

抑菌剂效力检查法指导原则

抑菌剂效力检查法系用于测定灭菌、非灭菌制剂中抑菌剂的活性，以评价最终产品的抑菌效力，同时也可用于指导生产企业在制剂研发阶段抑菌剂的确定。

如果药物本身不具有充分的抗菌活性，那么应根据制剂特性（如水溶液制剂）添加适宜的抑菌剂，以防止制剂在正常贮藏和使用过程中可能发生的微生物污染和繁殖，尤其是多剂量包装的制剂，避免因药物微生物污染及变质而对患者造成伤害。

在药品生产过程中，抑菌剂不能用于替代药品生产的 GMP 管理，不能作为非灭菌制剂降低微生物污染的唯一途径，也不能作为控制多剂量包装制剂灭菌前的生物负载的手段。

所有抑菌剂都具有一定的毒性，制剂中抑菌剂的量应为最低有效量。同时，为保证用药安全，最终包装容器中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度。

要求具有抗菌活性的制剂（参见制剂通则），不管是添加的抑菌剂，还是药物本身具有抗菌活性，在药物研发阶段，均应确认其抗菌效力。抑菌剂的抗菌效力在贮存过程中有可能因药物的成分或包装容器等因素影响而提高或降低，因此，应验证最终容器中的抑菌剂效力在效期内不因贮藏条件而降低。

本试验方法和抑菌剂抑菌效力判断标准用于包装未启开的成品制剂。

产品分类

需要进行本试验的药品分为四类（见表 1），以便标准的制定和执行。

表 1 产品分类

类别	药品
1 类	注射剂、其他非肠道制剂，包括乳剂、耳用制剂、无菌鼻用制剂及眼用制剂
2 类	局部给药制剂、非灭菌鼻用制剂及用于黏膜的乳剂
3 类	口服非固体制剂（非抗酸制剂）
4 类	非固体抗酸制剂

培养基

培养基的制备

1. 胰酪胨大豆肉汤培养基

酪蛋白胨	17.0g	磷酸二氢钾	2.5g
大豆木瓜蛋白酶消化物	3.0 g	氯化钠	5.0g
葡萄糖	2.5g	水	1000ml

除葡萄糖外，取上述成分混合，微温溶解，调 pH 约 7.0，煮沸，加入葡萄糖溶解后，摇匀，滤清，调节 pH 使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ，分装，灭菌。

2. 胰酪胨大豆琼脂培养基

除上述胰酪胨大豆肉汤培养基的处方和制法，加入 14.0g 琼脂，调 pH 使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ，分装，灭菌。

3. 沙氏葡萄糖肉汤培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基

照微生物限度检查法（附录 XIJ）制备。

培养基的适用性检查

抑菌剂效力测定用培养基应进行培养基的适用性检查，包括成品培养基、由脱水培养基或按培养基处方配制的培养基均应检查。

菌种

试验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），并采用适宜的菌种保藏技术，以保证试验菌株的生物学特性。

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

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) (CMCC (B) 44 102)

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

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

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

菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至胰酪胨大豆肉汤培养基中， $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 小时；接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖肉汤培养基中， $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 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 含菌数为 $50 \sim 100\text{cfu}$ 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基中， $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 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 $50 \sim 100\text{cfu}$ 的孢子悬液。

适用性检查 取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌各 $50 \sim 100\text{cfu}$ ，分

别注入无菌平皿中，立即倾注胰酪胨大豆琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 30~35℃培养 48 小时，计数；取白色念珠菌、黑曲霉各 50~100cfu，分别注入无菌平皿中，立即倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 20~25℃培养 72 小时，计数；同时，用对应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

结果判定 被检培养基的菌落数与对照培养基菌落数相比大于 70%，且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致。判该培养基的适用性检查符合规定。

抑菌剂效力测定

菌种 同培养基的适用性检查，若需要，制剂中常见的污染微生物也可作为试验菌株。

菌液制备 接种铜绿假单胞菌，金黄色葡萄球菌，大肠埃希菌的新鲜培养物至胰酪胨大豆肉汤培养基或胰酪胨大豆琼脂培养基中，30~35℃培养 18~24 小时，接种白色念珠菌于沙氏葡萄糖液体培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基中，20~25℃培养 24~48 小时。若为琼脂培养物，加入适量的 0.9%无菌氯化钠溶液将琼脂表面的培养物洗脱，然后，用适宜方法吸出菌悬液至无菌试管内，加入适量的 0.9%无菌氯化钠溶液并采用比浊法制成每 1ml 含菌数约为 10^8 cfu 的菌悬液。若为液体培养物，用离心法收集菌体，并用 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗，采用比浊法制成每 1ml 含菌数约为 10^8 cfu 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂培养基中，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，用适宜方法吸出孢子悬液至无菌试管内，加入适量的含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液并采用比浊法制成每 1ml 含孢子数 10^8 cfu 的孢子悬液。同时采用平皿法测定 1ml 菌悬液的菌数。

菌悬液制备后应在 2 小时内使用，若保存在 2~8℃，可以在 24 小时内使用。黑曲霉也可制成稳定的孢子悬液保存在 2~8℃，可在一周内使用。

供试品接种 抑菌剂效力可能受试验用容器特征的影响，如容器的材质、形状、体积及封口的方式等。因此，只要供试品每个包装容器的装量足够试验用，同时容器便于按无菌操作的接入试验菌液、混合及取样等，一般应将试验菌直接接种于供试品原包装容器中进行贮存。若因供试品的性状或每个容器装量等因素需将供试品转移至无菌容器时，该容器的材质不得影响供试品的特性（如吸附作用），特别应注意不得影响供试品的 PH，PH 对抑菌剂的活性影响很大，同时容器的口径大小应便于

供试品的进出及混匀。

取包装完整的供试品至少 5 份，直接接种试验菌，或取适量供试品分别转移至 5 个适宜的无菌容器中（若试验菌株数超过 5 株，应增加相应的供试品份数），每一容器接种一个试验菌，1、2、3 类供试品中 1g 或 1ml 接种菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cfu，4 类供试品中 1g 或 1ml 接种菌量为 $10^3 \sim 10^4$ cfu，接种菌液的体积不得超过供试品体积的 0.5%~1%，充分混合，使供试品中的试验菌均匀分布。然后将接种的供试品在试验期间置 20~25℃，避光贮存，贮存温度的变化应尽可能控制在最小范围，并防止被污染。

存活菌数测定 根据产品类型，在供试品刚接种（0 时）及表 2 规定的间隔时间，分别从上述每个容器中取供试品 1ml (g)，用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 1:10、1:10²、1:10³ 等稀释级。采用平皿法或薄膜过滤法（照附录 XIJ 微生物限度检查法，其中测定细菌用胰酪胨大豆琼脂培养基，测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基）测定每份供试品中所含的菌数。由于供试品中含有抑菌活性，所以菌数测定方法应进行验证，验证方法按微生物限度检查法（附录 XIJ）中的“计数方法的验证”进行，其中测定细菌用胰酪胨大豆琼脂培养基，测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基。

根据菌数测定结果，计算 1ml (g) 供试品各试验菌所加的菌数及各间隔时间的菌数，并换算成 1g 值。

结果判断 抑菌剂效力根据各间隔时间的菌数 1g 值相对于初始值（0 时菌数 1g 值）减少程度进行评价（见表 2），试验结果按有效数字的修约规则进舍，保留一位小数点。结果符合表 2 要求可判断该产品抑菌效力符合规定。

表 2 抑菌剂抑菌效力判断标准

1 类 供 试 品	
细菌	7 天菌数下降不少于 1.0 lg，14 天菌数下降不少于 3.0 lg， 14 天到 28 天菌数不增加。
真菌	与初始值比，7、14、28 天菌数均不增加。
2 类 供 试 品	
细菌	14 天菌数下降不少于 2.0 lg，14 天到 28 天菌数不增加。
真菌	与初始值比，14、28 天菌数均不增加。
3 类 供 试 品	
细菌	14 天菌数下降不少于 1.0 lg，14 天到 28 天菌数不增加。

真菌	与初始值比，14、28 天菌数均不增加。
4 类 供 试 品	
细菌，真菌	与初始值比，14、28 天菌数均不增加。

注：表中“不增加”是指对前一个测定时间，试验菌增加的数量不超过 0.5 lg。