

抑菌性药品微生物限度检查研究

田霞

重庆市黔江食品药品检验所 重庆 409000

【摘要】本文结合我国《中国药典》对抑菌性药品微生物限度检查要求,深入研究了药典颁布前后研究情况,并分别从回收率试验设计、微生物限度检查影响因素和药品生产、检验机构难点等方面梳理了前人研究成果,以期为我国抑菌性药物微生物限度检查研究提供有益的参考。

【关键词】抑菌性;药品;微生物;限度检查

【中图分类号】R446.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**2096-1685(2021)37-0045-02

自《中国药典》(2005年版)首次提出药品微生物限度检查要求以来,其2010年修订版本沿用了药品微生物限度检查要求,但进一步明确了培养基适用性检查要求。2015年版本明确了药品微生物限度检查实验环境、培养系统、微生物限度检查方法等要求^[1],并提出了纳入限度检查的药品必须按新版微生物限度检查的要求。由此可见,我国国家标准层面对药品微生物限度检查要求日趋严格,充分体现了我国国家对药品质量重视,本文现将近年来抑菌性药品生物限度检查研究成果梳理和总结。

1 回收率试验设计研究

回收率试验设计对抑菌性药品微生物限度检查结果影响显著,其原因在于微生物回收试验的重点难点是加菌回收试验,其试验设计直接影响微生物回收率,因此,在回收率试验设计时,应尽量遵循由简入难、单一至联合的设计思路,并尽可能减少回收试验设计中样品可能受到微生物污染的环节和试验步骤。兰茜等人对清湿热止痒洗液进行微生物限度检查验证时^[2],分别采用常规法、培养基稀释法、薄膜过滤法进行预试验设计,经预试验研究,薄膜过滤法应用过程中存在样品堵塞滤膜的问题,导致样品渗滤速度慢或难以渗滤,并指出抑菌活性较强的药物不适用于常规的静置或离心后取上清液过滤方法,中和剂类药品应经预试验验证后确定设计薄膜过滤法,对于非水溶性药品,可在样品溶液制备时和试验设计时,应合理选择活性剂;李珏等人在对3种药品不同加菌时机研究^[3],通过收集3种不同抑菌作用、不同剂型的药品,并分别设计了取样后加菌、供试液制备后加菌、最后环节加菌设计方案,比较验证不同加菌时机与菌回收率之间的关系,经试验研究,3种不同剂型的药品在不同加菌时机下,菌回收率存在显著差异,将加菌时机提前后会造造成加菌回收率偏低问题;李霞等人对非水溶性供试品萃取并低速离心沉淀后进行回收率试验研究^[4],经研究表明,8株菌株中萃取前处理后,3株菌株可100%回收,其余菌株回收率为70%。正采用离心沉淀法前处理后,白色念珠菌回收率低于30%,黑曲霉回收率也仅为30%,其余6株菌株中,加菌时机对不含辅料或可溶性辅料的菌株回收率影响不大,但加菌时机度对含有不溶性辅料的样品影响显著,可能造成菌回收率低于70%,并建议回收率试验设计时应根据样品抑菌活性合理选择前处理方法和加菌时机。

样品前处理加菌时机为样品处理前,并在加菌后采用合理方法进行前处理。在《中国药典》(2005年版)中,加菌时机表述为“取样品溶液和试验菌液分别注入平皿内”,加菌后通过培养基摇碟过程实现与样品溶液充分接触。而在《中国药典》(2005年版)中,明确了采用平皿法时应先加菌至样品溶液中充分混合摇匀后再注入平皿中,因此,旧版药典中药品微生物限度检查中培养基稀释法和加菌时机并非正确操作方法,应引起注意。刘绪平等人

通过对肠炎宁片进行微生物限度检查验证^[5],按浓度1:10和1:100制备供试液,采用平皿常规法进行大肠埃希菌检查、耐胆盐革兰阴性菌检查和沙门菌检查,经试验研究,5种试验菌回收率均在0.5~2.0,表明稀释倍数对供试液限度检查影响不显著。

当前,《中国药典》(2015年版)中已不再提倡采用离心沉淀集菌法进行微生物限度检查,其原因可能是基于离心沉淀对微生物限度检查结果准确性造成不利影响,结合离心沉淀集菌法试验经验,当供试液加菌后摇匀注入平皿后,平皿内长菌落较摇匀后再注皿少,其原因可能是由于离心沉淀或静置法会造成加菌沉淀。刘广文等人对养肝解毒丸微生物限度检查研究中认为^[6],微生物薄膜过滤时,为防止试液杂质过多造成滤膜堵塞和滤罐爆裂问题发生,应先将试液充分摇匀后减压抽滤。但考虑到其操作的复杂性,建议在药品微生物限度检查时并采用薄膜过滤法时,应充分考虑该检查方法的适用性,或采取易于操作的滤膜防堵措施。针对抑菌性强且滤过性低的药品微生物限度检查时,可选用中和法或稀释法联合薄膜过滤法进行微生物限度检查,以此解决抑菌性强药品强抑菌作用的不利影响。

2 抑菌性药品微生物限度检查影响因素研究

李超美对中成药香莲丸微生物限度检查研究^[7],通过对其所在省内9个地市药检所实验室消除抑菌成分处理方法测定细菌回收率高于70%,测定霉菌、酵母菌回收率且采用常规法的实验室1所,仅占总实验室总数的11.1%,采用其他限度检查方法的实验室8所,占总数比例为88.9%,相同厂家、品种、批次丸剂检查结果存在较大的差异,其主要原因是由于操作人员操作误差影响;李佩蓉等人影响检验误差影响研究中发现^[8],培养基、供试品溶液制备、菌落计数误差、药物自身性质、检验设备误差和操作环境等因素均对检验误差造成一定的影响。结合现有研究成果,加菌回收试验菌制备应充分考虑两方面问题:一是菌液注入量把握,试验菌注入量时,含菌量应小于100CFU/mL;二是菌株传代次数把控。根据《中国药典》要求,除黑曲霉以外的试验菌应为新鲜培养的菌株,且菌株传代次数应控制在5次以内。菌液定量关系不同于化学对照品含量,其原因在于化学对照品性质稳定,而菌液含量并不固定,菌株处于增殖、死亡的代谢动态过程中,因此,每次菌株均应为新鲜菌株培养物,且应准确计数后注入。为确保新鲜培养物计数控制在《中国药典》要求范围内,新鲜培养物使用期限应限制在7d以内,到期再次试验时应重新培养,防止菌株计数不准确或超出传代次数。此外,为确保菌株的生物学特性,应对试验菌株进行针对性生化、鉴定等试验,以满足试验研究要求。

3 药品检验、生产面临的难点问题研究

随着我国药品质量检验标准日趋严格,抑菌性药品微生物限度检查方法和标准日益规范,药品检验、(下转第47页)

生物污染鉴定和溯源方面具有显著应用优势。

2.3 基于细菌遗传物质分析的鉴定和溯源

基于细菌遗传物质分析的药品微生物污染鉴定和溯源方法包括核糖体分型技术和 16S rRNA 宏基因组高通量测序技术。核糖体分型技术是将微生物染色体 DNA 经限制性内切酶处理后,经琼脂糖凝胶电泳分离出片段,并将片段转印至硝化纤维素膜上,并运用标记 23S、16S 和 5S 的 rRNA 序列探针杂交检测,以此获得由不同分子量大小、不同数目的片段组成的指纹图谱,并基于 BioNumerics 数据库软件对指纹图谱进行带型识别,作为微生物污染鉴定依据。16S rRNA 宏基因组高通量测序技术是基于 16S rDNA 扩增子高通量测序技术的检查鉴定方法。与 16S rDNA 技术相比,16S rRNA 宏基因组高通量测序技术不需细菌培养即可实现细菌群落多样性鉴定。甘永琦等人在饮片污染耐热菌群落鉴定研究中,基于 16S rRNA 技术对 9 种复方桔梗麻黄碱糖浆进行微生物污染鉴定,对同一企业样品污染源菌株进行同源性分析,结果发现样品中存在微生物超标和污染不均匀问题,微生物污染主要为厚壁菌门、蓝菌门、变形菌门等,不同品种药品包括土壤芽孢杆菌属、甲基杆菌属、泛菌属等细菌,可为药品微生物污染鉴定和溯源提供有效依据,并可用于潜在致病菌检查,尤其适用于丰度低、传统培养方法难以分离鉴定的菌属鉴定。但因该方法测序长度有限,多种水平微生物污染检测结果准确性低,一般用于微生物属水平测序鉴定。

3 结语

药品微生物污染鉴定和溯源是药品质量安全保障的重要举措,关系到人民群众生命健康。随着我国药品微生物限度检查标准日益规范,加强药品微生物污染鉴定和溯源迫在眉睫。通过对我国饮片微生物污染研究成果进行梳理和总结,不难发现我国饮

片总体微生物污染问题严重,耐热菌和耐胆盐革兰阴性菌检出率较高,其主要原因是受栽植土壤环境和粪肥使用等因素影响。同时,在药品加工企业微生物污染检查中发现,同一企业药品存在部分药品污染严重、污染程度不一、微生物污染多样等问题,突出体现出企业药品净制不彻底、灭菌不到位等问题,要求药品生产企业、药检机构加强微生物污染鉴定和溯源,合理选用 API 系统、Vitek 2 Compact 系统、FRIT、MALDI-TOF/MS 等技术进行微生物污染鉴定和溯源,及时、快速、准确分离出致病菌,确保药品质量安全。

参考文献

- [1] 徐昕怡,许华玉,尚悦,等.《中国药典》2020 年版第四部通用技术要求增修订概况[J].中国药品标准,2020,21(4):299-306.
- [2] 杨美成,山药等 18 种中药饮片污染微生物状况及微生物限度标准的研究.上海:上海市食品药品检验所,2015-07-14.
- [3] 陈伟盛,关倩明,朱荣峰,等.药品微生物限度检查中微生物污染的鉴定和溯源分析[J].药物分析杂志,2014,34(1):58-63.
- [4] 绳金房,陕西省中药饮片微生物污染状况调查及微生物限度标准研究.陕西:陕西省食品药品监督检验研究院,2017-04-12.
- [5] 江志杰,刘文杰,张光华,等.鳖甲中污染微生物检测、分离鉴定及耐药性分析[J].中药材,2014,37(10):1739-1742.
- [6] 杨燕,孙梦家,蒋波,等.药品无菌检查中污染微生物的鉴定与 OOS 调查分析[J].中国医药工业杂志,2016,47(12):1559-1563.

(上接第 45 页) 生产面临一定的困难。钟国庆等人通过对 26 种医院制剂进行微生物限度检查中发现,26 种医院制剂中 19 种制剂回收率低于 70%,控制菌检查中有 10 种试验菌不能检出,需综合运用培养基稀释粉、薄膜过滤法、离心法、中和法等方法进行微生物限度检查,但医院在检验仪器投入方面不足,甚至部分医院严重缺乏微生物限度检查设备而无法开展限度检查,菌种保存质量无法得到有效保障,人员专业素质偏低,大部分限度检查以简单检验为主,导致医院制剂未经微生物限度检查投入使用,影响了制剂使用安全;马鸣晓等人通过对地市级药检所微生物限度检查情况进行调研,发现地市级药检所开展无菌和微生物限度检查工作的不多,导致“无菌”和“微生物限度”检查形同虚设,并形成了药品监管盲区,其原因在于微生物方法学验证工作量大、不同药检所方法欠佳,重复劳动过多等问题。结合笔者药检工作经验,发现药品生产厂家微生物限度检查中,大型企业检查检验相对规范,而中小型药企则相对薄弱,对药典中规范要求和限度检查标准理解不到位,进而出现验证项目不全、试验设计不合理、试验过程操作不当等问题。

4 结语

新时代背景下,随着《中国药典》日益完善,实现了我国抑菌性药品检查检验与国际通用标准接轨,有利于从微生物方面把关和控制药品质量,提高药品生产和流通环节的安全性。为提高药品微生物限度检查质量,药品生产企业、药检机构、医院应根据药

典要求配备专职人员、专用设备,制定符合药典要求的药品微生物限度检查制度,促进药品微生物限度检查要求落实到位。

参考文献

- [1] 洪小栩,许华玉,尚悦,等.2015 年版《中国药典》四部增修订概况[J].中国药学杂志,2015,50(20):1782-1786.
- [2] 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.
- [3] 李珏.药品微生物实验室计数培养基的质量控制[C].中国药理学学会.2010 年度全国医药学术论文交流会暨临床药学与药学服务研究进展培训班论文集,2010:162.
- [4] 李霞,周剑,刘理,等.2005 年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.
- [5] 刘绪平,张文婷,易路遥,等.肠炎宁片 2015 年版药典微生物限度检查法验证与评价[J].中国药师,2017,20(5):946-948.
- [6] 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):54-57,129.
- [7] 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.
- [8] 李佩蓉,范秋汝.药品微生物限度检验的误差影响因素[J].北方药学,2011,8(3):81,119.