

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.002

中美现行药典无菌检查法比对

李玉立, 江志杰, 刘文杰, 张光华[△]

(北京市药品检验研究院·北京市疫苗检验中心·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 比对2020年版《中国药典》与《美国药典·国家处方集》(USP-NF2021)无菌检查法方法与要求的差异。方法 以USP-NF2021无菌检查法所载内容及要求为参考,并将2020年版《中国药典(四部)》与之进行比对,列出差异项并进行分析。结果 中美两国现行药典无菌检查法在培养基配制、阳性对照试验、方法适用性试验、小剂量注射剂无菌检查等多处内容均存在差异。药典修订时可增加对冲洗流速的相关要求等内容。结论 中美现行药典中无菌检查法的方法和要求存在一定差异,其产生与无菌质量控制理念相关,有待各自下一版药典修订。

关键词: 中国药典;美国药典;无菌检查法;质量控制;比对

中图分类号:R95

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0006-04

Comparison of Sterility Test Methods Between Current Chinese Pharmacopeia and United States Pharmacopeia

LI Yuli, JIANG Zhijie, LIU Wenjie, ZHANG Guanghua

(Beijing Institute for Drug Control·Beijing Center for Vaccine Control·NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs·Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: **Objective** To compare the differences of methods and requirements of the sterility test between Chinese Pharmacopeia (2020 Edition) and United States Pharmacopeia·National Formulary (USP - NF2021). **Methods** The contents and requirements of sterility test in USP - NF2021 were compared with those in Chinese Pharmacopeia (Volume IV, 2020 Edition), the different items were listed and analyzed. **Results** The sterility test methods in the two pharmacopeias differ in many contents such as the medium preparation, positive reference test, method applicability and sterility test of low dose injection. Relevant requirements for flushing flow rate and other contents could be increased when the two pharmacopeias are revised. **Conclusion** The methods and requirements of the sterility test between current Chinese Pharmacopeia and United States Pharmacopeia have some differences, the occurrence of which relate to the conception of the sterile quality control and to be revised in their next edition of pharmacopeia.

Key words: Chinese Pharmacopeia; United States Pharmacopeia; sterility test methods; quality control; comparison

无菌检查法是针对无菌工艺产品和最终灭菌产品的无菌性而建立的检查法,1936年版《美国药典》第十一章开始引用单个培养基的直接接种法进行无菌检查,1953年版《中国药典》收录了“药品的灭菌检查法”^[1]。鉴于《中国药典》无菌检查法与国际通用标准在检查理念、培养体系、方法要求等诸多方面存在显著差异,《中国药典》于2015年版开始借鉴国外药典先进技术经验,以新的控制理念为指导,在检测范围及环境要求、培养体系、方法适用性等方面作了较大修订,逐步与国际通用标准一致^[2]。2020年版《中国药典(四部)》参考人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)协调案和相关国内外标准,结合我国医药产业实际情况和技术进步要求,进一步细化了无菌检查法的通用性和规范性要求,明确了环境监控的范围,修订了培养基的保存和使用时限及无菌检查法的关键操作步骤等^[3-4],从而使该版

《中国药典(四部)》的无菌检查法^[5]与ICH协调案框架下的《美国药典》《欧洲药典》《英国药典》《日本药典》进一步接轨。由于以上4部国外药典已通过ICH完成协调,主要技术基本一致,因此,现仅以网络最新(截至发稿时)版《美国药典·国家处方集》(USP-NF2021)无菌检查法所载内容及要求为参考,并将2020年版《中国药典(四部)》与之进行比对,为相关从业人员无菌操作及质量控制等工作提供借鉴。

1 USP-NF2021 无菌检查法主要内容

USP-NF2021通则<71>无菌检查法章节及主要内容见表1,表中注1~注14为与2020年版《中国药典(四部)》存在差异的版块,后续进行详细比对。

2 中美现行药典比对

2.1 方法的差异

2020年版《中国药典(四部)》与USP-NF2021无菌检查法方法的差异见表2。

第一作者:李玉立,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品标准及生物制品质量控制,(电子信箱)tt8765@live.com。

[△]通信作者:张光华,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品标准及药品微生物检查,(电子信箱)zhangguanghua2014@126.com。

表 1 USP – NF2021 无菌检查法主要内容
Tab. 1 Main contents of sterility test methods in USP – NF2021

章节标题	主要内容
微生物污染预防措施	试验环境需达到无菌检查的要求
培养基和培养温度(注 1)	硫乙醇酸盐流体培养基(注 2);硫乙醇酸盐替代培养基(注 3);大豆酪蛋白消化物培养基(注 4);青霉素或头孢菌素用培养基(注 5)
无菌性检查	需氧菌、厌氧菌和真菌的促生长试验(注 6),促生长试验和方法适用性试验适用的试验菌株主要有需氧菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌),厌氧菌(生孢梭菌),真菌(白色念珠菌,黑曲霉)(注 7)
无菌性检查	用于薄膜过滤法的稀释液和冲洗液主要有 4 种,液体 A、用于青霉素类或头孢菌素类的液体 A、液体 D、液体 K(注 8)
无菌性检查	方法适用性试验(注 9),包括 2 种方法:薄膜过滤法和直接接种法
供试品的无菌检查(注 10)	供试品检验数量;待检供试品的最小检验用量
供试品的无菌检查	薄膜过滤法(注 11),供试品分类如下:水溶性液体、水溶性固体、油剂和油性溶液、软膏剂和乳膏剂、预灌装注射器、非抗生素类注射用固体、注射用抗生素固体、抗生素固体、原料和混合物、无菌气雾剂产品(注 12)、具有导管的无菌设备
供试品的无菌检查	直接接种法(注 13),供试品分类如下:油性液体、软膏剂与乳膏剂、肠线和其他外科缝线、固体、消毒棉、纱布、外科敷料和相关物品、无菌器械
结果观察和解释(注 14)	定期观察,培养结束时检查培养基中是否肉眼可见微生物的生长

表 2 中美现行药典无菌检查法方法差异
Tab. 2 Differences of sterility test methods between Chinese Pharmacopeia and United States Pharmacopeia

注序	USP – NF2021	2020 年版《中国药典(四部)》	差异描述
1	如需储存培养基,应置无菌密闭容器中,在 2~25℃ 环境下保存	制备好的培养基若不即时使用,应置无菌密闭容器中,在 2~25℃、避光环境下保存	《中国药典》培养基储存条件多了“避光”要求
2	“硫乙醇酸盐流体培养基”配制方法:将 L-胱氨酸、琼脂、氯化钠、葡萄糖、酵母提取物和酪蛋白胰酶消化物与纯化水混合,加热至溶解。将硫乙醇酸钠或硫乙醇酸溶解于上述溶液,如必要,加入 1 N 氢氧化钠调灭菌后溶液 pH 为 7.1±0.2,如需过滤,可再次加热但不煮沸,趁热用润湿的滤纸过滤。加入刃天青钠溶液,混合,分装至适宜容器	“硫乙醇酸盐流体培养基”的配制方法:去除葡萄糖和刃天青溶液外的各成分混合,微温溶解,调 pH 为弱碱性,煮沸,滤清,加入葡萄糖和刃天青溶液,摇匀,调灭菌后 25℃ 的 pH 为 7.1±0.2。分装至适宜容器	二者的配制方法在各成分的添加顺序、调 pH 的具体试剂及具体加热时间等方面略有不同
2	硫乙醇酸盐流体培养基置 30~35℃ 培养	除另有规定外,硫乙醇酸盐流体培养基置 30~35℃ 培养。接种生物制品的硫乙醇酸盐流体培养基的容器应分成 2 等份,1 份置 30~35℃ 培养,1 份置 20~25℃ 培养	鉴于我国生物制品无菌检查曾发现过个别品种在 20~25℃ 培养的硫乙醇酸盐流体培养基中有菌生长的情况。《中国药典》本着求同存异的整合原则,保留了生物制品该培养基分别置 2 个温度范围培养的规定 ^[1]
3	必要时,可使用“硫乙醇酸盐替代培养基”代替“硫乙醇酸盐流体培养基”	无	《中国药典》无“硫乙醇酸盐替代培养基”
3	对于无法采用薄膜过滤法检测的含防腐剂类的供试品,如已按照需氧菌、厌氧菌和真菌促生长试验所述方法进行了验证,可使用硫乙醇酸盐流体培养基代替大豆酪蛋白消化物培养基在 20~25℃ 进行培养	无	《中国药典》无该说明
4	“大豆酪蛋白消化物培养基”	“胰酪大豆胨液体培养基”(TSB Tryptic Soya Broth)	虽名称不同,但配方一致
4	“大豆酪蛋白消化物培养基”的配制方法:将配方中固体溶于纯化水中,微温溶解。将溶液冷却至室温,并用 1 N 氢氧化钠调灭菌后的 pH 为 7.3±0.2	“胰酪大豆胨液体培养基”的配制方法:去除葡萄糖外各成分,混合,微温溶解,滤过,调灭菌后 25℃ 的 pH 为 7.3±0.2,加入葡萄糖,分装,灭菌	二者配制方法略有不同,如各成分的添加顺序及调节 pH 的具体试剂等
5	青霉素或头孢菌素用培养基	《中国药典》将具有抑菌性供试品所需培养基统一概述在“中和或灭活用培养基”	名称不同
6	促生长试验中,接种少量(不大于 100 cfu)的生孢梭菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌至适量硫乙醇酸盐流体培养基,每株菌均使用单独的培养基。接种少量(不大于 100 cfu)生孢梭菌至适量硫乙醇酸盐培养基替代品。接种少量(不大于 100 cfu)的黑曲霉、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌至适量大豆酪蛋白消化物培养基,每株菌均使用单独的培养基	灵敏度检查,取适宜装量的硫乙醇酸盐流体培养基 7 支,分别接种不大于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各 2 支,另 1 支不接种作为空白对照;取适宜装量的胰酪大豆胨液体培养基 7 支,分别接种不大于 100 cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 支,另 1 支不接种作为空白对照	促生长试验中,《美国药典》包含了“硫乙醇酸盐替代培养基”;《中国药典》则要求每种菌同时接种 2 支培养基,并另取 1 支作为空白对照
6	取部分培养基,培养 14 d,应无菌生长	每批培养基一般随机取不少于 5 支(瓶),置各培养基规定的温度培养 14 d,应无菌生长	无菌性检查中,《中国药典》对于具体取样数有明确规定

续表 2 中美现行药典无菌检查法方法差异

Continued Tab. 2 Differences of sterility test methods between Chinese Pharmacopeia and United States Pharmacopeia

注序	USP - NF2021	2020 年版《中国药典(四部)》	差异描述
6	促生长试验	灵敏度检查	名称不同,但试验目的相同,均为检查培养基的灵敏度
7	菌株来自 ATCC	菌株来自 CMCC	国别不同,菌株来源不同
8	稀释液和冲洗液有:1)液体 A;2)用于青霉素类或头孢菌素类的液体 A;3)液体 D;4)液体 K	稀释液和冲洗液有:1)0.1% 无菌蛋白胨水溶液;2)pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液;3)其他经验证的适宜溶液(如 0.9% 无菌氯化钠溶液)。如需要,可在上述液体中加入表面活性剂或中和剂等	除液体 A 即为 0.1% 无菌蛋白胨水溶液外,两国药典其他稀释液和冲洗液均不同
9	方法适用性试验用菌同促生长试验	方法适用性试验用菌将大肠埃希菌替代铜绿假单胞菌作为试验用菌	《中国药典》中发现,铜绿假单胞菌对一些抗革兰阴性杆菌为主的抗生素不敏感,故选择更敏感的大肠埃希菌更符合方法适用性试验的目的 ^[1]
10	供试品检验需包括阴性对照试验	供试品检验需同时进行阳性对照试验和阴性对照试验	《中国药典》无菌检查法一贯强调应同时进行供试品的阳性对照试验
11	如供试品具有抑菌性,需用冲洗液冲洗滤膜不少于 3 次,冲洗液种类及用量同方法适用性试验。每张滤膜均不得冲洗超过 5 次,每次 100 mL,即使方法适用性试验表明该冲洗方法不能完全清除供试品抑菌性,也不必增加冲洗次数	如供试品具有抑菌作用,须用冲洗液冲洗滤膜,冲洗次数一般不少于 3 次。每张滤膜每次冲洗量一般为 100 mL,总冲洗量一般不超过 500 mL,最高不得超过 1 000 mL,以避免滤膜上的微生物受损	《中国药典》中要求应尽可能通过冲洗消除抑菌活性,对于超过 1 000 mL/膜仍不能完全消除抑菌作用的供试品,会采用中和、分膜等操作进一步消除 ^[6-13]
12	无菌气雾剂产品	无菌气雾剂供试品	《中国药典》更详细地描述了气雾剂供试品取样操作的具体方式和步骤
13	供试品接入量应不超过培养基体积的 10%	供试品接入量应不超过培养基体积的 10%。硫乙醇酸盐流体培养基装量应不低于 15 mL,胰酪大豆胨液体培养基装量应不低于 10 mL。一般样品 2 种培养基接种的瓶或支数相等。生物制品接种硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基的瓶数或支数为 2:1	《中国药典》的要求可防止一些用太少的接种量和太少的培养基用量的操作,保证微生物有足够的营养生长以及对试验结果进行观察和判断
14	如果供试品使培养基浑浊,导致目视检查不能确定是否存在微生物生长,则在培养开始 14 d 后,将部分培养基(每份不少于 1 mL)转种至同种新鲜培养基中,将原始培养物和新接种的培养基继续培养不少于 4 d	如在加入供试品后或在培养过程中,培养基出现浑浊,培养 14 d 后,不能从外观上判断有无微生物生长,可取该培养液不少于 1 mL 转种至同种新鲜培养基中,将原始培养物和新接种的培养基继续培养不少于 4 d;或取培养液涂片,染色,镜检,判断是否有菌	确认培养结果时,对于目视检查不能确定是否存在微生物生长的情况,《美国药典》仅提及了转种的方式,《中国药典》提及也可涂片检测是否有菌

2.2 要求的差异

阳性对照试验:USP - NF2021 规定,在方法验证时进行阳性对照试验,常规检验仅求阴性对照试验,未明确要求进行阳性对照试验;2020 年版《中国药典(四部)》要求每批次检验时均需进行阳性对照试验。USP - NF2021 认为,通过方法适用性试验即可确认该产品无菌检查方法符合要求,后续常规检验中无须每批次进行阳性对照确认,定期进行确认即可。2020 年版《中国药典(四部)》则规定,应同时进行供试品的阳性对照试验。通过对成品每次无菌检验的阳性试验的确认,其作用相当于一次现时的、小规模的培养基灵敏度检查和方法适用性试验^[1],更有助于确认试验条件的符合性和检验结果的准确性。

方法适用性试验:USP - NF2021 要求,对于有抑菌性的供试品,冲洗不超过 5 次,试验菌不生长即认为“不污染”,认可供试品的抑菌性对试验菌的抑制作用。2020 年版《中国药典(四部)》则要求,对于有抑菌性的供试品,必须通过增加冲洗次数及

加入中和剂等方法去除供试品的抑菌性,使对应试验菌生长。USP - NF2021 认可供试品的抑菌性可抑制对应试验菌,2020 年版《中国药典(四部)》则要求去除供试品的抑菌性以确保抑菌性对潜在其他敏感菌抑制,更注重全面的无菌状态监测。这种差异可能与国内外医药工业体系的成熟度相关,2020 年版《中国药典(四部)》的要求可以更全面地监控产品真实无菌状态。

小剂量注射剂无菌检查^[14]:USP - NF2021 不要求对小剂量注射剂进行稀释,而是直接进行薄膜过滤培养。国内对小剂量注射剂的无菌检查均采用 0.9% 无菌氯化钠溶液等进行稀释后进行薄膜过滤培养。由于国外药典常规检验不进行阳性对照,每批样品冲洗到 2 个薄膜上进行培养,国内每批样品需进行阳性对照试验,每批样品需冲洗到 3 个薄膜上进行培养,为了确保每个薄膜样品的一致性,需对小剂量注射剂进行稀释,以使 3 个薄膜上的供试品具有较好的均一性,以确保阳性对照试验结果的可靠性。