

药品微生物限度检查方法学验证的研究进展

庞云娟¹, 樊文研^{1*}, 刘康连¹, 梁 洁²

(1. 广西壮族自治区玉林食品药品检验所, 广西 玉林 537000; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530222)

摘要:《中国药典》对药品微生物限度方法学验证提出要求已实施了 10 多年, 但目前它仍是药品生产企业工作中的重点难点。本文通过查阅文献并结合自身工作经历, 论述了药品微生物限度方法学验证研究的必要性, 对比现版与旧版药典相关要求与方法的差异, 以帮助药品检验机构和药品生产企业正确解读、执行 2015 年版《中国药典》, 并开展相关工作。

关键词: 药品; 微生物限度; 方法学验证

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)10-2137-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.10.031

2005 年版《中国药典》^[1]首先提出药品微生物限度检查方法学验证的要求; 2010 年版^[2]基本与其保持一致, 但进一步提出了对培养基适用性检查的要求; 2015 年版^[3]对微生物限度检验中的实验环境、培养系统、微生物限度验证方法作出了重大修订, 又再次要求所有要进行微生物限度检查的药品都要按照现版药典要求重新进行相关验证。由此可知, 《中国药典》要求从国家和标准层面体现了对药品微生物的重视, 本文现将 10 多年来药品微生物限度检查方法学验证的研究进展进行了总结。

1 微生物限度检查方法学验证的必要性

1.1 《中国药典》要求之前的研究 早在 2005 版《中国药典》规定之前, 就已经有研究人员进行了抗生素类^[4-7]和中成药类^[8-10]药品的微生物检查方法验证研究, 指出含抑菌成分的药品应采用培养基稀释法或低速离心-薄膜过滤法联合使用, 用一定量冲洗液冲洗后正面贴膜培养, 可大大提高方法的加菌回收率。张润婕^[11]也提出了对报批产品的审批要求申报单位提供药品微生物限度检查方法学验证的研究资料; 王知坚^[12]等在审核新药质量标准时, 对 164 个品种进行了微生物限度方法学验证, 提出对照菌回收率在 70% 以上时验证方法才有效。

1.2 《中国药典》要求之后的研究 按照《中国药典》^[1-2]一部的要求, 李立娜^[13-39]等对 43 个品种的药品进行微生物限度检查方法学验证研究, 覆盖了合剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂、胶剂、丸剂、洗液、乳液、喷雾剂等剂型, 给药途径亦包含了口服给药和局部给药, 其中细菌数的验证采用大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌进行加菌回收试验, 发现可用常规法的有 17 种, 培养基稀释法(0.5 mL/皿)的有 6 种, 培养基稀释法(0.2 mL/皿)的有 11 种, 薄膜过滤法的有 5 种, 中和剂处理后采用常规法的有 1 种, 离心后取上清液的有 3 种 [1 种取上清液按

常规法, 2 种取上清液按培养基稀释法(0.2 mL/皿)]; 霉菌及酵母菌数的验证采用白色念珠菌、黑曲霉进行加菌回收试验, 发现可用常规法的有 31 种, 培养基稀释法(0.5 mL/皿)的有 1 种, 培养基稀释法(0.2 mL/皿)的有 6 种, 薄膜过滤法的有 4 种, 中和剂处理后采用常规法的有 1 种; 控制菌检查项目包括大肠埃希菌、大肠菌群、沙门菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌, 其中可用常规法的有 60 项, 培养基稀释法的有 8 项, 薄膜过滤法的有 1 项, 中和剂处理后采用常规法有 1 项。

赵会兰^[40]对不同厂家七叶安神片进行验证, 发现相同品种、不同厂家片剂的抗菌作用不同; 肖双^[41]对来源于 2 个不同企业的安神丸进行微生物限度检查方法学验证, 发现安神丸 1 细菌采用培养基稀释法(0.2 mL/皿), 其他项目采用常规法; 安神丸 2 细菌、大肠菌群采用薄膜过滤法, 其他项目采用常规法, 表明安神丸 2 比安神丸 1 具有更强的抑菌作用; 郑兆显^[42]等对来源于 8 个厂家的通便灵胶囊进行微生物限度检查方法学验证, 发现 4 家采用常规法, 4 家采用培养基稀释法。

2 回收率试验设计

微生物限度检查方法学验证中回收率试验的设计至关重要, 因为加菌回收试验是重点难点, 其除了遵循由简单到复杂、由单一到联合外, 还要考虑尽量减少样品可能被污染环节和步骤。

兰茜等^[32-39]基本按照以下方法进行预试验摸索: 常规法(1 mL/皿)、培养基稀释法(0.5 mL/皿)、培养基稀释法(0.2 mL/皿)、薄膜过滤法(冲洗量由 100 mL 开始), 但薄膜过滤法比较普遍的问题是样品堵塞滤膜, 导致抽滤速度慢或难以继续。以往通常会对供试品溶液进行静置^[43]或低速离心^[44-45]处理后, 再取一定量上清液过滤膜, 但对于一些抑菌活性特别强的药物, 中和剂^[46-47]的使用通常也

收稿日期: 2017-04-07

作者简介: 庞云娟(1983—), 女, 主管药师, 从事药品质量标准研究和制订。E-mail: pangyunjuan2005@163.com

* 通信作者: 樊文研(1973—), 女, 高级工程师, 从事药品质量标准研究和制订。E-mail: 2740876952@qq.com

在薄膜过滤法时予以考虑，必要时冲洗液温度^[48-49]也要进行验证；而对于一些非水溶性样品，供试品溶液制备要使用合适的活性剂^[50-52]。

李珏^[53]收集了不同抑菌作用、不同剂型的样品（A ~ C）3 个，分别在 3 个不同环节（A 在取样后加菌、B 在供试液制备后加菌、C 在最后环节加菌）进行加菌回收操作，发现不同加菌时间下回收率存在显著差异；李霞^[54]认为，比较合理的加菌时间点应该是在样品处理前加入一定量阳性菌后，再采用适宜方法进行前处理，其所得回收率才能真实反映方法的可行性。旧版《中国药典》^[1-2]中关于加菌回收试验的描述是“取供试品溶液与试验菌菌液，分别注入平皿”，菌液在培养基摇碟时与供试品溶液相接触；现版《中国药典》^[3]中是“取已经制备好的供试品溶液，加入试验菌，混匀”，菌液在供试品溶液制备过程中即与其直接混匀接触，充分模拟样品污染状态，能更真实地反映样品的染菌状态，但也增加了操作难度，所以在 2015 年版《中国药典》要求中，加菌回收试验更是微生物限度方法学验证的重点难点。

按照现版《中国药典》^[3]的要求，平皿法应该先把菌加到制备好的供试品溶液中，混匀后再行注皿，导致以前方法设计中的培养基稀释法不再是方法学验证的常用方法，刘绪平等^[55-59]也证实了这一点。以固体样品为例，现在主要按照以下方法渐进地进行预试验摸索：常规法（1：10 供试液 1 mL/皿）、供试品溶液稀释法（1：20 供试液 1 mL/皿）、供试品溶液稀释法（1：50 供试液 1 mL/皿）、供试品溶液稀释法（1：100 供试液 1 mL/皿）等（供试品溶液的稀释倍数要结合样品在该项微生物的限度进行充分考虑）、薄膜过滤法（1：10 供试液 1 mL/膜，冲洗量由 100 mL 开始渐进地验证）。培养基稀释法要结合供试品溶液稀释法一起使用，当霉菌及酵母菌的总数限度为 10² CFU/g 时，由于供试品溶液可稀释的空间不大，两者相结合的方法（1：50 供试液 1 mL 分注 2 皿或 5 皿）也会被采用。

目前，现版《中国药典》^[3]已不再提倡使用离心沉淀集菌法，可能是考虑到离心沉淀会影响微生物检查结果。结合笔者工作经历发现，制备好的菌液摇匀后静置再注皿时，平皿长菌落比摇匀即注皿的要少很多，表明静置或离心沉淀会导致菌下沉；刘广文等^[60]提到“在进行薄膜过滤时须先将供试液采用适宜的方法进行预处理，然后移至带有冲洗液的滤罐中充分混匀后再进行减压抽滤，否则由于供试液杂质太多造成滤罐堵塞，引起滤罐爆裂，可能造成人员伤害”，但笔者认为该方法日常检验操作很不方便，实用性不强。满足采用薄膜过滤法的样品必须易于通过滤膜或者有解决滤膜堵塞的措施；对于抑菌作用特别强、不易通过滤膜的样品，可采用中和法^[55-56]、供试品溶液稀释法^[56-57]与薄膜过滤法相结合的方法解决堵塞滤膜的困难，消除样品强抑菌的作用。在方法学验证时，不能只追求加菌回收比值地去反复作验证试验，而应充分考虑该方法对人员操作的方便性及安全性。

3 影响微生物限度检查方法学验证的因素

李超美^[61]曾组织其所在省 9 个地市药检所，对同品种、同批号中成药香莲丸的微生物限度进行研究，发现 9 个实验室所采用的验证方法并不完全相同，同厂家、同品种、同批号丸剂在不同实验室验证时出现不同结果，表明其受人员操作的影响很大；玛尔江·木坎^[62]认为存在以下因素：标准菌种的选择和保存不当（建议采用新鲜培养物）、不同供试液制备方法（应力求均匀分散）、培养基的影响（建议现用现配）、计数和观察的误差、设备及人员的影响、抽样和取样误差；刘庆兰^[63]报道，影响检验误差的因素有培养基、供试品溶液制备、检验设备和用具、菌落计数误差、药物自身性质、操作环境等。

加菌回收的试验菌制备要克服 2 个难题：一是菌液定量的把握，要求加入的试验菌使每 1 mL 供试液或每张滤膜所过滤的供试液中，含菌量不大于 100 CFU；二是菌株传代的把握，《中国药典》要求，各试验菌株（除黑曲霉外）应该是新鲜培养物，且传代次数不得超过 5 代。菌液的定量关系不同于化学对照品含有量，后者性质更稳定，但菌液含有量是不固定的，其自身也是 1 个增殖与死亡的代谢过程，所以每一次培养的新鲜培养物都要进行计数。菌液计数要作新鲜培养物的预计数和每次试验时的同步计数，新鲜培养物使用期限一般在 1 周以内，到下周再使用又要重新培养，并且必须确保传代次数不得超过 5 代，同时为了确保试验菌株的生物学特性，还要进行针对性的生化、鉴定等试验。

4 药品检验机构和药品生产企业面临的困难

钟国庆^[64]指出了关于医院制剂开展方法学验证的困难，如在检验仪器投入方面，有的单位甚至连过万元的设备都没有，也无开展方法学验证所需的生物安全柜等设备，菌种保存无法有效控制；人员专业素质不高，大部分日常工作仅以开展简单检验为主，缺乏相应培训和业务交流；领导不够重视等。马鸣晓^[65]总结了微生物方法学验证存在工作量大、不同实验室方法欠佳、重复劳动过多等问题。罗书香^[66]对 12 家药品生产企业 36 个品种的验证资料进行统计分析，发现存在诸多缺陷，如验证结果和结论表述不清楚或不全面、未提及试液制备或制备方法错误、未提供所验证药品品种处方、记录不全、无证无编号等。吴潇^[67]曾建议国家收集资料整理分析，出台一些具体品种的微生物限度检查标准，以方便药品监督抽查检验，但经过了这么多年，相关验证还是药品检验机构和药品生产企业的联系和沟通，集中从上而下的管理并未落实。

笔者结合从事 10 多年药品微生物检验工作的经历，在审核各厂家不同品种的微生物限度方法学验证材料时发现，大型药品生产企业在这方面相对规范，而中小型比较薄弱，药典和标准解读不到位，导致验证项目不全或多余、方法设计不合理、实验研究不规范等问题。

5 结语

2015 年版《中国药典》中的微生物限度检查法在 2010

年版的基础上进一步完善，实现了与国际通用标准的接轨，有利于从微生物角度控制非无菌制剂的安全性，并保障其有效性。为了方法的完整性和检验结果的可靠性，进行一厂、一品、一规的微生物限度检查验证和标准制订是非常有必要的。因此，作为拥有设备、人员、专业优势的药品检验机构，有责任和义务帮助药品生产企业继续推动和规范该项工作。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2005 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2005：附录 70-附录 79.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：附录 79-附录 88

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版四部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：145-149.

[4] 杜平华，陈 涛. 阿莫西林微生物限度检测方法的验证 [J]. 海峡药学，2002，14(6)：84-85.

[5] 杜平华，朱世真. 抗菌药物微生物限度检查方法的验证 [J]. 中国抗生素杂志，2003，28(5)：311-313.

[6] 张新妹，胡昌勤，李 艳. 一般用途的抗生素滴眼剂的微生物限度检查方法[J]. 天津药学，2003，15(3)：16-19.

[7] 宋 勤，袁林娜，刘应旭. 口服头孢拉定制剂微生物限度检查法研究试验 [J]. 药物分析杂志，2005，25 (6)：689-691.

[8] 赵建英，李爱玲，陆 蓓. 含黄芩中成药微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药业，2004，13(11)：44-45.

[9] 应国红. 18 种中成药污染细菌的回收率试验[J]. 江西中医学院学报，2005，17(3)：65-66.

[10] 张玉兰，洪建文，罗翰宇. 复方丹参片微生物限度检查方法的建立[J]. 中药材，2005，28(8)：728-730.

[11] 张润婕. 药品微生物检验工作中的方法学验证[J]. 现代医药卫生，2003，19(1)：113.

[12] 王知坚，邵惠琴，杜 芸. 药品微生物限度检查法有效性验证实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志，2004，21 (3)：211-213.

[13] 李立娜. 复方碘口服溶液微生物限度检查方法学验证[J]. 内蒙古中医药，2016，35(13)：143-144.

[14] 蒋 玲，杨亮朴，朴春梅. 小清咽颗粒微生物限度检查方法学验证[J]. 贵州科学，2015，33(6)：83-85.

[15] 沈婷婷，李世芳，刘 瑾，等. 灵通颗粒微生物限度检查方法学验证[J]. 海峡药学，2015，27(1)：45-46.

[16] 余金燕，任平远，马小兵，等. 乙肝解毒胶囊的微生物限度检查方法验证[J]. 中国民族民间医药杂志，2016，25 (11)：10-11.

[17] 杨 劼，段肖翠，李 涛，等. 养真接骨胶囊微生物限度检查方法验证[J]. 河北医药，2016，38(9)：1363-1365.

[18] 高 源. 花红胶囊微生物限度检查方法学验证[J]. 生物技术世界，2016(2)：209.

[19] 胡小林，牟明芳. 颠茄合剂微生物限度检查方法学验证

[J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15(88)：179-180.

[20] 陈海鹰，范正达，陈叶琴，等. 两种医院制剂微生物限度检查方法学验证[J]. 海峡药学，2015，27(10)：52-54.

[21] 汤 慧，马杨红. 肺泰胶囊微生物限度检查方法学验证 [J]. 海峡药学，2015，27(9)：49-51.

[22] 王卓娅，谢华蓉，史亚楠，等. 当归活血液微生物限度检查的方法学验证[J]. 广东药学院学报，2015，31 (3)：345-348.

[23] 霍玲玲，冯健科. 消肿止痛洗液微生物限度检查法的研究 [J]. 西部中医药，2015，28(6)：34-35.

[24] 颜 明，王东兴，王艳美，等. 小儿启脾片微生物限度检查方法验证研究 [J]. 中国执业药师，2015，12 (5)：21-23.

[25] 于海云，张凤芝，王宝安. 蒙成药德都红花七味丸微生物限度检查的方法学验证[J]. 北方药学，2015，12(1)：13-15.

[26] 张小华，王婷婷，徐玉娥. 9 种中药口服制剂微生物限度与控制菌检查法的建立及方法学验证[J]. 西部中医药，2015，28(5)：36-39.

[27] 马韵韵. 枫蓼肠胃片微生物限度检查方法学验证试验研究 [J]. 生物技术世界，2015(4)：120.

[28] 张丽梅，李 俊，宋 畅. 三种中药制剂微生物限度检查方法学验证[J]. 解放军药科学学报，2015，31(1)：90-92.

[29] 海 金，于海云，张凤芝，等. 蒙成药德都红花七味丸微生物限度检查的方法学验证[J]. 北方药学，2015，12 (1)：13-15.

[30] 赵加强，周荣光，杨兆祥，等. 灯盏花乙素苷元的微生物限度检查方法验证[J]. 中国民族民间医药杂志，2015，24(1)：32-33.

[31] 马韵韵. 花蛇解痒胶囊微生物限度检查方法学验证试验研究[J]. 生物技术世界，2015(1)：12.

[32] 兰 茜，李 萍. 清湿热止痒洗液微生物限度检查方法的验证[J]. 食品与药品，2015，17(5)：342-346.

[33] 马韵韵. 丁细牙痛胶囊微生物限度检查方法学验证试验研究[J]. 生物技术世界，2015(12)：152.

[34] 张心悦，武海洋，朱逍遥，等. 3 种医院糊剂微生物限度检查方法学研究 [J]. 中国药师，2015，18 (12)：2198-2200.

[35] 严晓明，刘 萌，朱 燕. 四种医院制剂微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药事，2015，29(5)：485-491.

[36] 赵加强，周荣光，杨兆祥，等. 百宝丹喷雾剂微生物限度检查方法学验证[J]. 亚太传统医药，2015，11 (21)：23-25.

[37] 张广求，刘 文，田祥学. 碘乳康口服溶液微生物限度检查方法学验证[J]. 中国执业药师，2015，12(8)：10-13.

[38] 范永春，张国林. 小儿疳积洗剂微生物限度检查的方法验证[J]. 海峡药学，2015，27(11)：55-58.

[39] 汤 慧. 仙乐雄胶胶囊微生物限度检查方法学验证 [J]. 现代中药研究与实践，2015，29(1)：61-63.

[40] 赵会兰. 15 种中成药微生物限度检查方法验证[J]. 中国执业药师，2014，11(5)：17-20.

[41] 肖 双. 不同企业来源安神丸微生物限度检查方法学验证

比较[J]. 中国当代医药, 2010, 17(21): 133-136.

[42] 郑兆显, 张秀花, 李瑞英, 等. 不同厂家通便灵胶囊微生物限度检查方法学验证的探讨[J]. 药学研究, 2014, 33(8): 459-460.

[43] 特玉香, 曹艳玲, 林丽英. 十全大补丸微生物限度检查方法验证[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(6): 932-935.

[44] 钱文静, 张 玫. 盐酸米诺环素胶囊微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药品标准, 2008, 9(5): 346-349.

[45] 吴晓玲. 头孢泊肟酯胶囊的微生物限度检查方法研究[J]. 中国药业, 2008, 17(4): 40-41.

[46] 王伟箴, 葛朝霞, 头孢氨苄甲氧苄啶胶囊微生物限度检查方法验证[J]. 中国药品标准, 2007, 8(5): 370-374.

[47] 董 良, 徐 翔, 李 梅. 联磺甲氧苄啶胶囊微生物限度检查方法的研究[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(6): 327-328.

[48] 范震洪. 阿奇霉素缓释口服干混悬剂微生物限度检测[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(6): 348-351.

[49] 向 东, 范 兵, 李红缨. 薄膜过滤法检查蜂胶牙泰喷雾剂中微生物的限度[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(3): 299-302.

[50] 杨 洁, 严建国, 李志强. 微生物限度检查中非水溶性液体制剂供试液的制备方法[J]. 中国药业, 2004, 13(1): 54-55.

[51] 陆 蓓, 凌 明, 赵建英. 几种栓剂的微生物限度检查法的验证[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(3): 121-122.

[52] 杨 欣, 李秋菲, 赵 荣. 利拉萘酯乳膏微生物限度检查方法探讨[J]. 西北药学杂志, 2003, 18(6): 264-265.

[53] 李 珏, 王知坚, 赵 磊. 3 种药品不同加菌时机对菌回收率的影响[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1116-1118.

[54] 李 霞, 周 剑, 刘 理, 等. 2005 版中国药典微生物限度检查法验证试验中加菌时间的探讨[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 288-291.

[55] 刘绪平, 张文婷. 麝香草酚《中国药典》2015 年版微生物限度检查法方法学研究[J]. 实用中西医结合临床, 2016, 16(12): 80-82.

[56] 罗达龙, 覃 蓝, 李夷君. 盐酸氨溴索缓释胶囊微生物限度检查的方法学验证[J]. 临床医药文献杂志, 2016, 3(12): 2439-2440.

[57] 刘绪平, 肖钦钦, 陈 希, 等. 阿奇霉素胶囊新版药典微生物限度检查方法的建立[J]. 中国医药科学, 2016, 6(17): 37-39.

[58] 王洪家. 解毒散结颗粒《中国药典》2015 年版微生物限度检查方法学验证[J]. 天津药学, 2016, 28(4): 17-19.

[59] 孟宪丽. 硝酸咪康唑搽剂微生物限度检查方法学验证[J]. 科研, 2016(2): 210-211.

[60] 刘广文, 苑艳飞. 养肝解毒丸微生物限度检查法的验证实验[J]. 中国医药科学, 2016, 6(13): 54-57.

[61] 李超美. 全省 9 个地市药检所对中成药香莲丸微生物限度检查结果的研讨[J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 78-80.

[62] 玛尔江·木坎, 萨丽塔娜提·居努司. 影响微生物限度检查及方法验证的影响因素[J]. 新疆畜牧业, 2016, 10(6): 36-37.

[63] 刘庆兰. 分析药品微生物限度检验误差影响因素[J]. 医药卫生, 2015(10): 289.

[64] 钟国庆. 医院制剂开展方法学验证的困难与解决办法[J]. 中国药品标准, 2010, 11(4): 303-305.

[65] 马鸣晓. 地市级药检所开展无菌和微生物限度检查方法学验证工作之我见[J]. 中国药师, 2008, 11(9): 1105-1106.

[66] 罗书香. 药品微生物限度检查方法验证资料分析[J]. 中国药事, 2007, 21(7): 525-526.

[67] 吴 潇. 近年来我国药品微生物限度检查方法验证概况[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(20): 115-117.