

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.22.008

# 片剂水分活度迁移规律与载荷微生物生长状况研究\*

闵红,杨静,呼延婷婷,绳金房<sup>△</sup>

(陕西省食品药品监督检验研究院,陕西 西安 710065)

**摘要:**目的 考察片剂药品储存于不同水分活度( $a_w$ )环境时, $a_w$ 迁移规律与载荷微生物生长状况,为制订符合国情的“非无菌制剂水分活度测定的应用指导原则”奠定理论基础。**方法** 将自然污染后的妇康片分别置 $a_w$ 为0.328,0.529,0.753,0.902,0.973的密闭环境中,研究药品 $a_w$ 的水分迁移规律和载荷微生物数量的变化规律。**结果** 药品储存于5种不同 $a_w$ 环境,表现出药物的 $a_w$ 在第1周急剧增加,随后缓慢增加,并逐渐与环境 $a_w$ 趋于一致的变化规律;药品置低 $a_w$ 环境时,需氧菌总数(TAMC)及霉菌和酵母菌总数(TYMC)随着时间的延长有降低趋势,置高 $a_w$ 环境时,TAMC和TYMC随着时间的延长呈现平稳趋势。**结论** 本身 $a_w$ 较低的片剂可考虑根据历史检测数据和有效证明文件进行微生物指标的参数放行,或采用 $a_w$ 取代微生物指标的检测,实现从终端控制到源头和过程控制的目标。

**关键词:**片剂;水分活度;需氧菌总数;霉菌和酵母菌总数;载荷微生物

中图分类号:R927.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)22-0021-05

## Study on the Transfer Regularity of Water Activity and Growth Status of Loaded Microorganisms of Tablets

MIN Hong, YANG Jing, HUYAN Tingting, SHENG Jinfang

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

**Abstract: Objective** To investigate the transfer regularity of water activity( $a_w$ ) and growth status of loaded microorganisms of tablet drugs under different  $a_w$  conditions, and to lay a theoretical foundation for the establishment of "the application guiding principle for the determination of water activity of non-sterile preparations" in line with national conditions. **Methods** Fukang Tablets had been contaminated naturally were placed in a closed environment with  $a_w$  of 0.328, 0.529, 0.753, 0.902 and 0.973 to study the transfer regularity of  $a_w$  and change the regularity of the number of loaded microorganisms. **Results** Drugs stored in five kinds of  $a_w$  environments showed a sharp increase of  $a_w$  in the first week, followed by a slow increase, and gradually tend to be consistent with the environment's  $a_w$ . When the drugs were stored in low  $a_w$  environment, the total amount of aerobic bacteria(TAMC) and total amount of mold and yeast(TYMC) decreased over time. When the drugs were stored in high  $a_w$  environment, TAMC and TYMC showed a stable change trend over time. **Conclusion** For the tablets with low  $a_w$ , the parameter release of microbial indicators can be considered according to the historical test data and valid certification documents, or the microbial indicators are replaced by the  $a_w$  detection, so as to realize the concept from terminal control to source and process control.

**Key words:** tablets; water activity; total amount of aerobic bacteria; total amount of mold and yeast; loaded microorganisms

\*基金项目:2020年版《中国药典》药品标准提高项目[15]。

第一作者:闵红,女,博士研究生,副主任药师,研究方向为食品、药品与化妆品微生物检测,(电子信箱)hong-min518@163.com。

<sup>△</sup>通信作者:绳金房,男,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品微生物控制标准,(电子信箱)shengkangjia@163.com。

加入润滑剂则会,大幅延长崩解时限。后法可压性强,能有效提高药片的硬度及耐磨性。

综上所述,优选的处方辅料类型及比例适宜,崩解时限符合要求,可为清热解暑分散片的工业化生产提供参考。

### 参考文献:

[1] WS<sub>3</sub>-B-3996-98,卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)[S].

[2] 经嘉,黄桂华. 中药分散片的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(8): 73-75.

[3] 冯耀荣,袁强. 中药口服给药新剂型研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(4): 793-795.

[4] CHAROO NA, SHAMSHER AA, ZIDAN, AS, et al. Quality by de-

sign approach for formulation development: A case study of dispersible tablets[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 423(2): 167-178.

[5] 敖玲玲,张晨芳,徐凯敏,等. 几种常用崩解剂的理化性能和应用效果[J]. 中国医药指南, 2015, 13(16): 20-22.

[6] 陈燕军,臧琛,赵小妹,等. 几种常用填充剂与崩解剂在中药分散片应用中的性能比较[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 580-583.

[7] 汤继辉,胡容峰,怀素丽. 新型辅料性质考察及其在中药分散片中的应用[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(1): 48-49.

[8] 代玉玲,普俊学,廖荣,等. 中药分散片与其他中药口服制剂特点比较[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(8): 63-65.

(收稿日期:2019-03-21)

水分活度( $a_w$ )指样品中水分的饱和蒸气压与相同温度下纯水的饱和蒸气压的比值<sup>[1]</sup>。样品中的水可分为结合水和自由水两类,只有自由水能被微生物生长、繁殖、孢子萌发所利用。 $a_w$ 反映产品中微生物新陈代谢的可利用水(结合水)的量度,其值介于0~1<sup>[2]</sup>。目前, $a_w$ 常用的3种方法为露点/冷面镜法、电子湿度计法和相对平衡湿度法。其中,露点/冷面镜法具有精确度高( $\pm 0.003$ )、检测速度快( $< 5 \text{ min}$ )、检测范围广(0.03~1.00)、准确度高、稳定性好等优点<sup>[3-4]</sup>,是美国药典41版(USP 41)、欧洲药典第九版(EP 9.0)、日本药局方2016年版(JP 2016)、美国分析化学家协会(AOAC)、国际标准化组织(ISO)等机构推荐使用的 $a_w$ 测定方法。2015年版《中国药典》尚未收载此内容,这与我国药品生产质量管理规范(GMP)强调的药品微生物质量源头设计(QbD)和过程控制的理念不相适应。本研究中将药品分别置 $a_w$ 为0.328,0.529,0.753,0.902,0.973的密闭环境中,对药品 $a_w$ 和载荷微生物的生长规律进行研究,揭示将样品储存于不同 $a_w$ 环境下的水分迁移规律及样品载荷微生物变化规律。本研究内容填补了国内药品 $a_w$ 研究的空白,为制订《中国药典》“非无菌制剂水分活度测定的应用指导原则”奠定了理论基础。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

仪器:HFsafe-1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);SHA-C型水浴恒温振荡器(天津鑫博得仪器有限公司);LRH-250F型生化霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);涡旋混合器(德国IKA公司);Aqualab型水分活度仪(美国Decagon公司)。

菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B) 10104]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44102]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003],均购自中国医学细菌保藏管理中心,工作用菌株为第3代。

试药:妇康片(陕西东泰制药有限公司,批号为8E01,规格为每片0.5g);胰酪大豆胨琼脂培养基、胰酪大豆胨液体培养基(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、沙氏葡萄糖液体培养基,均购自北京陆桥技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 微生物限度方法适用性试验

为了模拟药品微生物的自然污染状态,将药品置于非洁净区环境进行生产,造成环境中细菌、霉菌和酵母菌对该药品的污染。称取样品10g,分别加入胰酪大豆胨液体培养基至100mL,200mL,45℃水浴15min,振荡使其分散均匀,制成1:10和1:20供试液。计数方法

适用性试验分试验组、供试品对照组和菌液对照组,进行3次平行试验。

1)试验组取1:10供试液分装于5个无菌试管中,每管装量为9.9mL,再分别加入含菌量不大于 $10^4 \text{ cfu/mL}$ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉试验菌液各0.1mL,混匀,得样品液。

2)供试品对照组取供试液原液9.9mL,加入胰酪大豆胨液体培养基0.1mL,混匀,得样品液。

3)菌液对照组取胰酪大豆胨液体培养基分装于5个无菌试管中,每管装量为9.9mL,同试验组操作,分别加入含菌量不大于 $10^4 \text{ cfu/mL}$ 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉试验菌液各0.1mL,混匀,得样品液。

取制备好的试验组样品液1mL,置直径为90mm的无菌平皿中,注入温度不超过45℃熔化的培养基约20mL,其中,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌注入TSA,白色念珠菌和黑曲霉注入SDA,混匀,凝固,按规定条件倒置培养、计数。同法测定供试品对照组及菌液对照组菌落数,观察各组的平均菌落数,计算各试验菌回收率。各试验菌回收率=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数。各试验菌回收率不得低于50%,否则需继续进行方法适用性试验,直至消除供试品的抑菌性。

#### 1.2.2 不同环境 $a_w$ 的制备

将不同质量氯化钠加入500mL纯化水中,分别制成 $a_w$ 为0.328,0.529,0.753,0.902,0.973的氯化钠溶液,分别加入相应干燥器中,制备 $a_w$ 分别为0.328,0.529,0.753,0.902,0.973的储存环境。

#### 1.2.3 $a_w$ 、需氧菌总数、霉菌与酵母菌总数测定

准确称取10g药品置小平皿内,共称取36份,将其放入 $a_w$ 为0.328的干燥器中,同法分别将样品置 $a_w$ 为0.529,0.753,0.902,0.973的干燥器中,在25℃条件下密闭储存3个月,从0周开始,每周对样品 $a_w$ 、需氧菌总数(TAMC)、霉菌与酵母菌总数(TYMC)进行检测。TAMC和TYMC检测方法为2.1项下微生物限度方法适用性试验得出的检测方法。

### 1.3 数据分析

采用SPSS 13.0软件对试验数据进行描述性统计与分析,揭示将样品在不同 $a_w$ 环境下储存水分的迁移规律及载荷微生物变化规律。

## 2 结果

### 2.1 TAMC及TYMC适用性试验

取1:10供试液制得的样品液各1mL倾注平皿,按“非无菌产品微生物限度检查项下计数检查法(通则1105)”检查,发现铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉回收比值在0.5~2.0之间,金黄色葡萄球菌

表1 TAMC方法适用性试验各试验菌回收比值

| 供试液比例 | 金黄色葡萄球菌 |     |     | 铜绿假单胞菌 |     |     | 枯草芽孢杆菌 |     |     | 白色念珠菌 |     |     | 黑曲霉 |     |     |
|-------|---------|-----|-----|--------|-----|-----|--------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
|       | 1       | 2   | 3   | 1      | 2   | 3   | 1      | 2   | 3   | 1     | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   |
| 1:10  | 0.4     | 0.4 | 0.4 | 0.9    | 0.9 | 0.8 | 0.9    | 0.9 | 0.8 | 0.8   | 1.1 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 1.0 |
| 1:20  | 0.8     | 0.9 | 0.8 |        |     |     |        |     |     |       |     |     |     |     |     |

回收比值不足0.5,不可取;当取1:20供试液制得的样品液各1 mL倾注平皿,金黄色葡萄球菌的回收比值为0.8,0.9,0.8,可取。结果见表1。然后在平皿中加入TSA,摇匀,待凝固后置35℃条件下培养5d进行TAMC计数。

取1:10供试液制得的样品液1 mL倾注平皿,按照“非无菌产品微生物限度检查计数检查法(通则1105)”检查,发现白色念珠菌和黑曲霉试验菌的回收比值均在0.5~2.0之间,可取。结果见表2。然后在平皿中加入SDA,摇匀,待凝固后置25℃条件下培养7d进行该TYMC计数。

表2 TYMC适用性试验各试验菌回收比值(n=3)

| 供试液比例 | 白色念珠菌 |     |     | 黑曲霉 |     |     |
|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
|       | 1     | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   |
| 1:10  | 0.9   | 0.9 | 0.8 | 1.0 | 0.9 | 0.9 |

## 2.2 a<sub>w</sub>的迁移规律

药品a<sub>w</sub>随时间变化的曲线见图1A。可见,药品储存于5种不同a<sub>w</sub>(0.328,0.529,0.753,0.902,0.973)环境,样品a<sub>w</sub>在第1周表现出急剧增加,随后缓慢增加,并逐渐与环境a<sub>w</sub>趋于一致。

当环境a<sub>w</sub>分别为0.328,0.529,0.753,0.902,0.973时,药品储存1周的a<sub>w</sub>较初始值分别增加了9.34%,62.63%,111.49%,149.22%,160.28%。样品储存1周后的a<sub>w</sub>随时间的延长缓慢增加,并逐渐与环境a<sub>w</sub>保持一致,当环境a<sub>w</sub>为0.328时,药品a<sub>w</sub>在第1周就达到0.347,1周后随着储存时间的延长,药品a<sub>w</sub>无显著性变化;当环境a<sub>w</sub>为0.529时,药品a<sub>w</sub>在第2周达到0.538,2周后随着储存时间的延长,药品a<sub>w</sub>无显著变化;当环境a<sub>w</sub>为0.753时,药品储存12周的a<sub>w</sub>为0.755;当环境a<sub>w</sub>为0.902和0.973时,药品储存12周

的a<sub>w</sub>分别为0.901和0.954,药品a<sub>w</sub>需要更长的储存时间才能与环境a<sub>w</sub>保持一致。表明药品a<sub>w</sub>低于其储存环境a<sub>w</sub>时的水分迁移规律,即药品a<sub>w</sub>最终与其储存环境a<sub>w</sub>保持一致,环境a<sub>w</sub>越大,药品达到环境a<sub>w</sub>所需时间越长。

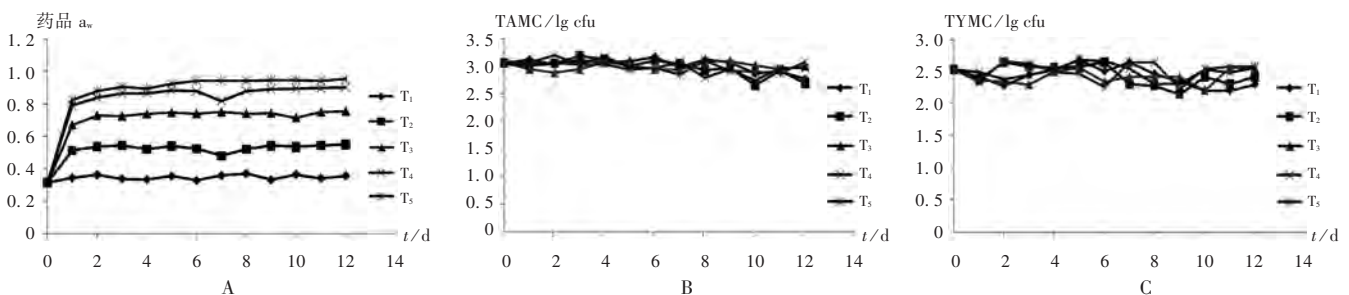
## 2.3 TAMC及TYMC变化规律

将样品置低a<sub>w</sub>环境时(a<sub>w</sub>为0.328和0.529),样品TAMC和TYMC随时间的延长有降低趋势。当环境a<sub>w</sub>为0.328时,样品TAMC数量在第10,11,12周分别较初始值降低6.57%,5.36%,10.51%;样品TYMC数量在第8,9,10,11,12周分别较初始值降低2.75%,8.01%,14.79%,14.79%,9.95%;当a<sub>w</sub>为0.529时,样品TAMC在第8,9,10,11,12周分别较初始值降低4.62%,2.94%,15.29%,4.26%,13.75%,样品TYMC在第7,8,9,10,11,12周分别较初始值降低9.95%,11.03%,17.89%,4.76%,9.95%,4.76%。将样品置较高a<sub>w</sub>环境时(a<sub>w</sub>为0.753,0.902,0.973),样品TAMC和TYMC随时间的延长呈现平稳趋势,样品TAMC和TYMC无显著变化。分析原因为,药品置较高a<sub>w</sub>环境时(a<sub>w</sub>为0.753,0.902,0.973),该环境a<sub>w</sub>能达到微生物生长条件,但妇康片的成分为益母草、延胡索(醋制)、阿胶、当归、人参、熟地黄、白芍(酒制)、川芎、白术(炒)、茯苓、炙甘草,不能提供微生物生长所需要的氮源、碳源、无机盐、生长因子等营养成分,故在环境a<sub>w</sub>较高时,药品污染的TAMC和TYMC无显著性变化,而样品置低a<sub>w</sub>环境时(a<sub>w</sub>为0.328和0.529),除了药品成分不能提供营养,环境a<sub>w</sub>也不能满足微生物生长代谢所需的最低水分子要求,初始污染微生物逐渐死亡,TAMC和TYMC较初始值缓慢减低。详见图1B及图1C。

## 3 讨论

### 3.1 指标价值

a<sub>w</sub>影响微生物代谢活性,大多数微生物的代谢活动



注:T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>分别表示a<sub>w</sub>为0.328、0.529、0.753、0.902和0.973的储存环境。

A. a<sub>w</sub> B. TAMC C. TYMC

图1 药品在不同a<sub>w</sub>环境储存的a<sub>w</sub>、TAMC、TYMC随时间变化的曲线图

需要水分子参与,  $a_w$  的降低会导致微生物的代谢活性降低<sup>[5]</sup>。微生物在  $a_w$  较高时生长较旺盛, 在  $a_w$  较低时生长缓慢, 每种微生物都有 1 个临界  $a_w$ , 当样品  $a_w$  低于该临界值时, 微生物不能正常生长繁殖<sup>[6]</sup>, 数量逐步衰减直至死亡, 最后该样品达到无菌状态。如铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、沙门氏菌等革兰阴性菌在  $a_w$  低于 0.91 时不能增殖(甚至不能存活); 金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌在  $a_w$  低于 0.86 时不能增殖; 黑曲霉在  $a_w$  低于 0.77 时不能增殖; 嗜渗酵母和耐旱真菌在  $a_w$  低于 0.60 时不能增殖<sup>[7]</sup>。 $a_w$  对微生物的致死作用, 与微生物细胞内外的  $a_w$  息息相关, 当微生物处在低于临界  $a_w$  环境时, 细胞内水分就会瞬间流失, 伴随细胞内细胞质体积的缩小, 从而导致细胞的质壁分离<sup>[8-9]</sup>。

$a_w$  是控制微生物污染风险和维持稳定性的关键因素。传统工艺中常将食品控制在较低  $a_w$  范围内, 从而抵制由微生物导致的腐败变质, 例如干制水果、糖浆剂、和腌制肉、蔬菜等低  $a_w$  食品具有自我保鲜能力<sup>[9-10]</sup>。将药品  $a_w$  控制在较低范围内, 同样可阻止自身及环境污染微生物的生长繁殖, 然而, 将  $a_w$  应用于药品微生物控制的研究较少, 仅有少量国际药品企业在新药研发阶段, 将  $a_w$  作为控制微生物污染的重要参数进行研究, 确保药品质量的稳定性, 而该研究在国内药品领域尚属空白。

### 3.2 控制药品 $a_w$ 的意义

$a_w$  是控制药品微生物污染风险和维持药品稳定性的关键因素<sup>[11-13]</sup>。USP 41 指出, 药品  $a_w$  的降低可提高药品的抑菌性, 阻止微生物增殖; 减少处方对微生物污染的敏感性; 减少处方中活性成分水解; 为减少微生物限度和控制菌检查频次的参数放行提供支持; 并为微生物风险控制提供一种替代方法。

### 3.3 如何在药品生产和储存过程保持低 $a_w$

在药品研发过程,  $a_w$  可作为固定参数指标优化处方, 降低处方中  $a_w$ , 提高药物制剂的抑菌性, 通过在处方中改变氯化钠、蔗糖、酒精、丙二醇或甘油的浓度达到降低药品  $a_w$  的目的。USP 41 指出, 加强包装研究, 以确保包装密闭性, 从而有效防止环境水分子在储存过程进入药品, 导致药品在  $a_w$  的增加。

根据药品的性质和要求, GMP 规定常温储存库保持 10~30℃, 相对湿度为 45%~75%, 冷藏库保持 2~10℃, 阴凉库温度不超过 20℃, 阴暗库温度不超过 20℃ 并保持避光<sup>[14]</sup>。储存环境湿度较高, 空气中的水蒸气就会被一些药品吸收, 导致药品变潮湿, 从而发生霉变、潮解、稀释及变形等, 储藏环境湿度比较低, 药品中的结晶水就会被蒸发而导致风化<sup>[15]</sup>。本研究中将药品储存于 5 种不同  $a_w$  环境中, 由于药品本身的  $a_w$  低于这 5 种环境  $a_w$ , 导致药品吸收环境中的水蒸气, 药品  $a_w$  表现出在第 1 周急剧增加, 随后缓慢增加, 并逐渐与环境  $a_w$  趋于

一致的变化规律。

### 3.4 低 $a_w$ 药品的参数放行

当药品  $a_w$  足够低, 可通过对药品的风险评估决定是否减少或取消微生物限度和控制菌检查频次的参数放行。风险评估内容包括药品原料、水、生产过程、处方和包装系统微生物风险控制的有效性证明文件, 以及对药品研发、生产、过程验证及大量批次(至少 20 批)上市样品常规试验的历史数据<sup>[14]</sup>。

事实上, 非水溶性液体制剂和固体制剂等许多非无菌药物制剂几乎没有微生物污染的可能性, 分析其原因可能为这些药物制剂本身  $a_w$  较低, 不适合孢子萌发和微生物生长<sup>[16]</sup>。妇康片的初始  $a_w$  仅为 0.317, 将药品置低  $a_w$  环境时, 样品 TAMC 和 TYMC 随着时间的延长有降低趋势, 而置较高  $a_w$  环境时, 样品 TAMC 和 TYMC 随着时间的延长呈现平稳趋势。因此, 对该类药物制剂进行微生物参数控制的意义不大, 可考虑根据历史检测数据和有效证明文件进行微生物指标的参数放行, 或采用  $a_w$  取代微生物指标的检测。 $a_w$  检测具有操作简便、成本低、周期短等优点, 一般检测 1 次药品  $a_w$  约需 30 min, 而检测微生物指标的时间为 5~7 d。采用药品  $a_w$  替代微生物指标可显著减少药品放行周期, 加快样品流转速度, 降低库存成本和检验费用, 提高药品生产产值, 实现从终端控制到源头过程控制的理念。

### 参考文献:

- [1] GB/T 23490-2009, 食品水分活度的测定[S].
- [2] SCOTT WJ. Water relations of food spoilage microorganisms[J]. *Advances in Food Research*, 1957, 7: 83-127.
- [3] FONTANA AJ. Dew - Point Method for the Determination of Water Activity[EB/OL]. (2001-08-01) [2018-11-20]. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faa0202s00>.
- [4] ISO Norm 21807:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs: Determination of water activity[S].
- [5] HORNER WFA. Preservation of fish by curing, drying, salting and smoking[M]. In: Hall, G. M. (Ed.), *Fish Processing Technology*, 2nd edition. London: Blackie Academic and Professional, 1997: 32-73.
- [6] CHRISTIAN JHB. Specific solute effects on microbial water relation[M]. Rockland L. B. and Stewart G. F. // *Water activity: influence on food quality*. New York: Academic Press. Inc., 1981: 825-854.
- [7] PRIOR BA. Measurement of water activity in foods: A review[J]. *Journal of Food Protection*, 1979, 42(8): 668-674.
- [8] CSONKA LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. *Microbiol Rev*, 1989, 53(1): 121-147.
- [9] WIJNKER JJ, KOOP G, LIPMAN LJA. Antimicrobial properties of salt(NaCl) used for the preservation of natural casings[J]. *Food Microbiology (London)*, 2006, 23(7): 657-662.
- [10] MOL S, COSANSU S, ALAKAVUK DU, et al. Survival of