·新药述评与论坛·

《中华人民共和国药典》2020 年版抑菌效力检查法解析

李　辉[1],周发友[2],杨晓莉[3],马仕洪[2],绳金房[4]

(1 陕西盛德泰林生物安全技术检测有限公司,西安 710065; 2 中国食品药品检定研究院,北京 100050;
3 陕西省食品药品监督检验研究院,西安 710065;4 陕西省药品技术审评中心,西安 710065)

[摘要] 通过分析《中华人民共和国药典》2020 年版抑菌效力检查法的主要内容,探讨方法的内在要求。其中抑菌效力检查法的测试菌种、菌液制备、供试品接种、存活菌数测定、结果判断等方面的要求进一步补充完善,标准科学合理。《中华人民共和国药典》2020 年版抑菌效力检查法进一步提高成为更加完善的检查方法,有利于新药研发阶段抑菌剂的筛选和评价。

[关键词] 抑菌效力;抑菌剂;抑菌效力检查法;《中华人民共和国药典》2020 年版;药典修订;微生物控制;水分活度;抑菌体系

[中图分类号] R926　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)12 - 1063 - 05

Interpretation of the antimicrobial effectiveness test of Chinese Pharmacopoeia 2020 edition

LI Hui[1], ZHOU Fa-you[2], YANG Xiao-li[3], MA Shi-hong[2], SHENG Jin-fang[4]

(1 *Shaanxi ShengDeTaiLin Biological Safety Technical Testing Co., Ltd., Xi'an* 710065, *China*; 2 *National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 100050, *China*; 3 *Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an* 710065, *China*; 4 *Shaanxi Center for Drug Evaluation, Xi'an* 710065, *China*)

[**Abstract**] By analyzing the main content of the antimicrobial efficacy test of the Chinese Pharmacopoeia 2020 edition, the inherent requirements of the method were explored. The requirements of the Chinese Pharmacopoeia 2020 edition on the test bacteria, preparation of the bacterial solution, inoculation of test products, determination of viable bacteria, and determination of results have been further supplemented, and the standards have become more scientific and reasonable. The antimicrobial efficacy test of Chinese Pharmacopoeia 2020 edition has been further improved to become a more comprehensive testing method, which was beneficial to the screening and evaluation of antimicrobial agents in the research and development phase of new drugs.

[**Key words**] antimicrobial effectiveness; antimicrobial agent; antimicrobial effectiveness testing; Chinese Pharmacopoeia 2020 edition; pharmacopoeia revision; microbial control; water activity; antimicrobial system

《中华人民共和国药典》2020 年版(以下简称 ChP)抑菌效力检查法在 2015 年版的基础上,对培养基适用性检查、方法适用性检查、抑菌效力测定用的试验菌、新鲜培养物制备和抑菌效力测定菌种等内容做了补充完善[1-2]。抑菌效力检查法在最严谨的标准思想指导下,借鉴吸收《欧洲药典》(EP)相关内容对检查方法的诸多细节做了修订,虽属于一般性修订,然而更为细致的要求提高了方法的适用性和准确性[3],使 ChP 抑菌效力检查法成为与国际接轨的更严谨标准,将对新药研发阶段抑菌剂的筛选和已上市药品抑菌剂的评价产生实际指导意义。本文旨在探讨当前抑菌效力测定与评价应用中存在

[基金项目] 国家药典委员会课题资助项目(15):水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用

[作者简介] 李辉,男,硕士研究生,副主任药师,主要从事药品微生物检测与控制研究。E-mail:flywithme100@163.com。

[通讯作者] 绳金房,男,主任药师,主要从事药物分析与质量控制标准研究。E-mail:shengkangjia@163.com。

的问题,分析抑菌效力检查法的内容、展望抑菌效力检查法的应用趋势。

1 抑菌效力测定与评价现状

ChP 制剂通则根据不同药物剂型的给药途径和剂型特点,在 38 种剂型中有 18 种有明确要求应符合抑菌效力检查法的要求,占 47.4%,具体收载情况见表 1。在制剂通则的鼻用制剂和耳用制剂中强调如制剂本身如果有足够的抑菌性能,可不加抑菌剂。在注射剂、糖浆剂与合剂 3 种剂型中推荐了常用抑菌剂的种类和浓度,如注射剂常用的抑菌剂为 0.5% 苯酚、0.3% 甲酚、0.5% 三氯叔丁醇和 0.01% 硫柳汞等,糖浆剂与合剂中的山梨酸和苯甲酸的用量不得超过 0.3%(其钾盐、钠盐的用量分别按酸计),羟苯酯类的用量不得超过 0.05%。此外还规定了几种不得加抑菌剂的情况,如静脉给药与脑池内、硬膜外、椎管内用的注射液均不得加抑菌剂,眼内注射溶液、眼内插入剂、供外科手术和急救用的眼用制剂均不得加抑菌剂且应采用一次性使用包装。

表 1 《中华人民共和国药典》2020 年版制剂通则中可添加抑菌剂的制剂

序号	通则编号	通则名称
1	0102	注射剂
2	0105	眼用制剂
3	0106	鼻用制剂
4	0107	栓剂
5	0109	乳膏剂
		软膏剂
6	0111	吸入剂
7	0112	喷雾剂
8	0113	气雾剂
9	0114	凝胶剂
10	0116	糖浆剂
11	0117	搽剂
12	0118	涂剂
13	0121	贴剂
14	0122	贴膏剂
15	0123	口服溶液、口服混悬液、口服乳剂
16	0126	耳用制剂
17	0181	合剂
18	0187	露剂

ChP 药用辅料中收载了酸及其盐类、季铵盐类、对羟基苯甲酸酯类、醇类和酚类等常用抑菌剂质量标准 31 个,新增 7 个,其中酸及其盐类数量最多,共 14 种,占 45.2%。抑菌剂质量标准明确了抑菌剂的添加种类,在新药开发的处方研究中,需考察抑菌剂与处方的相容性等问题,进而采用抑菌效力检查法确定添加的抑菌剂的种类和浓度。

抑菌效力检查法是进行抑菌剂种类筛选和浓度确定的基本方法,它用于测定无菌及非无菌制剂抑菌体系的抑菌活性,用于指导生产企业在新药研发阶段制剂中抑菌剂种类和浓度的确定。从应用层面看,目前该方法在测试和评价已上市药品抑菌效力是否合理方面报道较多,而在新药研发阶段报道较少[4-9]。从研究剂型方面看,在滴眼剂抑菌剂测定和筛选中的报道较多而其他剂型(如口服液体制剂、喷雾剂、乳膏剂、凝胶剂等)的报道较少[10-15]。从存在问题层面看,药品处方中抑菌剂使用的种类和用量差异较大,部分药品抑菌效力不理想,反映出对抑菌剂的使用存在盲目性,缺乏科学评估[16-19]。潘雯等[20]研究了硫酸软骨素滴眼液中抑菌剂的使用情况,结果显示 5 个厂家中仅 1 个厂家的产品达到 B 标准;张文燕等[21]研究了 6 个厂家的半夏糖浆/半夏止咳糖浆的抑菌效力,结果显示仅 4 个厂家符合药典标准,以上研究结果说明抑菌效力检查合格率低,存在微生物污染风险。随着抑菌效力检查法标准的提高,当前已上市药品中部分抑菌剂存在研究不充分的现象,影响了药品的安全性,该问题日益受到监管机构和生产企业的重视。

2 抑菌效力检查法内容解析

2.1 菌种 抑菌效力检查法规定了 5 种试验菌株,分别为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉,它们分别代表了不同类型的潜在污染菌。大肠埃希菌是发酵的革兰阴性杆菌,属于肠杆菌科,是粪便污染的指示菌,容易产生耐药性,是革兰阴性菌的代表,ChP 考虑到给药途径的微生物风险,规定该菌仅用于口服制剂抑菌效力的测定。铜绿假单胞菌在高水分活度条件下生长和存活良好[22],比大肠埃希菌的耐药性更强,它与大肠埃希菌共同代表了革兰阴性菌。金黄色葡萄球菌是皮肤上常见的微生物,代表了革兰阳性菌。白色念珠菌是致病酵母菌的代表。黑曲霉代表了霉菌。尽管枯草芽孢杆菌可作为芽孢杆菌的代表,然而各国药典中均未采用枯草芽孢杆菌评估药品的抑菌效力。药品中使用的抑菌剂一般不具备杀孢子能力,规定对芽孢的抑菌效力这一要求既过于严苛也不合理。如果以枯草芽孢杆菌作为试验菌株必然造成抑

菌剂的过度使用,从毒理学角度看它是不安全的,也违背抑菌剂加入量应为最低有效量的基本原则。值得注意的是,抑菌效力检查法的试验菌株不能代表对抑菌剂有耐受性微生物[23],这是造成抑菌效力检查法局限性的原因之一。此外,ChP 考虑到标准的普遍性和产品的特殊性,还以举例的方式推荐了糖浆剂增加鲁氏酵母作为试验菌,进一步降低高浓度糖类口服制剂的安全风险,提高其使用中的微生物控制水平。

2.2 菌液制备 菌液制备影响试验菌株的活性状态,菌液活性差异可能会导致对药品抑菌效力错误的估计,影响试验的准确性[22]。美国药典(USP)推荐使用新鲜菌液,ChP 也强调了试验菌液采用新鲜培养物以保证试验的准确性。试验菌株的连续传代会导致其表型表达和对抑菌剂的敏感性方面的问题,因此,一般要求传代次数不超过 5 代。虽然 EP 没有详细规定传代次数,但是规定应最小化传代[24]。制备的菌液的稳定性和均一性会影响培养基适用性检查和抑菌效力检查结果的准确性,如果菌液没有立即使用,应评估菌液活力,避免菌液活性差异对结果造成影响[22,25],因此 ChP 中规定了菌液制备后应在室温下 2 h 内使用,若保存在 2 ℃ ~8 ℃条件下,黑曲霉孢子悬液 7 d 内使用,其他试验菌液可 24 h 内使用。黑曲霉制备时常会发生聚集生长,不易形成均匀分散的孢子悬液,因此常需使用吐温 80 防止孢子的聚集生长,所用洗脱液的具体用量应根据实际情况而定,不做严格规定。

2.3 供试品接种 各国药典均推荐供试品的接种应在原始包装中进行,以避免包装容器对测试结果的影响。考虑到接种菌液不能明显稀释产品,并且试验菌应均匀分散在供试品中,因此规定接种体积不能超过供试品体积的 1%,这是微生物计数准确的重要保证,且与 ChP 通则 1105 的相关要求一致。温度是抑菌效力重要的影响因素之一,抑菌效力通常会随着温度的降低而降低,为接种后的供试品设置合理的贮存温度对于准确评价抑菌效力十分必要。ChP 规定接种后的供试品置于 20 ℃ ~25 ℃避光贮存,设置该贮存条件强调了处方中的抑菌剂在与设计温度相似的条件下发挥抑菌作用。

2.4 存活菌数测定 建立科学有效的微生物计数方法是进行抑菌效力检查的前提。抑菌效力检查法中计数方法适用性的目的是证明产品残余的抑菌作用被去除,使用试验菌株起到生物指示的作用[26]。样品的抑菌活性和理化特性可能抑制或破坏微生物生长,综合表现为抑菌能力[27],抑菌效力的评估依赖于可靠的微生物计数方法,彻底的中和抑菌体系的抑菌作用防止残余抑菌剂对结果的影响是获得准确结果的基础。为了消除抑菌作用,有时需要用到中和剂,而中和剂的选择通常有 3 条标准:中和剂必须有效中和抑菌作用;中和剂必须对试验菌株无毒;中和剂不能与活性成分发生反应而形成毒性化合物[28]。因此在建立抑菌效力检查法时应考虑中和剂的有效性和无毒性。

ChP 设置的测定时间点与 2015 年版一致,即设置了 6 h,24 h,2 d,7 d,14 d,28 d 等不同时间点的存活菌数测定,使得测试更切合实际应用。设置 6 h 和 24 h 的测定时间点,恰恰是患者在滴眼液使用过程中可能的间隔时段,因此,增加测定点能够更好地模拟使用过程不当造成的微生物污染[29]。某些多剂量包装产品由于化学或微生物稳定性问题,需要在 24 h 内使用,而另一些在 2 ℃ ~8 ℃下 1 周内使用,各测定时间点药品抑菌体系的抑菌效力要足以保证任何由于疏忽引入的微生物在下次使用时被抑制或杀灭。相比之下,USP 规定的抑菌效力测试要到7 d[24],不能很好地模拟药品实际使用情况,而 6 h 和 24 h 测定时间点强调了风险管理的实际需要,弥补了这一不足,体现了标准的严谨性。

不同的抑菌剂对微生物的瞬间杀灭能力不同,例如醋酸苯汞对微生物的瞬间杀灭能力明显强于其他抑菌剂。各国对于“0 时”定义均为添加菌液的原始浓度,如果药物成分本身就具有杀菌作用时,“0 时”的菌数测定若按 2010 年版《中华人民共和国药典》中规定的刚接种时,则计数结果的差异会非常显著,故 ChP 对于“0 时”的定义更具规范性和科学性[30]。

2.5 结果判断 ChP 抑菌效力检查法在结果判断方面与 2015 年版保持一致,也与 EP 抑菌效力检查法类似,即包含了 2 个标准(A 和 B)。A 标准表示药典推荐的产品要达到的抑菌效力,其代表了普遍适用的“目标”标准,对于某些产品例如抗酸剂和某些生物制品,除非以牺牲其他一些同等重要甚至更重要的性质为代价,否则难以达到这一“目标”标准,在这种情况下应满足 B 标准,这是制药企业与监管部门之间达成的共识,应用中应考虑到某些产品的特殊性[31]。在各国或地区药典的结果判断标准中常用“no recovery(NR)”和“no increase(NI)”

表示测定结果,NR 意思是试验菌未恢复生长,指的是接种的试验菌在某一时间间隔上(通常为 28 d)在平皿上未观察到生长的现象,即测试平皿上没有观察到菌落的生长。NI 意思是未增加,指的是对前一个测定时间,试验菌增加的数量不超过 0.5 lg,即与前一个测定时间点结果相比较,抑菌剂将使微生物种群保持在或低于这一较低水平。由于微生物计数具有特殊性,测试中微生物数量不可避免地会发生变化,为了解决该问题,采用计数与之前确定的时间点建立的计数进行比较,允许存在 0.5 lg 的校正因子差值,这一规定体现了对微生物数据特殊性的理解。当前 ChP 与 EP 的标准规定严于 USP 和日本药局方(JP)。有研究表明,当前 USP 和 JP 对口服制剂的标准有利于通过处方调节满足要求,而对于 EP 更为严格的要求,则需要添加合适的抑菌剂方能满足要求[32]。

3 抑菌效力检查法的优势与局限

抑菌效力检查法是新药开发阶段的研究试验,而非日常产品放行的检查试验。作为评价药品抑菌体系抑菌能力的生物测定法,它弥补了化学测定法的不足。化学测定法仅能确定抑菌剂的种类和浓度而不能确定抑菌剂相互作用及其在药物中的活性,而抑菌效力检查法可测定药品抑菌体系的整体抑菌作用。抑菌体系的抑菌效力不仅来自抑菌剂,还可能来自药物活性成分、高或低 pH 条件、低水分活度、缺乏营养及这些因素的协同作用。在抑菌剂选择时应综合考虑以上因素,分析剂型最大潜在污染微生物,利用该检查法指导新药抑菌体系的建立。例如,某些药品处方中存在多种原辅料与水分相互作用的机制,其结果导致了水分活度的降低,这一特性起到了类似添加抑菌剂的作用,影响了潜在微生物的存活或生长,是新药处方开发的重要考虑因素之一。

抑菌效力检查法的最终目的为药品筛选安全、有效、质量可控、科学合理的抑菌剂,以保障药品质量。尽管存在测试菌株代表性不足、测定方法繁琐、费时费力等局限性,其仍然是保证药品安全有效的重要标准之一。

4 抑菌效力检查法的应用趋势展望

当前我国药品发展目标是提升存量药品质量层次,提高增量药品创新水平,以增量创新促进存量调整。抑菌效力检查法的应用从已上市药品评价逐渐向新药研发方向转变是必然趋势。虽然抑菌效力检查法在我国的应用已有 10 年,然而从抑菌剂使用存在的问题看,我国与国际水平还有相当差距,尤其是在新药研发阶段抑菌剂筛选方面。因此,对药品添加抑菌剂的精准选择及处方合理性分析是抑菌效力检查法应用的主要方向。针对新药开发时的处方设计,应重视药品本身的抑菌特性与添加抑菌剂的协同效应及单剂量包装技术的应用,针对已上市药品中抑菌剂的滥用、乱用突出问题,应明确常用抑菌剂的抑菌谱和抑菌浓度,优化处方降低安全风险。如何精准筛选出抑菌谱广、添加量合理、不良反应少的抑菌剂是抑菌效力研究要解决的主要问题。抑菌剂的选择应有相应的研究数据支持,明确其与药物的相容性及其对产品稳定性的影响,符合相关的法规和技术要求[33],通过抑菌效力检查法分析添加的抑菌剂的种类、抗菌谱、影响因素、安全有效浓度,可为提高药品质量提供理论依据。此外,由于抑菌效力检查试验周期较长,出现偏差结果常会造成较大成本损失,实验室应遵从严格的标准操作规程(standard operating procedure,SOP),若出现微生物数据偏差(microbiological data deviations,MDD),应重视对偏差数据的调查,保障微生物数据的完整性和可靠性。

[参 考 文 献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:176 - 177.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 版. 四部. 北京:中国医药科技出版社, 2015:151 - 153.

[3] 朱冉, 许华玉, 宋宗华. 2020 年版《中国药典》四部微生物控制体系的增修订概况及展望[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(19): 1564 - 1568.

[4] 易巧, 刘绪平, 刘荷英. 国产马来酸噻吗洛尔滴眼液抑菌效力研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(15): 1263 - 1267.

[5] 孙春艳, 赵亚萍, 姜红, 等. 对湖北省眼用制剂质量提升及风险的思考[J]. 中国药师, 2018, 21(7): 1250 - 1252.

[6] 吴燕燕. 添加羟苯乙酯的加替沙星滴眼液抑菌效力的检测与评价[J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 87 - 90.

[7] 毛腾霄, 程龙, 张聪聪, 等. 萘敏维滴眼液抑菌效力评价及抑菌剂最适浓度考察[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 319 - 325.

[8] 刘钐, 吴静萍, 陈茜, 等. 国产加替沙星滴眼液的质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(3): 313 - 318.

[9] 杨育儒, 沈秋莲, 王庆芬. 氯化钾溶液中羟苯乙酯含量考察[J]. 中国药师, 2017, 20(5): 953 - 955.

[10] 曹寒梅, 杨晓莉, 蔡虎, 等. 3 种中药口服液体制剂抑菌效力测定与评价[J]. 中国药业, 2019, 28(14): 37 - 39.

[11] 刘广桢, 凌霄, 国明, 等. 复方盐酸普鲁卡因溶液Ⅰ抑菌剂处方研究[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(9): 798 - 801.

[12] 甘永琦, 农浚, 朱荣, 等. 复方桔梗麻黄碱糖浆(Ⅱ)的微生物污染状况分析及抑菌剂效力考察[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(11): 925 - 930.

[13] 王银环, 王征南, 钱凌, 等. 普瑞巴林口服溶液抑菌效力研究与抑菌剂浓度筛选[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3):

545 – 550.
[14] 曹美英, 方欢, 叶朝阳. 鸦胆子油乳膏抑菌剂的检测和评价[J]. 中国处方药, 2019, 17(7): 36 – 39.
[15] 张文燕, 曹晓云, 郭福庆. 酒石酸溴莫尼定凝胶抑菌效力检查方法研究[J]. 天津药学, 2020, 32(2): 17 – 22.
[16] 杨美琴, 曹莹, 戴翠, 等. 国产氧氟沙星滴眼液中抑菌剂使用现状分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(6): 516 – 520.
[17] 邹谨霜, 王茜, 姜红, 等. 湖北省眼用制剂中抑菌剂的使用及控制[J]. 医药导报, 2019, 38(5): 636 – 641.
[18] 肖璜, 戴翠, 杨美琴, 等. 国产牛磺酸滴眼液中抑菌剂使用状况分析[J]. 中国药业, 2018, 27(24): 5 – 8.
[19] 逄焕欢, 杨志宏, 宫丽婷, 等. 国产盐酸洛美沙星滴眼液中抑菌剂使用现状分析[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(12): 2218 – 2224.
[20] 潘雯, 陈伟盛. 硫酸软骨素滴眼液抑菌效力的研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(9): 1709 – 1714.
[21] 张文燕, 曹晓云. 半夏糖浆/半夏止咳糖浆抑菌效力测定及分析[J]. 中国药品标准, 2020, 21(3): 213 – 217.
[22] 王似锦, 周发友, 刘鹏, 等. 2 种即用型工作菌株在琼脂培养基上的生长情况研究[J]. 中国药品标准, 2020, 21(5): 385 – 389.
[23] NICOLE LV, NGUYEN K, KUPIEC T. Quality control analytical methods: The essentials of united states pharmacopoeia chapter antimicrobial effectiveness testing and its application in pharmaceutical compounding[J]. *Int J Pharm Compound*, 2014, 18(2): 123 – 130.
[24] MOSER CL, MEYER BK. Comparison of Compendial Antimicrobial Effectiveness Tests: A Review[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011, 12(1): 222 – 226.
[25] 李趣嫦, 张帆, 李文靖, 等. 商业定量菌株用于药品微生物计数法建立的可行性探讨[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 2093 – 2097.
[26] SUTTON SVW. The antimicrobial efficacy test, GMP and investigations[J]. *Am Pharm Rev*, 2013, 14(5): 40.
[27] 马仕洪, 刘鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877 – 882.
[28] SUTTON SVW. The antimicrobial effectiveness test[J]. *Pharm Microbiol Forum News*, 2010, 16(3): 2 – 14.
[29] 肖璜, 王似锦, 周发友, 等. 硼类化合物在滴眼剂中抑菌效力的探讨[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(4): 58 – 61.
[30] 王领, 汤湛, 王俏. 滴眼剂的抑菌增效研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2017, 36(12): 693 – 700.
[31] British Pharmacopoeia[S]. Vol Ⅴ. 2018: V-A519, V-A683.
[32] STEFAN S, SEBASTIAN S, ANGELA H, *et al*. Preservation of liquid drug preparations for oral administration[J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(1): 357 – 367.
[33] 赵靖,白玉,罗建辉, 等.多剂量胰岛素制剂中防腐剂使用的考量[J].中国新药杂志,2019,28(23):2814 – 2817.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 03 – 19