

## 他克莫司胶囊微生物限度检查法验证的探讨

占景华<sup>a</sup>, 石鹤坤<sup>b</sup>, 钟渊福<sup>a</sup>, 董智聪<sup>a</sup>, 胡永狮<sup>a\*</sup>

**[摘要]** 目的 按 2010 版《中国药典》的要求探讨他克莫司胶囊微生物限度检测方法。方法 选取 5 种具有代表性的微生物菌悬液, 用常规法、稀释法、膜过滤法或其相结合的方法分别对他克莫司胶囊进行微生物验证试验。**结果** 细菌总数用膜过滤法稀释 1:10, 霉菌和酵母菌用膜过滤法稀释 1:1 000, 检测后回收率均能达到 70% 以上。**结论** 避免采用单一常规法或膜过滤法进行微生物限度检测, 使实验科学合理, 提高工作效率, 更加规范性。

**[关键词]** 微生物方法验证; 稀释法; 膜过滤法

**Research on the microbial limit verification test of tacrolimus capsules** ZHAN Jing-hua<sup>a</sup>, SHI He-kun<sup>b</sup>, ZHONG Yuan-fu<sup>a</sup>, DONG Zhi-cong<sup>a</sup>, HU Yong-shi<sup>a\*</sup> (a. Central Lab, b. Department of Pharmacy, The 175th Hospital of PLA/Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Fujian 363000, China)

**[Abstract]** **Objective** To research the microbial limit verification test of tacrolimus capsules according to the requirements of the 2010-edition Chinese Pharmacopoeia. **Methods** Five types of representative microbial bacterial suspension were selected and then microbial verification tests on tacrolimus capsules through the conventional method, the dilution method, the membrane filtration method or a combination of the above methods respectively were carried out. **Results** Both of the recovery rates were more than 70% when the total number of bacterial was detected by the membrane filtration method as per 1:10 and when mould and yeast were detected by the membrane filtration method as per 1:1 000. **Conclusion** Microbial limit test through the single conventional method or membrane filtration method is avoided so as to ensure scientific and reasonable experiment, improve work efficiency and achieve normalization.

**Key words:** Microbial verification; Dilution method; Membrane filtration method

### 0 引言

他克莫司 (Tacrolimus, FK-506) 最早由日本藤泽药品工业公司探索研究所于 1984 年自日本筑波山土壤中分离的筑波链霉菌 (Streptomyces tsskibaensis) NO9993 的发酵液中提取, 是含氮 23 元环的大环内酯类强效免疫抑制剂<sup>[1]</sup>。目前, 已广泛应用于肝脏、胰腺、肾脏、心脏和肺等实体器官移植后的抗排斥治疗, 其药理作用是有效抑制 T 细胞激活, 与内源性细胞受体 (FKBP12) 结合形成一个亲免疫 immunophilins 复合物, 从而发挥药理作用<sup>[2]</sup>。

由于他克莫司是一种上市不久的新型免疫抑制剂, 所以关于他克莫司胶囊的检测方法报道相对较少, 为了保证他克莫司胶囊的微生物限度检测法的准确性和可靠性, 减少患者健康潜在的危害, 保证在生产、贮存、销售过程中的质量, 现按照 2010 版《中国药典》二部附录微生物限度检查法有关规定<sup>[3]</sup> 通过系列试验, 考察了他克莫司胶囊的

抑菌活性和微生物检查法, 并建立适合于该制剂的微生物限度检查方法, 为制剂的进一步开发提供依据。

### 1 试验材料

1.1 样品 他克莫司胶囊分别由杭州中美华东制药有限公司 (批号: 13401, 样品 1)、安斯泰来制药有限公司 (批号: OD5606A, 样品 2)、浙江海正药业股份有限公司 (批号: 20130311, 样品 3) 提供。

1.2 验证用菌种 枯草杆菌 CMCC 63202-4a (第三代), 金黄色葡萄球菌 CMCC 26003-28 (第三代), 大肠埃希菌 CMCC 44102-22 (第三代), 白色念珠菌 CMCC (F) 98001 (第三代), 黑曲霉 CMCC (F) 98003 (第三代), 均由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 培养基 营养琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、真菌琼脂培养基、改良马丁培养基、胆盐乳糖培养基、营养肉汤培养基、真菌培养基、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基和甘露醇氯化钠琼脂培养基均由中国药品生物制品检定所生产, 按使用说明配制。

1.4 设备 ES-315 全自动灭菌锅 (TOMY)、SW-

收稿日期: 2014-03-21

作者单位: 中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院 a. 中心实验室 b. 药学科 福建 363000

\* 通信作者

CJ4FD 医用净化工作台(苏州康莱特净化工程有限公司)、ZW-2008 集菌仪(温州维科生物实验设备有限公司)、KBF220 一次性使用集菌过滤培养器(温州维科生物实验设备有限公司)、恒温培养箱(THERMO)。

## 2 方法

2.1 菌液制备 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中,经 30~35℃ 培养 18~24 h 后,分别取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草杆菌的肉汤培养物 1 mL + 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液,10 倍稀释至  $10^6 \sim 10^7$ ,细菌数约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。

接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,经 23~28℃ 培养 24~48 h 后,取白色念珠菌液体培养物 1 mL + 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液,10 倍稀释至  $10^4 \sim 10^7$ ,菌数约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。

接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基中,经 23~28℃ 培养 5~7 d 后,取黑曲霉斜面培养物,加 3~5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液将孢子洗脱,吸出孢子悬液 1 mL + 9 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液,10 倍稀释至  $10^4$ ,菌数约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。

2.2 供试液制备 称取样品 5 g,加 0.5% 吐温 80 蛋白胨水氯化钠缓冲液至 45 mL,作为 1:10 供试液。

### 2.3 回收率测定(平皿计数法)

2.3.1 常规法 试验组:取 1:10 供试液 1 mL、50~100 个/mL 试验菌液 1 mL 同时加入平皿中,立即倾注 15~20 mL 温度不超过 45℃ 的培养基中,待凝固后,置培养基观察结果,同时平行 3 个平皿。供品对照:取 1:10 供试液各 1 mL 分别加入至平皿中,立即倾注 15~20 mL 温度不超过 45℃ 的培养基,待凝固后,置培养基观察结果。稀释剂对照:取稀释液 1 mL 替代供试品,加入 50~100 个试验菌,按试验组的供试液制备方法和菌落计数方法测定其菌数。

2.3.2 0.2 mL/皿稀释法 取 1:10 的供试液 1 mL 分注于 5 个平皿(即 0.2 mL/皿)中,于每皿中分别加入 1 mL 含有 50~100 个的试验菌,立即倾注 45℃ 相应的培养基,每株试验菌平行制备 3

个平皿,按平皿法测定其菌数。

2.3.3 薄膜过滤法 试验组:每管分别取已制成的 1:10 供试液 10 mL,全量过滤(蠕动泵转速 160 r/min),用无菌 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 500 mL 或 1 L,等瓶底留冲洗液 20 mL 左右时,分别加入各试验菌液 1 mL,混匀,过滤,取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基或玫瑰红钠琼脂培养基上,35℃ 培养 48 h 观察结果或 25℃ 72 h 观察结果。稀释剂对照组:取稀释剂各 100 mL,分别加入上述试验菌,使菌浓度为 50~100 cfu/mL,按试验组的方法进行菌落计数。供试品对照组:按试验组方法处理,但不加菌液。

2.3.4 计算方法 试验组的菌回收率(%) = [(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%

## 3 结果

3.1 他克莫司胶囊微生物检测回收率(常规法)(1:10) 他克莫司胶囊 3 个样品常规平皿培养法微生物限度检查的验证结果见表 1。从表 1 可以看出:采用常规方法检验他克莫司胶囊供试品,人工污染 5 株代表菌株,该供试品对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉回收率试验均低于 70%,有一定抑菌作用,不能采用常规方法检验。根据验证试验结果,确定他克莫司胶囊微生物限度检查法为细菌数和霉菌数测定均不能采用常规方法检验。

表 1 他克莫司胶囊微生物检测回收率(常规法)(1:10)

组别		样品 1	样品 2	样品 3	稀释剂	样品 本底
大肠埃希菌	菌落数( cfu)	14	11	7	88	0
	回收率( %)	15.9	12.5	8		
金黄色葡萄球菌	菌落数( cfu)	0	0	0	82	0
	回收率( %)	0	0	0		
枯草芽孢杆菌	菌落数( cfu)	0	0	0	90	0
	回收率( %)	0	0	0		
白色链球菌	菌落数( cfu)	0	0	0	87	0
	回收率( %)	0	0	0		
黑曲霉	菌落数( cfu)	0	0	0	67	0
	回收率( %)	0	0	0		

3.2 他克莫司胶囊微生物检测回收率(常规法) 0.2 mL 稀释法 他克莫司胶囊 3 个样品稀释法

0.2 mL/皿微生物限度检查的验证结果见表 2。从表 2 可以看出:采用稀释法 0.2 mL/皿检验他克莫司胶囊供试品,人工污染 5 株代表菌株,该供试品对枯草杆菌的回收率高于 70%;而对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉回收率试验均低于 70%,有一定抑菌作用,不能采用稀释法 0.2 mL/皿检验。根据验证试验结果,确定他克莫司胶囊微生物限度检查法为细菌数和霉菌酵母菌数测定均不能采用稀释法 0.2 mL/皿检验。

表 2 他克莫司胶囊微生物检测回收率 (常规法) 0.2 mL 稀释法

组别		样品 1	样品 2	样品 3	稀释剂	样品
大肠埃希菌	菌落数( cfu)	44	39	35	98	0
	回收率( %)	44.9	39.8	35.8		
金黄色葡萄球菌	菌落数( cfu)	34	42	41	84	0
	回收率( %)	40.5	50	48.8		
枯草芽孢杆菌	菌落数( cfu)	93	89	101	98	0
	回收率( %)	94.9	90.1	100		
白色链球菌	菌落数( cfu)	13	8	21	81	0
	回收率( %)	16.1	9.9	25.9		
黑曲霉	菌落数( cfu)	1	0	0	65	0
	回收率( %)	1.5	0	0		

3.3 他克莫司胶囊微生物检测回收率(薄膜过滤法 1:10, 冲洗 500 mL) 他克莫司胶囊 3 个样品薄膜过滤法(1:10)微生物限度检查的验证结果见表 3。上述试验结果表明,他克莫司胶囊微生物限度检查菌落计数采用薄膜过滤法供试液 1:10, 冲洗 500 mL, 除黑曲霉外, 试验组的各试验菌回收率均在 70% 以上。

表 3 他克莫司胶囊微生物检测回收率 (薄膜过滤法 1:10, 冲洗 500 mL)

组别		样品 1	样品 2	样品 3	稀释剂	样品
大肠埃希菌	菌落数( cfu)	81	85	76	84	0
	回收率( %)	96.4	100	90.5		
金黄色葡萄球菌	菌落数( cfu)	80	82	77	87	0
	回收率( %)	91.9	94.3	88.5		
白色链球菌	菌落数( cfu)	80	75	78	82	0
	回收率( %)	97.6	91.5	95.1		
黑曲霉	菌落数( cfu)	5	14	6	53	0
	回收率( %)	9.4	26.4	11.3		

3.4 他克莫司胶囊微生物检测回收率(薄膜过滤法 1:100、1:1 000, 冲洗 500 mL) 见表 4、表 5。表 4 结果显示,采用薄膜过滤法供试液 1:100; 冲洗 500 mL, 供试品对黑曲霉回收率低于 70%。表 5 结果显示,采用薄膜过滤法供试液 1:1 000; 冲洗 500 mL, 供试品对黑曲霉回收率高于 70%。

表 4 他克莫司胶囊微生物检测回收率 (薄膜过滤法 1:100, 冲洗 500 mL)

组别		样品 1	样品 2	样品 3	稀释剂	样品
黑曲霉	菌落数( cfu)	25	33	28	65	0
	回收率( %)	38.5	50.8	43.1		

表 5 他克莫司胶囊微生物检测回收率 (薄膜过滤法 1:1 000, 冲洗 500 mL)

组别		样品 1	样品 2	样品 3	稀释剂	样品
黑曲霉	菌落数( cfu)	43	49	45	54	0
	回收率( %)	79.6	90.7	83.3		

#### 4 结论

微生物限度方法验证是确认供试品在所采用的检查方法和检验条件下无抑菌作用,以保证供试品污染的微生物能被充分检验出来<sup>[4]</sup>。药物具有抑菌成分的进行微生物限度检查时,要求供试品本身在试验的条件下有效排除其抑菌作用,使其在不干扰染菌的限度检验,结果方属有效<sup>[5]</sup>。

他克莫司胶囊按照 2010 年版《中国药典》微生物限度检查法验证方法验证,结果如下,细菌总数:取供试品 5 g,加无菌 0.5% 吐温 80 的 pH 7.0 氯化钠-蛋白胍缓冲液至 45 mL,振摇混匀,制成 1:10 供试液;取供试液 1 mL,全量过滤(蠕动泵转速 160 r/min),用无菌 pH 7.0 氯化钠-蛋白胍缓冲液 500 mL 冲洗,取出滤膜菌面朝上贴于营养琼脂培养基,35 °C 培养 48 h,计数菌落。霉菌和酵母菌:另取 1:10 供试液 1 mL,加入到 100 mL 的无菌 pH 7.0 氯化钠-蛋白胍缓冲液,取 1 mL,全量过滤(蠕动泵转速 160 r/min),用无菌 pH 7.0 氯化钠-蛋白胍缓冲液 500 mL 冲洗,取出滤膜菌面朝上贴于玫瑰红钠琼脂培养基,25 °C 培养 72 h,计数菌落。

在菌落计数方法验证中,大肠埃希菌代表革兰阴性菌,金黄色葡萄球菌代表革兰阳性菌,枯草

## 抗癫痫肽纳米粒的制备及体外释药性能的研究

王石健, 王彬辉\*, 章文红, 张晓芬, 吴敏

**[摘要]** 目的 制备抗癫痫肽纳米粒, 并研究其体外释药性能。方法 选用聚乙二醇-聚乳酸-聚乙醇酸嵌段共聚物为载体, 采用复乳-溶剂挥发法制备抗癫痫肽纳米粒, 以包封率、载药量等指标优化制备工艺, 并研究纳米粒体外释药性能。结果 抗癫痫肽纳米粒外观呈圆形或类圆形, 平均粒径为  $(100.2 \pm 2.45)$  nm, 包封率和载药量分别为  $(64.46 \pm 1.34)\%$  和  $(4.73 \pm 0.32)\%$ , 体外释药呈现缓释和突释两个阶段, 符合 Weibull 方程。结论 建立的制备工艺简便可行, 得到的抗癫痫肽纳米粒包封率和载药量较高, 粒径小, 体外释药具有明显的缓释特征。

**[关键词]** 抗癫痫肽; 纳米粒; 体外释药

**Preparation of anti-epilepsy peptide nanoparticles and investigation of the drug releasing characteristic *in vitro*** WANG Shi-jian, WANG Bin-hui\*, ZHANG Wen-hong, ZHANG Xiao-fen, WU Min (Affiliated Municipal Hospital of Taizhou University School of Medicine, Taizhou 318000, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare anti-epilepsy peptide nanoparticles and evaluate its release characteristics *in vitro*. **Methods** Anti-epilepsy peptide nanoparticles were prepared by emulsion/solvent evaporation method and poly(ethylene glycol)-poly(lactide acid)-poly(glycolic acid) copolymer was used as carrier material. Encapsulation efficiency and drug loading were used to optimize the technique and evaluate its release characteristics *in vitro*. **Results** The appearance of all anti-epilepsy peptide nanoparticles were round or similar. The mean particle size, encapsulation efficiency and drug loading of anti-epilepsy peptide nanoparticles were  $(100.2 \pm 2.45)$  nm,  $(64.46 \pm 1.34)\%$  and  $(4.73 \pm 0.32)\%$  respectively. The drug release from nanoparticles appeared consisting of two phases with initial burst release and sustained-release *in vitro* and the release rule accorded with Weibull equation. **Conclusion** The preparation technics is simple and feasible and the obtained anti-epilepsy peptide nanoparticles has high encapsulation efficiency, high drug loading, small mean diameter and the drug releasing characteristic is sustained *in vitro*.

**Key words:** Anti-epilepsy peptide; Nanoparticles; Drug releasing characteristic *in vitro*

### 0 引言

抗癫痫肽(Anti-epilepsy peptide, AEP)是从东亚钳蝎粗毒液中分离的一种具有生物学活性的多

肽, 分子量为 8 300 Da, 有良好的抗癫痫作用, 具有作用强、用量小、毒性低等特点<sup>[1]</sup>。但 AEP 为水性大分子蛋白多肽类药物, 很难透过血脑屏障入脑, 因此, 改变 AEP 在体内分布, 增加其在病灶药物浓度是关键。

聚乙二醇-聚乳酸-聚乙醇酸嵌段共聚物

[Polyethyleneglycol-modified poly(d, l-lactide-co-

收稿日期: 2014-01-16

作者单位: 台州学院医学院附属市立医院, 台州 318000

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2011KYB144); 台州学院青年基金(2012QN33)

\* 通信作者

芽孢杆菌代表芽孢杆菌, 白色链球菌代表酵母菌, 黑曲霉代表霉菌, 因此, 该验证方法较能体现出检测方法的准确性, 减少检测方法误差<sup>[6-7]</sup>。建议不同检测样品进行微生物限度检测都必须进行方法验证, 避免采用单一常规法或膜过滤法进行微生物限度检测, 使实验科学合理, 提高工作效率, 更加规范性。

参考文献:

[1] 徐亲民. 他克莫司胶囊的工业化研究[J]. 国外医药: 抗生素分册 2000 21(4): 151-155.

[2] 周立明, 张莉, 赵晓娟, 等. 他克莫司自微乳的制备和质量评价[J]. 中国医院药学杂志 2012 32(24): 1975-1979.

[3] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 2010 年版. 北京: 化学工业出版社 2010: 附录 107-115.

[4] 谢委, 马永贵, 张光勋, 等. 阿托伐他汀钙片微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药师 2013 1(3): 471-473.

[5] 黄依玲. 医院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.

[6] 由亚宁, 任安民, 裴为芝. 药品微生物验证枯草芽孢杆菌实验菌液制备方法的探讨[J]. 西北药学杂志 2007 22(6): 345.

[7] 范兵, 杜娟, 陈林芳. 黄藤片微生物检验方法验证中加菌方法的比较研究[J]. 儿科药学杂志 2007 13(1): 37-38.