

综述专论

药品微生物限度检查方法适用性的研究进展*

庞云娟, 刘康连**, 梁晓玲, 赖馥茜, 周德华, 李翔朝, 黎强, 樊文研**

(玉林市食品药品检验检测中心 玉林市中药材(含香辛料)质量监测与评价工程技术研究中心, 玉林 537000)

摘要: 本文针对药品微生物限度检查方法适用性研究的关键实验操作, 从供试品溶液的制备、微生物计数方法和控制菌检查方法适用性试验的方法设计、加菌回收试验操作、菌液计数、菌液纯度控制等方面进行文献和经验的总结。重点介绍了具有较强抑菌作用的水溶性供试品、不易溶解分散的非油脂类供试品、油脂类供试品的供试品溶液制备方法, 详细介绍了需氧菌总数计数、霉菌酵母菌总数计数、控制菌检查方法的循序实验方案; 阐述了关于薄膜过滤法加菌操作的4种方式并分析其对方法结果的影响, 总结了3种菌液计数的方法; 详细分享了关于菌液纯度控制的操作经验, 总结了药品微生物限度检查方法适用性研究的现状。提出了关于药品微生物限度检查方法适用性研究未来发展的4点建议: 对薄膜过滤法加菌操作进行科学、合理的统一; 加强对药品生产企业的监管和对药品微生物限度检查方法的复核; 对国抽品种开展统一其微生物限度检查方法的研究并逐步收载成册; 加强药用辅料微生物限度检查方法适用性试验的研究。

关键词: 微生物限度; 方法适用性; 供试品溶液的制备; 微生物计数; 控制菌检查; 菌液计数; 菌液纯度控制; 平皿倾注法; 薄膜过滤法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)08 - 1285 - 08

doi: 10. 16155/j. 0254 - 1793. 2024 - 0060

Research progress on applicability of microbial limit test for drugs*

PANG Yun - juan, LIU Kang - lian**, LIANG Xiao - ling, LAI Fu - xi,

ZHOU De - hua, LI Xiang - chao, LI Qiang, FAN Wen - yan**

(Yulin Center for Food and Drug Control, Yulin Engineering Technology Research Center for Quality Monitoring and Evaluation of Chinese Medicinal Materials(Including Spices), Yulin 537000, China)

Abstract: This article focuses on the key experimental operations in the study about the applicability of microbial limit testing methods for drugs, summarizing literature and experience from the preparation of test solution, design of methods for microbial counting and control bacteria inspection, operation of microbial recovery test, bacterial liquid concentration counting, and operational methods for controlling bacterial & fungal purity. Emphasis was placed on the preparation methods of water - soluble test samples with strong antibacterial effects, non - oil and fat test samples that were not easily soluble and dispersed, and the test solution for oil and fat test samples. Detailed introduction of the sequential experimental plan for methods of aerobic bacterial count, mold & yeast count, and control bacterial inspection were introduced. Four operational methods for adding bacteria about membrane

* 广西重点研发计划(桂科 AB24010236); 广西科技重大专项(桂科 AA23023035); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD22080002)

** 通信作者 樊文研 Tel:(0775)2827042; E-mail:2740876952@qq.com

刘康连 Tel:(0775)2293721; E-mail:675649849@qq.com

第一作者 Tel:(0775)2380553; E-mail:837008756@qq.com

filtration were explained, and the impact of different ways of adding bacteria on the results of the method was analyzed. Summarized three counting methods for bacterial & fungal concentrations. Detailed sharing of operational experience on controlling the purity of bacterial solution. Summarized the current status about research on the applicability of microbial limit testing methods of drugs. Four suggestions for the future development of research on the applicability of microbial limit testing methods for drugs have been proposed: (1) Unify the operation about bacteria adding method in membrane filtration, scientific and reasonable; (2) Strengthen supervision of pharmaceutical production enterprises and review of microbial limit testing methods for drugs; (3) Unify the microbial limit testing methods for the drugs of the national sampling plan, and gradually collect and bind into a book; (4) Strengthen the research on the applicability of microbial limit testing methods for excipients.

Keywords: microbial limit; method applicability; preparation of test solution; microbial count; control bacteria inspection; bacterial liquid concentration count; operational method for controlling bacterial & fungal purity; petri dish pouring method; membrane filtration method

2015年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)四部通则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做出了重大修订,提出了非无菌产品微生物计数法和控制菌检查法的适用性试验要求^[1-2],2020年版《中国药典》四部通则增加了中药饮片的微生物限度检查,在整体要求上与2015年版《中国药典》基本保持一致^[3]。本文通过查阅文献,结合笔者的工作经历和思考,总结《中国药典》做出重大修订9年以来的关于药品微生物限度检查方法适用性研究的实施情况并提出建议。

1 供试品溶液的制备

1.1 水溶性供试品

1.1.1 一般水溶性供试品 一般水溶性的片剂、胶囊剂、颗粒剂、栓剂、丸剂、膏剂等样品,都是以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液为稀释液,需要检查耐胆盐革兰阴性菌的供试品溶液制备统一用胰酪大豆胨液体培养基(TSB)^[4-7]。40~45℃水浴振摇可以加速常温下不易溶解样品的溶胀、分散、混匀^[7-10]。

1.1.2 具有较强抑菌作用的水溶性供试品 包含水溶性抗生素类制剂、酒剂、抗菌消炎的洗剂或栓剂、有抑菌组分的中成药制剂等。

对具有较强抑菌活性的抗生素药物或化学药物,对其处方分析可为微生物限度检查方法适用性研究提供方向。蔡素芬等^[11]、刘文等^[12]对甲癣涂剂进行处方分析,发现处方中含有大比例的醋酸和游离碘,采用硫代硫酸钠和碘发生氧化还原反应的方法中和碘、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中和醋酸的方法

进行甲癣涂剂供试品溶液的制备^[11-12]。潘震宇等^[13]试验了硫酸锰、硫代硫酸钠、硫酸镁对硝酸布康唑的中和实验,最终在培养基中添加 0.1 mol·L⁻¹ 的硫酸镁可中和残留在薄膜上的硝酸布康唑。牟建平等^[14]分别选择了硫酸锰、硫酸镁、氯化钡、氯化钙和氯化镁作为林可霉素利多卡因凝胶的中和剂进行试验,最终在稀释液中加入 10 mL 氯化镁溶液(10%)制成 1:10 供试液,解决了 1:10 供试液 1 mL 薄膜过滤的堵膜难题。

抑菌作用强、容易过膜的水溶性供试品,直接取供试品至水溶性稀释液中,制成 1:10 的供试液,必要时稀释成 1:20、1:50、1:100 的供试液,采用薄膜过滤法,通过调整上膜样品的量,结合冲洗液的量来消除其抑菌作用^[15-17]。

其他抑菌作用较强、不易过膜的水溶性样品,供试品溶液制备时可在稀释液中加入一定量的吐温 80,有助于过膜和抑菌作用的消减^[18]。

1.1.3 1:10 供试液不便操作的供试品 对于一些粘稠度较大、难以吸取的 1:10 供试液,可以增加稀释液,直接制备成 1:20 或 1:30 稀释级别的供试液,降低其黏稠度,以利于实验的可操作性,且在供试液制备时边搅拌边加入样品,以避免样品结团^[19]。

1.2 不易溶解分散的非油脂类供试品

基质中含有脂溶性的组分,或者含植物油组分的制剂,如含有挥发油组分的酊剂或洗剂等。此类供试品溶液的制备,需在水溶性稀释液中加入一定比例的聚山梨酯 80,必要时还需加入一定量的卵磷脂。

聚山梨酯 80(吐温 80)是非离子表面活性剂,卵磷脂是两性离子表面活性剂,二者均可降低酚、醛、碘酒、季铵类、洗必泰类、石炭酸类、二重双肌类、对羟基苯甲酸类药物的活性,可降低其抑菌作用^[20]。吡啶美辛栓、健阴栓、呋柳粉等不易溶解分散、且有一定抑菌作用的样品,在稀释液中加入 0.1%~5% 的聚山梨酯 80 有助于样品的溶解分散和抑菌作用的消减^[21-23]。无痛酚、阿奇霉素片、复方乳酸依沙吡啶软膏等分散力差且抑菌作用较强的样品,其供试品溶液在制备时,稀释液中除加聚山梨酯 80 外,还加了 0.3% 的卵磷脂^[23-25]。但是不同外观性状的聚山梨酯 80 对需氧菌总数计数和控制菌检查试验结果会有影响,呈深黄色的聚山梨酯 80 没有抑菌作用,而呈黄绿色的聚山梨酯 80 对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌有一定的抑菌作用,实验室应加强聚山梨酯 80 时,质量把关,在稀释液中加入聚山梨酯 80 时,需要同步进行稀释剂对照组的试验^[26]。

1.3 油脂类供试品

油脂类供试品首先需要解决供试品溶液制备均匀的问题,对于抑菌作用较强的、采用供试品溶液稀释平皿倾注法不能消除其抑菌作用的油脂类样品,还需要解决薄膜过滤法堵膜的操作难题。

一般油脂类样品:可加入一定量的司盘 80、单硬脂酸甘油酯、聚山梨酯 80,45 °C 保温并研磨成均匀、不分层的乳化供试品溶液,采用平皿倾注法进行加菌回收试验^[27]。

较强抑菌作用的油脂类样品:可采用无菌十四烷酸异丙酯溶解样品,再加入水溶性的稀释液进行萃取的方法进行供试品溶液的制备,取其水层进行薄膜过滤,必要时在水溶性稀释液和冲洗液中加入一定量的聚山梨酯 80,有助于消减供试品溶液的抑菌作用^[28-30]。

1.4 贴剂、贴膏剂类供试品

取规定量的供试品,去掉防粘层,在粘贴面上覆盖无菌纱布,置 100 mL 含一定比例聚山梨酯 80 的稀释液中,振摇 30 min,制成 1:10 供试液^[31-32]。

2 微生物计数方法适用性试验

2.1 方法设计原则

固体制剂的需氧菌总数计数一般按照 1:10、1:20、1:50、1:100(液体制剂按原液、1:2、1:5、1:10)共 4 个稀释级别进行加菌回收预试验,霉菌和酵母菌总数一般按照 1:10、1:20(液体制剂按原液、1:2)

共 2 个稀释级别进行加菌回收预试验^[33-35]。当敏感菌株的回收比值达不到 0.5 的要求时,应首先充分考察供试品溶液过膜是否会发生堵膜。如果供试品溶液滤过性很好,优先往薄膜过滤法的方向去设计其方法适用性研究的方案;如果供试品溶液滤过会产生一定的堵膜,且抑菌作用不是特别强,要在供试品溶液稀释平皿倾注法与薄膜过滤法之间进行充分的实验比较,以便最终验证出来的方法具备较好的可操作性,且供试品溶液的稀释级别在其允许的范围之内^[7];如果供试品溶液滤过会产生一定的堵膜,且抑菌作用特别强,在其允许范围内不能通过稀释供试品溶液来消除其抑菌作用,可减少上膜供试品的量,继续采用薄膜过滤法来开发其微生物计数的方法^[36-37]。

2.2 加菌回收试验

2.2.1 平皿倾注法加菌操作 微生物计数方法的关键仍然是加菌回收试验。平皿倾注法的加菌回收试验操作比较统一,一般是将制备好的供试品溶液,按照每管 10 mL 分装好,加入含菌量为 3 000~10 000 cfu·mL⁻¹ 的菌液 100 μL,混匀,注皿^[6,33-34]。

2.2.2 薄膜过滤法加菌操作 薄膜过滤法的加菌操作仍存在较大差异。滕钰等对重楼解毒酊^[38]、苗药伤科止痛液^[39]、伤痛克酊^[40]、炉甘石氧化锌洗剂^[41]等样品的薄膜过滤采用的是前加菌方式:取 1:10 供试液 10 mL,加入 100 μL 菌液,混匀,再取 10 mL 或 1 mL 供试液过滤,然后再冲洗。

鄢雷娜等对炉甘石粉原料药^[42]、芪连降糖片^[43]、替硝唑栓^[44]、神农蛇药酒^[45]等样品的薄膜过滤法采用的是后加菌方式:在最后 100 mL 冲洗液中加菌。

庞云娟等^[36]和刘康连等^[46]关于薄膜过滤研究的加菌方式是在滤杯中先加入约 20 mL 稀释液润湿滤膜,再加入 1:10 供试液 10 mL 或 1 mL,再缓慢地把菌液 1 mL(不大于 100 cfu)分散打进薄膜过滤杯中,抽滤,再冲洗。

牛萌萌等^[47]对 2 种大环内酯类抗生素的薄膜过滤研究采用的是在第 1 次冲洗液中加菌的方式。

由于加菌操作不同,方法的结论差异较大。目前的文献以前加菌和后加菌的占比最多,前加菌的方式导致菌株与供试品溶液提前接触、可能在上样到薄膜过滤器的时候大部分菌已被抑制死,后续的冲洗无法体现出不同冲洗量对抑菌作用消减的差异^[41];而后加

菌的方式,所加进去的菌没有参与冲洗的过程。笔者认为之所以选择薄膜过滤方法的样品,是因为其供试品溶液有较强的抑菌作用,且采用供试品溶液稀释平皿倾注法不能消除其抑菌作用。关于薄膜过滤法的加菌操作应满足以下2点要求:(1)菌液避免与供试品原液或其1:10供试液的液体成分提前接触;(2)加进去的菌要参与冲洗的试验过程。可见在第1次冲洗液中加菌的方式相对合理^[47]。

3 控制菌检查方法适用性试验

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、梭菌的检查方法适用性试验,一般是取1:10供试液10 mL(相当于样品1 g或1 mL)接种到100 mL增菌液中,并加入不大于100 cfu的阳性菌,按照药典的规定进行培养,再划线相应的选择分离平板,如在选择分离平板能长出相应菌落形态的菌株,则认为接种到100 mL增菌液的方法可行^[48-49]。如供试品有一定的抑菌作用,则把增菌液的体积逐步增加到200、300、400、500 mL,直到适宜体积的增菌液能检出所加入的阳性菌株^[50]。

对于一些抑菌作用特别强的样品,增菌液的体积增加到600 mL,仍然不能消除其抑菌作用的,则考虑采用中和法、薄膜过滤法或分膜过滤联合培养基稀释法^[51-53]。分膜过滤联合培养基稀释法可以有效解决规定量的供试品溶液在1张膜过滤堵膜的操作难题^[54]。

李敏等^[55]利用磺胺类药物与对氨基苯甲酸竞争性结合二氢蝶酸合成酶、阻断细菌叶酸的合成而干扰细菌生长繁殖的反应原理,在做磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂的控制菌检查方法适用性试验时,将供试品接种至100 mL含0.5%对氨基苯甲酸的胰酪大豆胨液体培养基,可消除供试品对金黄色葡萄球菌的抑制作用。

沙门菌的取样量是10 g(或10 mL),亦是按照以上的实验思路进行适用性试验研究。耐胆盐革兰阴性菌的肠道增菌液体积一般为10 mL,如有一定的抑菌作用,把肠道增菌液的体积增加到15 mL^[56-57]。

4 菌液计数和纯度控制

菌种的纯度和计数稳定是加菌回收试验的关键。微生物限度检查方法适用性试验涉及到金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、沙门菌、白色念珠菌、黑曲霉、梭菌等8种菌株,前面5种细菌一般是接种0代冻干粉或实验室的菌

种冻存管到胰酪大豆胨液体培养基(TSB)培养,白色念珠菌是接种到沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)培养,梭菌是接种到硫乙醇酸盐流体培养基(FT)厌氧培养^[3]。

4.1 菌液计数方法

黑曲霉制备成黑曲霉孢子菌悬液,黑曲霉孢子菌悬液在6个月内菌落计数结果稳定^[58]。肉汤菌液的计数是取肉汤逐级进行10倍稀释、注皿、计数。菌液计数的另一种方法是挑取新鲜培养物的纯菌落,制备成一定比浊浓度的菌悬液,再逐级进行10倍稀释、注皿、计数^[59]。

4.2 菌液纯度控制方法

当发现菌液组平皿长杂菌的时候,挑取典型菌落形态的单菌落到肉汤培养,或划线到胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)平板培养能获得纯菌株。金黄色葡萄球菌在甘露醇氯化钠琼脂平板上的典型菌落形态显黄色,且培养基本底色由红色变为黄色^[3],在Baird-Parker琼脂平板上的典型菌落形态是黑色,有光泽,菌落周围绕以不透明圈,外围有清晰透明带^[60];铜绿假单胞菌在溴化十六烷基三甲胺琼脂平板的典型菌形态是菌落扁平较大,湿润,产绿色素^[7];枯草芽孢杆菌在TSA平板的菌落较大,污白色,边缘不整齐,干燥,接种针蘸取有颗粒感。大肠埃希菌在麦康凯琼脂平板上的菌落呈桃红色,圆形,湿润光滑,在曙红亚甲蓝琼脂平板上的典型菌落显金属光泽^[61];沙门菌在亚硫酸铋琼脂(BS)平板上的典型菌落显金属光泽,且菌落周围培养基本底色变为褐色或棕色,在HE琼脂平板上的典型菌落形态是菌落中心黑色,且培养基本底色由浅绿色变为蓝绿色^[62];白色念珠菌在沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养平板上的菌落乳白色,圆形凸起,光滑,有酵母气味的^[3,61];梭菌培养后的典型特征是腐肉臭味。

笔者的操作经验是用接种针点蘸以上的典型单菌落中心接种到相应的肉汤,或者相应的琼脂平板,再培养,能够获得较纯的菌液或菌苔。

5 药品微生物限度检查方法适用性研究的现状

夏天等^[4]对22家企业生产的清火片(胶囊)进行了微生物限度检查方法适用性试验,并与厂家所提供的方法进行对比,结果仅有1家企业的清火片与企业提供的试验方法相同,有21家企业的清火片的微生物限度检查法未得到重现。

曹婷婷等^[63]在开展508批次化妆品检验时参考

《中国药典》(2015年版)添加阳性对照菌对化妆品控制菌检查进行方法考察,发现有18.50%的大肠埃希氏菌阳性对照未生长,有11.42%的金黄色葡萄球菌阳性对照未生长。可见《中国药典》关于微生物限度检查方法适用性试验研究的指导原则亦适用于对化妆品、食品(含香辛料)等行业产品的微生物限度检查方法的研究和修订。

对厂家提供的药品微生物限度检查方法材料进行研判,发现存在以下问题:(1)个别品种制订的方法不具备可操作性,比如口服固体样品,通过供试品溶液稀释平皿倾注法应该可以消除其抑菌作用,而企业提供的方法是1:10供试液1 mL薄膜过滤,结果堵膜而无法过滤;(2)含药材原粉或含动物器脏的非无菌药品的控制菌检查容易漏掉耐胆盐革兰阴性菌或沙门菌项目;(3)盲目全部统一采用常规平皿倾注法,在配方颗粒厂家中较为普遍,比如个别配方颗粒1:10供试液酸度较大,显然是有抑菌作用的,而企业提供的方法却是常规平皿倾注法;(4)化学药开展微生物限度方法适用性试验研究的普及率比中成药要低。

6 结语

《中国药典》要求各个企业要对其所生产的需要进行微生物限度检查的药品品种进行微生物限度检查方法适用性试验研究,目前主要还是靠企业的自觉和配合、药品检验机构的技术支持和反馈,但是缺乏系统性地对相应品种进行方法复核。企业所提供的材料方法不适用、项目不齐全的情况仍然存在,也有个别品种在监督抽检中联系厂家,厂家提供不了微生物限度检查方法材料的情况,就此提出以下几点建议。

6.1 对薄膜过滤法加菌操作进行科学、合理的统一

薄膜过滤法主要在于加菌环节和时间点的差异,导致同一品种由不同的人员验证出来的方法结果差异较大,建议加强关于薄膜过滤法的研究,对加菌环节的操作进行科学、合理的统一。

6.2 加强对药品生产企业的监管和对药品微生物限度检查方法的复核

建议各级药品监督管理部门在行政监管层面追踪各个药品生产企业对其生产的需要进行微生物限度检查的药品品种的方法适用性试验研究情况,并要求进行方法复核。

6.3 对国抽品种开展统一其微生物限度检查方法

的研究并逐步收载成册

建议承担国抽品种的药品检验机构,对抽检到的同品种、多厂家、多批号的药品品种开展微生物限度检查方法适用性试验研究,以便统一同一品种的微生物限度检查方法,国家药典委员会层面逐步将其收载成册。

6.4 加强药用辅料微生物限度检查方法适用性试验的研究

关于药用辅料的微生物限度检查方法适用性试验研究的文献较少,而药用辅料在制剂中占比较大,辅料的溶解特性、抑菌作用对制剂有直接的影响,建议加强药用辅料的微生物限度检查方法适用性试验的研究。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典2015年版·四部[S]. 2015:140
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015:140
- [2] 庞云娟,樊文研,刘康连,等. 药品微生物限度检查方法学验证的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(10):2137
PANG YJ, FAN WY, LIU KL, et al. Research progress on methodological validation of microbial limit testing for drugs[J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(10):2137
- [3] 中华人民共和国药典2020年版·四部[S]. 2020:160
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:160
- [4] 夏天,崔迎,任文鑫,等. 清火片(胶囊)微生物限度检查方法适用性试验[J]. 安徽医药, 2021, 25(6):1114
XIA T, CUI Y, REN WX, et al. Research on applicability test of microbial limit test for Qinghuo tablets (capsules) [J]. Anhui Med Pharm J, 2021, 25(6):1114
- [5] 刘博,任仲丽,李瑞英. 不同厂家小儿咳喘灵颗粒微生物限度检查与分析[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1):32
LIU B, REN ZL, LI RY, et al. Microbial limit test and analysis of pediatric kechuanling granules from different manufacturers [J]. Drug Stand China, 2023, 24(1):32
- [6] 古丽巴哈尔·托乎提,李海芳,顾金花,等. 10种维吾尔药微生物限度检查方法及探讨[J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, 17(7):940
GULIBAHAER · TUOHUTI, LI HF, GU JH, et al. Investigation of microorganism limited inspecting method on ten kinds of uighur drugs[J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2017, 17(7):940
- [7] 庞云娟,庞兰英,曾金,等. 岩黄连栓微生物限度检查方法的适用性试验[J]. 湖北农业科学, 2023, 62(1):162
PANG YJ, PANG LY, ZENG J, et al. Applicability test of microbial limit test for Yanhuanglian suppository [J]. Hubei Agric Sci, 2023, 62(1):162
- [8] 闵朕,卫延明,杜思迪. 复方气管炎片微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药业, 2021, 30(4):60

- MIN Z, WEI YM, DU SD. Applicability of microbiological limit test for compound bronchitis tablets [J]. *China Pharm*, 2021, 30(4):60
- [9] 张媛媛, 曹宽恺, 李晓波. 紫苏方胶囊微生物限度检查方法的研究[J]. *上海医药*, 2018, 39(13):80
ZHANG YY, CAO XK, LI XB. Verification of microbial limit test method for Zisufang capsules[J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2018, 39(13):80
- [10] 邓莉, 陈勇川, 胡斌, 等. 3种医院外用制剂微生物限度检查方法的建立[J]. *中国药业*, 2020, 29(17):68
DENG L, CHEN YC, HU B, *et al.* Establishment of microbial limit test method for 3 kinds of hospital external use preparations [J]. *China Pharm*, 2020, 29(17):68
- [11] 蔡素芬, 黎金丽, 徐晓, 等. 医院制剂甲癣涂剂微生物限度检查方法建立及方法适用性研究[J]. *海峡药学*, 2021, 33(1):72
CAI SF, LI JL, XU X, *et al.* Study on microbial limit test for hospital preparation of onychomycosis [J]. *Strait Pharm J*, 2021, 33(1):72
- [12] 刘文, 张广求, 朱立刚. 2种含碘制剂《中华人民共和国药典》(2015年版)微生物限度检查方法的建立[J]. *中国执业药师*, 2017, 14(2):14
LIU W, ZHANG GQ, ZHU LG. Establishment of a microbial limit test method for two iodine preparations in Chinese pharmacopoeia (2015 Edition) [J]. *China Licens Pharm*, 2017, 14(2):14
- [13] 潘震宇, 汤茜, 李瑞莲. 硝酸布康唑栓微生物限度检查方法适用性试验研究[J]. *中国药事*, 2017, 31(1):43
PAN ZY, TANG Q, LI RL. Methodological study on microbial limit test of butoconazole nitrate suppositories [J]. *Chin Pharm Aff*, 2017, 31(1):43
- [14] 牟建平, 滕宝霞, 顾海燕, 等. 林可霉素利多卡因凝胶微生物检验中和剂的选择及方法适用性[J]. *海峡药学*, 2021, 33(8):43
MU JP, TENG BX, GU HY, *et al.* Selection of neutralizer and applicability of method for microbiological examination of lincomycin lidocaine gel [J]. *Strait Pharm J*, 2021, 33(8):43
- [15] 张红霞, 李亚东, 赵小芳. 莫匹罗星软膏微生物限度检查方法的建立[J]. *中国药品标准*, 2017, 18(3):211
ZHANG HX, LI YD, ZHAO XF. Establishment of microbial limit test method of mupirocin ointment [J]. *Drug Stand China*, 2017, 18(3):211
- [16] 孙晓朋, 刘菊. 湿毒净洗剂微生物限度检查方法的适用性研究[J]. *抗感染药*, 2022, 19(2):164
SUN XP, LIU J. Study on applicability of microbial limit test method for Shidujing lotion [J]. *Antiinfect Pharm*, 2022, 19(2):164
- [17] 陈洁, 周剑. 盐酸小檗碱片微生物限度适用性试验验证[J]. *现代医药卫生*, 2017, 33(12):1775
CHEN J, ZHOU J. Validation test of microbial limit for berberine hydrochloride tablets [J]. *Mod Med Health*, 2017, 33(12):1775
- [18] 郑中杰, 罗腾硕, 陈泽伟, 等. 连三叶触变凝胶剂微生物限度检查的方法学验证[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(4):478
ZHENG ZJ, LUO TS, CHEN ZW, *et al.* Methodology validation of microbial limit test for Liansanye thixotropic gel [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2020, 31(4):478
- [19] 李趣嫦, 李文靖, 张帆. 11种药用淀粉及衍生物的微生物限度检查法适用性试验[J]. *中国药品标准*, 2020, 21(1):56
LI QC, LI WJ, ZHANG F. Suitability of microbial limit test methods for 11 kinds of medicinal starches and its derivatives [J]. *Drug Stand China*, 2020, 21(1):56
- [20] 张光华, 李玉立, 刘文杰, 等. 阿法替尼和塞瑞替尼微生物限度检查方法验证[J]. *中国药业*, 2020, 29(17):55
ZHANG GH, LI YL, LIU WJ, *et al.* Methodology validation of microbial limit test for afatinib and ceritinib [J]. *China Pharm*, 2020, 29(17):55
- [21] 张煜琳, 李哲, 王建声, 等. 不同厂商吡喹酮美辛栓微生物限度检查方法适用性研究[J]. *广东化工*, 2022, 49(3):59
ZHANG YL, LI Z, WANG JS, *et al.* Study on applicability of microbial limit test methods for indomethacin suppositories from different manufacturers [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2022, 49(3):59
- [22] 张明君, 哈丽旦·苏莱曼, 李海芳. 健阴栓微生物限度检查方法适用性试验及体外抑菌作用研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2019, 19(7):853
ZHANG MJ, HALIDAN·SULAIMAN, LI HF. Adaptability test and bacteriostasis *in vitro* of microbial limit test on Jianyin suppository [J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2019, 19(7):853
- [23] 刘洁琼, 戴安印, 濮晓燕, 等. 2种含抑菌成分的医院制剂微生物限度方法适用性验证[J]. *解放军药学报*, 2023, 36(3):242
LIU JQ, DAI AY, PU XY, *et al.* Validation and establishment of a microbial limit test method for two external hospital preparations with antibacterial ingredients [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2023, 36(3):242
- [24] 瞿燕萍. 阿奇霉素片微生物限度检查方法的适用性验证[J]. *上海医药*, 2019, 40(23):107
QU YP. Applicability validation for the microbial limit test of azithromycin tablets [J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2019, 40(23):107
- [25] 牛振东, 陈卓, 刘文杰, 等. 薄膜过滤法和中和法联用在复方乳酸依沙吡啶软膏微生物限度检查中的应用研究[J]. *中国药品标准*, 2022, 23(4):440
NIU ZD, CHEN Z, LIU WJ, *et al.* Application of membrane filtration - neutralization method in microbial limit test of compound ethacridine lactate ointment [J]. *Drug Stand China*, 2022, 23(4):440
- [26] 赵新霞, 杨淑先, 王海波, 等. 聚山梨酯80对药品微生物限度检查的影响[J]. *中国药品标准*, 2019, 20(3):224
ZHAO XX, YANG SX, WANG HB, *et al.* Effects of polysorbate

- 80 on microbiological examination of drugs [J]. *Drug Stand China*, 2019, 20(3):224
- [27] 王振伟, 孙亦粉, 李海伦, 等. 吡啶软膏的微生物限度检查适用性考察[J]. *按摩与康复医学*, 2022, 13(24):63
WANG ZW, SUN YF, LI HL, *et al.* Applicability test of microbial limit test for Fuxin ointment [J]. *Chin Manipul Rehabil Med*, 2022, 13(24):63
- [28] 李辉, 李翠, 杨晓莉, 等. 油脂类乳膏药品萃取后微生物在油相与水相中的分布状况研究[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(3):496
LI H, LI C, YANG XL, *et al.* Distribution of microorganisms in oil and aqueous phase of grease cream drugs after extraction [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(3):496
- [29] 倪玉佳, 朱文静, 戈煜, 等. 复方硝酸咪康唑软膏微生物限度检查的方法学验证[J]. *药学服务与研究*, 2019, 19(6):409
NI YJ, ZHU WJ, GE Y, *et al.* Methodological verification of microbial limit test for compound miconazole nitrate ointment [J]. *Pharm Care Res*, 2019, 19(6):409
- [30] 孙乃霞, 赵新霞. 氯霉素氧化锌乳膏微生物限度检查方法验证[J]. *安徽医药*, 2023, 27(2):255
SUN NX, ZHAO XX. Verification of microbial limit test method for chloramphenicol zinc oxide cream [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2023, 27(2):255
- [31] 张银花, 刘绪平, 储梅君. 麝香关节止痛膏微生物限度检查方法研究[J]. *江西医药*, 2017, 52(8):803
ZHANG YH, LIU XP, CHU MJ. Study on microbial limit test method for musk joint pain relieving cream [J]. *Jiangxi J Med Pharm*, 2017, 52(8):803
- [32] 储梅君, 陈希, 张银花, 等. 关节解痛膏微生物限度检查方法学验证[J]. *药品评价*, 2022, 19(14):850
CHU MJ, CHEN X, ZHANG YH, *et al.* Validation of microbial limit test method of joint pain relieving ointment [J]. *Drug Eval*, 2022, 19(14):850
- [33] 李趣嫦, 曾璞, 肖建光, 等. 50种中成药微生物限度检查法的适用性试验及结果分析[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(12):2214
LI QC, ZENG P, XIAO JG, *et al.* Microbial limit test for determination of 50 Chinese patent drugs and results analysis [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(12):2214
- [34] 刘康连, 庞云娟, 卢如剑, 等. 中药胶囊剂微生物限度检查方法适用性试验研究及结果分析[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(S02):368
LIU KL, PANG YJ, LU RJ, *et al.* Study on the applicability of microbial limit test for traditional Chinese medicine capsule and result analysis [J]. *Hubei Agric Sci*, 2021, 60(S02):368
- [35] 庞云娟, 刘康连, 周晓婷. 4种口服液微生物限度检查法验证[J]. *医药导报*, 2017, 36(A01):82
PANG YJ, LIU KL, ZHOU XT. Validation of microbial limit testing methods for four oral liquids [J]. *Her Med*, 2017, 36(A01):82
- [36] 庞云娟, 刘康连, 庞兰英, 等. 2种瑶方合剂微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. *中成药*, 2022, 44(8):2715
PANG YJ, LIU KL, PANG LY, *et al.* Study on the applicability of two microbial limit testing methods for yao formula mixtures [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(8):2715
- [37] 李敏, 龚亚, 曹健, 等. 6种医院抑菌制剂的微生物限度检查方法适用性研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2021, 21(8):951
LI M, GONG Y, CAO J, *et al.* Applicability research of six kinds of microbial limit test methods for hospital antibacterial preparations [J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2021, 21(8):951
- [38] 滕钰, 徐洪, 邹莉, 等. 重楼解毒酊微生物限度检查方法适用性探讨[J]. *中成药*, 2019, 41(4):951
TENG Y, XU H, ZOU L, *et al.* Discussion on the applicability of microbial limit test method for Chonglou Jiedu tincture [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2019, 41(4):951
- [39] 杨仁惠, 陈永敏, 罗玉玲, 等. 苗药伤科止痛液微生物限度检查法适用性探讨[J]. *海峡药学*, 2021, 33(6):44
YANG RH, CHEN YM, LUO YL, *et al.* Discussion on the applicability of microbial limit test method for Shangke Zhitong liquid [J]. *Strait Pharm J*, 2021, 33(6):44
- [40] 王俊. 伤痛克酊微生物限度检查方法建立[J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(23):34
WANG J. Establishment of microbial limit inspection method of pain tincture [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2017, 26(23):34
- [41] 李锦妹, 林颖苹, 陈文静, 等. 炉甘石氧化锌洗剂微生物限度检查法的建立[J]. *药品评价*, 2022, 19(1):14
LI JM, LIN YP, CHEN WJ, *et al.* Establishment and validation of microbial limit test method for calamine zinc oxide lotions [J]. *Drug Eval*, 2022, 19(1):14
- [42] 鄢雷娜, 储梅君, 章瑛, 等. 炉甘石粉原料药微生物限度检查法适用性研究[J]. *中国药物评价*, 2022, 39(3):209
YAN LN, CHU MJ, ZHANG Y, *et al.* Applicability test of microbiological limit method for calamine powder [J]. *Chin J Drug Eval*, 2022, 39(3):209
- [43] 沈锐, 周剑, 严海元, 等. 芪连降糖片微生物限度检查方法适用性研究[J]. *中国药业*, 2021, 30(8):52
SHEN R, ZHOU J, YAN HY, *et al.* Microbial limit suitability test method for Qilian Jiangtang tablets [J]. *China Pharm*, 2021, 30(8):52
- [44] 刘戈, 邱唯佳, 费夷敏. 替硝唑栓微生物限度检查方法适用性试验研究[J]. *上海医药*, 2016, 37(13):73
LIU G, QIU WJ, FEI YM. Study on microbial limit test method for tinidazole suppositories [J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2016, 37(13):73
- [45] 邱泉, 覃聪慧, 黄秋燕. 神农蛇药酒微生物限度检查方法适用性试验[J]. *蛇志*, 2017, 29(4):393
QIU Q, QIN CH, HUANG QY. Suitability test of microbial limit test method of Shennong snake liquor [J]. *J Snake*, 2017, 29

- (4):393
- [46] 刘康连, 庞云娟, 龙文洲, 等. 两种瑶药酊剂微生物限度检查方法适用性试验及结果分析[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(14):26
LIU KL, PANG YJ, LONF WZ, *et al.* Experimental study on applicability of microbial limit test for 2 kinds of Yao medicine tinctures and result analysis [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2022, 31(14):26
- [47] 牛萌萌, 王立云, 姬俊, 等. 2种大环内酯类抗生素干混悬剂微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药事, 2023, 37(2):205
NIU MM, WANG LY, JI J, *et al.* Study on applicability validation for the microbial limit test of two macrolide antibiotics for suspension [J]. *Chin Pharm Aff*, 2023, 37(2):205
- [48] 李响铮. 不同厂家二丁颗粒微生物限度检查方法建立及结果分析评价[J]. 工业微生物, 2023, 53(6):115
LI YZ. Research on establishment of microbial limit test methods and result analysis and evaluation for erding granules from different manufacturers [J]. *Ind Microbiol*, 2023, 53(6):115
- [49] 郑城茹, 朱铮, 郑挺, 等. 安乐阴洗剂微生物限度检查方法学的研究[J]. 中国医药科学, 2023, 13(23):77
ZHENG YR, ZHU Z, ZHENG T, *et al.* Study on the methodology of microbial limit test for Anleyin lotion [J]. *China Med Pharm*, 2023, 13(23):77
- [50] 曹鲁娜, 王静, 李怀伟, 等. 新癍片微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国医药导刊, 2022, 24(5):508
CAO LN, WANG J, LI HW, *et al.* Study on the applicability of microbial limit test method for Xinhuang tablets [J]. *Chin J Med Guide*, 2022, 24(5):508
- [51] 卫延明, 陈子龙, 闵朕, 等. 三种西药制剂微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. 海峡药学, 2020, 32(1):59
WEI YM, CHEN ZL, MIN Z, *et al.* Research on applicability methods of microbial limit determination for three kinds of western medicine preparation [J]. *Strait Pharm J*, 2020, 32(1):59
- [52] 苑艳飞, 申应德, 李伟栋. 复方白及液微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药物评价, 2022, 39(1):32
YUAN YF, SHEN YD, LI WD. Study on suitability of microbial limit test method of compound Baiji enema [J]. *Chin J Drug Eval*, 2022, 39(1):32
- [53] 雷宇, 秦银燕, 何成章, 等. 速康宁滴眼液和速康宁滴鼻液的生物检查方法适用性研究[J]. 广西医学, 2023, 45(5):553
LEI Y, QIN YY, HE CZ, *et al.* Biological examination method of Sukangning eye drops and Sukangning nasal drops: a research on suitability [J]. *Guangxi Med J*, 2023, 45(5):553
- [54] 关迪, 曹晓云. 风油精微生物限度检查方法适用性的建立[J]. 中国药品标准, 2020, 21(2):239
GUAN D, CAO XY. Establishment of microbial limit test for essential balm [J]. *Drug Stand China*, 2020, 21(2):239
- [55] 李敏, 龚亚, 曹健, 等. 磺胺嘧啶鱼肝油滴鼻剂微生物限度检查方法的建立[J]. 安徽医药, 2021, 25(8):1497
LI M, GONG Y, CAO J, *et al.* Establishment of microbial limit test method for sulfadiazine fish oil nasal drops [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2021, 25(8):1497
- [56] 魏金梅, 钟国庆, 谢美珍, 等. 干姜饮片微生物限度检查方法适用性研究[J]. 现代食品, 2023, 29(15):147
WEI JM, ZHONG GQ, XIE MZ, *et al.* Study on the applicability of microbiological limit test method for dried ginger decoction pieces [J]. *Mod Food*, 2023, 29(15):147
- [57] 孙晓朋, 曹莹, 王萌. 泻痢康肠溶胶囊微生物限度检查方法适用性试验研究[J]. 黑龙江医学, 2021, 45(3):306
SUN XP, CAO Y, WANG M. Experimental study on the applicability of Xielikang enteric-coated capsule microbial limit inspection method [J]. *Heilongjiang Med J*, 2021, 45(3):306
- [58] 林吉恒, 肖璜, 马仕洪, 等. 黑曲霉孢子悬液贮存期的验证[J]. 中国药品标准, 2014, 15(2):117
LIN JH, XIAO H, MA SH, *et al.* The verification of *Aspergillus niger* spore suspension's storage period [J]. *Drug Stand China*, 2014, 15(2):117
- [59] 林燕, 张宝献, 刘春兰, 等. 实验室几种常用菌悬液制备方法的探讨[J]. 广东化工, 2021, 48(21):65
LIN Y, ZHANG BX, LIU CL, *et al.* Discussion on the preparation methods of several common bacterial suspensions in laboratory [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2021, 48(21):65
- [60] GB 4789.10-2016 食品安全国家标准. 食品微生物学检验. 金黄色葡萄球菌检验[S]. 2016
GB 4789.10-2016 National Food Safety Standard. Food Microbiological Examination. *Staphylococcus aureus* Examination [S]. 2016
- [61] 中华人民共和国药典2010年版. 一部[S]. 2010:附录 82
ChP 2010. Vol I [S]. 2010:Appendix 82
- [62] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准. 食品微生物学检验. 沙门氏菌检验[S]. 2016
GB 4789.4-2016 National Food Safety Standard. Food Microbiological Examination. *Salmonella* Examination [S]. 2016
- [63] 曹婷婷, 江艳芳, 林铁豪. 508批化妆品微生物检验结果及方法的初步研究[J]. 香料香精化妆品, 2020(6):29
CAO TT, JIANG YF, LIN TH. Preliminary study on microbiological inspection results and methods of 508 batches of cosmetics [J]. *Flavour Frag Cosmet*, 2020(6):29

(本文于2024年1月25日收到)