

两性霉素 B 脂质体无菌检查法研究

娄晓春 赵霞芬 朱其兵¹

(江苏省药品检验所, 南京 210008)

摘要 在一般无菌检查方法的基础上, 结合两性霉素 B 与卵磷脂的理化特点, 确立了两性霉素 B 脂质体的无菌检查方法。用无菌甲醇 40 ml 溶解样品(含两性霉素 B 4 mg), 通过 0.45 μm 薄膜 (TYPE FH MILLIPORE), 用 pH7.3 磷酸盐缓冲液(含 0.1% 吐温 80, 0.002% 甘牛胆酸钠)和生理盐水各 200 ml 先后冲洗, 按一般无菌方法进行检验。实验结果表明, 本方法简单、易行、可靠。

关键词 两性霉素 B; 脂质体; 无菌检查; D 值测定

两性霉素 B 脂质体是近年来研制的一种抗深部真菌新型制剂。由天然卵磷脂为主要膜材, 通过一定的制备工艺包裹两性霉素 B 而制得。由于脂质体是 70 年代末、80 年代初发展起来的一种新型药物载体, 国内外药典均未收载。以磷脂为主要成分的膜材以及所包裹的药物特定的理化特性而使一般的无菌检查法难以适用。为配合两性霉素 B 脂质体的研制, 我们在一般无菌检查法的基础上, 结合卵磷脂和两性霉素 B 的理化特性, 对两性霉素 B 脂质体的无菌检查法进行了探讨, 较好地解决了该产品的溶解、过膜及冲洗等问题。实验证明, 本方法简单、易行, 可顺利地进行该产品的无菌检查。

1 实验部分

1.1 材料、试剂及样品

0.45 μm 薄膜 (TYPE FH MILLIPORE); 无菌用薄膜过滤器; 吐温 80 (浙江龙游化工试剂厂); 甘牛胆酸钠 (上海化学试剂采购供应站)。

金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 63501]; 白色念珠菌 [10231]; (以上菌种由卫生部药品生物制品检定所提供); 两性霉素 B 脂质体 (2mg/支, 南京药物研究所, 批号 921020,

930106, 930405)。

1.2 pH7.3 磷酸盐缓冲液的配制^[1]

精密称取磷酸氢二钠 1.9734 g, 磷酸二氢钾 0.2245 g, 甘牛胆酸钠 0.02 g, 溶于 1000 ml 蒸馏水中, 过滤, 加吐温 80 1.0 ml, 于 115℃ 高压灭菌 30 min 后备用。

1.2.1 过滤用具

分别将直径 2.5 cm, 3.5 cm 薄膜过滤器, 内装 0.45 μm 薄膜后, 灭菌备用。

1.2.2 无菌甲醇的制备

取甲醇适量用灭菌过的过滤器过滤, 收集溶液备用。

1.2.3 菌液的制备

枯草杆菌液: 取枯草芽胞杆菌悬液^[2], 用肉汤稀释成 1:10 与 1:10000, 备用。

白色念珠菌液: 将菌种接种于菌种小斜面上, 经 (25±2)℃ 培养 3 d, 用灭菌水将菌苔洗下, 用肉汤稀释成 1:10000, 备用。

1.3 菌种对甲醇的敏感度试验

取 2 组灭菌小试管, 每组 8 根, 分别进行枯草杆菌与白色念珠菌的细菌敏感度试验。

分别于第 1 至第 8 管中加枯草菌液 (1:10000) 与白色念珠菌液 (1:10000) 2 ml, 从第 1 管起加甲醇 2 ml, 混匀, 吸 2 ml 至第 2 管, 同法稀释直至第 7 管, 弃去最后第 7 管的

2 ml。第 8 管作为生长对照管。经 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养,霉菌于 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养,20 h 后观察。实验结果表明:两组菌均于第 4 管有菌生长,说明最低抑菌浓度均为第 3 管浓度(甲醇浓度为 1:8)。两种菌对甲醇的敏感度一致。

1.4 D 值(Decimal Reduction)测定^[3]

试验菌种采用枯草杆菌与白色念珠菌。因白色念珠菌为两性霉素 B 的敏感菌,而且,两者对甲醇的敏感度一致,故只进行枯草杆菌的 D 值测定。

实验过程为取样品 2 支(约相当于两性霉素 B 4mg,用无菌甲醇 40 ml 溶解,加入(1:10)枯草芽胞杆菌液 0.5 ml,混匀,于 0、30、60 min 各取溶液 2 ml,通过薄膜,用 pH7.3 磷酸盐缓冲液 200 ml 冲洗,最后用 200 ml 无菌生理盐水洗净,将薄膜放入 100 ml 肉汤培养基中,用力振摇数分钟,取 1 ml 接种至无菌双碟中,同时加入已溶化并保温至 50℃的营养琼脂 20 ml,摇匀,于 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

实验结果表明 D 值大于 60 min。故本实验中使用甲醇对细菌生长没有影响。

1.5 薄膜试验

为考察使用的脂溶性膜受缓冲液及水溶性溶剂的影响,特进行了薄膜试验。

取无菌甲醇 40 ml 通过薄膜后,取金黄色葡萄球菌($1:10^7$)1 ml 过膜,用 200 ml pH7.3 缓冲液冲洗,最后用 200 ml 无菌生理盐水冲洗,取薄膜贴于营养琼脂平皿上,于 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。另取金黄色葡萄球菌($1:10^7$)1 ml 直接接种于灭菌双碟中,作阳性对照。同时加入已溶化并保温至 50℃的营养琼脂 20 ml,于 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,作菌落计数。

通过薄膜组与阳性对照组平均菌落数分别为 140 与 145 个。说明在本实验中使用脂溶性薄膜不会由于使用缓冲液冲洗而影响薄膜的孔径。

1.6 两性霉素 B 脂质体无菌检验方法

取样品 2 支(约相当于两性霉素 B 4 mg),加无菌甲醇 40 ml 溶解,通过 0.45 μm 薄膜后,分别用 pH7.3 磷酸盐缓冲液和生理盐水各 200 ml 冲洗,取出薄膜,分 4 份,分别接种于需气管、厌气管、霉菌管及阳性管。阳性对照菌为 $1:10^6$ 金黄色葡萄球菌 1 ml。细菌培养基放置 $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,霉菌于 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,对照管应于 24 h 内有菌生长。其余各管经 7 d 培养后,均应无菌生长。

2 结论与讨论

2.1 结论

用以上方法对三个批号样品进行检验,其结果均符合规定。

2.2 讨论

1) 本实验应严格遵循无菌操作法。

2) 两性霉素 B 在水中不溶解,在甲醇中极微溶解,根据中国药典凡例中规定:极微溶解系指 1 g 溶质溶于 1000 ml 不到 10000 ml 的溶剂中的概念^[4],取 4 mg 两性霉素 B 于 40 ml 甲醇中,能达到完全溶解;脂质体在甲醇中易溶。因此,本实验中溶解与破膜同时进行。

3) 两性霉素 B 为两性化合物,可形成各种盐而增加其溶解度^[5],我们采用磷酸盐缓冲液冲洗,使两性霉素 B 在缓冲液中形成磷酸盐而达到溶解样品、冲洗薄膜的作用。考虑到 pH 过高、过低对细菌生长的影响,选择了 pH7.3 磷酸盐缓冲液。

4) 由于本品含有磷脂质,对于脂溶性药物,国内外药典常用加入吐温 80 的方法增加溶解度^[6,7];由于两性霉素 B 亦为脂溶性药物,吐温 80 的加入,对两性霉素 B 的溶解变可起到协同作用。

5) 两性霉素 B 与胆酸盐的复合物在水中可形成稳定的胶体溶液^[3],使得两性霉素 B 在水中的溶解度增加。因此,在缓冲液中加入了 0.002%的甘牛胆酸钠。

6) 中国药典 90 年版中收载有注射用两性霉素 B, 其无菌检查用阳性对照菌为金黄色葡萄球菌 $1:10^6$, 因此, 本实验阳性对照菌参照该品种项下无菌检查法, 阳性对照菌亦采用金葡菌 $1:10^6$ 。考虑到两性霉素 B 为抗真菌药物, 可补充真菌的阳性对照实验, 有待进一步实验。

7) 用甲醇作溶媒, 溶解样品及膜材, 使用薄膜为脂溶性薄膜 (TYPE FH MILLIPORE), 但冲洗液为 pH7.3 磷酸盐缓冲液。实验表明吐温 80 的加入可有效地防止脂溶性薄膜在水溶液中的溶化与孔径的扩大。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990, 附录 173
- 2 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990, 附录 115
- 3 Placencia AM, Oxborrow GS, Danielson JW. Sterility testing of fat emulsions using membrane filtration and dimethyl sulfoxide. *J Pharm Sci*, 1982, 71:704
- 4 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990, 凡例
- 5 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典注释. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990, 247
- 6 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990, 110
- 7 USP. XI. 1990, 1484

Studies on Amphotericin B Liposomes Sterility Test Procedure

Lou Xiaochun, Zhao Xiafen, Zhu Qibing

Jiangsu Institute of Drug Control, Nanjing 210008

On the basis of general sterility tests procedure and the chemical and physical properties of amphotericin B (Amp-B) and egg phosphatidylcholine (Egg PC), an Amp-B liposome sterility test procedure was established through a series of experiments. Dissolve Amp-B liposome (containing 4 mg Amp-B) in 40 ml methanol. Pass the specimen through the membrane filter (pore size: $0.45\ \mu\text{m}$, TYPE FH MILLIPORE). Wash the membrane with 200 ml of phosphate buffer (pH 7.3, 0.1% Tween-80, 0.002% sodium tauroglycocholate) and then with 200 ml physiological saline. Treat the test membrane as general sterility test procedure. The results indicate that it is simple and reliable.

Key words Amphotericin B; Liposomes; Sterility test; Decimal reduction