

附录XIII B 无菌检查法

无菌检查法系用于检查药典要求无菌的药品、医疗器具、原料、辅料、及其他品种是否无菌的一种方法。若供试品符合无菌检查法的规定, 仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染。

无菌检查应在环境洁净度 10 000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内或隔离系统中进行, 其全过程应严格遵守无菌操作, 防止微生物污染, 防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。单向流空气区、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室(区) 悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证。隔离系统应按相关的要求进行验证, 其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。日常检验还需对试验环境进行监控。

无菌检查人员必须具备微生物专业知识, 并经过无菌技术的培训。

培养基

培养基的制备及培养条件

培养基可按以下处方制备, 亦可使用按该处方生产的符合规定的脱水培养基。配制后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。制备好的培养基应保存在 2℃~ 25℃、避光的环境, 若保存于非密闭容器中, 一般在三周内使用; 若保存于密闭容器中, 一般可在一年内使用。

1. 硫乙醇酸盐流体培养基

酪朊(胰酶水解)	15.0g	酵母浸出粉	5.0g
葡萄糖	5.0g	氯化钠	2.5g
L-胱氨酸	0.5g	新配制的 0.1% 刃天青溶液	1.0 ml
硫乙醇酸钠	0.5g	琼脂	0.75g
(或硫乙醇酸)	(0.3 ml)	水	1000 ml

除葡萄糖和刃天青溶液外, 取上述成分混合, 微温溶解, 调节 pH 为弱碱性, 煮沸, 滤清, 加入葡萄糖和刃天青溶液, 摇匀, 调节 pH 值使灭菌后为 7.1 ± 0.2 。分装至适宜的容器中, 其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层(粉红色)不超过培养基深度的 1/2。灭菌。在供试品接种前, 培养基氧化层的高度不

得超过培养基深度的 1/5，否则，须经 100℃水浴加热至粉红色消失（不超过 20 分钟），迅速冷却，只限加热一次，并防止被污染。

硫乙醇酸盐流体培养基置 30℃～35℃培养。

2. 改良马丁培养基

胨	5.0g	磷酸氢二钾	1.0g
酵母浸出粉	2.0g	硫酸镁	0.5g
葡萄糖	20.0g	水	1000 ml

除葡萄糖外，取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 值约为 6.8，煮沸，加入葡萄糖溶解后，摇匀，滤清，调节 pH 值使灭菌后为 6.4 ± 0.2 ，分装，灭菌。

改良马丁培养基置 23℃～28℃培养。

3. 选择性培养基

按上述硫乙醇酸盐流体培养基或改良马丁培养基的处方及制法，在培养基灭菌或使用前加入适宜的中和剂、灭活剂或表面活性剂，其用量同验证试验。

4. 营养肉汤培养基

胨	10.0g	氯化钠	5.0g
牛肉浸出粉	3.0g	水	1000 ml

取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 为弱碱性，煮沸，滤清，调节 pH 值使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，分装，灭菌。

5. 营养琼脂培养基

按上述营养肉汤培养基的处方及制法，加入 14.0g 琼脂，调节 pH 值使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，分装，灭菌。

6. 改良马丁琼脂培养基

按改良马丁培养基的处方及制法，加入 14.0g 琼脂，调节 pH 值使灭菌后为 6.4 ± 0.2 ，分装，灭菌。

培养基的适用性检查

无菌检查用的硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基等应符合培养基的无菌性检查及灵敏度检查的要求。本检查可在供试品的无菌检查前或与供试品的无菌检查同时进行。

无菌性检查：每批培养基随机取不少于 5 支（瓶），培养 14 天，应无菌生长。

灵敏度检查

菌种：培养基灵敏度检查所用的菌株传代次数不得超过 5 代（从菌种保存中心获得的冷冻干燥菌种为第 0 代），试验用菌种应采用适宜的菌种保存技术进行保存，以保证试验菌株的生物学特性。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)〔CMCC(B) 26 003〕

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)〔CMCC(B) 10 104〕

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)〔CMCC(B) 63 501〕

生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)〔CMCC(B) 64 941〕

白色念珠菌(*Candida albicans*)〔CMCC(F) 98 001〕

黑曲霉(*Aspergillus niger*)〔CMCC(F) 98 003〕

菌液制备 接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中或营养琼脂培养基上，接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中，30℃~35℃培养 18 小时~24 小时；接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中或改良马丁琼脂培养基上，23~28℃培养 24~48 小时，上述培养物用 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数小于 100 cfu（菌落形成单位）的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基上，23~28℃培养 5~7 天，加入 3~5ml 含 0.05%（v/v）聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05%（v/v）聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含孢子数小于 100 cfu 的孢子悬液。

菌悬液在室温下放置应在 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。

培养基接种 取每管装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 9 支，分别接种小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 3 天；取每管装量为 9ml 的改良马丁培养基 5 支，分别接种小于 100 cfu 的白色念珠菌、黑曲霉各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 5 天。逐日观察结果。

结果判定 空白对照管应无菌生长，若加菌的培养基管均生长良好，判该培养基的灵敏度检查符合规定。

稀释液、冲洗液及其制备方法

稀释液、冲洗液配制后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

1. **0.1%蛋白胨水溶液** 取蛋白胨 1.0g，加水 1000ml，微温溶解，滤清，调节 pH 值至 7.1 ± 0.2 ，分装，灭菌。

2. **pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液** 取磷酸二氢钾 3.56g，磷酸氢二钠 7.23g，氯化钠 4.30g，蛋白胨 1.0g，加水 1000ml，微温溶解，滤清，分装，灭菌。

3、根据供试品的特性，可选用其他经验证过的适宜的溶液作为稀释液、冲洗液。如需要，可在上述稀释液或冲洗液的灭菌前或灭菌后加入表面活性剂或中和剂等。

方法验证试验

当建立产品的无菌检查法时，应进行方法的验证，以证明所采用的方法适合于该产品的无菌检查。若该产品的组分或原检验条件发生改变时，检查方法应重新验证。

验证时，按“供试品的无菌检查”的规定及下列要求进行操作。对每一试验菌应逐一进行验证。

菌种及菌液制备 除大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) [CMCC(B) 4 4102] 外，金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉同培养基灵敏度检查。大肠埃希菌的菌液制备同金黄色葡萄球菌。

薄膜过滤法 取每种培养基规定接种的供试品总量按薄膜过滤法过滤，冲洗，在最后一轮的冲洗液中加入小于 100 cfu 的试验菌，过滤。取出滤膜接种至硫乙醇酸盐流体培养基或改良马丁培养基中，或将培养基加至滤筒内。另取一装有同体积培养基的容器，加入等量试验菌，作为对照。置规定温度培养 3~5 天，各试验菌同法操作。

直接接种法 取符合直接接种法培养基用量要求的硫乙醇酸盐流体培养基 8 管，分别接入小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各 2 管，取符合直接接种法培养基用量要求的改良马丁培养基 4 管，分别接入小于 100 cfu 的白色念珠菌、黑曲霉各 2 管。其中 1 管接入每支培养基规定量的供试品量，另 1 管作为对照，按规定的温度培养 3~5 天。

结果判断 与对照管比较，如含供试品各容器中的试验菌均生长良好，则说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计，照此检查方

法和检查条件进行供试品的无菌检查。如含供试品的任一容器中的试验菌生长微弱、缓慢或不生长，则说明供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用，可采用增加冲洗量、增加培养基的用量、使用中和剂或灭活剂、更换滤膜品种等方法，消除供试品的抑菌作用，并重新进行方法验证试验。

验证试验也可与供试品的无菌检查同时进行。

供试品的无菌检查

检验数量 检验数量是指一次试验所用供试品最小包装容器的数量。除另有规定外，出厂产品按表 1 规定；上市产品监督检验按表 2、表 3 规定。表 1、表 2、表 3 中最少检验数量不包括阳性对照试验的供试品用量。一般情况下，供试品无菌检查若采用薄膜过滤法，应增加 1/2 的最小检验数量作阳性对照用；若采用直接接种法，应增加供试品 1 支（或瓶）作阳性对照用。

检验量 是指一次试验所用的供试品总量（g 或 ml）。除另有规定外，每份培养基接种的供试品量按表 2、表 3 规定。若每支（瓶）供试品的装量按规定足够接种两份培养基，则应分别接种硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基。采用薄膜过滤法时，检验量应不少于直接接种法的总接种量，只要供试品特性允许，应将所有容器内的全部内容物过滤。

阳性对照 应根据供试品特性选择阳性对照菌：无抑菌作用及抗革兰阳性菌为主的供试品，以金黄色葡萄球菌为对照菌；抗革兰阴性菌为主的供试品以大肠埃希菌为对照菌；抗厌氧菌的供试品，以生孢梭菌为对照菌；抗真菌的供试品，以白色念珠菌为对照菌。阳性对照试验的菌液制备同方法验证试验，加菌量小于 100cfu，供试品用量同供试品无菌检查每份培养基接种的样品量。阳性对照管培养 48~72 小时应生长良好。

阴性对照 供试品无菌检查时，应取相应溶剂和稀释液、冲洗液同法操作，作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。

无菌试验过程中，若需使用表面活性剂、灭活剂、中和剂等试剂，应证明其有效性，且对微生物无毒性。

无菌检查法包括薄膜过滤法和直接接种法。只要供试品性状允许，应采用薄膜过滤法。供试品无菌检查所采用的检查方法和检验条件应与验证的方法相同。

操作时，用适宜的消毒液对供试品容器表面进行彻底消毒，如果供试品容器内有一定的真空度，可用适宜的无菌器材（如带有除菌过滤器的针头）向容器内导入无菌空气，再按无菌操作起开容器取出内容物。

供试品处理及接种培养基

除另有规定外，按下列方法进行。

1. 薄膜过滤法

薄膜过滤法应优先采用封闭式薄膜过滤器，也可使用一般薄膜过滤器。无菌检查用的滤膜孔径应不大于 $0.45\ \mu\text{m}$ 。直径约为 50mm。根据供试品及其溶剂的特性选择滤膜材质。抗生素供试品应选择低吸附的滤器及滤膜。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。

水溶性供试液过滤前先将少量的冲洗液过滤以润湿滤膜。油类供试品，其滤膜和过滤器在使用前应充分干燥。为发挥滤膜的最大过滤效率，应注意保持供试品溶液及冲洗液覆盖整个滤膜表面。供试液经薄膜过滤后，若需要用冲洗液冲洗滤膜，每张滤膜每次冲洗量一般为 100ml，总冲洗量不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。

水溶液供试品 取规定量，直接过滤，或混合至含适量稀释液的无菌容器内，混匀，立即过滤。如供试品具有抑菌作用或含防腐剂，须用冲洗液冲洗滤膜，冲洗次数一般不少于三次，所用的冲洗量、冲洗方法同方法验证试验。冲洗后，如用封闭式薄膜过滤器，分别将 100ml 硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基加入相应的滤筒内。如采用一般薄膜过滤器，取出滤膜，将其分成 3 等份，分别置于含 50ml 硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基容器中，其中一份做阳性对照用。

可溶于水的固体制剂供试品 取规定量，加适宜的稀释液溶解或按标签说明复溶，然后照水溶液供试品项下的方法操作。

非水溶性制剂供试品 取规定量，直接过滤；或混合溶于含聚山梨酯 80 或其他适宜乳化剂的稀释液中，充分混合，立即过滤。用含 0.1~1% 聚山梨酯 80 的冲洗液冲洗滤膜至少 3 次。滤膜于含或不含聚山梨酯 80 的培养基中培养。接种培养基照水溶液供试品项下的方法操作。

可溶于十四烷酸异丙酯的膏剂和粘性油剂供试品 取规定量，混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯^①中，剧烈振摇，使供试品充分溶解，如果需要可适当加热，但温度

不得超过 44℃，趁热迅速过滤。对仍然无法过滤的供试品，于含有适量的无菌十四烷酸异丙酯中的供试液中加入不少于 100ml 的稀释液，充分振摇萃取，静置，取下层水相作为供试液过滤。过滤后滤膜冲洗及接种培养基照非水溶性制剂供试品项下的方法操作。

无菌气（喷）雾剂供试品 取规定量，将各容器置至少-20℃的冰室冷冻约 1 小时。以无菌操作迅速在容器上端钻一小孔，释放抛射剂后再无菌开启容器，并将供试液转移至无菌容器中，然后照水溶液或非水溶性制剂供试品项下的方法操作。

装有药物的注射器供试品 取规定量，排出注射器中的内容物，若需要可吸入稀释液或标签所示的溶剂溶解，直接过滤，或混合至含适量稀释液的无菌容器内，混匀，立即过滤。然后按水溶性供试品项下方法操作。同时应采用直接接种法进行包装中所配带的无菌针头的无菌检查。

2. 直接接种法

直接接种法即取规定量供试品分别接种至各含硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基的容器中。除另有规定外，每个容器中培养基的用量应符合接种的供试品体积不得大于培养基体积的 10%，同时，硫乙醇酸盐流体培养基每管装量不少于 15ml，改良马丁培养基每管装量不少于 10ml。培养基的用量和高度同方法验证试验。

混悬液等非澄清水溶液供试品 取规定量，接种至各管培养基中。

固体制剂供试品 取规定量直接接种至各管培养基中。或加入适宜的溶剂溶解，或按标签说明复溶后，取规定量接种至各管培养基中。

非水溶性制剂供试品 取规定量，混合，加入适量的聚山梨酯 80 或其它适宜的乳化剂及稀释剂使其乳化，接种至各管培养基中。或直接接种至含聚山梨酯 80 或其它适宜乳化剂的各管培养基中。

培养及观察

上述含培养基的容器按规定的温度培养 14 天。培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。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 天后，不能从外观上判断有无微生物生长，可取该培养液适量转种至同种新鲜培养基中，

注：①无菌十四烷酸异丙酯的制备 采用薄膜过滤法过滤除菌。选用孔径为 0.22 μm 的脂溶性滤膜，在 140℃干热灭菌 2 小时。

细菌培养 2 天、真菌培养 3 天，观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。

结果判断

阳性对照管应生长良好，阴性对照管不得有菌生长。否则，试验无效。

若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，判供试品符合规定；若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，判供试品不符合规定，除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含。当符合下列至少一个条件时方可判试验结果无效：

- (1) 无菌检查试验所用的设备及环境的微生物监控结果不符合无菌检查法的要求。
- (2) 回顾无菌试验过程，发现有可能引起微生物污染的因素。
- (3) 供试品管中生长的微生物经鉴定后，确证是因无菌试验中所使用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的。

试验若经确认无效，应重试。重试时，重新取同量供试品，依法检查，若无菌生长，判供试品符合规定；若有菌生长，判供试品不符合规定。

表 1 批出厂产品最少检验数量

供试品	批产量 N (个)	接种每种培养基所需的 最少检验数量
注射剂	≤ 100	10%或 4 个（取较多者）
	$100 < N \leq 500$	10 个
	> 500	2%或 20 个（取较少者）
	大体积注射剂 (> 100 ml)	2%或 10 个（取较少者）
眼用及其他非注射产品	≤ 200	5%或 2 个（取较多者）
	> 200	10 个
桶装无菌固体原料	≤ 4	每个容器

	$4 < N \leq 50$	20%或 4 个容器（取较多者）
	> 50	2%或 10 个容器（取较多者）

注：若供试品每个容器内的装量不够接种两种培养基，那么表中的最少检验数量加倍。

表 2. 液体制剂最少检验量及上市抽验样品的最少检验数量

供试品装量 V (ml)	每支供试品接入每种培养基的最少量	供试品最少检验数量（瓶或支）
≤ 1	全量	10 ^①
$1 < V < 5$	半量	10
$5 \leq V < 20$	2ml	10
$20 \leq V < 50$	5ml	10
$50 \leq V < 100$	10ml	10
$50 \leq V < 100$ (静脉给药)	半量	10
$100 \leq V \leq 500$	半量	6
$V > 500$	500ml	6 ^①

注：① 若供试品每个容器内的装量不够接种两种培养基，那么表中的最少检验数量加倍。

表 3 固体制剂最少检验量及上市抽验样品的最少检验数量

供试品装量 M/支或瓶	每支供试品接入每种培养基的最少量	供试品最少检验数量（瓶或支）
$M < 50\text{mg}$	全量	10 ^①
$50\text{mg} \leq M < 300\text{mg}$	半量	10
$300\text{mg} \leq M < 5\text{g}$	150 mg	10

$M \geq 5g$		500 mg		10 ^②
-------------	--	--------	--	-----------------

注：① 若供试品每个容器内的装量不够接种两种培养基，那么表中的最少检验数量加倍。

② 桶装固体原料的最少检验数量为 4 个包装。