

附件 1121 抑菌效力检查法草案公示稿（第一次）

1 **1121 抑菌效力检查法**

2 抑菌剂是指抑制微生物生长的化学物质。抑菌效力检查法系用于测定无菌及非
3 无菌制剂的抑菌活性，用于指导药品研发阶段制剂中抑菌剂种类和浓度的确定。

4 如果药物本身不具有充分的抗菌效力，那么应根据制剂特性（如**水溶性制剂水**
5 **分活度、酸碱度或 pH 值等**）添加适宜的抑菌剂，以防止制剂在正常贮藏或使用过
6 程中由于微生物污染和繁殖，使药物变质而对使用者造成危害，尤其是多剂量包装
7 的制剂。

8 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
9 无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
10 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。
11 同时，为保证用药安全，成品制剂中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度。

12 抑菌剂的抑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
13 而变化，因此，应验证成品制剂的抑菌效力在效期内不因贮藏条件而降低。

14 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。

15 **培养基**16 **培养基的制备**

17 胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、
18 沙氏葡萄糖琼脂培养基照无菌检查法（通则 1101）制备。

19 **培养基的适用性检查**

20 **每批**抑菌效力测定用**培养基包括的**商品化的预制培养基、由脱水培养基或
21 按处方配制的培养基均应进行培养基适用性检查。

22 **菌种** 试验所用的菌株传代次数不得超过 5 代（从菌种保藏中心获得的干燥菌
23 种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌株的生物学特
24 性。培养基适用性检查的菌种及新鲜培养物的制备见表 1。

25 **表 1 培养基适用性检查、方法适用性检查、抑菌效力测定用的**
26 **试验菌及新鲜培养物制备**

试验菌株	试验培养基	培养温度	培养时间
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) (CMCC(B)26003)	胰酪大豆胨琼脂培养基或 胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (CMCC(B)10104)	胰酪大豆胨琼脂培养基或 胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
大肠埃希菌* (<i>Escherichia coli</i>) (CMCC(B) 44102)	胰酪大豆胨琼脂培养基或 胰酪大豆胨液体培养基	30~35℃	18~24 小时
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) (CMCC(F) 98001)	沙氏葡萄糖琼脂培养基或 沙氏葡萄糖液体培养基	20~25℃	48 小时
黑曲霉 (<i>Aspergillusniger</i>) (CMCC(F) 98003)	沙氏葡萄糖琼脂培养基或 沙氏葡萄糖液体培养基	20~25℃	6~10 天 5~7 天或 直到获得丰富足量 的孢子

27 *大肠埃希菌仅用于口服制剂的抑菌效力测定。

28 **菌液制备** 取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌
29 的新鲜培养物，用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液制成
30 适宜浓度的菌悬液。取黑曲霉的新鲜培养物加入适量含 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml)
31 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或含 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml) 聚
32 山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，采用适宜方法吸出孢子
33 悬液至无菌试管内，用含 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯
34 化钠-蛋白胨缓冲液或含 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化
35 钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

36 菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在
37 24 小时内使用。黑曲霉的孢子悬液可保存在 2~8℃，在验证过的贮存期内使用。

38 **适用性检查** 分别接种不大于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大
39 肠埃希菌的菌液至胰酪胨大豆琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平板，混匀，
40 凝固，置 30~35℃ 培养不超过 3 天，计数；分别接种不大于 100cfu 的白色念珠菌、
41 黑曲霉的菌液至沙氏葡萄糖琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平板，混匀，凝

42 固，置 20~25℃培养不超过 5 天，计数；同时，用对应的对照培养基替代被检培
43 养基进行上述试验。

44 **结果判定** 若被检培养基上的菌落平均数不小于对照培养基上菌落平均数的
45 50%，且菌落形态大小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
46 规定。

47 抑菌效力测定

48 **菌种** 抑菌效力测定用菌种见表 1，若需要，制剂中常见的污染微生物也可作
49 为试验菌株，**例**如含高浓度糖的口服制剂还应选用鲁氏酵母为试验菌株。

50 **菌液制备** 试验菌**新鲜**培养物制备见表 1，铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、
51 大肠埃希菌、白色念珠菌若为琼脂培养物，加入适量的 0.9%无菌氯化钠溶液将琼
52 脂表面的培养物洗脱，并将菌悬液移至无菌试管内，用 0.9%无菌氯化钠溶液稀释
53 并制成每 1ml 含菌数约为 10^8 cfu 的菌悬液；若为液体培养物，离心收集菌体，用
54 0.9%无菌氯化钠溶液稀释并制成每 1ml 含菌数约为 10^8 cfu 的菌悬液。取黑曲霉**新**
55 **鲜**培养物加入适量含 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶
56 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
57 0.05% ~~(ml/ml)~~ (g/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含孢子
58 数 10^8 cfu 的孢子悬液。测定 1ml 菌悬液中所含的菌数。必要时，试验菌的接种量
59 和接种浓度可通过浊度法评估，再通过平板计数法确认。

60 菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在 24
61 小时内使用。黑曲霉的孢子悬液可保存在 2~8℃，在 7 天内使用。

62 **供试品接种** 抑菌效力可能受试验用容器特征的影响，如容器的材质、形状、
63 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
64 容器便于按无菌操作技术接入试验菌液、混合及取样等，一般应将试验菌直接接
65 种于供试品原包装容器中进行试验。若因供试品的性状或每个容器装量等因素需
66 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)，
67 特别应注意不得影响供试品的 pH 值，pH 值对抑菌剂的活性影响很大。

68 取包装完整的供试品至少 4 份，直接接种试验菌，或取适量供试品分别转移
69 至 4 个适宜的无菌容器中，若试验菌株数超过 4 株，应增加相应的供试品份数，

70 每一容器接种一种试验菌，1g 或 1ml 供试品中接菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cfu，接种菌液
71 的体积不得超过供试品体积的 1%，充分混合，使供试品中的试验菌均匀分布，
72 然后置 20~25℃ 避光贮存。

73 **存活菌数测定** 根据产品类型，按表 2-1、表 2-2、表 2-3 规定的间隔时间，
74 分别从上述每个容器中取适量供试品，一般为 1ml(g)，测定每份供试品中所含的
75 菌数，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。
76 存活菌数测定方法及方法适用性试验照“非无菌产品微生物限度检查：微生物计
77 数法（通则 1105）”进行，每株试验菌（包括平板计数法和薄膜过滤法）应进行
78 平行测定，以算术平均值作为计数结果。方法适用性试验用菌株见表 1，菌液制
79 备同培养基适用性检查，方法适用性试验试验菌的回收率不得低于 50%。

80 如果药物的抑菌性较强，无适宜的中和剂或其它消除供试品抑菌活性的方法，
81 采用较高稀释（如 10^{-3} 或 10^{-4} ）可满足存活菌数测定方法适用性的要求，采用此
82 方法进行抑菌效力测定时，可以依据对数减少值的可接受标准，接种较高含量的
83 试验菌（如 1g 或 1ml 供试品中接菌量为 $10^7 \sim 10^8$ cfu）。

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

86 **结果判断** 供试品抑菌效力评价标准见表 2-1、表 2-2、表 2-3，表中的“减少
87 的 lg 值”是指各间隔时间测定的菌数 lg 值与 1ml(g) 供试品中接种的菌数 lg 值的
88 相差值。表中“A”是指应达到的抑菌效力标准，特殊情况下，如抑菌剂可能增加不
89 良反应的风险，则至少应达到“B”的抑菌效力标准。

90 **表 2-1 注射剂、眼用制剂、用于子宫和乳腺的制剂抑菌效力判断标准**

		减少的 lg 值				
		6h	24h	7d	14d	28d
细菌	A	2	3	-	-	NR
	B	-	1	3	-	NI
真菌	A	-	-	2	-	NI
	B	-	-	-	1	NI

91 注：NR 试验菌未恢复生长。

92 NI 未增加，是指对前一个测定时间，试验菌增加的数量不超过 0.5 lg。

93

94

表 2-2 耳用制剂、鼻用制剂、皮肤给药制剂、吸入制剂抑菌效力判断标准

		减少的 lg 值			
		2d	7d	14d	28d
细菌	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
真菌	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

95

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

96

97

表 2-3 口服制剂、口腔黏膜制剂、直肠给药制剂的抑菌效力判断标准

		减少的 lg 值	
		14d	28d
细菌		3	NI
真菌		1	NI

98

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

起草单位：陕西省食品药品检验研究院

联系电话：13649201777

1121 抑菌效力检查法修订说明

本次修订的主要内容如下：

1. 将原文“如果药物本身不具有充分的抗菌效力，那么应根据制剂特性（如水溶性制剂）添加适宜的抑菌剂”修改为“如果药物本身不具有充分的抗菌效力，那么应根据制剂特性（如水分活度、酸碱度或 pH 值等）添加适宜的抑菌剂”。修改后综合栅栏因子强调应添加抑菌剂的制剂特性，对可测量性差的栅栏因子未表述。

2. 将原文“抑菌效力测定用培养基包括商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基适用性检查”修改为“每批抑菌效力测定用的商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基适用性检查”。

3. 在原文增加“必要时，试验菌的接种量和接种浓度可通过浊度法评估，再通过平板计数法确认”，有效指导试验菌操作。

4. 在原文增加“每株试验菌（包括平板计数法和薄膜过滤法）应进行平行测定，以算术平均值作为计数结果”。强调薄膜过滤法的平行测定，保证结果的准确性。

5. 在原文增加“如果药物的抑菌性较强，无适宜的中和剂或其它消除供试品抑菌活性的方法，采用较高稀释（如 10^{-3} 或 10^{-4} ）可满足存活菌数测定方法适用性的要求，采用此方法进行抑菌效力测定时，可以依据产品对数减少值的可接受标准，接种较高含量的试验菌（如 1g 或 1ml 供试品中接菌量为 $10^7 \sim 10^8$ cfu）”，指导抑菌性较强样品的抑菌效力测定方法。

6. 其他要求及文字表述的调整：将原文“抑菌剂抑菌效力判定标准”修改为“抑菌效力判定标准”、“6~10 天或直到获得丰富的孢子”修改为“5~7 天或直到获得足量的孢子”、“黑曲霉的新鲜培养物”修改为“黑曲霉培养物”、“0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80”修改为“0.05% (g/ml) 聚山梨酯 80”、“例如”修改为“如”、“试验菌新鲜培养物制备见表 1”修改为“试验菌培养物制备见表 1”、“取供试品 1ml(g)”修改为“取适量供试品，一般为 1ml(g)”；将表 1 中黑曲霉试验用培养基“或沙氏葡萄糖液体培养基”删除。