

注射用泮托拉唑钠过滤除菌前配制液的微生物限度检查方法学验证

黄加秀*, 谢春娟, 王 林, 洪丽萍, 石晶萍, 朱佳丽, 周海强(扬子江药业集团有限公司, 江苏泰州 225321)

中图分类号 R927.11;R975.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4307-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.31

摘要 目的:建立注射用泮托拉唑钠过滤除菌前配制液的微生物限度检查方法。方法:采用薄膜过滤法进行预试验;根据预试验结果对样品以100、300 ml 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗后再进行验证试验。结果:预试验中各菌回收率大于70%,但白色念珠菌生长受抑;在样品经300 ml 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗后进行的验证试验中,所有菌的回收率均大于70%,且未见生长受抑情况。结论:确定样品微生物限度检查方法为细菌检查时样品直接过滤不冲洗;霉菌及酵母菌检查时样品过滤后需用0.9%无菌氯化钠溶液300 ml冲洗。建立的方法有效可行,可用于该品种配制液的微生物限度检查。

关键词 注射用泮托拉唑钠;微生物限度检查;方法学验证

Methodology Validation for Microbial Limit Test of Liquid Preparation of Pantoprazole Sodium for Injection before Filtration Sterilization

HUANG Jia-xiu, XIE Chun-juan, WANG Lin, HONG Li-ping, SHI Jing-ping, ZHU Jia-li, ZHOU Hai-qiang (Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jiangsu Taizhou 225321, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for microbial limit test of liquid preparation of Pantoprazole sodium for injection before filtration sterilization. METHODS: The membrane-filter method was used for pre-experiment. Validation test was conducted after the samples were rinsed with 100 and 300 ml sterile 0.9% Sodium chloride solution according to pre-experiment. RESULTS: The recoveries of all test bacteria in the pre-experiment were greater than 70%; the growth of *Candida albicans* had been inhibited. The recoveries of all test bacteria after rinsed with 300 ml sterile 0.9% Sodium chloride solution were greater than 70% in validation test; no inhibition of bacteria growth was found. CONCLUSIONS: In microbial limit test, the samples only should be filtrated directly; mold and yeast should be rinsed with 300 ml sterile 0.9% Sodium chloride solution after filtration. This method is effective and feasible, and can be used for microbial limit test of the liquid preparation.

KEY WORDS Pantoprazole sodium for injection; Microbial limit test; Methodology validation

泮托拉唑钠为第3代质子泵抑制剂,在中性和弱酸性条件下相对稳定,在强酸性条件下迅速活化。其具有的pH依赖的活化特性,使其对H⁺/K⁺-三磷酸腺苷(ATP)酶的作用具有更好的选择性^[1]。注射用泮托拉唑钠属于非最终灭菌无菌制剂,主要适用于十二指肠溃疡、胃溃疡、急性胃黏膜病变、复合性溃疡等引起的急性上消化道出血^[2]。

根据新版《药品生产质量管理规范》(GMP)的要求^[3],应当依据所用灭菌方法的效果确定灭菌前产品(如冻干制剂过滤除菌前配制液)微生物污染水平的监控标准,并定期监控。企业在日常生产过程中应做好微生物的污染水平的监控工作,对产品含菌量的变化进行趋势分析,及时发现不良趋势,采取相应的措施确保产品的无菌保证水平^[4]。这就要求对微生物限度检查方法进行验证以保证方法的可靠性和有效性,从而准确了解产品的微生物污染水平^[5]。笔者在此建立了注射用泮托拉唑钠过滤除菌前配制液的微生物限度检查方法,并进行了方法学验证。

1 材料

1.1 仪器

HTY-601型智能集菌仪、HTY型反复使用全封闭集菌培养器(杭州高得泰林生物技术设备有限公司);LRH-250型恒温培养箱(上海索普仪器有限公司)。

1.2 样品与试剂

注射用泮托拉唑钠过滤除菌前配制液(简称配制液,批号:1208043、1208073、1208083、1208093、1208113、1208143、

1208173,质量浓度:20 mg/ml,pH值:10.8~11.3)、0.9%无菌氯化钠溶液(批号:12032622)、pH 7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:12032621)均为自制。

注射用泮托拉唑钠处方为:泮托拉唑钠 40 g(以C₁₆H₁₅F₂N₃O₄S计),甘露醇 50 g,依地酸钙钠 1.5 g,注射用水加至2 000 ml,制成1 000支。

1.3 试验用菌种(第4代)

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均来自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.4 培养基

营养琼脂培养基(批号:110613)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1109052)、改良马丁培养基(批号:110525)、营养肉汤培养基(批号:110407)、改良马丁琼脂培养基(批号:101028)均由北京三药科技开发有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备

分别接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基,30~35℃培养18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基,23~28℃培养24~48 h。上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释成50~100 CFU/ml的菌悬液;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基,培养5~7 d,使大量孢子产生,加入3~5 ml含0.05%(V/V)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,然后吸出孢子悬液(管口带有薄的无菌棉花过滤菌丝)至

*助理工程师。研究方向:药品检验。电话:0523-86975516。E-mail:huangjx@yangzijiang.com

灭菌试管内,用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液将菌液稀释至50~100 CFU/ml的菌悬液,备用。

2.2 细菌、霉菌和酵母菌检查方法的验证

2.2.1 细菌、霉菌及酵母菌检查方法的验证(预试验,样品批号:1208043)。(1)试验组:取配制液20 ml,至含50 ml 0.9%无菌氯化钠溶液的集菌培养器中,并分别加入50~100 CFU的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌悬液,过滤,取出滤膜,菌面朝上贴至营养琼脂培养基平板上,于30~35℃倒置培养3 d。取配制液20 ml,至含50 ml 0.9%无菌氯化钠溶液的集菌培养器中,分别加入50~100 CFU的白色念珠菌、黑曲霉菌悬液,过滤,取出滤膜,菌面朝上贴至玫瑰红钠琼脂培养基平板上,于23~28℃倒置培养5 d。(2)菌液组:方法同试验组,不加样品。测定每一菌株所加的试验菌数。(3)供试品对照组:照试验组项下方法操作,不加菌悬液,作为供试品本底菌数。

计算试验组回收率[(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%]。结果大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的菌回收率分别为89%、91%、86%、92%、90%,白色念珠菌在不冲洗的情况下菌落生长情况(第3天)见图1。

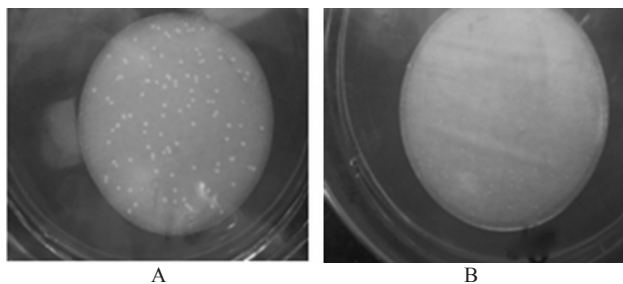


图1 预试验中白色念珠菌菌落生长情况(第3天)

A. 菌液组; B. 试验组

Fig 1 The growth of *Candida albicans* colonies in pre-experiment (the third day)

A. bacilli group; B. experimental group

虽然白色念珠菌的最终回收率大于70%,符合规定,但是试验组较菌液组菌落生长缓慢,表明样品对白色念珠菌的生长有抑制作用。故此法虽可用于该样品的细菌检查,但不适用于霉菌及酵母菌检查,需要对样品进行适当冲洗。

2.2.2 霉菌及酵母菌检查方法的第2次验证(样品批号:1208073)。(1)试验组:取配制液20 ml,至含50 ml 0.9%无菌氯化钠溶液的集菌培养器中,过滤,分别用100、300 ml 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗,每次100 ml,在最后一次冲洗液中加入50~100 CFU的白色念珠菌、黑曲霉菌悬液,取出滤膜,菌面朝上贴至玫瑰红钠琼脂培养基平板上,于23~28℃倒置培养5 d。(2)菌液组:方法同试验组,不加样品。测定每一菌株所加的试验菌数。(3)供试品对照组:照试验组项下操作,不加菌悬液,作为供试品本底菌数。(4)稀释剂对照组:取试验菌1 ml,至含50 ml 0.9%无菌氯化钠溶液的集菌培养器中,过滤,分别用0.9%无菌氯化钠溶液100、300 ml冲洗,取出滤膜,菌面朝上贴至玫瑰红钠琼脂培养基平板上,于23~28℃倒置培养5 d。

结果样品过滤后冲洗100 ml,试验组的白色念珠菌较菌液组菌落生长缓慢;而冲洗300 ml后,试验组的白色念珠菌与菌液组菌落生长情况一致,且回收率都符合规定,结果见图2。

由此得到样品微生物限度检查方法如下:细菌检查时样品直接过滤不冲洗;霉菌及酵母菌检查时样品过滤后需用0.9%无菌氯化钠溶液300 ml冲洗。对3批配制液按此法进行

重复验证,结果见表1。

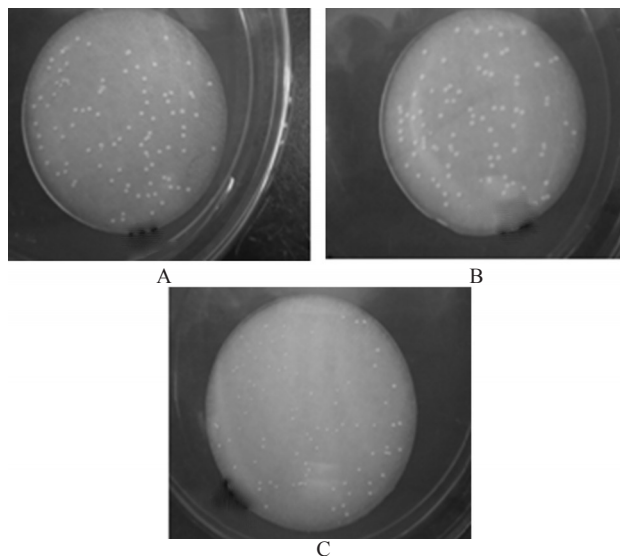


图2 第2次验证试验中白色念珠菌在不同冲洗量下菌落生长情况(第3天)

A. 菌液组; B. 试验组(冲洗量300 ml); C. 试验组(冲洗量100 ml)

Fig 2 The growth of *Candida albicans* colonies under different flush volume in 2nd test (the third day)

A. bacilli group; B. experimental group (300 ml of flush volume); C. experimental group (100 ml of flush volume)

表1 3批样品菌回收率验证结果(%)

Tab 1 Results of validation tests of recovery rate of 3 batches of samples (%)

批号	组别	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
1208073	试验组	103	83	95	92	92
	稀释剂对照组	98	99	88	99	95
1208083	试验组	90	89	100	92	89
	稀释剂对照组	85	79	99	81	93
1208093	试验组	76	89	96	92	98
	稀释剂对照组	76	94	75	95	91

由表1可见,各菌的回收率均符合规定,故采用此法进行微生物限度检查。

2.3 样品微生物限度检查

对3批配制液进行微生物限度检查,结果见表2。

表2 3批配制液的微生物限度检查结果

Tab 2 The microbial limit test of 3 batches of liquid preparation

批号	细菌数	霉菌及酵母菌数	细菌、霉菌及酵母菌总数	结果	标准规定
1208113	0	0	0	符合规定	应不得过 2 CFU/20 ml
1208143	0	0	0	符合规定	
1208173	0	0	0	符合规定	

3 讨论

由于洋托拉唑钠与pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液中的磷酸二氢钾、磷酸氢二钠组成的缓冲液电离出来的H⁺反应生成洋托拉唑,洋托拉唑不溶于水且遇光易变色,故会产生白色沉淀影响滤过^[6-7],因此用0.9%无菌氯化钠溶液代替pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液进行验证试验。

本品在不冲洗及冲洗量为100 ml的情况下,白色念珠菌在第3天时,试验组长势较菌液组弱,但到第5天时与菌液组长势相同且回收率也符合规定。所以在进行药品微生物限度

人防御素β在肿瘤发生中的作用及其机制研究进展

郑小卫*, 陈凌亚, 林能明*(浙江省肿瘤医院药剂科, 杭州 310022)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4309-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.32

摘要 目的:综述人防御素β在肿瘤发生发展中的作用及机制。方法:以“人防御素β”“防御素”“肿瘤”“作用机制”等为关键词,查阅1986—2012年间维普、PubMed数据库中的国内外相关文献,总结人防御素β与肿瘤的关系、对肿瘤的作用及机制。结果与结论:1986年Lichtenstem A等首先发现防御素能裂解肿瘤细胞,此裂解作用与防御素的浓度密切相关,温度下降或加入血清可抑制防御素的功能;人防御素β的表达失调促进肿瘤的发生发展,肿瘤形成后又进一步影响人防御素β的表达;人防御素β通过细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡、趋化免疫细胞、抗血管生成发挥对肿瘤细胞的作用,但作用机制尚未研究透彻,目前多限于体外水平。随着研究的不断深入,防御素可能会成为未来肿瘤治疗领域一类高效低毒的新药物。

关键词 防御素β;肿瘤;作用机制;综述

防御素(Defensins)是广泛存在于生物体中的一种富含半胱氨酸的阳离子肽,分子质量为2~6 kD,存在于脊椎动物、无脊椎动物和植物中,在先天免疫与抗细菌、真菌、原虫、病毒中有重要作用^[1]。成熟的防御素包含6个半胱氨酸残基,形成3个分子内二硫键,根据半胱氨酸的位置及二硫键的排列,被分为α、β、θ亚族^[2]。人防御素β(HBDs)分布广泛,并且可被诱导表达,在很多肿瘤中都存在表达失调的情况。近年的研究发现,人防御素β有抗肿瘤作用,其机制主要为细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡、增强机体对肿瘤细胞的免疫监视、抗血管生成等,有可能成为肿瘤治疗的有效靶点。笔者以“人防御素β”“防御素”“肿瘤”“作用机制”等为关键词,查阅1986—2012年间维普、PubMed数据库中的国内外相关文献,就人防御素β在肿瘤发生发展中的作用及机制研究作一综述。

1 人防御素β

首个人防御素β分离于肾透析者血浆,至今已经发现4种人防御素β:HBD1、HBD2、HBD3、HBD4。HBDs基因簇定位于人第8号染色体的p22~p23区间,主要包括2个外显子,一

个编码富含亮氨酸的信号肽和原片段,一个编码成熟肽。HBDs前体比成熟肽长,带负电荷,而成熟的防御素带正电荷;后者可被其前体的负电荷平衡,而前体帮助防御素正确地折叠^[3]。

HBDs以1-5,2-4和3-6配对的半胱氨酸残基区分,其一级结构是可变的,二级结构和三级结构相对保守,均由3个反向平行的β片层和1个N端的α螺旋组成。其一级结构见图1^[4]。

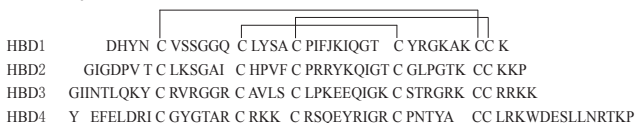


图1 HBDs的一级结构

HBDs由人上皮细胞产生,在人体中既存在固有表达,也可被微生物或脂多糖(LPS)诱导表达,对炎症反应具有双重作用。在无诱导刺激时,HBDs存在基础水平的表达,此时HBDs发挥抗炎作用,维持无炎症的内环境。当受细菌、真菌和病毒等外界因子刺激后,带正电荷的HBDs作为配体通过静

检查法验证时,应当逐日观察,及时发现样品对试验菌微弱的抑菌作用,便于寻求更有效的检验方法,保证对灭菌前微生物污染状况实行有效监控,确保无菌药品的安全有效。

经查阅相关文献并未发现有明确针对冻干制剂过滤除菌前配制液微生物限度的限度规定。为规范冻干制剂生产过程中过滤除菌前产品微生物的质量监控,保证药品质量,本企业制订了注射用泮托拉唑钠过滤除菌前配制液的微生物限度:细菌、霉菌及酵母菌总数应不得过2 CFU/20 ml。验证方法建立后,取3批样品按此方法检验,检查结果均符合规定。由此表明建立的方法有效可行,可用于该品种配制液的微生物限度检查。

参考文献

*药师,硕士。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-88122438。E-mail:tgg3333@163.com

#通信作者:硕士研究生导师,博士。研究方向:临床药理学、肿瘤药理与肿瘤个性化药物治疗方案筛选及新药开发。电话:0571-88122501。E-mail:lnm1013@163.com

[1] 蒋鹏,钱新毅.质子泵抑制剂:泮托拉唑[J].医药导报,2003,22(3):1841.
[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知[S].2010年版.北京:人民卫生出版社,2010:280-281.
[3] 国家食品药品监督管理局.药品生产质量管理规范[S].2011-03-01.
[4] 曹元,梁毅.无菌药品灭菌前微生物控制研究[J].中国药业,2009,18(22):9.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录103-107.
[6] Ekpe A, Jacobsen T. Effect of various salts on the stability of lansoprazole, omeprazole, and pantoprazole as determined by high-performance liquid chromatography[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999, 25(9): 1057.
[7] 李军,部敬顺,张鉴.注射用泮托拉唑钠的稳定性考察[J].中国药房,2005,16(21):1655.

(收稿日期:2013-07-23 修回日期:2013-09-23)