

【干货分享】新版《中国药典》中关于非无菌产品微生物限度检查的要点

新版《中国药典》中对非无菌产品的微生物限度及检查方法等都做出了相关要求,本文对其要点进行了整理,供大家参考。

微生物计数法

1、微生物计数法用于能在有氧条件下生长的嗜温细菌和真菌的计数。

2、微生物计数法用于检查非无菌制剂及其原、辅料等是否符合规定的微生物限度标准时,应按下述规定进行检验,包括样品的取样量和结果的判断等。除另有规定外,本法不适用于活菌制剂的检查。

3、微生物计数试验环境应符合微生物限度检查的要求。

4、检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染,防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。

5、洁净空气区域、工作台面及环境应定期进行监测。

6、如供试品有抗菌活性,应尽可能去除或中和。

7、供试品检查时,若使用了中和剂或灭活剂,应确认其有效性及对微生物无毒性。

8、供试液制备时如果使用了表面活性剂,应确认其对生物无毒性以及与所使用中和剂或灭活剂的相容性。

计数方法

1、计数方法包括平皿、薄膜过滤法和最可能数法(Most-Probable-Number Method, 简称 MPN法), MPN法用于微生物计数时精确度较差, 但对于某些微生物污染量很小的供试品, MPN法可能是更合适的方法。

2、供试品检查时, 应根据供试品理化特性和微生物限度标准等因素选择计数方法, 检测的样品量应能保证所获得的试验结果能够判断供试品是否符合规定。

3、所选方法的适用性须经确认。

计数培养基适用性检查和供试品计数方法适用性试验

1、供试品微生物计数中所使用的培养基应进行适用性检查。

2、供试品的微生物计数方法应进行方法适用性试验, 以确认所采用的方法适合于该产品的微生物计数。

3、若检验程序或产品发生变化可影响检验结果时, 计数方法应重新进行适用性试验。

菌种及菌液制备

1、菌种

(1) 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代（从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌株的生物学特性。

(2) 计数培养基适用性检查和计数方法适用性试验用菌株见表 1。

表 1 试验菌液的制备和使用

试验菌株	试验菌液的制备	计数培养基适用性检查		计数方法适用性试验	
		需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌点计数	需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌总数计数
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) [CMCC(B) 26 003]	胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法)，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) [CMCC(B) 10 104]	胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法)，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) [CMCC(B) 53 501]	胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法)，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) [CMCC(F) 98 001]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖液体培养基，培养温度 20~25℃，培养时间 2~3 天	胰酪大豆琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	胰酪大豆琼脂培养基(MPN 法不适用)，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) [CMCC(F) 98 003]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间 5~7 天，或直到菌丝生长茂盛	胰酪大豆琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	胰酪大豆琼脂培养基(MPN 法不适用)，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu

2、菌液制备

(1) 按表 1 规定程序培养各试验菌株。

(2) 取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的新鲜培养物，用 pH7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液；取黑曲霉的新鲜培养物加入适量含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠液，将孢子洗脱。

(3) 采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液或含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

(4) 菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在 24 小时内使用。黑曲霉孢子悬液可保存在 2~8℃，在验证过的贮存期内使用。

3、阴性对照

为确认试验条件是否符合要求，应进行阴性对照试验，阴性对照试验应无菌生长，如阴性对照有菌生长，则应进行偏差调查。

4、培养基适用性检查

(1) 微生物计数用的商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基适用性检查。

(2) 按表 1 规定，接种不大于 100cfu 的菌液至胰酪大豆胨液体培养基管或胰酪大豆胨琼脂培养基平板或沙氏葡萄糖琼脂培养基平板，置表 1 规定条件下培养。

(3) 每一试验菌株平行制备 2 管或 2 个平板；同时，用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

(4) 被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在 0.5~2 范围内，且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致；被检液体培养基管与对照培养基管比较，试验菌应生长良好。

计数方法适用性试验

1. 供试液制备

(1) 根据供试品的理化特性与生物学特性，采取适宜的方法制备供试液。

(2) 供试液制备若需加温时，应均匀加热，且温度不应超过 45℃。

(3) 供试液从制备至加入检验用培养基，不得超过 1 小时。

(4) 常用的供试液制备方法如下。如果下列供试液制备方法经确认均不适用，应寻找其他适宜的方法。

1) 水溶性供试品

a. 取供试品，用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，或 pH7.2 磷酸盐冲液，或胰酪大豆胨液体培养基溶解稀释成 1:10 供试液。

b. 若需要，调节供试液 pH 值至 6~8。

c. 必要时，用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。

d. 水溶性液体制剂也可混合供试品原液作为供试液。

2) 水不溶性非油脂类供试品

a. 取供试品，用 pH7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液，或 pH7.2 磷酸盐缓冲液，或胰酪大豆胨液体培养基制备成 1:10 供试液。

b. 分散力较差的供试品，可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1% (ml/ml) 的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。

c. 若需要，调节供试液 pH 值至 6~8。

d. 必要时，用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。

3) 油脂类供试品

a. 取供试品，加入无菌十四烷酸异丙使其溶解，或与最少量并能使供试品乳化的无菌聚山梨酯 80 或其无抑菌性的无菌表面活性剂充分混匀。

b. 表面活性剂的温度一般不超过 40°C (特殊情况下，最多不超过 45°C)，小心混合，若需要可在水浴中进行，然后加入预

热的稀释液制成 1:10 供试液，保温，混合，并在最短时间内形成乳状液。

c. 必要时，用稀释液或含上述表面活性剂的稀释液进一步 10 倍系列稀释。

4) 膜剂供试品

a. 取供试品，剪碎，加 pH7.0 无菌化钠蛋白胨缓冲液，或 pH7.2 磷酸盐缓冲液，或胰酪大豆胨液体培养基，浸泡，振摇，制成 1:10 的供试液。

b. 若需要，调节供试液 pH 值至 6~8。

c. 必要时，用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。

5) 肠溶及结肠溶制供试品

a. 取供试品，加入 pH6.8 无酸盐缓冲液(用于肠溶制剂)或 pH7.6 无磷酸盐缓冲液(用于结肠溶制剂)，置 45℃ 水浴中，振摇，使溶解，制成 1:10 的供试液。

b. 必要时，用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。

6) 气雾剂供试品

a. 取供试品，置 -20℃ 或其他适宜温度冷冻约 1 小时，取出，迅速消毒供试品开启部位或阀门。

b. 正置容器，用无菌钢锥或针样设备在与阀门结构相匹配的适宜位置钻一小孔，供试品各容器的钻孔大小和深度应尽量保持一致，拔出钢锥时应无明显抛射剂抛出，轻轻转动容器，使抛射剂缓缓释出。

c. 释放抛射剂后再无菌开启容器，并将供试品转移至无菌容器中混合，必要时用缓冲液冲洗容器内壁，然后取样检查。

7) 贴剂、贴膏剂供试品

a. 取供试品，去掉防粘层，将粘贴面朝上放置在无菌玻璃或塑料器皿上，在粘贴面上覆盖一层适宜的无菌多孔材料(如无菌纱布)，避免供试品粘贴在一起。

b. 将处理后的供试品放入盛有适宜体积并含有表面活性剂(如聚山梨酯 80 或卵磷脂)稀释液的容器中，振荡至少 30 分钟。

c. 必要时，用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。

计数方法适用性试验

2. 接种和稀释

(1) 按表 2 规定及下列要求进行供试液的接种和稀释，制备微生物回收试验用供试液。

表 2 试验菌液的制备和使用

试验菌株	试验菌液的制备	计数培养基适用性检查		计数方法适用性试验	
		需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌总数计数	需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌总数计数
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) [CMCC(B) 26 003]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法), 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu	
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) [CMCC(B) 10 104]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法), 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu	
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) [CMCC(B) 63 501]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基(MPN 法), 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 3 天, 接种量不大于 100cfu	
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) [CMCC(F) 98 001]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖液体培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间 2~3 天	胰酪大豆胨琼脂培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu	胰酪大豆胨琼脂培养基(MPN 法不适用), 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) [CMCC(F) 98 003]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间 5~7 天, 或直到	胰酪大豆胨琼脂培养基, 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不	胰酪大豆胨琼脂培养基(MPN 法不适用), 培养温度 30~35℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基, 培养温度 20~25℃, 培养时间不超过 5 天, 接种量不

(2) 所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%。

(3) 为确认供试品中的生物能被充分检出, 首先应选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。

试验组

取上述制备好的供试液, 加入试验菌液, 混匀, 使 1ml 供试液或每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于 100cfu。

供试品对照组

取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组操作。

菌液对照组

(1) 取不含中和剂及灭活剂的相应稀释液替代供试液，按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

(2) 若因供试品抗菌活性或溶解性较差的原因导致无法选择低释的供试液进行方法适用性试验时，应用适宜的方法对供试液进行进一步的处理。如果供试品对微生物生长的抑制作用无法以其他方法消除，供试液可经过中和、稀释或薄膜过滤处理后再加入试验菌悬液进行方适性试验。

抗菌活性的去除或灭活

(1) 供试液接种后，按“做生物回收”规定的方法进行做生物计数。

(2) 若试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值小于菌液对照组菌落数值的 50%，可采用下述方法消除供试品的抑菌活性。

1) 增加稀释液或培养基体积。

2) 加入适宜的中和剂或灭活剂。

(3) 中和剂或灭活剂可用于消除干扰物的抑菌活性，最好在稀释液或培养基灭菌前加入，若使用中和剂或灭活剂，试验中应设中和剂或灭活剂对照组，即取相应量含中和剂或灭活剂的稀释液替代供试品同试验组操作，以确认其有效性和对微生

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/77521102224011104>