

药品微生物经典分析方法的验证探讨

安春艳, 井良义, 陈卓, 刘文杰, 牛振东*

(北京市药品检验研究院 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: 本文通过研读分析药品、食品和环境微生物分析方法验证的相关规范性文件, 结合药品微生物分析实践, 对药品微生物经典分析方法的验证进行了研究, 总结了微生物分析方法验证的考察指标, 包括专属性、灵敏度、精密度、检测限和定量限、线性、范围、耐用性及方法适用性等, 并阐述了各指标在药品微生物分析中的含义、测量方法、影响因素和可接受标准。为规范经典微生物分析方法的验证, 获得可靠的微生物检验结果及建立相关指导原则, 提供了参考依据。

关键词: 药品质量控制; 分析方法验证; 经典微生物分析方法; 定量分析方法; 定性分析方法

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2023)02-0000-00

doi: 10.19778/j.chp.2023.02.00

Medicine conventional microbiological method validation

AN Chunyan, JING Liangyi, CHEN Zhuo, LIU Wenjie, NIU Zhendong*

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

Abstract: Based on the interpretation and analysis of the standard documents on microbiological method validation used in medicines, foods, and environment, the medicine conventional microbiological method validation was focused on combining with the practical experience of medicine microbiological analysis. Herein, we summarized the critical characteristics in the medicine conventional microbiological method validation, including specificity, sensitivity, precision, limit of detection, limit of quantification, linearity and range, robustness, and suitability. The definitions, measurements, affecting factors, and acceptable standards of the characteristics were elaborated. This study provided a reference for standardizing conventional microbiological method validation, obtaining reliable analytical results, and establishing the relative guiding principle.

Key words: medicine quality control; analytical method validation; conventional microbiological method; quantitative method; qualitative method

药品的微生物分析是质量控制的重要环节。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020年版规定药品的微生物分析可以使用基于培养的微生物分析方法(经典方法)或替代方法。经典方

法一般指通过在特定培养条件(培养基、时间、温度等)下使药品中的微生物生长,并利用微生物的特性(菌落形态、产酸、产气等)进行定性或定量分析的方法。替代方法指经典方法以外的微生物分

改为: 药师

第一作者简介: 安春艳, 助理研究员; 研究方向: 微生物药物。Tel: 010-52779661, E-mail: anyanchina@foxmail.com

* 通讯作者简介: 牛振东, 副主任药师; 研究方向: 药品微生物。Tel: 010-52779661; E-mail: dividniu@163.com

析方法,一般是将微生物的数量与其生物或物理化学性质(如微生物的免疫原性、核酸或蛋白、产气或产酸等)关联并转换为某种特定信号(如荧光值、压力值、酸度等),从而对药品中的微生物进行定性或定量分析的方法。《中国药典》2020年版中涉及经典方法的有三部“微生态活菌制品总论”中的活菌数测定和杂菌检查,四部通则1101“无菌检查法”、通则1105“非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法”、通则1106“非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法”、通则1107“非无菌药品微生物限度标准”、通则1108“中药饮片微生物限度检查法”等;涉及替代方法的是《中国药典》2020年版四部通则9021“药品微生物检验替代方法验证指导原则”。

在药品研发和生产过程中,实验室在建立药品的微生物分析方法的标准、变更药品生产工艺或制剂组分、修订原微生物分析方法时,都需要进行微生物分析方法的验证。其目的是证明所采用的微生物分析方法适合于相应产品,从而保证产品质量的可控性和一致性,同时证明该实验室对分析方法具备检验能力^[1]。确立分析方法验证的考察指标也是分析方法确认和转移的基础^[2]。国内外药品检验相关机构均就分析方法的验证在各自的技术文件中做了相应的阐释和规定,但这些指导原则均明确指出,其适用范围仅限于化学分析方法和生物制品的理化分析方法,不适用于药品微生物分析方法。随着我国药品生产规模的扩大和生产能力提高,以及药品微生物检验的理念和技术的进步,利用经典方法进行药典中没有明确指出、但存在严重危害性的微生物(如洋葱伯克霍尔德菌群、罗尔斯通菌等)的检验分析成为新的需求,并在将来可能建立相关标准^[3]。针对某些“不可接受微生物(Objectionable microorganisms)”而建立的新的经典微生物分析方法,必须经过验证才能得到认可或建立标准。如何进行经典微生物分析方法的验证,如考察指标和可接受标准是什么,目前国内外药典中均缺少明确的指导性规范。因此,在对国内外的药品分析方法验证、药品微生物分析方法验证、食品微生物和环境微生物分析方法验证的相关规范进行研究的基础上,结合药品微生物检验的实践特点,本文浅析药品微生物分析方法验证的考察指标的含义、测量方法和可接受标准,供药品微生物工作者探讨,以期对相关指导原则的建立提供一点参考。

1 分析方法验证的研究进展

1.1 分析方法验证的法规和指导原则

分析方法验证(Validation)及其相关的确认(Verification)和转移(Transfer)的有关概念及内涵已经在文献中有详细的辨析^[1,4,5],国内外多个组织也出台了相应的指导性文件。应用较广泛的文件包括:国际标准组织(International Organization for Standardization, ISO)17025:2017中7.2节“方法的选择、确认和验证”^[6],国际人用药品注册技术协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)Q2(R1)文件“分析方法的验证:正文和方法学——企业指导原则”^[7],世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的“关于验证的指导方针——附录4 分析方法验证”^[8],(美国)注射药协会(Parenteral Drug Association, PDA)第57号技术报告(TR 57)“生物技术产品的分析方法验证与转移”^[9],欧洲药品质量控制实验室联盟(European Official Medicine Control Laboratories Network, OMCL)的PA/PH/OMCL(13)82 2R文件“分析规程的验证”^[10],美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)的企业指导方针“验证过程:通用原则和实践(Process validation: general principles and practices)”^[11],“药品和生物制品分析规程和方法的验证(Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics)”^[12],及“生物分析方法验证(Bioanalytical method validation)”^[13]等。国际上几部重要药典也对分析方法验证做了规定:《中国药典》2020年版四部通则9101“分析方法验证指导原则”,美国药典(U. S. Pharmacopeia, USP)2022年版的附录1225“药典规程的验证(Validation of compendial procedures)”,日本药典(Japanese Pharmacopeia, JP)18版通则G1“物理和化学”项下“分析规程的验证(Validation of analytical procedures)”,而欧洲药典(European Pharmacopeia, EP)10.8版则把验证包含在具体方法的章节中。上述技术文献包含了分析方法验证需考察的技术指标及相应的执行方法和可接受标准。由于微生物分析方法受到的干扰因素多、与理化分析方法具有显著区别,因此这些文件均指出其不适用于药品微生物分析方法。

1.2 微生物分析方法验证的现状

关于药品微生物分析方法的验证,目前仅有原则性指导文件和关于替代方法的指导原则。WHO

2011年发布的第961号技术报告附录2“WHO药品微生物实验室管理规范(WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories)”指出,非药典或其他法定方法应在使用前进行验证,指标包括准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性和耐用性^[15]。《中国药典》2020年版通则9203“药品微生物实验室质量管理指导原则”规定,如果检验方法不是标准中规定的方法,使用前应进行替代方法的验证,确认其应用效果优于或等同于标准方法。这些文件概括地规定了何时进行微生物分析方法的验证及所需考察指标。微生物分析的替代方法与理化分析方法有相似之处,都是建立被检物与测量值之间的关系^[15]。《中国药典》2020年版通则9201, USP 2022年版附录1223“微生物学替代方法的验证(Validation of alternative microbiological methods)”, EP 10.8版2.6.7“支原体(Mycoplasmas)”中的核酸扩增方法(Nuclei acid amplification technology, NAT)的验证, JP18通则G4“快速分析方法(Rapid Microbial Methods)”的验证(Validation)等内容给出了微生物替代方法验证的指标。这些指标与理化分析方法的验证指标相似,包括专属性、重复性和耐用性等,但含义区别很大。替代方法验证考察的许多指标都是与经典方法同时进行测试,如《中国药典》2020年版通则9201规定进行准确度考察时,要求替代方法的结果不得少于药典方法检验结果的70%,或表明替代方法的回收率至少与药典方法一致。可见,经典方法也要进行方法验证指标的考察,只是目前仅体现在与替代方法进行比较时,未单独提出。

食品微生物和环境微生物的分析方法验证为药品微生物提供了重要参考。美国分析化学家协会(Association of Analytical Chemists, AOAC)研究的微生物包括环境(如卫生设备、水等)、消毒剂、化妆品和食品(奶制品和非奶制品)微生物等,该机构在2007年发布了《如何达到ISO 17025对方法确认的要求》,给出了微生物学方法验证的考察指标,包括:相对准确度(Relative accuracy)、基质效应(Matrix effects)、精确度(Precision)、选择性(Selectivity)、专属性(Specificity)、包容性(Inclusivity)、排他性(Exclusivity)、假阳性率(False-positive rate)、假阴性率(False-negative rate)、检测限(Limit of detection, LOD)、定量限(Limit of quantification, LOQ)、耐用性(Ruggedness)、和线性/范围(Linearity / Range),但并未给出具体指标的含义和验证方法^[16]。FDA在2015年“食品和饲料中病原微生物

检测分析方法的验证指导原则(第2版)(Guidelines for the validation of analytical methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds, 2nd Edition)”的2.0节“FDA所开发方法的验证标准和指导原则(Criteria and guidance for the validation of FDA-developed methods)”中,提出了针对基于微生物培养的分析方法的验证应包括包含性(Inclusivity)或灵敏度(Sensitivity),以及排他性(Exclusivity)或专属性(Specificity)等^[17]。美国环境保护局(U. S. Environmental Protection Agency, EPA)在2016年发布的“EPA方法验证:微生物分析方法(Method validation of U. S. EPA microbiological methods of analysis)”中,提出针对环境微生物检验方法的验证指标,包括专属性和灵敏度(Specificity and sensitivity),精确度(Precision),准确度和偏差(Accuracy and bias),检测限(Limit of detection),线性(Linearity)等^[18]。ISO 16140“食物链的微生物学方法——方法验证(Microbiology of the food chain — Method validation)”用一系列文件(6个)规定了微生物替代方法替代参照方法(Reference method)时的具体实施规程,包括如何在实验室内部和实验室间实施替代方法的验证^[19-23]。这些文件为研究药品微生物分析方法验证提供了很有价值的参考。

2 药品微生物分析方法的验证

药品微生物分析方法验证是建立或修订一种分析方法时,方法建立实验室为确立特定用途下方法实施的限制条件而进行的工作。实施该方法之前需要首先做分析方法的验证,目的是证明方法适合特定检测目的和要求、实验室具有实施方法的能力及获得的结果具有可靠性和一致性^[1]。分析方法的验证通常要求两个层次,一是在单个实验室(多为建立方法的实验室)中的验证,二是多个实验室间的协同研究,本文主要指第一层次^[18]。微生物分析方法验证要考察哪些指标需根据方法的性质和用途来确定,如用途是定性分析还是定量分析,方法类型是基于培养法还是基于显微观察/分子生物学/化学方法等。不同分析方法用到的方法验证指标可能不同,指标所代表的含义也有区别。本文参考环境和食品微生物分析方法验证以及药品微生物替代方法的验证指导原则,对药品微生物经典分析方法验证的考察指标、操作方法和可接受标准进行探讨,概括为表1。

2.1 专属性

专属性(Specificity)指分析方法能将目标微生物

物从与之相似的微生物中选择出来的能力。对于药品微生物检验的定性和定量分析,方法的专属性是检出样品中特定微生物(如控制菌或特定有害微生物、微生物活菌制剂中的细菌、需氧菌、霉菌与/或酵母菌等)的能力。专属性可通过培养基的促生长试验、抑制试验和指示特性来考察,要求对目标菌有特异性或选择性。除了药典规定的菌株,还应选择多个具有相似特性的参考菌株作为考察对象,以确定分析方法的专属性。

专属性用数学式表示为:专属性 = $TN / (TN + FP)$ [18]。其中 TN 代表真阴性(True negative)结果的数目,FP 代表假阳性(False positive)结果的数目 [18]。“真阴性”指非目标菌株被分析方法认为是非目标菌株,“假阳性”代表非目标菌株被分析方法误认为是目标菌株。专属性受到培养基的选择性、微生物的种类、培养条件(温度、通风、光照等)等因素影响。

专属性的测量,可用多种干扰微生物(非目标菌株)和空白组与目标微生物同时分析,要求分析方法对目标微生物的选择性高、与其他微生物区分度大。干扰微生物的选择和数量,目前无相关技术标准参考,但通过相关研究,作者认为宜包括与目标微生物具有相似特性或相近种属的微生物及不相似的微生物,数目各 5 种或更多(有待探讨) [24]。

2.2 灵敏度

灵敏度(Sensitivity)是衡量理化仪器或分析方法的一个参数,一般指随着被检物含量的变化产生可被检测到的响应值的变化程度。Andrews WH [25] 和 De Smedt JM [26] 等学者认为,微生物分析方法的灵敏度是阳性样品能被正确检出的比例,用数学式表示为:灵敏度 = $TP / (TP + FN)$ 。其中 TP 代表真阳性(True positive)结果的数目,FN 代表假阴性(False negative)结果的数目 [18]。“真阳性”指目标微生物被分析方法认为是目标微生物,“假阴性”代表目标微生物被分析方法误认为非目标微生物。这一解释为美国环保局在 2016 年发布的“EPA 方法验证:微生物分析方法(Method validation of U. S. EPA microbiological methods of analysis)”中沿用 [18]。从这一解释的内涵看,更适用于微生物的定性分析。从药品微生物检验的实践来看,在没有药品存在时,分析方法灵敏度主要受微生物自身性质及培养条件影响,如《中国药典》2020 年版四部通则 1001“无菌检查法”中要求进行培养基灵敏度检查。灵敏度的测量,可用同一方法检测目标微生物(阳性),重复 10 次,计算 TP 所占比例。

2.3 准确度和偏差

准确度(Accuracy)指测量结果与真实值之间的接近程度,真实值可以用已知的、可接受的参比值代替;偏差(Bias)指测量结果与参比值之间的差异。准确度用于一组测量结果时,是随机因素(随机误差)和偏倚因素(总的系统误差)的综合体现。微生物定量分析方法的准确度指与参比微生物相比,待测微生物的回收率可满足要求。准确度的测量可通过加入内部对照组、增敏等方法测量,如可参照《中国药典》2020 年版四部通则 1105 中方法适用性试验进行。有文献认为准确度和偏差也与微生物定性分析相关 [18],但鉴于经典的微生物定性分析(检测)方法缺少可定量表示的“真实值”和“测量结果”,也难以衡量误差大小,故在微生物定性分析方法验证中暂不建议进行准确度和偏差的考察。

2.4 精密度

精密度(Precision)指在规定测试条件下,同一份均匀样品多次取样测试结果之间的接近程度,分为重复性和重现性。对于经典微生物分析方法,测量精密度的前提是认为微生物在充分混匀的培养基上随机分布,符合泊松分布。精密度分为四个水平:实验室内重复性、实验室内重现性、实验室间重复性、实验室间重现性,在第一层次的分析方法验证时通常考察前两个水平。若设实验室内验证的精密度为 S_r ,实验室间协同研究的精密度为 S_L ,则总的精密度 S_R 表示为 $S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$ [27]。微生物分析方法的精密度,反映了偶然误差和系统误差的联合影响,如操作误差(取样、稀释、转接等)、仪器偏差和随机误差等。精密度通常用偏差(Deviation)、标准偏差(Standard deviation, SD)、相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)或置信区间(Confidence interval, CI)等数值表示。

重复性(Repeatability)是指在重复性条件(同一个分析人员,同一份均匀样品,在同一实验室,使用同样的方法和仪器,较短的时间间隔,多次取样和测定)下,所测得结果之间的接近程度。重复性的测量,可在重复性条件下至少重复 5 次试验,统计结果之间的接近程度,可用重复性标准差(s_r)或相对标准偏差(RSD_r)表示。由于《中国药典》2020 年版通则 1431“生物检定统计法”并未给出适用于微生物定量检查的统计学方法,可借鉴 AOAC 关于食品微生物和环境微生物方法验证的指导原则中的统计学方法 [27-29],将微生物数目进行对数转换,用 Bessel 公式计算得到 s_r ,用平均值除 s_r 得到 RSD_r 。重现性

(Reproducibility) 指在重现性条件(实验地点、实验人员、仪器或试剂的批次等发生变化)下,对同一份均质样品所测得结果之间的接近程度。重现性的测试方法与重复性类似,至少重复取样 5 次。由于微生物分散性各有差异,微生物定量分析方法精密度的可接受范围可设置较理化分析方法更宽松的标

准,如 RSD 值 0-35%,针对特定微生物的标准可由方法建立者通过实验确立。药品微生物的定性分析方法虽不像定量分析方法那样对精密度有准确的量值范围要求,但要求在重复性和重现性条件下进行微生物检验时得到的结论一致,即“能”或“不能”检出特定微生物(表 1)。

表 1 基于培养的微生物经典分析方法的验证指标

Tab. 1 Performance characteristics in the conventional culture-based microbiological method validation

验证指标	含义	影响因素	测量方法	可接受标准	适用范围
专属性	检出样品中可能存在的特定微生物的能力	培养基选择性、微生物的种类、培养条件(温度、通风、光照等)	用多种干扰微生物(非目标菌株)和空白组与目标微生物同时检测	对目标微生物有选择性	定性分析 定量分析
灵敏度	阳性样品能被正确检出的比例,用数学式表示为:灵敏度 = TP/(TP + FN)	微生物种类、样品溶解程度、样品抗菌性	用同一方法检测目标微生物(阳性)及干扰微生物(阴性)	目标微生物能被检出	定性分析
准确度和偏差	准确度指测量结果与真实值之间的接近程度,真实值可以用已知的、可接受的参比值代替;偏差指测试结果与参比值之间的差异	随机误差、系统误差	定量:内部对照组、增敏法等,回收率可参照 ChP 2020 四部通则 1005 中方法适用性	定量:与参比微生物相比,待测微生物回收率满足要求	定量分析
检测限和定量限	微生物在规定的实验条件下能被分析方法可靠地检测或定量的最小量	微生物种类、培养基、检测方法	对于菌体或其孢子能在一定溶剂中均匀分散的微生物,可将较浓菌液进行多水平稀释后测量,也可采用其他合理方法,在保证方法重复性和重现性时,确定 LOD 和 LOQ	由方法建立者判断	定性分析(LOD) 定量分析(LOQ)
线性和范围	线性是一定范围内,分析方法获得与微生物含量成比例的检测结果的能力。范围指满足线性相关性的微生物的最大和最小含量之间的区间,在此区间内的检测结果满足一定的精密度和准确度要求	微生物性质、稀释方法、基质	利用已知种类和含量的微生物,测试至少 5 个水平的检测结果,每个水平重复 3 次,建立标准曲线,由标准曲线来估测待检样品中微生物数量	定性:在一定范围内取得可信结果 定量: $r > 0.9$ 或由方法建立者判断	定性分析 定量分析
精密度	规定测试条件下,同一份均匀样品多次取样测试结果之间的接近程度	偶然误差、系统误差	偏差、标准偏差、相对标准偏差、或置信区间		
重复性	在重复性条件(同一个分析人员,同一份均匀样品,在同一实验室,使用同样的方法和仪器,较短的时间间隔,多次取样和测定)下,所测得微生物数量之间的接近程度	操作误差(取样、稀释、转接等)、随机误差	在重复性条件下,至少重复 5 次取样和测定,统计计数结果之间的接近程度,可用重复性标准差表示	定性:各次试验结论一致; 定量:一般 RSD_p 0 ~ 35%,或由方法建立者判断	定性分析 定量分析
重现性	相同的样品在重现性条件(实验地点、实验人员、仪器、试剂的批次等发生变化)下,所测得微生物数量之间的接近程度	操作误差(取样、稀释、转接等)、仪器偏差、随机误差	在重现性条件下,至少重复 5 次取样和测定,统计计数结果之间的接近程度,可用重复性标准差表示	定性:各次试验结论一致; 定量:一般 RSD_R 0 ~ 35%,或由方法建立者判断	定性分析 定量分析
耐用性	当方法参数有小的刻意变化时,检验结果不受影响的能力,为方法正常使用时的可靠性提供依据	培养基品牌和批次、稀释方法、注血体积、培养温度和时间	定性分析方法:刻意改变环境或操作条件,与未改变前的结果进行对比 定量分析方法:选择可能明显影响结果的方法参数,改变参数进行试验	定性:各次试验结论一致; 定量:经试验,方法参数小的变动应不影响方法适用性,具体标准或由方法建立者判断	定性分析 定量分析
方法适用性	证明所建立的方法适用于特定样品,包括培养基适用性和方法适用性	样品抗菌性、样品性状、微生物种类、培养基	定性:样品存在时能检出目标微生物 定量:回收率或置信区间满足要求	定性:所建立的方法能检出目标微生物; 定量:回收率或置信区间满足要求	定性分析 定量分析

编辑老师:此处有文字重叠

精密度

重复性

重现性

“重复性”和“重现性”应缩进2字符,因这两者并列,但都是“精密度”的下位概念

2.5 检测限和定量限

检测限(Limit of detection, LOD)是微生物在规

定的实验条件下能被分析方法检测到的最小数量,适用于定性分析方法;定量限(Limit of quantifica-

tion, LOQ)是微生物能被分析方法可靠地定量检测到的最小数量,适用于定量分析方法。两者虽都是“最小数量”,但区别在于,LOQ 还应满足一定的精密度和准确度的要求。基于培养的微生物经典分析方法,理论上在合适的条件下能检测到样品中所含的低至1个微生物的数量。对于菌体或其孢子能在一定溶剂中均匀分散的微生物,可以将较浓菌液进行多水平稀释后测量,亦可采用其他合理方法,在保证方法重复性和重现性时,确定 LOD 和 LOQ。由方法建立者针对具体微生物而确立合理的可接受标准。

2.6 线性和范围

线性(Linearity)是在一定范围内,分析方法获得与微生物含量成比例的检测结果的能力。范围(Range)指满足线性相关性时微生物最大和最小量之间的区间,在此区间内的检测结果满足一定的精密度和准确度要求。如在液体培养基中分散均匀的细菌数目(\lg 值)与吸光值 OD_{600} ,在对数生长期的一定范围内接近线性相关。考察时,可利用已知种类和含量的微生物,测试至少5个连续稀释水平、每个水平重复3次,建立标准曲线,由标准曲线来计算待检样品中的微生物数量,可以用相关系数 r 和置信区间来衡量可信度或不确定度。

2.7 耐用性

耐用性(Robustness)是指当分析方法的参数有小的刻意变化时,检验结果不受影响的能力,为方法正常使用时的可靠性提供依据。在药品微生物分析方法建立后,应首先进行该指标的验证。分析方法参数包括:取样方法、培养基、中和剂、稀释方法、注皿体积、膜法的冲洗次数、培养温度和时间等。对于微生物定性分析方法,改变参数后的测试结果不改变结论(如控制菌的“有”或“无”)为可接受。对于微生物定量分析方法,选择可能明显影响结果的方法参数,改变参数进行试验,例如试验至少5个菌液浓度,每个浓度至少5个重复,计算每个浓度下计数结果的 s_r 或 RSD_r 。经试验,方法参数小的变动应不影响方法适用性,具体标准由方法建立者判断。

2.8 方法适用性

在《中国药典》2020年版四部通则1101、1105和1106中,方法适用性(Method suitability)是在检查药品微生物之前必须实施的步骤,也是证明方法有效性的最重要指标。完整的药品微生物分析方法,必须建立在药品存在的环境中,药品的性质(剂

型、溶解度、抑菌性等)直接影响着对其中微生物的分析。因此,经典的药品微生物分析方法不同于理化分析方法,在其他指标考察的基础上,必须进行方法适用性考察。对微生物定性分析方法,方法适用性可测试该方法能否检出目标微生物;对微生物定量分析方法,方法适用性可检查目标微生物的回收率或置信区间是否满足要求。必要时,还应进行培养基适用性检查。

3 讨论

3.1 药品微生物经典分析方法的其它限制因素

在实验室内部进行分析方法验证时,除了前述指标(表1),还应考虑其他可能影响检测结果的因素。例如,样品存放时间、保存条件、标准参照物等条件,条件各异的样品也应按前述精密度、偏差或回收率等方法进行测试,目的是保证这些因素在一定置信水平对检测结果无明显影响,即当因素在一定范围内变化时的检测结果与新鲜样品的检测结果差异不显著^[18]。此外,还应考虑样品基质对检测结果的影响,在考察参比微生物的相关指标时,最好采用与实际样品一致的基质,或采用内标法测试基质对结果的影响后确定方案。进行验证的指标,可由方法建立人员提出和验证,并将验证过的因素及结果记录到微生物分析方法验证报告。通过这些措施,保证微生物分析方法验证的质量。

3.2 药品微生物分析方法的独特性

与物理化学分析方法相比,微生物分析方法,特别是基于培养的经典微生物分析方法具有一定特殊性。药品微生物是生命体,其活力受到药品成分的直接影响。经典方法也具有一定的局限性,即不可能检测到药品中的所有微生物,而仅仅是在经过验证的分析方法下能存活并生长的微生物,那些死亡、受损严重或在当前条件下无法生存的微生物无法检出。又如,定量分析采用的微生物计数法是一种接近于绝对定量的方法,虽然可以通过设计试验获得 LOD 和 LOQ,但其可接受标准无法像化学品分析一样规定确定的数值(如高效液相色谱法的信噪比在定性分析中大于3,在定量分析中大于10)。

药品微生物分析方法的独特性还体现在,微生物的生长容易受到多种因素影响,任何一种限制因素都可能引起检测结果的变化。这些因素包括药品的性质(如剂型和成分)、环境因素(如水分、通氧量、温度)、样品处理(如震荡、中和剂、溶剂)、及微

生物自身特性(如代谢和繁殖特性)等。因此,基于培养的经典微生物分析方法的验证面临更多限制因素,增加了难度。

3.3 建立药品微生物经典分析方法验证指导原则的必要性

药品微生物经典分析方法在药品生产企业、药品注册和药品检验机构进行药品微生物检验时广泛应用。值得关注的是,应进行检查并加以控制的微生物范围并不仅限于目前药典中明确给出的控制菌。《中国药典》2020年版四部通则1007“非无菌药品微生物限度标准”指出,“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,可能还需检查其他具有潜在危害的微生物。应当…进行评估”;通则9202“非无菌产品微生物限度检查指导原则”中指出,“无毒性确认试验的菌株不能仅局限于验证试验菌株,而应当包括产品中可能污染的微生物”,“药用原料、辅料及中药提取物…还需控制具有潜在危害的致病菌”;USP 2022年版通则1115“非无菌药品中的生物负载控制(Bioburden control of nonsterile drug substances and products)”中提到,“药品企业有责任确定分离微生物是否为不可接受。一般来说,不可接受微生物是通过给药途径能够致病的微生物”。这些有害微生物的分析需要建立相应的分析方法,但目前尚无对新建立的方法进行方法学验证的指导原则,亟需出台药品微生物分析方法验证的规范性文件。

综上所述,本文结合食品和环境微生物分析方法的验证,对经典药品微生物分析方法验证指标进行了阐述,不仅为微生物检验实践和相关标准的建立提供参考,也为经典微生物分析方法的确认和转移奠定了理论基础。同时,这些介绍主要是基于文献法,还需要典型的案例研究数据来对这些指标进行验证和校正。相信随着药品微生物分析方法验证这一课题受到越来越多使用者和学者的关注,会建立更完善的指导规范。

参考文献

- [1] 许明哲,黄宝斌,杨青云,等. 分析方法验证、转移和确认概念解析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 169
XU MZ, HUANG BB, YANG QY, *et al.* Elaboration on the concepts of analytical method validation, transfer and verification [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(1):169
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 478
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020: 478
- [3] 王似锦,余萌,王杠杠,等. 非无菌药品中不可接受微生物的控制与风险评估[J]. 中国药事. 2020, 34(9): 1028
WANG SJ, YU M, WANG GG, *et al.* Control and risk assessment of objectionable microorganisms in non-sterile medicines [J]. *Chin Pharm Aff*, 2020, 34(9):1028
- [4] 许明哲,黄宝斌,杨青云,等. 分析方法转移内容介绍[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 176
XU MZ, HUANG BB, YANG QY, *et al.* Introduction to the concept and content of analytical method transfer [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(1):176
- [5] 许明哲,黄宝斌,杨青云,等. 分析方法确认内容介绍[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 183
XU MZ, HUANG BB, YANG QY, *et al.* Analytical method verification in China OMCLs [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(1):183
- [6] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. [S]. 2017
- [7] ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology guidance for industry [S]. 2005
- [8] WHO Working document QAS/16.671 Guidelines on validation - appendix 4 Analytical method validation [S]. 2016
- [9] PDA Technical Report No. 57, Analytical method validation and transfer for biotechnology products [S]. 2012
- [10] OMCL Network of the Council of Europe GENERAL DOCUMENT, PA/PH/OMCL (13) 82 2R Validation of analytical procedures [S]. 2014
- [11] FDA Guidance for Industry, Process validation: general principles and practices [S]. 2011
- [12] FDA Guidance for Industry, Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics [S]. 2015
- [13] FDA Guidance for Industry, Bioanalytical method validation [S]. 2018
- [14] WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 2, WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories [S]. 2011
- [15] 张国林. 生物制品微生物质量控制与快速微生物检测的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(6): 833
ZHANG GL. Research progress of microbial quality control and rapid microbiological detection of biological products[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(6):833
- [16] AOAC Guidance: How to Meeting ISO 17025 Requirement for Method Verification, Association of Official Analytical Chemists [S]. 2007
- [17] FDA Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds 2nd Ed [S]. 2015
- [18] Method Validation of U. S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis [EB/OL]. 2016, https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf
- [19] ISO16140 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method [S]. 2016

- [20] ISO16140 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 3; Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory [S]. 2021
- [21] ISO16140 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 4; Protocol for method validation in a single laboratory [S]. 2020
- [22] ISO16140 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 5; Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods [S]. 2020
- [23] ISO16140 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 6; Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures [S]. 2019
- [24] DADDY GS, KWEON O, LEE YJ, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detecting *Burkholderia cepacia* complex in non-sterile pharmaceutical products [J]. Pathogens, 2021, 10(9): 1071
- [25] ANDREWS WH. Validation of modern methods in food microbiology by AOAC INTERNATIONAL collaborative study [J]. Food Control, 1996, 7(1): 19
- [26] DE SMEDT JM. AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. Association of Official Agricultural Chemists [J]. Int J Food Microb, 1998, 45(1): 25
- [27] PITON C, GRAPPIN R. A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods; application to dry rehydratable film methods and IDF reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(1): 92
- [28] APPENDIX J; AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces [S]. 2012
- [29] FELDSINE P, ABEYTA C, ANDREWS WH. AOAC INTERNATIONAL Methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis [J]. J AOAC Int, 2002, 85(5): 1187

(收稿日期:2022-08-03)