

## 4. 非无菌含药材原粉的中药制剂的微生物限度标准见表 2。

表 2 非无菌含药材原粉的中药制剂的微生物限度标准

给药途径	需氧菌总数 (cfu/g、cfu/ml 或 cfu/10cm <sup>2</sup> )	霉菌和酵母菌总数 (cfu/g、cfu/ml 或 cfu/10cm <sup>2</sup> )	控制菌
固体口服给药制剂			
不含豆豉、神曲等发酵原粉	10 <sup>4</sup> (丸剂 3×10 <sup>4</sup> )	10 <sup>2</sup>	不得检出大肠埃希菌(1g); 不得检出沙门菌(10g); 耐胆盐革兰阴性菌应小于 10 <sup>2</sup> cfu(1g)
含豆豉、神曲等发酵原粉	10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>2</sup>	
液体及半固体口服给药制剂			
不含豆豉、神曲等发酵原粉	5×10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	不得检出大肠埃希菌(1g 或 1ml); 不得检出沙门菌(10g 或 10ml); 耐胆盐革兰阴性菌应小于 10 <sup>1</sup> cfu (1g 或 1ml)
含豆豉、神曲等发酵原粉	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	
固体局部给药制剂			
用于表皮或黏膜不完整	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(1g 或 10cm <sup>2</sup> ); 阴道、尿道给药制剂还不得检出白色念珠菌、梭菌(1g 或 10cm <sup>2</sup> )
用于表皮或黏膜完整	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	
液体及半固体局部给药制剂			
用于表皮或黏膜不完整	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(1g 或 1ml); 阴道、尿道给药制剂还不得检出白色念珠菌、梭菌(1g 或 1ml)
用于表皮或黏膜完整	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	

## 5. 非无菌药用原料及辅料的微生物限度标准见表 3。

表 3 非无菌药用原料及辅料的微生物限度标准

	需氧菌总数 (cfu/g 或 cfu/ml)	霉菌和酵母菌总数 (cfu/g 或 cfu/ml)	控制菌
药用原料及辅料	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	*

注: \* 未做统一规定。

## 6. 中药提取物及中药饮片的微生物限度标准见表 4。

表 4 中药提取物及中药饮片的微生物限度标准

	需氧菌总数 (cfu/g 或 cfu/ml)	霉菌和酵母菌总数 (cfu/g 或 cfu/ml)	控制菌
中药提取物	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	*
直接口服及 泡服饮片	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	不得检出大肠埃希菌(1g 或 1ml); 不得检出沙门菌(10g 或 10ml); 耐胆盐革兰阴性菌应小于 10 <sup>4</sup> cfu(1g 或 1ml)

注: \* 未做统一规定。

## 7. 有兼用途径的制剂

应符合各给药途径的标准。

8. 除中药饮片外, 非无菌药品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数照“非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法(通则 1105)”检查; 非无菌药品的控制菌照“非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法(通则 1106)”检查。各品种项下规定的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数标准解释如下:

10<sup>1</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 20;10<sup>2</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 200;10<sup>3</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 2000; 依此类推。

中药饮片的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数及控制菌检

查照“中药饮片微生物限度检查法”(通则 1108)检查; 各品种项下规定的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数标准解释如下:

10<sup>1</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 50;10<sup>2</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 500;10<sup>3</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 5000;10<sup>4</sup> cfu: 可接受的最大菌数为 50 000; 依此类推。

9. 本限度标准所列的控制菌对于控制某些药品的微生物质量可能并不全面, 因此, 对于原料、辅料及某些特定的制剂, 根据原辅料及其制剂的特性和用途、制剂的生产工艺等因素, 可能还需检查其他具有潜在危害的微生物。

10. 除了本限度标准所列的控制菌外, 药品中若检出其他可能具有潜在危害性的微生物, 应从以下方面进行评估。

药品的给药途径: 给药途径不同, 其危害不同;

药品的特性: 药品是否促进微生物生长, 或者药品是否有足够的抑制微生物生长能力;

药品的使用方法;

用药人群: 用药人群不同, 如新生儿、婴幼儿及体弱者, 风险可能不同;

患者使用免疫抑制剂和甾体类固醇激素等药品的情况;

存在疾病、伤残和器官损伤; 等等。

11. 当进行上述相关因素的风险评估时, 评估人员应经过微生物学和微生物数据分析等方面的专业知识培训。评估原辅料微生物质量时, 应考虑相应制剂的生产工艺、现有的检测技术及原辅料符合该标准的必要性。

## 1108 中药饮片微生物限度检查法

中药饮片微生物限度检查法用于检查中药材及中药饮片的微生物污染程度。检查项目包括需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热菌总数、耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌。本法中的耐热菌系供试液置水浴(98~100℃)30 分钟

处理后按需氧菌总数测定方法检出的微生物总称。

中药饮片微生物限度检查的试验环境应符合微生物限度检查的要求。检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染,防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。洁净空气区域、工作台面及环境应定期进行监测。

### 微生物计数

#### 培养基适用性检查和方法适用性试验

供试品微生物计数中所使用的培养基应进行适用性检查。

供试品的微生物计数方法应进行方法适用性试验,以确认所采用的方法适合于该产品的微生物计数。

若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时,计数方法应重新进行适用性试验。

#### 菌种及菌液制备

菌种 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代(从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 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性。计数培养基适用性检查 and 计数方法适用性试验用菌株见表 1。

表 1 试验菌液的制备和使用

试验菌株	试验菌液的制备	计数培养基适用性检查		计数方法适用性试验	
		需氧菌总数、耐热菌总数计数	霉菌和酵母菌总数计数	需氧菌总数、耐热菌总数计数	霉菌和酵母菌总数计数
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) [CMCC(B)26 003]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基,培养温度 30~35℃,培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu	
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) [CMCC(B)10 104]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基,培养温度 30~35℃,培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu	
枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) [CMCC(B) 63 501]	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基,培养温度 30~35℃,培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 3 天,接种量不大于 100cfu	
白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> ) [CMCC(F) 98 001]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖液体培养基,培养温度 20~25℃,培养时间 2~3 天	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> ) [CMCC(F) 98 003]	沙氏葡萄糖琼脂培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间 5~7 天,或直到获得丰富的孢子	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu

注:当需用玫瑰红钠琼脂培养基测定霉菌和酵母菌总数时,应进行培养基适用性检查,检查方法同沙氏葡萄糖琼脂培养基。

**菌液制备** 按表 1 规定程序培养各试验菌株。取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的新鲜培养物,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) 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) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后,采

用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用含 0.05% (ml/ml) 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) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

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 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。

### 培养基适用性检查

微生物计数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。

按表 1 规定,接种不大于 100cfu 的菌液至胰酪大豆琼脂培养基平板或沙氏葡萄糖琼脂培养基平板,置表 1 规定条件下培养。每一试验菌株平行制备 2 个平板。同时,用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在 0.5~2 范围内,且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致。

### 方法适用性试验

**供试液制备** 取供试品,置适量的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,或 pH7.2 磷酸盐缓冲液,或胰酪大豆胨液体培养基中使成 1:10 供试液,充分振摇荡洗(不少于 15 分钟)或用有隔均质袋处理,取其液体作为供试液。取上述 1:10 供试液适量,置水浴(98~100℃)30 分钟处理后迅速冷却,作为耐热菌总数测定用供试液。分散力较差的供试品,可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)聚山梨酯 80,使供试品分散均匀。若需要,调节供试液 pH 值至 6~8。然后用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。供试液从制备至加入检验用培养基,不得超过 1 小时。

**接种和稀释** 按表 1 规定及下列要求进行供试液的接种和稀释,制备微生物回收试验用供试液。所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%。一般选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。若供试品污染的微生物数较多,低稀释级供试液可能影响微生物回收结果,因此,应选择低微生物污染的样品或选择适宜稀释级的供试液进行方法适用性试验。

**(1) 试验组** 取上述制备好的供试液,加入试验菌液,混匀,使每 1ml 供试液加菌量不大于 100cfu。

**(2) 供试品对照组** 取制备好的供试液,以稀释液代替菌液同试验组操作。

**(3) 菌液对照组** 取相应稀释液替代供试液,按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

**供试品中微生物的回收** 计数方法适用性试验用的各试验菌应逐一进行微生物回收试验。微生物的回收一般采用平皿法。每株试验菌每种培养基至少制备 2 个平板,以算术平均值作为计数结果。

取上述“试验组”制备的供试液 1ml,置直径 90mm 的无菌平皿中,注入 15~20ml 温度不超过 45℃熔化的胰酪大豆琼脂或沙氏葡萄糖琼脂培养基,混匀,凝固,倒置培养。若使用直径较大的平皿,培养基的用量应相应增加。按规定的条件培养、计数。同法测定供试品对照组及菌液对照组菌数。计算各组平均菌落数。

**结果判断** 计数方法适用性试验中,试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值应在

0.5~2 范围内。若各试验菌的回收试验均符合要求,照所用的供试液制备方法及计数方法进行该供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数及耐热菌总数计数。若因供试品抗菌活性或溶解性较差等原因导致试验菌的回收试验不符合要求,将供试液进行进一步的稀释或采用其他适宜的方法处理,重新进行方法适用性试验。

### 供试品检查

#### 抽样量

除另有规定外,参照药材和饮片取样法(通则 0211)抽取试验样品,大包装饮片每批抽取 100~500g,混匀;独立小包装饮片按装量抽取 100~500g 的包装数。

#### 检验量

即一次试验所用的供试品量(g 或 ml)。除另有规定外,中药饮片的检验量为 25g 或 25ml。贵重品种或密度较小品种(如金银花、穿心莲、夏枯草)等可酌减,如 10g 或 10ml。

#### 供试品的检查

供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数及耐热菌总数测定一般采用平皿法。用胰酪大豆琼脂培养基测定需氧菌总数和耐热菌总数,用沙氏葡萄糖琼脂培养基测定霉菌和酵母菌总数。

**阴性对照试验** 以稀释液代替供试液进行阴性对照试验,阴性对照试验应无菌生长。如果阴性对照有菌生长,应进行偏差调查。

**供试液制备** 除另有规定外,取规定量供试品,按计数方法适用性试验确认的方法进行供试液制备,并进行 10 倍系列稀释。

**供试品检查** 按方法适用性试验确认的菌数测定方法,取上述供试品系列稀释液 2~3 级进行菌数测定,每稀释级每种培养基至少制备 2 个平板。

**培养和计数** 除另有规定外,胰酪大豆琼脂培养基平板在 30~35℃培养 3~5 天,沙氏葡萄糖琼脂培养基平板在 20~25℃培养 5~7 天,观察菌落生长情况,点计平板上生长的所有菌落数,计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后,计算各稀释级供试液的平均菌落数,按菌数报告规则报告菌数。若同稀释级两个平板的菌落数平均值不小于 15,则两个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上。

需氧菌总数是指胰酪大豆琼脂培养基上生长的总菌落数(包括真菌菌落数);霉菌和酵母菌总数是指沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的总菌落数(包括细菌菌落数)。若因沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的细菌使霉菌和酵母菌的计数结果不符合微生物限度要求,可使用含抗生素(如氯霉素、庆大霉素)的沙氏葡萄糖琼脂培养基或其他选择性培养基(如玫瑰红钠琼脂培养基)进行霉菌和酵母菌总数测定。使用选择性培养基时,应进行培养基适用性检查。

**菌数报告规则**

需氧菌总数及耐热菌测定宜选取平均菌落数小于 300cfu 的稀释级、霉菌和酵母菌总数测定宜选取平均菌落数小于 100cfu 的稀释级, 作为菌数报告的依据。取最高的平均菌落数, 计算 1g 或 1ml 供试品中所含的微生物数, 取两位有效数字报告。

如各稀释级的平板均无菌落生长, 或仅最低稀释级的平板有菌落生长, 但平均菌落数小于 1 时, 以 <1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

**控制菌检查****培养基适用性检查和方法适用性试验**

供试品控制菌检查中所使用的培养基应进行适用性检查。

供试品的控制菌检查方法应进行方法适用性试验, 以确认所采用的方法适合于该产品的控制菌检查。

若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时, 控制菌检查方法应重新进行适用性试验。

**菌种及菌液制备**

**菌种** 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代(从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 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]

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

乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi* B) [CMCC (B) 50 094]

**菌液制备** 将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、沙门菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大豆胨琼脂培养基上, 30~35℃ 培养 18~24 小时。上述培养物用 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适宜浓度的菌悬液。

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 小时内使用。

**培养基适用性检查**

控制菌检查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的适用性检查。

控制菌检查用培养基的适用性检查项目包括促生长能力、抑制能力及指示特性的检查。各培养基的检查项目及所用的菌株见表 2。

**液体培养基促生长能力检查** 分别接种不大于 100cfu 的试验菌(见表 2)于被检培养基和对照培养基中, 在相应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养, 与对照培养基管比较, 被检培养基管试验菌应生长良好。

表 2 控制菌检查用培养基的促生长能力、抑制能力和指示特性

控制菌检查	培养基	特性	试验菌株
耐胆盐革兰阴性菌	肠道菌增菌液体培养基	促生长能力 抑制能力	大肠埃希菌、铜绿假单胞菌 金黄色葡萄球菌
	紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基	促生长能力+指示特性	大肠埃希菌、铜绿假单胞菌
大肠埃希菌	麦康凯液体培养基	促生长能力 抑制能力	大肠埃希菌 金黄色葡萄球菌
	麦康凯琼脂培养基	促生长能力+指示特性	大肠埃希菌
沙门菌	RV 沙门菌增菌液体培养基	促生长能力 抑制能力	乙型副伤寒沙门菌 金黄色葡萄球菌
	木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基	促生长能力+指示特性	乙型副伤寒沙门菌
	三糖铁琼脂培养基	指示能力	乙型副伤寒沙门菌

**固体培养基促生长能力检查** 用涂布法分别接种不大于 100cfu 的试验菌(见表 2)于被检培养基和对照培养基平板上, 在相应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养, 被检培养基与对照培养基上生长的菌落大小、形态特征应一致。

**培养基抑制能力检查** 接种不少于 100cfu 的试验菌(见表 2)于被检培养基和对照培养基中, 在相应控制菌检查规定的培养温度及不小于规定的最长培养时间下培养, 试验菌应不得生长。

**培养基指示特性检查** 用涂布法分别接种不大于 100cfu 的试验菌(见表 2)于被检培养基和对照培养基平板上, 在相

应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养, 被检培养基上试验菌生长的菌落大小、形态特征、指示剂反应情况等应与对照培养基一致。

**控制菌检查方法适用性试验**

**供试液制备** 按下列“供试品检查”中的规定制备供试液。

**试验菌** 根据各品种项下微生物限度标准中规定检查的控制菌选择相应试验菌株, 确认耐胆盐革兰阴性菌检查方法时, 采用大肠埃希菌和铜绿假单胞菌为试验菌。

**适用性试验** 取规定量供试液及不大于 100cfu 的试验菌接入规定的培养基中, 依相应的控制菌检查方法, 在规

的温度和最短时间下培养,应能检出相应控制菌。

**结果判断** 上述试验若检出相应控制菌,按此供试液制备法和控制菌检查方法进行供试品检查,否则,应采用适宜的方法(如培养基稀释或薄膜过滤方法)消除供试品的抑菌活性,并重新进行方法适用性试验。

#### 供试品检查

供试品的控制菌检查应按经方法适用性试验确认的方法进行。

#### 阳性对照试验

阳性对照试验方法同供试品的控制菌检查,对照菌的加量应不大于 100cfu。阳性对照试验应检出相应的控制菌。

#### 阴性对照试验

以稀释剂代替供试液照相应控制菌检查法检查,阴性对照试验应无菌生长。如果阴性对照有菌生长,应进行偏差调查。

#### 耐胆盐革兰阴性菌(Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria)

**供试液制备和预培养** 取供试品,用胰酪大豆胨液体培养基作为稀释剂照上述“微生物计数”中“方法适用性试验”项下制成 1:10 供试液,混匀,在 20~25℃ 培养,培养时间应使供试品中的细菌充分恢复但不增殖(约 2 小时)。

**选择和分离培养** 取相当于 0.1g、0.01g 和 0.001g(或其他适宜的连续 3 级稀释液)供试品的预培养物分别接种至适宜体积(经方法适用性试验确定)的肠道菌增菌液体培养基中,供试液加入量不得超过培养基体积的 10%,30~35℃ 培养 24~48 小时。上述每一培养物分别划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 18~24 小时。

**结果判断** 若紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上有菌落生长,则对应培养管为阳性,否则为阴性。根据各培养管检查结果,从表 3 查 1g 或 1ml 供试品中含有耐胆盐革兰阴性菌的可能菌数。

表 3 耐胆盐革兰阴性菌的可能菌数(N)

各供试品量的检查结果			每 1g(或 1ml)供试品中可能的菌数 (cfu)
0.1g 或 0.1ml	0.01g 或 0.01ml	0.001g 或 0.001ml	
+	+	+	$N > 10^3$
+	+	-	$10^2 < N < 10^3$
+	-	-	$10 < N < 10^2$
-	-	-	$N < 10$

注:(1) +代表紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上有菌落生长,-代表紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上无菌落生长。

(2) 若供试品量减少 10 倍(如 0.01g 或 0.01ml, 0.001g 或 0.001ml, 0.0001g 或 0.0001ml),则每 1g 供试品中可能的菌数(N)应相应增加 10 倍。

#### 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)

**供试液制备和增菌培养** 取供试品,照上述“微生物

计数”中“方法适用性试验”项下制成 1:10 供试液。取相当于 1g 供试品的供试液,接种至适宜体积(经方法适用性试验确定)的胰酪大豆胨液体培养基中,供试液加入量不超过培养基体积的 10%,混匀,30~35℃ 培养 18~24 小时。

**选择和分离培养** 取上述培养物 1ml 接种至 100ml 麦康凯液体培养基中,42~44℃ 培养 24~48 小时。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 18~72 小时。

**结果判断** 若麦康凯琼脂培养基平板上有菌落生长,应进行分离、纯化及适宜的鉴定试验,确证是否为大肠埃希菌;若麦康凯琼脂培养基平板上没有菌落生长,或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性,判供试品未检出大肠埃希菌。

#### 沙门菌(*Salmonella*)

**供试液制备和增菌培养** 取 10g 供试品直接或处理后接种至适宜体积(经方法适用性试验确定)的胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,30~35℃ 培养 18~24 小时。

**选择和分离培养** 取上述培养物 0.1ml 接种至 10ml RV 沙门菌增菌液体培养基中,30~35℃ 培养 18~24 小时。取少量 RV 沙门菌增菌液体培养物划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 18~48 小时。

沙门菌在木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上生长良好,菌落为淡红色或无色、透明或半透明、中心有或无黑色。用接种针挑选疑似菌落于三糖铁琼脂培养基高层斜面上进行斜面和高层穿刺接种,培养 18~24 小时,或采用其他适宜方法进一步鉴定。

**结果判断** 若木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上有疑似菌落生长,且三糖铁琼脂培养基的斜面为红色、底层为黄色,或斜面黄色、底层黄色或黑色,应进一步进行适宜的鉴定试验,确证是否为沙门菌。如果平板上没有菌落生长,或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性,或三糖铁琼脂培养基的斜面未见红色、底层未见黄色;或斜面黄色、底层未见黄色或黑色,判供试品未检出沙门菌。

#### 结果判断

各品种项下规定的微生物限度标准解释如下:

$10^1$  cfu: 可接受的最大菌数为 50;

$10^2$  cfu: 可接受的最大菌数为 500;

$10^3$  cfu: 可接受的最大菌数为 5000;

$10^4$  cfu: 可接受的最大菌数为 50 000; 依此类推。

供试品检出控制菌或其他致病菌时,按一次检出结果为准,不再复试。

若供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热菌总数、控制菌检查结果均符合该品种项下的规定,判供试品符合规定;若其中任何一项不符合该品种项下的规定,判供试品不符合规定。

### 稀释液、培养基及制备方法

见非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法(通则 1106)。

## 1121 抑菌效力检查法

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。

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(如水性制剂)添加适宜的抑菌剂，以防止制剂在正常贮藏或使用过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，尤其是多剂量包装的制剂。

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，成品制剂中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度。

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。

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。

### 培养基

#### 培养基的制备

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、沙氏葡萄糖琼脂培养基照无菌检查法(通则 1101)制备。

#### 培养基的适用性检查

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的适用性检查。

**菌种** 试验所用的菌株传代次数不得超过 5 代(从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 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性。培养基适用性检查的菌种及新鲜培养物的制备见表 1。

表 1 培养基适用性检查、方法适用性试验、抑菌效力测定用的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)26 003〕	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)10 104〕	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)44 102〕	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)98 001〕	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>Aspergillus niger</i> ) 〔CMCC(F)98 003〕	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 天或直到获得丰富的孢子

注：\* 大肠埃希菌仅用于口服制剂的抑菌效力测定。

**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) 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) 聚山梨酯 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悬液至无菌试管内，用含 0.05% (ml/ml) 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) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

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 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。

**适用性检查** 分别接种不大于 10cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌的菌液至胰酪大豆胨琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平板，混匀，凝固，置