菌性筛查试验

#### 2.3.1 常规稀释剂 1:10 供试液和 1:100 供试液

菌液对照组: 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9.9 mL, 加入制备好的试验菌液 0.1 mL (细菌、酵母菌 500~1 000 cfu, 霉菌 300~600 cfu), 混匀, 使每 1 mL 稀释液中含菌量为 30~100 cfu。分别取上述菌悬液 1 mL 注入平皿中, 测定每 1 mL 的活菌数。

供试品对照组: 取 1:10 供试液 S1A 和 S2A 各 9.9 mL, 分别加入稀释剂 0.1 mL, 混匀, 取 1 mL 注入平皿中, 测定供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数。取 1:100 供试液 S1A 和 S2A 各 9.9 mL, 分别加入稀释剂 0.1 mL, 混匀, 取 1 mL 注入平皿中, 测定其需氧菌总数。

试验组: 取 1:10 的供试液 S1A 和 S2A 9.9 mL 各 5 份, 分别加入制备好的试验菌液 0.1 mL, 混匀, 取 1 mL 注入平皿中, 测定需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数。取 1:100 供试液 S1A 和 S2A 9.9 mL 各 5 份, 分别加入制备好的试验菌液 0.1 mL, 混匀, 取 1 mL 注入平皿中, 测定需氧菌总数。

检测方法: 需氧菌总数测定用 TSA, 置 33℃ 培养 5 d, 逐日观察结果; 霉菌和酵母菌总数测定用 SDA, 置 23℃ 培养 7 d, 逐日观察结果。

结果分析: 结果见表 1。可见, S1A 的微生物计数采用 1:10 和 1:100 供试液用平皿法检查, 枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收比值均为 0, 表明 S1A 的

表 1 S1A 和 S2A 微生物计数抑菌性筛查试验结果

| 菌种           | 菌液对照组<br>(cfu) | 供试品对照组(cfu) |       |      |       | 试验组(cfu) |       |      |       | 回收比值 |       |      |       |
|--------------|----------------|-------------|-------|------|-------|----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
|              |                | S1A         | S1A   | S2A  | S2A   | S1A      | S1A   | S2A  | S2A   | S1A  | S1A   | S2A  | S2A   |
|              |                | 1:10        | 1:100 | 1:10 | 1:100 | 1:10     | 1:100 | 1:10 | 1:100 | 1:10 | 1:100 | 1:10 | 1:100 |
| 枯草芽孢杆菌(TSA)  | 97             | 0           | 0     | 0    | 0     | 0        | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     |
| 铜绿假单胞菌(TSA)  | 53             | 0           | 0     | 0    | 0     | 29       | 51    | 30   | 39    | 0.55 | 0.96  | 0.56 | 0.73  |
| 金黄色葡萄球菌(TSA) | 106            | 0           | 0     | 0    | 0     | 0        | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     | 0    | 0     |
| 白色念珠菌(TSA)   | 70             | 0           | 0     | 0    | 0     | 73       | 71    | 0    | 10    | 1.04 | 1.01  | 0    | 0.14  |
| 黑曲霉(TSA)     | 54             | 0           | 0     | 0    | 0     | 53       | 51    | 39   | 49    | 0.98 | 0.94  | 0.72 | 0.91  |
| 白色念珠菌(SDA)   | 78             | 0           | -     | 0    | -     | 82       | -     | 0    | -     | 1.05 | -     | 0    | -     |
| 黑曲霉(SDA)     | 47             | 0           | -     | 0    | -     | 50       | -     | 37   | -     | 1.06 | -     | 0.79 | -     |

注: 表中数值为 2 个平行平皿的平均值;“-”表示不用做筛查试验。表 2 至表 4 同。

1:10和1:100供试液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有抑菌性,该方法不适合S1的需氧菌总数计数。S1A的1:10供试液白色念珠菌(SDA)和黑曲霉(SDA)的回收比值在0.5~2.0范围内,该方法适合S1的霉菌和酵母菌总数计数。S2A的微生物计数采用1:10和1:100供试液用平皿法检查,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收比值均为0,白色念珠菌的回收比值为0和0.14,表明S2A的1:10和1:100供试液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌有抑菌性,该方法不适合S2的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数。

### 2.3.2 稀释剂添加3%吐温80和0.3%卵磷脂

用于验证2.3.1项下回收比值小于0.5的供试液。

菌液对照组:同2.3.1项下菌液对照组。

供试品对照组:取1:10供试液S2B 9.9 mL,加入稀释剂0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定供试品的霉菌和酵母菌总数;取1:100供试液S1B和S2B 9.9 mL,分别加入稀释剂0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定供试品的需氧菌总数。

试验组:取1:10供试液S2B 9.9 mL,加入制备好的白色念珠菌试验菌液0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定霉菌和酵母菌总数;取1:100供试液S1B和S2B 9.9 mL各5份,分别加入制备好的试验菌液0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定需氧菌总数。

检测方法:需氧菌总数测定用TSA,置33℃培养5 d,逐日观察结果;霉菌和酵母菌总数测定用SDA,置23℃培养7 d,逐日观察结果。

结果分析:结果见表2。可见,S1B的需氧菌总数计数采用1:100供试液用平皿法检查,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收比值均在0.5~2.0范围内,表明

S1B的1:100供试液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌性已消除,该方法适合S1的需氧菌总数计数。S2B的需氧菌总数计数采用1:100供试液用平皿法检查,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收比值均小于0.5,表明S2B的1:100供试液对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有抑菌性,该方法不适合S2的需氧菌总数计数。S2B的霉菌和酵母菌数总数计数采用1:10供试液用平皿法检查,白色念珠菌的回收比值小于0.5,表明S2B的1:10供试液对白色念珠菌有抑菌性,该方法不适合S2的霉菌和酵母菌总数计数。

### 2.3.3 稀释剂和培养基均添加3%吐温80和0.3%卵磷脂

用于验证2.3.2项下回收比值小于0.5的供试液。

菌液对照组:同2.3.1项下菌液对照组。

供试品对照组:取1:10供试液S2B 9.9 mL,加入稀释剂0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定供试品的霉菌和酵母菌总数。取1:100供试液S2B 9.9 mL,加入稀释剂0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定供试品的需氧菌总数。

试验组:取1:10供试液S2B 9.9 mL,加入制备好的白色念珠菌试验菌液0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定霉菌和酵母菌总数。取1:100供试液S2B 9.9 mL各5份,分别加入制备好的试验菌液0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿中,测定需氧菌总数。

检测方法:需氧菌总数测定用含3%吐温80和0.3%卵磷脂的TSA,置33℃培养5 d,逐日观察结果;霉菌和酵母菌总数测定用含3%吐温80和0.3%卵磷脂的SDA,置23℃培养7 d,逐日观察结果。

测定结果:结果见表3。可见,S2B的需氧菌总数计

表2 S1B和S2B微生物计数抑菌性筛查试验结果

| 菌种           | 菌液对照组<br>(cfu) | 供试品对照组(cfu) |       |       | 试验组(cfu) |       |       | 回收比值 |       |       |
|--------------|----------------|-------------|-------|-------|----------|-------|-------|------|-------|-------|
|              |                | S2B         | S1B   | S2B   | S2B      | S1B   | S2B   | S2B  | S1B   | S2B   |
|              |                | 1:10        | 1:100 | 1:100 | 1:10     | 1:100 | 1:100 | 1:10 | 1:100 | 1:100 |
| 枯草芽孢杆菌(TSA)  | 52             | —           | 0     | 0     | —        | 46    | 6     | —    | 0.88  | 0.12  |
| 金黄色葡萄球菌(TSA) | 84             | —           | 0     | 0     | —        | 76    | 15    | —    | 0.90  | 0.18  |
| 白色念珠菌(TSA)   | 98             | —           | —     | 0     | —        | —     | 72    | —    | —     | 0.73  |
| 白色念珠菌(SDA)   | 102            | 0           | —     | —     | 49       | —     | —     | 0.48 | —     | —     |

表3 S2B微生物计数抑菌性筛查试验结果

| 菌种           | 菌液对照组<br>(cfu) | 供试品对照组(cfu) |       | 试验组(cfu) |       | 回收比值 |       |
|--------------|----------------|-------------|-------|----------|-------|------|-------|
|              |                | S2B         | S2B   | S2B      | S2B   | S2B  | S2B   |
|              |                | 1:10        | 1:100 | 1:10     | 1:100 | 1:10 | 1:100 |
| 枯草芽孢杆菌(TSA)  | 60             | —           | 0     | —        | 61    | —    | 1.02  |
| 金黄色葡萄球菌(TSA) | 87             | —           | 0     | —        | 94    | —    | 1.08  |
| 白色念珠菌(SDA)   | 73             | 0           | —     | 73       | —     | 1.00 | —     |

数采用 1 : 100 供试液用平皿法检查,培养基用含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 TSA,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收比值均在 0.5 ~ 2.0 范围内,表明 S2B 的 1 : 100 供试液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌性已消除,该方法适合 S2 的需氧菌总数计数。S2B 的霉菌和酵母菌数总数计数采用 1 : 10 供试液用平皿法检查,培养基用含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 SDA,白色念珠菌的回收比值在 0.5 ~ 2.0 范围内,表明 S2B 的 1 : 10 供试液对白色念珠菌的抑菌性已消除,该方法适合 S2 的霉菌和酵母菌总数计数。

#### 2.4 微生物计数方法适用性试验

菌液组:取 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液 9.9 mL,加入制备好的试验菌液 0.1 mL(细菌、酵母菌 500 ~ 1 000 cfu,霉菌 300 ~ 600 cfu),混匀,使每 1 mL 稀释液中含菌 30 ~ 100 cfu。分别取 1 mL 注入平皿,测定每 1 mL 的活菌数。

供试品对照组:取 S1B 和 S2B 的 1 : 100 供试液 9.9 mL,分别加入稀释剂 0.1 mL,混匀,取 1 mL 注入平皿,测定供试品的需氧菌总数;取 S1B 和 S2B 的 1 : 10 供试液 9.9 mL,加入稀释剂 0.1 mL,混匀,取 1 mL 注入平皿,测定其霉菌和酵母菌总数。

试验组:分别取 S1B 和 S2B 的 1 : 100 供试液 9.9 mL 各 5 份,加制备好的试验菌液 0.1 mL,混匀,取 1 mL 注入平皿,测定需氧菌总数。分别取 S1B 和 S2B 的 1 : 10 供试液 9.9 mL 各 2 份,加制备好的真菌菌液 0.1 mL,混匀,取 1 mL 注入平皿,测定霉菌和酵母菌数。

稀释剂对照组:分别取含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液 9.9 mL 5 份,加入制备好的试验菌液 0.1 mL(300 ~ 1 000 cfu),混匀,取 1 mL 注入平皿,测定每 1 mL 的活菌数。

添加中和剂的培养基对照组:分别取菌液组制备好的菌液 1 mL 注入平皿,测定需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数。

检测方法:上述已注入供试液的平皿,S1 需氧菌总数测定倾注 TSA,霉菌和酵母菌总数测定倾注 SDA。S2 及添加中和剂的培养基对照组,需氧菌总数测定倾注含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 TSA,霉菌和酵母菌总数测定倾注含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 SDA。需氧菌总数测定置 33 °C 培养 5 d,逐日观察结果;霉菌和酵母菌总数测定置 23 °C 培养 7 d,逐日观察结果。

结果分析:结果见表 4。可见,稀释剂对照组回收比值均在 0.5 ~ 2.0 范围内,表明含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液对微生物

表 4 S1 和 S2 微生物计数方法适用性试验结果(n = 3)

| 菌种           | 菌液对照组<br>(cfu) | 编号 | 供试品对照组(cfu) |    | 稀释剂<br>对照组<br>(cfu) | 试验组(cfu) |    | 加中和剂<br>培养基对<br>照组(cfu) | 回收比值 |      |            |                |
|--------------|----------------|----|-------------|----|---------------------|----------|----|-------------------------|------|------|------------|----------------|
|              |                |    | S1          | S2 |                     | S1       | S2 |                         | S1   | S2   | 稀释剂<br>对照组 | 加中和剂培<br>养基对照组 |
| 枯草芽孢杆菌(TSA)  | 66             | 1  | 0           | 0  | 64                  | 67       | 72 | 70                      | 1.02 | 1.09 | 0.97       | 1.06           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 66                  | 68       | 68 | 71                      | 1.03 | 1.03 | 1.00       | 1.08           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 65                  | 70       | 66 | 74                      | 1.06 | 1.00 | 0.98       | 1.12           |
| 铜绿假单胞菌(TSA)  | 53             | 1  | 0           | 0  | 66                  | 49       | 65 | 59                      | 0.92 | 1.23 | 1.24       | 1.11           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 64                  | 52       | 60 | 62                      | 0.98 | 1.13 | 1.21       | 1.17           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 62                  | 51       | 64 | 64                      | 0.96 | 1.21 | 1.17       | 1.21           |
| 金黄色葡萄球菌(TSA) | 50             | 1  | 0           | 0  | 62                  | 45       | 59 | 57                      | 0.90 | 1.18 | 1.24       | 1.14           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 59                  | 43       | 64 | 60                      | 0.86 | 1.28 | 1.18       | 1.20           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 64                  | 56       | 64 | 63                      | 1.12 | 1.28 | 1.28       | 1.26           |
| 白色念珠菌(TSA)   | 88             | 1  | 0           | 0  | 80                  | 90       | 82 | 89                      | 1.02 | 0.93 | 0.91       | 1.01           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 84                  | 84       | 79 | 87                      | 0.95 | 0.90 | 0.95       | 0.99           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 86                  | 87       | 79 | 89                      | 0.99 | 0.90 | 0.98       | 1.01           |
| 黑曲霉(TSA)     | 40             | 1  | 0           | 0  | 36                  | 44       | 40 | 48                      | 1.10 | 1.00 | 0.90       | 1.20           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 40                  | 47       | 39 | 43                      | 1.18 | 0.98 | 1.00       | 1.08           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 36                  | 41       | 36 | 44                      | 0.93 | 0.90 | 0.90       | 1.10           |
| 白色念珠菌(SDA)   | 82             | 1  | 0           | 0  | 76                  | 78       | 74 | 84                      | 0.95 | 0.90 | 0.93       | 1.02           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 78                  | 86       | 65 | 80                      | 1.05 | 0.79 | 0.95       | 0.98           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 84                  | 81       | 72 | 81                      | 0.99 | 0.88 | 1.02       | 0.99           |
| 黑曲霉(SDA)     | 34             | 1  | 0           | 0  | 33                  | 29       | 32 | 36                      | 0.85 | 0.94 | 0.97       | 1.06           |
|              |                | 2  | 0           | 0  | 34                  | 33       | 30 | 35                      | 0.97 | 0.88 | 1.00       | 1.03           |
|              |                | 3  | 0           | 0  | 32                  | 34       | 30 | 32                      | 1.00 | 0.88 | 0.94       | 1.00           |

无毒性<sup>[3-4]</sup>。S1 和 S2 枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的回收比值均在 0.5~2.0 范围内,提示 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂在本研究中的有效性<sup>[3-4]</sup>,该方法进行 S1 和 S2 的需氧菌总数计数、霉菌和酵母菌总数计数方法准确、可行。

## 2.5 控制菌检查方法适用性试验

供试品对照组:取 S1B 和 S2B 的 1:10 供试液 10 mL,分别加入 TSB 100 mL 中,33℃ 培养 24 h。

阴性对照组:取稀释液 10 mL,置 TSB 100 mL 中,33℃ 培养 24 h。

阳性对照组:取 S1B 和 S2B 的 1:10 供试液 10 mL,分别加入 TSB 100 mL 中,再加入不大于 100 cfu 的大肠埃希菌,33℃ 培养 24 h。

检测方法:分别取上述预培养物 1 mL,加入麦康凯液体培养基 100 mL 中,42℃ 培养 24 h 后,再分别划线于麦康凯琼脂平板上,33℃ 培养 24 h,观察结果。

结果分析:结果见表 5。可见,S1 和 S2 阳性对照菌生长良好,表明 S1 和 S2 在该条件下对大肠埃希菌无抑菌作用或其抑菌作用可忽略不计。表明采用该方法进行 S1 和 S2 的大肠埃希菌检查方法可行。

表 5 控制菌检查方法适用性试验结果

| 培养基        | 供试品对照组 |    | 阴性<br>对照组 | 阳性对照组 |    |
|------------|--------|----|-----------|-------|----|
|            | S1     | S2 |           | S1    | S2 |
| 胰酪大豆胨液体培养基 | -      | -  | -         | +     | +  |
| 麦康凯液体培养基   | -      | -  | -         | +     | +  |
| 麦康凯琼脂平板    | -      | -  | -         | +     | +  |

注:“-”为阴性,“+”为阳性。

## 3 讨论

### 3.1 中和剂吐温 80 和 卵磷脂的应用

吐温 80 和卵磷脂是《中国药典》《欧洲药典》收载的常用中和剂,可添加至稀释剂或培养基中<sup>[1-2]</sup>。试验证明,3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂对微生物无毒性。吐温 80 为非离子表面活性剂,卵磷脂为两性离子表面活性剂,均可降低季铵类化合物、酚、醛、对羟基苯甲酸类、二重双肌类、碘酒、洗必泰类、石炭酸类药物的活性<sup>[3]</sup>。卵磷脂是细胞膜上最主要的脂质,其脂肪酸种类会影响细胞的流动性及通透性;通过影响细胞膜上许多酶素的功能来调控细胞生长;可改变细胞膜功能,是细胞膜修复的营养剂。3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂对部分有抑菌作用化学药可作为中和剂,可降低抑菌作用<sup>[3-6]</sup>。

### 3.2 微生物限度检查方法的确立

阿法替尼片:取供试品 10 g,加含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,充分振摇,制成 1:10 的供试液,取 1:10 供试

液 1 mL,置含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL 中,即为 1:100 的供试液。需氧菌总数计数取 1:100 供试液 1 mL 注入平皿,按 2015 年版《中国药典》通则 1105 方法检查;霉菌和酵母菌总数计数,取 1:10 供试液 1 mL 注入平皿,按 2015 年版《中国药典》通则 1105 方法检查。大肠埃希菌检查,取 1:10 供试液 10 mL,置 TSA 100 mL 中,按 2015 年版《中国药典》通则 1106 方法检查。

塞瑞替尼胶囊:取供试品 10 g,加入含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,充分振摇,制成 1:10 的供试液,取 1:10 供试液 1 mL,置含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL 中,即得 1:100 的供试液。需氧菌总数计数取 1:100 供试液 1 mL 注入平皿,培养基为含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 TSA,按 2015 年版《中国药典》通则 1105 方法检查;霉菌和酵母菌总数计数,取 1:10 供试液 1 mL 注入平皿,培养基为含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 SDA,按 2015 年版《中国药典》通则 1105 方法检查;大肠埃希菌检查,取 1:10 供试液 10 mL,置 TSB 100 mL 中,按 2015 年版《中国药典》通则 1106 方法检查。

### 3.3 替尼类抗癌药物的微生物检查方法建立的思路

替尼类抗癌药物对微生物都有一定的抑菌作用,尤其是对细菌。抑菌性筛查试验结果也表明,S1 和 S2 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均有很强的抑菌作用。建议可直接采用含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的稀释液,如 1:10 供试液的回收率低于《中国药典》要求,直接采用 1:100 供试液进行试验,抑菌性更强的可选择在培养基中添加 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂。本研究中的 2 种替尼类抗癌药物,通过稀释法和中和法,均消除了其抑菌作用,符合《中国药典》的相关规定,可用于产品的质量,并为口服替尼类抗癌药物的微生物限度的检查提供了参考。

### 参考文献:

- [1] 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,2015:140-151.
- [2] European Pharmacopoeia Commission. EP10.0[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care,2019:201-205.
- [3] 张光华,余立. Tween 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.
- [4] 刘冬玲,蒋波,刘浩. 西罗莫司口服溶液微生物限度检查方法的探讨[J]. 中国医药工业杂志,2017,48(5):730-733.
- [5] 牛振东,郝运伟,刘文杰,等. 地拉罗司分散片微生物限度检查方法研究[J]. 中国现代应用药学,2019,36(1):36-40.
- [6] 曹寒梅,蔡虎,杨晓丽,等. 氧氟沙星胶囊微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药业,2019,28(16):35-37.

(收稿日期:2020-01-09)