



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.01.17

文章编号: 2095-1264(2024)01-0104-04

注射用多西他赛胶束无菌检查方法验证*

张国林¹, 景荣先^{2*}, 邢以文¹

(¹苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州, 215000; ²南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院 药学部, 江苏 苏州, 215000)

摘要: **目的** 建立针对 2 种注射用多西他赛胶束的无菌检查方法。**方法** 参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 1105 无菌检查法, 取注射用多西他赛胶束 15 瓶, 用 500 mL 0.9% 氯化钠溶液溶解, 作为供试液, 平均分配至 3 个滤筒过滤。同法制备 6 个滤筒。每个滤筒用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL, 然后加入相应培养基, 并分别接种 <100 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、生孢梭菌和黑曲霉, 于适宜温度下观察培养。以等量无菌氯化钠溶液替代注射用多西他赛胶束供试液后采用相同的后续操作, 作为对照组。采用薄膜过滤法, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜, 每个滤筒冲洗 3 次, 每次 100 mL, 检测各菌株生长情况。**结果** 6 种验证菌株均在 48 h 内生长良好, 样品的抑菌活性被完全消除。**结论** 注射用多西他赛胶束可用上述方法进行无菌检查。

关键词: 注射用多西他赛胶束; 无菌; 验证; 薄膜过滤法

中图分类号: R927.1 **文献标识码:** A

Sterility test validation of docetaxel micelles for injection*

ZHANG Guolin¹, JING Rongxian^{2*}, XING Yiwen¹

(¹Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou, 215000, Jiangsu, China; ²Department of Pharmacy, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, 215002, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To establish a sterility test method of docetaxel micelles for injection. **Methods** The method was established according to the general principles 1105 of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition). 15 bottles of docetaxel micelles for injection were dissolved in 500 mL 0.9% sodium chloride solution. The prepared solution was filtrated to three filter cartridges at equal volume. Other three filter cartridges were prepared by the same method. Each filter cartridge was rinsed with pH 7.0 sterile sodium chloride-peptone buffer solution for three times (100 mL each time). *Staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, *bacillus subtilis*, *candida albicans*, *clostridium sporogenes* and *aspergillusniger* with a content less than 100 CFU/mL was respectively added in the last rinse. Then the corresponding culture medium was added and the cartridges were cultured at a suitable temperature. The same follow-up procedure was performed for the control group, in which the same amount of sterile sodium chloride solution was substituted for the test solution of docetaxel for injection. The growth of each strain was detected. **Results** All the six strains grew well within 48 h under suitable temperature. The antibacterial activities of the samples were completely eliminated. **Conclusion** The sterility test of docetaxel micelles for injection could be assayed by the established method.

Keywords: Docetaxel micelles for injection; Sterility; Validation; Membrane filtration

*基金项目: 苏州市科技发展计划项目(SYS201425)。

作者简介: 张国林, 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 药品检验质量控制。

*通信作者: 景荣先, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 医院药学及药品检验质量控制。

0 前言

多西他赛是细胞周期 M 期特异性药物,临床上主要用于晚期乳腺癌、非小细胞肺癌和卵巢癌的治疗^[1-2]。多西他赛具有促进小管聚合成微管并抑制其降解的药理活性,主要通过减少小管数量、破坏微管网状结构发挥作用^[3-4]。胶束是指溶液中表面活性剂浓度超过临界浓度后,其分子以极性基团为外层、非极性基团为内核形成的有序组装体^[5-7],具有包埋和输送药物的作用。胶束具有良好的生物相容性和可降解、结构易修饰、改善抗肿瘤药物水溶性差的优点^[8-9]。注射用多西他赛胶束属于无菌制剂,其无菌检查项为质量控制中最关键的安全性指标之一。2006 年发生的“欣弗”事件就是由于克林霉素磷酸酯注射液生产过程中违规改变灭菌工艺参数,影响灭菌效果,最终导致无菌检查项目不合格引起的。建立有效的无菌检查方法是无菌制剂质量标准中最重要的检查项,也是确保无菌检查结果准确、可靠的前提,同时对无菌检查不合格样品进行微生物溯源分析也十分重要。本研究拟建立针对 2 种注射用多西他赛胶束的无菌检查法,以期产品的质量研究与控制提供支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及试剂

注射用多西他赛胶束 A 来自 WB 药物研究有限公司(规格 500 mg/瓶,批号 20131123);注射用多西他赛胶束 B 来自 SH 生物技术有限公司(规格 500 mg/瓶,批号 20141110);硫乙醇酸盐流体培养基(fluid thioglycollate medium, FTM)购自北京三药科技有限公司(批号 1210172);胰酪大豆胨(trypticase soy broth, TSB)液体培养基(批号 20141105)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号 20150326)购自青岛海博生物技术有限公司;氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司(批号 F20110915)。LA2-4A1 型生物安全柜购自新加坡 Esco 公司;KB240 型培养箱购自德国 Binder 公司;Steritest™ Equinox 集菌仪购自德国默克密理博公司;NS01-AS3 型全封闭无菌试验过滤培养器购自北京牛牛基因技术有限公司;LASAIR III 尘埃粒子计数器购自美国 PMS 公司。

1.2 实验菌株及处理方法

分别取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的甘油冻存液 1 mL 接种至 TSB 中,32 °C 培养

24 h 后待用;生孢梭菌的甘油冻存液 1 mL 接种至 FTM 中,32 °C 培养 24 h 后待用;白色念珠菌甘油冻存液 1 mL 接种至沙氏葡萄糖液体培养基中,23 °C 培养 24 h 后待用;黑曲霉孢子甘油冻存液恢复室温后直接稀释使用。按上述方式处理后,将培养的菌悬液或解冻的孢子悬液用灭菌的 0.9% 氯化钠溶液进行 10 倍梯度稀释,最终制成含菌数(或孢子数)< 100 CFU/mL 的实验菌液。实验用菌株均购自中国食品药品检定研究院,编号及本试验中使用代数见表 1。

表 1 无菌检查方法验证用实验菌株

Tab. 1 Standard bacterial strains for sterility test validation

菌种名称	菌种编号	使用代数
金黄色葡萄球菌	CMCC(B)26003	第 3 代培养物
枯草芽孢杆菌	CMCC(B)63501	第 3 代培养物
大肠埃希菌	CMCC(B)44102	第 3 代培养物
生孢梭菌	CMCC(B)64941	第 3 代培养物
白色念珠菌	CMCC(F)98001	第 3 代培养物
黑曲霉菌	CMCC(F)98003	第 2 代培养物

1.3 供试品处理

观察组:分别取多西他赛胶束 A 和 B 各 15 瓶,用 0.9% 氯化钠溶解稀释至 500 mL,作为供试液。按薄膜过滤法全量过滤至 3 个滤筒。同法制备 6 个滤筒,每个滤筒用 pH 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL。在最后一次冲洗液中加入 <100 CFU/mL 的 6 种实验菌液,并在每个滤筒中加入相应培养基 100 mL,于适宜温度培养,逐日观察。对照组:以等量 0.9% 无菌氯化钠溶液替代注射用多西他赛胶束供试液,采用相同的后续操作。

1.4 环境监测

本研究对进行无菌检查方法学验证环境的温湿度、换气次数、对外压差及尘埃粒子数(方法参照 GB/T16292-2010)和沉降菌(方法参照 GB/T16294-2010)等项目进行监测。

2 结果

2.1 环境监测结果

生物安全柜 $\geq 5 \mu\text{m}$ 和 $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 的尘埃粒子均为 0 个/ m^3 ,沉降菌检测结果为 0 CFU/皿,无菌室的对外压差为 10 Pa,环境温度 23 °C,相对湿度 50%,换气次数 41 次/h,符合方法学验证要求。

2.2 注射用多西他赛胶束无菌检查方法验证

本研究结果显示,注射用多西他赛胶束 A 和 B 中的 6 种验证菌株均在 48 h 内生长良好,即待验证注射用多西他赛胶束在此处理条件下无抑菌活性或抑菌活性可忽略不计(表 2)。

3 讨论

3.1 结果与结论

依据 2015 年版《中国药典》(四部)通则 1105 相关方法,本研究建立了注射用多西他赛胶束的无菌检查方法,结果发现每个滤筒用 pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL 时,注射用多西他赛胶束的抑菌活性均被基本消除,可采用金黄色葡萄球菌作为阳性菌进行无菌检查。

3.2 研究结论分析

部分抗肿瘤药物如柔红霉素、更生霉素、阿霉素等均具有不同程度的抑菌活性,有些具有抗肿瘤活性的物质也表现出一定程度的抗菌活性。一项对春砂仁和益智仁中黄酮类物质的抑菌和抗肿瘤功能研究发现,二者均具有较强的抗菌和抗肿瘤活性^[10]。橘皮与橙皮精油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌均有抑制作用,对肿瘤细胞凋亡或坏死的作用可能与其抗氧化性和抑菌性有一定相关性^[11]。同时,*Tubeufiaceae* 科真菌次生代谢产物均具有较强的抑菌和抗肿瘤活性^[12]。本研究发现,注

射用多西他赛胶束经 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次(每次 100 mL)后抑菌活性基本消除,提示虽然抗肿瘤药物均有较强的抑菌性,但基于胶束剂型药物溶解性好、对滤膜吸附性低的特性,在此处理条件下注射用多西他赛胶束的抑菌活性能够得到完全消除,可作为一种无菌检查方法。本研究未发现注射用多西他赛胶束对 6 种验证用菌株中的某一种具有特别的抑菌活性,因此,可选择金黄色葡萄球菌作为阳性菌。

3.3 研究实际价值及创新性

抗肿瘤药物化学治疗与传统手术切除和放射治疗是目前抗肿瘤治疗的主要手段。小分子抗肿瘤药物由于溶解性差、特异性差的特性以及容易产生耐药性的缺点严重影响其临床应用效果。胶束作为一种药物新剂型,属于胶体分散系统,由两种亲性分子或表面活性剂分子自组装形成^[13-14],能够增强难溶性药物的溶解性、提高其生物利用度,并具有增强渗透性和滞留效应的效果,使药物具有一定的被动靶向性^[15]。

注射用多西他赛胶束为抗肿瘤药物新剂型,关于其无菌检查方法学的报道较少,建立注射用多西他赛胶束的无菌检查方法对产品质量研究和控制具有重要的价值。

3.4 研究局限性及下一步工作

表 2 注射用多西他赛胶束无菌检查方法验证结果

Tab. 2 Validation result of sterility test of docetaxel micelles for injection

菌株类型	样品类型	FTM 培养基						TSB 培养基											
		观察组			对照组			观察组					对照组						
		1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		
金黄色葡萄球菌	注射用多西他赛胶束 A	+	+	+	+	+	+												
	注射用多西他赛胶束 B	+	+	+	+	+	+												
大肠埃希菌	注射用多西他赛胶束 A	+	+	+	+	+	+												
	注射用多西他赛胶束 B	+	+	+	+	+	+												
枯草芽孢杆菌	注射用多西他赛胶束 A	+	+	+	+	+	+												
	注射用多西他赛胶束 B	+	+	+	+	+	+												
生孢梭菌	注射用多西他赛胶束 A	+	+	+	+	+	+												
	注射用多西他赛胶束 B	+	+	+	+	+	+												
白色念珠菌	注射用多西他赛胶束 A											+	+	+	+	+	+	+	+
	注射用多西他赛胶束 B											+	+	+	+	+	+	+	+
黑曲霉菌	注射用多西他赛胶束 A																		
	注射用多西他赛胶束 B											-	+	+	+	+	-	+	+

注:“-”表示实验菌不生长或生长微弱难以发现;“+”表示实验菌生长良好;“-”表示此处不适合。

Note: In this text, the symbol “-” imply that no multiplication of the bacteria was found. The symbol “+” indicates that the bacteria grow well. The symbol “-” indicates that it is not proper here.

本研究发现,对 2 种注射用多西他赛胶束进行薄膜过滤后,每个滤筒经 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次(每次 100 mL)后,药物的抑菌活性基本消除,可进行无菌检查。但应指出的是,一旦药物的生产工艺、处方或原/辅料等发生变化,应当对已经建立的无菌检查方法进行确认或重新验证,以确保方法的合理性。

参考文献

- [1] 常莎,宫小勇,郑伟,等.阿比特龙联合多西他赛化疗方案治疗转移性去势抵抗性前列腺癌的效果及对 miR-103、miR-802 表达的影响[J].临床医学研究与实践,2023,8(29):13-16. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202329004.
- [2] RUSHWORTH L K, HEWIT K, MUNNINGS-TOMES S, et al. Repurposing screen identifies mebendazole as a clinical candidate to synergise with docetaxel for prostate cancer treatment [J]. Br J Cancer, 2020, 122(4): 517-527. DOI: 10.1038/s41416-019-0681-5.
- [3] ZHAO Y, WAN B, ZHANG T L, et al. Irinotecan, topotecan, paclitaxel or docetaxel for second-line treatment of small cell lung cancer: a single-center retrospective study of efficiency comparison and prognosis analysis [J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(6): 829-837. DOI: 10.21037/tlcr.2019.10.21.
- [4] 丁宏,卢惠茹,蒋昊.多西他赛及其新剂型的临床应用进展[J].医学理论与实践,2019,32(14):2165-2167. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2019.14.010.
- [5] 许雪雅,王夏英,郑雅玲,等.载紫杉醇的聚乙二醇修饰的大黄酸偶联物胶束的体内安全性及抗肿瘤药效学研究[J].中国现代应用药学,2023,40(05):577-583. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20220289.
- [6] SHI C H, ZHANG Z Q, SHI J X, et al. Co-delivery of docetaxel and chloroquine via PEO-PPO-PCL/TPGS micelles for overcoming multidrug resistance [J]. Int J Pharm, 2015, 495(2): 932-939. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.009.
- [7] 代艳冬.响应型纳米载药胶束的制备和性质研究[D].北京:中国食品药品检定研究院,2019.

- [8] GONG F R, WANG R R, ZHU Z Q, et al. Drug-interactive mPEG-*b*-PLA-Phe(Boc) micelles enhance the tolerance and anti-tumor efficacy of docetaxel [J]. Drug Deliv, 2020, 27(1): 238-247. DOI: 10.1080/10717544.2020.1718245.
- [9] 贾玲玉,郝单丽,杨佳颖,等.肿瘤微环境双重响应性水飞蓟宾纳米胶束体外抗乳腺癌活性及转移研究[J].药学报,2023,58(9):2785-2793. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1357.
- [10] 高林林,王倩,张竞雯,等.春砂仁和益智仁中黄酮类物质的精制及其抑菌和抗肿瘤功能研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(14):4659-4666. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0381.2019.14.035.
- [11] 郝靖玮,索莲宦,杨斯棋,等.橘皮与橙皮精油抑菌、抗氧化、抗肿瘤活性研究[J].中医药学报,2019,47(4):37-41. DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.190108.
- [12] 卢永仲,康冀川,王鲁,等.Tubeufiaceae 科真菌次生代谢产物抑菌、抗肿瘤活性评价及相关化学成分分析[C]//中国菌物学会 2018 年学术年会论文汇编.泰安,2018:208.
- [13] LU X Y, FANG M, YANG Y, et al. PEG-conjugated triacontanol micelles as docetaxel delivery systems for enhanced anti-cancer efficacy [J]. Drug DelivTransl Res, 2020, 10(1): 122-135. DOI: 10.1007/s13346-019-00667-6.
- [14] 胡楚玲,顾芬芬,宫春爱,等.负载自噬抑制小干扰 RNA 的聚精氨酸多肽纳米胶束抗肿瘤转移作用的初步研究[J].实用药物与临床,2023,26(11):961-966. DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202311001.
- [15] XU G Y, ZHU C H, LI B, et al. Improving the anti-ovarian cancer activity of docetaxel by self-assemble micelles and thermosensitive hydrogel drug delivery system [J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(1): 40-53. DOI: 10.1166/jbn.2020.2867.

校稿:于静 李征

本文引用格式:张国林,景荣先,邢以文.注射用多西他赛胶束无菌检查方法验证[J].肿瘤药学,2024,14(1):104-107. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.01.17.

Cite this article as: ZHANG Guolin, JING Rongxian, XING Yiwen. Sterility test validation of docetaxel micelles for injection[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2024, 14(1): 104-107. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.01.17.