

· 学术探讨 ·

基于QbD理念探索中药生产全过程微生物的质量控制策略

张泽帅¹, 谢茂梅¹, 李正¹, 卢红委², 奚萌², 王海霞^{1*}

(1. 天津中医药大学 中药制药工程学院,
组分中药国家重点实验室, 现代中医药海河实验室, 天津 301617;
2. 扬子江药业集团 江苏龙凤堂中药有限公司, 江苏泰州 225327)

[摘要] 安全性是中药产品质量的核心,由中药材、饮片及中间品等造成的微生物污染会给中药产品质量安全带来一定影响。究其原因,既有药材本身的问题,也有生产制造过程中引入的外源性污染。如何有效运用微生物检测技术,建立适当的中药生产全过程微生物质量控制策略,对于提升中药产品品质具有重要意义。据此,笔者提出基于质量源于设计(QbD)理念指导的中药生产全过程微生物质控策略,强调内部与外部微生物质量控制体系的科学联动,共同保障各环节产品质量。其中,内部微生物质量控制体系包括对“中药材-饮片-中间品-辅料-包材-终产品”全链条的控制,要按阶段、有特点展开,而外部质控体系包括对“人员-设备设施-制药用水-环境”的控制,强调要遵循质量风险管理原则,分类制定监控方案,旨在将微生物质量风险管理与中药生产过程密切结合,分类制定微生物控制策略,以最大程度降低污染微生物对中药产品质量的影响,切实保障中药产品质量。

[关键词] 质量源于设计(QbD); 微生物; 质量控制; 中药生产; 快速检测; 安全性; 饮片

[中图分类号] R22;R28;R94;Q93 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0176-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220551

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220524.0812.002.html>

[网络出版日期] 2022-05-24 11:38:07

Discussion on Microbial Quality Control Strategy in Whole Process of Chinese Materia Medica Production Guided by Concept of QbD

ZHANG Zeshuai¹, XIE Maomei¹, LI Zheng¹, LU Hongwei², XI Meng², WANG Haixia^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine (TCM),
State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine,
Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China;
2. Jiangsu Longfengtang TCM Co. Ltd., Yangtze River Pharmaceutical Group, Taizhou 225327, China)

[Abstract] Safety is the core of the quality of Chinese materia medica products, and microbial pollution caused by medicinal materials, decoction pieces, intermediate products and others can bring certain impact on the quality and safety of Chinese materia medica products. The reasons for this are not only the problems of medicinal materials themselves, but also the exogenous pollution introduced in the production process. How to effectively use microbial detection technology and establish an appropriate microbial quality control strategy in the whole process of Chinese materia medica production is of great significance to improve the quality of Chinese materia medica products. Therefore, the authors put forward a microbial quality control strategy in the whole process of Chinese materia medica production based on the guidance of quality by design (QbD) concept,

[收稿日期] 2022-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82003944);国家中医药多学科交叉创新团队项目(ZYYCXTD-D-202002)

[第一作者] 张泽帅,在读硕士,从事中药微生物快速检测研究,E-mail:1057317649@qq.com

[通信作者] *王海霞,博士,副研究员,从事中药产品质量智能检测及创新药物载体合成研究,E-mail:whxtcm@tjutcm.edu.cn

emphasizing the scientific linkage between the internal and external microbial quality control systems to jointly ensure the quality of products in all aspects. Among them, the internal microbial quality control system includes the control of the whole chain of Chinese materia medica-decoction pieces-intermediate products-excipients-packaging materials-final products, which should be carried out by stages and characteristics, while the external microbial quality control system includes the control of personnel-equipment and facilities-pharmaceutical water-environment, emphasizing the principle of quality risk management and the development of monitoring programs, aiming to closely integrate microbial quality risk management with the production process of Chinese materia medica products, and to classify and develop microbial control strategies in order to minimize the impact of contaminating microorganisms and effectively guarantee the quality of Chinese materia medica products.

[Keywords] quality by design (QbD); microbes; quality control; production of Chinese materia medica; rapid detection; safety; decoction pieces

安全性是中药产品质量的核心,是保障中药产业稳定发展的根本^[1]。目前,微生物污染给中药产品质量安全带来了极大挑战,这不仅源于药材本身,在生产加工过程中,由人、设备、生产用水和环境等携带的外源微生物对中药产品质量安全也会构成严重威胁。2014—2019年我国药品飞行检查结果统计发现,与微生物缺陷直接相关的占比达33%,其中涉及中药产品比例最高,为30项,化学药21项,生物药4项^[2-3]。中药由于其特殊性,原料携带微生物风险较高,再加上我国中药制药企业对于微生物控制缺乏足够的风险管控意识,过程检测技术也相对匮乏,致使中药微生物污染风险远高于化学药和生物药。基于此,胡昌勤^[4]提出全过程控制是我国药品微生物质量控制的重要发展方向,要推动药品微生物从简单的终产品检验向风险调查、风险评估、风险管理方向转变,加强全过程质量控制保障,践行质量源于设计(QbD)理念,为中药产品微生物质量控制指明了方向。

QbD理念强调产品的质量无法通过检验赋予,而应该通过设计赋予。在该理念指导下,制药工业应该将质量风险管理^[5]与产品、生产工艺深度结合,运用过程分析技术,建立适当的控制策略,促进产品在整个生命周期内持续改进和创新。程翼宇等^[6]针对我国中药质量监管依赖检验和质量风险管控不足等现状,提出需要建立以过程管控为核心的中药质量控制技术体系。徐冰等^[7]结合QbD理念、中药生产及研发特点,提出了符合中药质量系统设计思维的“四全”QbD模式,即全局设计、全息分析、全面控制和全程优化。同样,在QbD理念指导下建立中药生产全过程微生物质量控制策略也是必要的。但目前药品监管部门和中药生产企业尚无相对完善和成熟的质控方案。基于此,笔者从内部和外部

双重微生物污染风险入手,提出基于内外联动的中药产品微生物质量控制策略,推引各环节控制微生物污染的快速替代方法,以最高效率和最大限度保障中药产品质量安全,见图1。内部建立如图2所示的“中药材-饮片-中间品-辅料-包材-终产品”全流程微生物控制体系,即强化中药材源头预防控制,突出饮片微生物大类控制,完善中间品过程控制,重视辅料和包材的个性化控制,减少对终产品检验的依赖,实现中药产品快速放行。外部建立如图3所示的“人员-设备设施-制药用水-环境”多方位微生物控制体系,将微生物质量风险管理结合于对生产过程的深刻理解中,采用适宜微生物快速检测技术,建立有效的微生物控制策略,最大程度降低外源微生物对中药产品质量的影响。

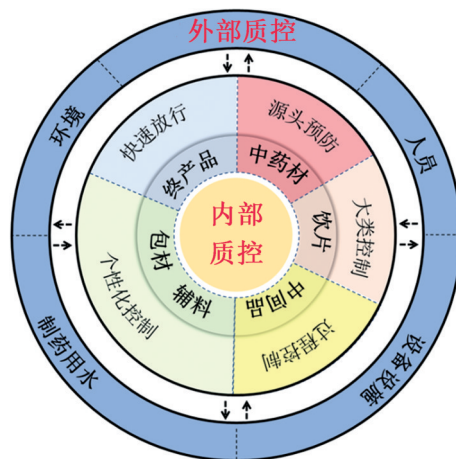


图1 基于内外联动的中药产品微生物质控策略

Fig. 1 Microbial quality control strategy of Chinese materia medica products based on internal and external linkage

1 内部微生物质量控制体系

1.1 中药材源头预防 植物类中药材多直接来源于天然或栽培的植物,容易受到土壤背景微生物及

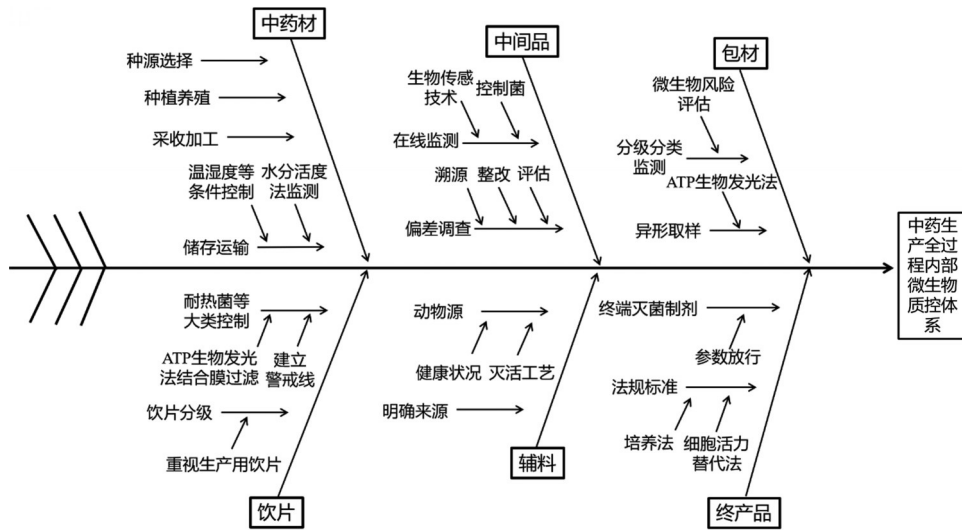


图2 中药生产全过程内部微生物质量控制体系

Fig. 2 Internal microbial quality control system in whole production process of Chinese materia medica

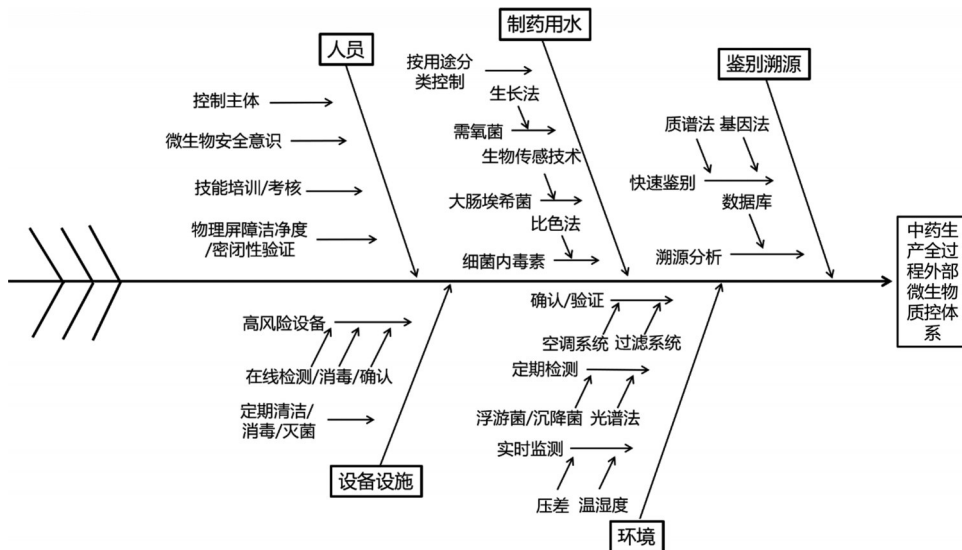


图3 中药生产全过程外部微生物质量控制体系

Fig. 3 External microbial quality control system in whole production process of Chinese materia medica

施肥导致的外源性微生物污染^[8-9]。动物源类中药材可能携带细菌、霉菌、酵母菌等传染因子,对人体健康和公共卫生带来风险^[10]。为提高中药材微生物源头控制水平,应当建立健全在种源选择、种植养殖、采收加工、储存运输等环节的中药材全流程微生物污染风险防控体系,确保中药生产源头药材的安全性。重视中药材基原和产地等信息的记录备案有利于中药材微生物安全事故调查及进一步溯源分析。种植养殖应遵循药用植物、动物的生长发育规律和生长习性,严防施肥过程导致的外源性微生物污染。动物粪肥类有机肥料往往含有致病性微生物,因此选择中药材肥料时要考虑微生物风险,并且严格限制使用量。此外,采收、加工和储存

运输环节也是药材微生物污染防控的重要一环。因此,中药材产地加工的呼声一直很高,尤其是对于那些因“二次浸润”后切制造成成分流失和损耗增加的药材品种。2021年7月,国家药品监督管理局在《关于中药饮片生产企业采购产地加工(趁鲜切制)中药材有关问题的复函》中明确表示,中药饮片生产企业可以采购具备健全质量管理体系的产地加工企业生产的产地趁鲜切制中药材用于中药饮片生产^[11]。这可在一定程度上减少中药材异地加工带来的运输和制造成本,也会降低由运输及存储过程带来的微生物污染风险,但也会增加中药材产地的工作量,需保证中药材的采收加工有序完成。产地中药材鲜度较高,若控制不好温度、湿度

和光照等条件,极易导致药材受潮或霉变。因此,引入快速简便的产地中药材微生物污染风险监测及预测体系极为必要。

水分活度法可通过测定样品表面影响微生物生长的水分活度值来预测微生物污染风险^[12-13]。该方法操作简便,可快速获得检测结果,适合现场快速检测,在食品和化妆品微生物风险监测领域已有应用,且被2017年版《美国药典》记载为非无菌制剂微生物控制方法^[14];同时,这种方法在中药产品微生物污染检测方面也有应用探索。李辉等^[15]测定了11种非无菌中药制剂的水分活度分布,提出了基于水分活度的中药制剂微生物分类控制策略,说明水分活度法用于中药产品微生物检测是可行的。

1.2 饮片大类控制 中药饮片是符合制剂需求和临床需要的特色中药产品,也是中药微生物污染防治的重点对象。中药饮片微生物污染整体呈数量大、类别多、分布不均匀态势。杨美琴等^[16]对17个省市的151种2286批中药饮片样本进行微生物污染调查,结果发现17%煎煮类饮片不能满足2016年版《美国药典》要求,约5%直接服用饮片不能满足2019年版《欧洲药典》和2016年版《日本药典》要求。说明中药饮片微生物污染现状较为严峻,不同类别饮片污染情况差异比较明显,且国内对饮片微生物控制标准较低。因此,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(四部)通则新增“中药饮片微生物限度检查法”,同时在通则1107中对直接口服和泡服饮片增设了大肠埃希菌的控制要求^[17]。这些规定暂且将微生物污染控制重点聚焦于直接口服和泡服用临床中药饮片,而对生产用中药饮片暂缓要求。但这不代表生产用中药饮片不存在微生物污染风险,相反,生产用中药饮片更容易受到微生物侵蚀,相信在后续规定中会对此污染问题做出更严格、更精准的质控要求。按照国际共识,对饮片分类进行微生物污染控制是科学之举。目前,2020年版《中国药典》中规定饮片微生物限度检查按照微生物计数法进行,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。针对这几类微生物总数测定,建议采用膜过滤或短时培养技术结合三磷酸腺苷(ATP)生物发光检测策略对饮片大类微生物进行快速预判。

ATP生物发光法是一种基于微生物体内ATP引发荧光素酶反应产生荧光信号,从而实现微生物总数快速测定的光谱分析方法^[18]。该方法在化学药

微生物限度检查领域早有应用。BUGNO等^[19]针对4种注射剂和6类代表菌株,采用ATP荧光增幅法对360批受污注射剂进行检测,结果表明该方法和常规法定方法检测的结果差异无统计学意义,并证明药品基质对检测结果无干扰。同时,ATP生物发光法已被列入我国食品接触表面消毒效果评价的国家标准^[20]。该方法可检测到绝大多数活的微生物,而且从样品前处理到获得测试结果不超过10 min,适用于样品中微生物污染总数的快速检测。但中药饮片成分较为复杂,经过震荡提取后的供试液,可能存在荧光素酶抑制剂或者无机盐等干扰因子,进而影响ATP生物发光检测。因此,采用有效的膜分离技术和ATP快检技术有机结合,可将供试液中的微生物截留在滤膜上,在滤膜上直接完成ATP生物发光检测,从而避免这一干扰。

快速 Milliflex 检测系统(RMDS)是基于ATP生物发光法开发的用于可过滤样品微生物的快速计数系统。样品通过0.45 μm 无菌滤膜过滤后,将冲洗后的滤膜分离至规定培养基表面进行增殖培养,培养1~5 d后于滤膜表面喷洒细胞裂解剂和生物发光反应试剂,再将滤膜装入反应塔内完成信号收集和细胞计数。PARVEEN等^[21]应用RMDS对疫苗等生物制品进行微生物限度评价,结果证明该方法在检测灵敏度和检测时间两方面均明显优于法定方法。同时,在硫柳汞等防腐剂或磷酸铝等佐剂存在的情况下,该方法依然可以检测到疫苗样品中所有微生物,进一步证明了其在复杂基质中的检测应用能力。此外,对于耐热菌总数测定,一般需要水浴(98~100 °C)30 min处理后的冷却液作为检测用供试液。传统培养方法需要将供试液培养3~5 d后进行计数测定,如果将供试液通过0.22 μm 无菌滤膜过滤,就可以将细菌截留在滤膜上。滤膜再经短期增菌培养,就可以在滤膜表面进行ATP生物发光法测试,结果以相对发光值(RLU)呈现,从而实现中药饮片中耐热菌总数的快速检测,这样预计可以在1~2 d内完成该类别项目测试。基于此原理开发的Pallchek检测系统被用于非无菌制剂产品的第一环节微生物污染质量控制。若此项检测结果阴性则放行,若检测结果阳性则进入第二环节检测,综合培养计数或鉴定法测试结果,若符合要求,则二次放行,若不符合要求,则不放行。

此外,饮片耐热菌检测供试液中可能存在一些动植物细胞或游离ATP,可能会造成假阳性检测结果。因此,检测之前增加非微生物ATP消除措施十

分必要。由于微生物细胞壁比体细胞细胞壁更厚,可以先采用体细胞裂解剂专一裂解体细胞且释放ATP,然后加入ATP双磷酸酶消除释放的ATP。若要使ATP生物发光检测技术在饮片大类微生物污染质量控制中发挥作用,还应该做好此方法与传统培养计数结果的对比验证工作,应该明确各污染类别、各饮片品种、各检测环节的微生物限度值,从而制定科学、有效的警戒限,用于饮片污染微生物快速检测放行。

1.3 中间品过程控制 中药生产过程中会产生提取液、浓缩液、浸膏及制剂类等中间产品。目前对这些中间品的微生物污染防控多为离线检测,即根据现行版《中国药典》要求,按照微生物限度检测或控制菌检测方法进行。由于培养法检测周期长,绝大多数情况下,需要1周才能出具各检查项的最终检测结果,大大影响了连续化生产进程,同时也增加了企业对中间品的存储负担。因此,迫切需要引入快速检测技术用于中间品污染微生物过程质量控制。若按照图2体系进行内部微生物质量控制,由于上游的中药饮片已采取了微生物大类控制设计,中间品的微生物已基本达到了可接受水平,此时污染微生物防控的重点应该聚焦于控制菌。控制菌的检测要求一般是不得检出,因此对测试方法的灵敏度和选择性要求极高,可应用生物传感方法实现控制菌的快速替代检测。

生物传感方法的技术核心是生物传感器开发。生物传感器是一类由生物识别元件和物理化学换能器组成的分析装置。由于中间品的化学组分较为复杂,通过采用抗体、核酸适配体或抗菌肽修饰的磁性纳米材料预先对目标控制菌进行靶向识别并分离富集,可在一定程度上避免中间品中干扰物质对检测结果的影响。目前,基于荧光和表面增强拉曼光谱技术的生物传感方法在中药产品等复杂基质控制菌的快速检测中都取得了很好的应用效果。WANG等^[22]基于荧光标记和免疫磁分离技术开发了一款微流控生物传感器,可直接通过智能手机软件在线检测苹果汁中的沙门菌,回收率在84.82%~98.39%,检测时间在2h以内。本课题组结合表面增强拉曼光谱技术和生物传感识别技术开发了应用于甘草提取液中大肠埃希菌的快速检测方法,检测限可达 $2.86\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,检测时间仅需2.5h^[23]。这些生物传感技术的引入大大提高了控制菌的检测效率和检测精度。

综上所述,笔者建议在中间品微生物质量控制

环节,可考虑设置一个控制菌快速代替检测项目。根据现行版《中国药典》对不同中间产品控制菌的要求,分类选取针对不同控制菌的快检方法。若该控制菌替代方法检测结果阴性,基本可以说明此环节中间品该类别控制菌检测合格。若结果为阳性,则应该采取果断措施停止该批次中间品下游工序,同时积极展开污染排查工作。一方面是对上游饮片和中药材进行污染微生物检测及排查,另一方面是对重点人员、制药用水、洁净室环境和上游高风险工艺等外源风险控制点展开溯源排查,快速确定污染源。可见,在中间品中引入控制菌快速检测项目可实现对生产过程控制菌的有效监测,检测结果既可检验前期防控效果,又有助于科学调整后续的检测和防控策略,确保终产品控制菌符合要求,说明该策略对于整个中药产品的微生物安全性防控是极为有益的。

1.4 辅料和包材个性化控制 药用辅料是在中药制剂生产过程中使用的赋形剂和附加剂。应该特别注意动物来源药用辅料的微生物风险,明确原材料供应商资质,保障供体动物的安全可靠,防范运输过程的污染风险,并在辅料生产工艺过程中配合使用病毒灭活和微生物去除等工序操作。包材是中药制剂所使用的直接与药品接触的包装材料和容器,依据包材用途及其与制剂发生相互作用的概率,建立不同药物包材的微生物风险等级,进而做到分级分类监测。一般来说,微生物风险等级由高到低依次为注射类药用包材、眼用制剂药用包材、气雾剂药用包材、口服液体制剂药用包材和颗粒剂药用包材等。药用包材的材质种类较多,有塑料、金属、玻璃、陶瓷和橡胶等,常见有聚丙烯瓶、氯化丁基橡胶塞、铝箔、软膏管、复合膜和聚异戊二烯垫片等。药用包材材质的个性化差异进一步突显了传统培养法检测步骤繁琐这一缺陷,为了提高检测效率,可选择ATP生物发光法作为微生物检测的替代方法。当然,需要考虑结合适宜的采样技术,如液体或固体拭子采样,使采样拭子充分接触辅料和包材或在其表面摩擦,然后将拭子插入荧光素酶反应液中,数分钟后即可报告检测结果。该方法克服了异形包材取样难的问题,可提高药用包材或辅料污染微生物检测效率。

1.5 终产品快速放行 建立从中药材到终产品的中药产品内部生产全流程微生物控制体系,就是为了降低终产品的检验压力和控制成本。通过建立中药材源头控制、饮片微生物大类控制、中间品控

制菌过程控制、辅料和包材的个性化控制等环节,中药终产品的微生物污染风险将会大为降低,但是对于终产品的检验仍然是微生物控制体系的重要组成部分。鉴于微生物培养的周期长及存在部分微生物不可培养等情况^[24],可以在终产品微生物快速检测中引入基于细胞活力的微生物替代检测方法^[25-26]。微生物细胞活力可以通过其细胞膜维持细胞内荧光分子稳定性的能力来指示。基于细胞活力的检测方法一般需要引入活力标志物对细胞进行染色或者直接利用细胞内的自发荧光物质如还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、氧化黄素或吡啶二羧酸等,再结合流式细胞术、固相细胞术或自发荧光等技术完成检测。这种检测方法的优点是可视化结果准确且检测速度快,目前已有成型设备在环境水样^[27]和血液样品^[28]等的微生物检测中获得应用。

Growth Direct系统是一款基于自发荧光原理开发的微生物细胞快速无损检测技术^[29],适合于终产品的快速无损检测。该系统实现了培养和分析自动一体化,利用细胞内氧化黄素的自发荧光性质,采用激发光侧向照射,在垂直方向上通过CCD检测器收集500~600 nm波段的荧光,进而实现样品微生物快速检测。同时,美国食品药品监督管理局(FDA)批准的Chemunex ScanRDI系统^[30-31]也可用于中药终产品的微生物检测。但在实际应用时,应严格按照终产品的理化属性和微生物质量控制要求综合选择适宜检测方法,在投入应用前完成严格的验证工作。此外,对于需要终端灭菌的中药终产品,可考虑采用参数放行替代常规无菌检验。通过对灭菌工艺的充分验证,确定合适的灭菌温度、压力和时间等参数作为中药产品终端放行的依据。

2 外部微生物质量控制体系

2.1 人员 人是微生物风险控制的主体,同时也是风险最大的外部污染源。中药生产制药企业应充分重视微生物污染风险防控,组建专门的微生物质量风险管控团队负责中药产品微生物全程质量控制。微生物质量控制人员首先要树立风险管理意识,其次要强化部门之间的合作意识。微生物质量风险管控团队并不只是负责中药产品微生物检测,而是要建立覆盖中药产品全生产过程微生物污染风险评估、风险管理和风险调查等的综合管理体系。此外,生产操作人员携带微生物风险的不确定性较高,务必重视人员微生物污染风险监控。要使一线生产人员牢固树立微生物安全防范意识,并定

期对一线生产人员进行微生物安全技能培训和考核,高风险区域操作人员还应该进行专门培训。洁净区工作人员的洁净服、头罩、护目镜、口罩、手套、鞋套要做洁净度、密闭性的定期检测和确认。

2.2 设备设施 常见的中药生产设备包括粉碎设备、提取设备和浓缩干燥设备等,制药设备设施是影响药品质量安全的重要外部条件,与药品长期直接接触的设备要定期清洁、消毒或灭菌,以防止微生物污染。选用合适的风险评估工具,依据接触频率和历史数据将设备设施分为高、中、低三类风险等级,分类制定微生物监测控制方案,包括清洁消毒的效力及频率等,最大程度降低污染风险。重点监测高风险设备,配置在线检测系统,现行版《中国药典》规定的接触碟法和擦拭法均需要离线培养,无法实时监测,可考虑引入基于拭子取样的ATP生物发光检测系统进行设备表面污染微生物风险监测。将检测结果和限度标准进行比较,配合相应的消毒措施,并进行消毒后确认,若检测结果依然超过限度值,则重新调整消毒控制方案,直至确认设备表面污染微生物检测合格。

2.3 制药用水 水是制药过程中使用极为广泛的一种介质,应该充分重视由各个生产环节用水带来的外源性微生物污染。制药用水根据用途可分为饮用水、纯化水、注射用水、灭菌注射用水。2020年版《中国药典》规定制药用水中微生物检测项目主要包括需氧菌总数、大肠埃希菌和细菌内毒素3项。考虑到制药用水微生物检测样本量较大和检测项目多这2个特点,引入制药用水微生物快速检测技术^[32-33]十分必要。对于需氧菌总数测定,可选用基于微生物生长的替代检测方法^[34]。这种方法依靠微生物生长代谢过程中产生的检测信号,比如CO₂的产生和O₂的消耗,都可以作为需氧菌总数的判断依据^[35]。BacT/ALERT检测系统是通过监测微生物生长代谢所产生CO₂引起培养瓶内反应底物的显色或荧光信号变化从而间接检测需氧微生物,较适用于制药用水中需氧菌总数快速测定^[36-37]。大肠埃希菌的替代检测方法可以考虑采用**1.3**项下提到的生物传感检测技术。而对于制药用水中内毒素的检测,基于鲎试剂和细菌内毒素的特异性反应进行检测是目前的常规方法,但传统鲎试剂法操作较为复杂且易受外界环境干扰,针对这些问题,Charles River Labs对检测装置进行了系统集成化和自动化改造升级,检测的易操作性和抗干扰性均得到了提高,可用于制药用水中细菌内毒素快速筛查。具体

流程是首先将制药用水导入样品盒,通过流通渠同螯试剂混合,并顺流至显色基底区域,若反应阳性,二者反应释放的凝固酶会和底物作用发生颜色变化,从而实现细菌内毒素的快速自动检测^[38]。

2.4 环境 中药制药工艺较为复杂,并且部分生产过程为开放式或者半开放式,环境监测对于中药制药生产过程外源微生物控制十分关键。不同的中药制药过程应该满足对应的洁净度要求,应实时动态监测洁净室内的温度、湿度和压差等环境参数,以利于预防和控制微生物污染。同时,定期监测环境中浮游菌和沉降菌情况,有利于系统监测洁净区环境微生物污染趋势,包括污染量和污染来源,定期进行趋势分析,提前预判受控区域微生物污染风险。采用基于光谱的微生物替代方法检测速度快、灵敏度高,适用于实时监测无菌操作环境或者高风险环境内的浮游菌和沉降菌。BioVigilant IMD-A系统采用双光路设计,其平行光路上基于米氏散射原理检测空气中悬浮粒子的粒径分布和粒子总数,斜向光路上基于细胞内自发荧光分子NADH或氧化黄素检测空气中的活细胞数目,适用于同时监测环境中悬浮粒子和浮游菌^[39]。傅里叶变换红外光谱(FTIR)技术结合化学计量学方法可以给出一种基于全细胞信息,可识别的微生物分类群的典型模式,可用于环境微生物的分类鉴别。裴琳等^[40]建立了洁净室环境微生物数据库,通过比较药品检出菌和环境菌FTIR谱图的相似性,从而快速预判药品污染菌是否源于环境微生物。拉曼光谱技术根据微生物细胞特定分子的振动和转动信息也可以实现对微生物细胞的快速检测。Rap.ID Particle Systems结合共聚焦拉曼技术和染色成像技术设计,激光自动对焦于细胞位置以实现拉曼信号精准采集,快速识别微生物,适合环境中沉降菌快速检测^[41]。洁净室内的空调送风系统和空气过滤系统需要经过确认和验证,洁净室内日常清洁和消毒措施的有效性也需要经过评价确认。当洁净室有超净工作台、空气调节系统等关键设备发生重大改变时,应重新进行验证和评价。

2.5 鉴别溯源 前面所述的基于生产过程的微生物污染防治主要是针对微生物检测控制而言的,而鉴别溯源也是微生物污染防治中比较重要的一项工作,通过鉴别溯源可以明确微生物污染种类,便于调查污染源,采取针对性措施,对于整个生产过程的微生物污染防治体系工作具有重要指导意义。微生物鉴别基本程序是分离纯化和鉴定,传统的鉴

别方法是依据微生物的形态和理化特征等指标,采用《伯杰氏系统细菌学手册》作为判断标准,从而得出鉴别结果。传统方法往往要求检测多项指标才可以得出鉴别结果,检测周期较长,不适合用于中药污染微生物的快速鉴别。2020年版《中国药典》新增的基因型检测法可以用于中药产品生产过程中微生物菌种鉴定。基因是生物体的基本遗传单位,相比经典的微生物学方法,目前基于基因的检测方法被认为可以提供更为精准和科学的微生物鉴别结果。基因型检测方法包括核酸杂交、核酸扩增、DNA指纹图谱和高通量测序等,基于聚合酶链式反应技术的基因检测方法目前已是微生物鉴定检测领域通用技术。其中,16S RNA核酸测序检测灵敏度高,一般可鉴别至种水平,全基因组测序重复性高,可鉴别至菌株水平,但成本相对较高。作为微生物表型检测技术的代表,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)通过检测微生物细胞的蛋白指纹图谱从而实现微生物鉴别^[42]。Microflex MALDI Biotyper是一款微生物专用的检测系统,检测微生物细胞数需大于 1×10^5 个,但检测时间仅需几秒钟,然后通过与内部数据库(微生物种类>2 000种)比较,可实现污染微生物准确鉴别。白雯静等^[43]利用MALDI-TOF-MS实现了9批中药材污染菌的快速鉴别,该方法具有快速和高通量优势,适用于中药制药过程检出微生物的快速鉴别。说明基因型检测技术和MALDI-TOF-MS技术均适用于中药产品污染微生物的快速鉴别。同时应鼓励建立和完善人体、环境和制药用水的微生物污染数据库,明确常见污染微生物类别,进而有利于对污染微生物做出快速溯源分析。

3 总结

本文将QbD理念与中药生产全过程微生物质量控制策略深度融合,提出基于内外联动的中药产品微生物质量控制策略。其中“中药材-饮片-中间品-辅料-包材-终产品”的内部微生物质量控制体系是整个中药生产过程微生物质量控制体系的核心,直接影响着最终中药产品微生物质量控制水平;而围绕“人员-设备设施-制药用水-环境”的外部微生物质量控制体系服务于中药产品全生产流程微生物质量控制,为中药制药过程微生物质量控制提供了重要保障。内部微生物质量控制体系分阶段、有特点地对生产过程展开微生物污染控制,强化源头预防控制,突出饮片微生物大类控制,完善中间品过程控制,重视辅料和包材的个性化控制,最终减

少对终产品检验的依赖并实现中药产品快速放行。外源微生物质控体系遵循质量风险管理原则,分类制定微生物风险监测和控制方案,提高溯源调查水平,以保障各生产环节符合制药微生物要求。基于QbD理念指导的中药生产全过程微生物质量控制策略不仅仅是为了设计和制造出符合微生物质量控制要求的中药产品,同时也要建立一套能持续生产出符合微生物质量控制要求的中药产品的生产工艺体系。考虑到目前行业微生物质量控制现状,该策略的全面实施还有一定难度,尚需不断提高和强化行业对微生物污染风险的防范意识,推进微生物快检技术的成熟化,最终实现中药产品品质的提升。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 马丽霞,杨怀瑾,张佳,等. 中药制剂质量与临床疗效的保障:中药品质传递过程控制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(14):222-228.

[2] 国家药品监督管理局. 药品飞行检查通报[EB/OL]. (2019-01-25)[2022-05-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fxjzh/ypfxjch/index.html>.

[3] 李辉,杨静,贾萌,等. 2014~2018年药品生产飞行检查中的常见微生物问题分析与对策探讨[J]. 中国药师,2019,22(2):310-314.

[4] 胡昌勤. 药品微生物控制体系建设现状与展望[J]. 中国现代应用药学,2021,38(5):513-519.

[5] ICH. Quality risk management: Q9[EB/OL]. (2005-11-09)[2022-05-18]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q9%20Guideline.pdf>.

[6] 程翼宇,钱忠直,张伯礼. 创建以过程管控为核心的中药质量控制技术体系[J]. 中国中药杂志,2017,42(1):1-5.

[7] 徐冰,史新元,吴志生,等. 论中药质量源于设计[J]. 中国中药杂志,2017,42(6):1015-1024.

[8] 霍晓菲,刘卫德,刘绪平,等. 中药材及中药饮片微生物污染研究[J]. 药品评价,2021,18(23):1469-1472.

[9] 王佩,孟广云,毛如志,等. 不同环境栽培对天麻土壤理化性质、微生物、代谢物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(14):164-174.

[10] 管珂,王丹丹,李耀磊,等. 动物类中药材生物安全现状及风险防控分析[J]. 中国药事,2020,34(11):1275-1280.

[11] 国家药品监督管理局. 关于中药饮片生产企业采购产地加工(趁鲜切制)中药材有关问题的复函[EB/OL]. (2021-06-18)[2022-05-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20210705142059112.html>.

[12] SPERBER W H. Influence of water activity on foodborne bacteria-a review[J]. J Food Prot, 1983, 46(2):142-150.

[13] SYAMALADEVI R M, TANG J, VILLA-ROJAS R, et al. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: A review[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2016, 15(2):353-370.

[14] THE UNITED STATES PHARMACOPIEIAL CONVENTION. USP40-NF35 [M]. Rockville: The United States Pharmacopieial Convention, 2017: 1416-1418.

[15] 李辉,马仕洪,王似锦,等. 基于水分活度的非无菌中药制剂微生物控制策略研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(1):55-60.

[16] 杨美琴,胡昌勤,刘鹏,等. 中药饮片微生物污染量调查分析[J]. 中国药学杂志,2021,56(20):1671-1676.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:170-175.

[18] BOTTARI B, SANTARELLI M, NEVIANI E. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP[J]. Trends Food Sci Technol, 2015, 44(1):36-48.

[19] BUGNO A, ALMODOVAR A A B, SAES D P S, et al. Evaluation of an amplified ATP bioluminescence method for rapid sterility testing of large volume parenteral[J]. J Pharm Innov, 2019, 14(2):152-158.

[20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 36004-2018, 食品接触表面清洗消毒效果试验方法三磷酸腺苷生物发光法[S]. 北京:中国标准出版社,2018.

[21] PARVEEN S, KAUR S, DAVID S A W, et al. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products[J]. Vaccine, 2011, 29(45):8012-8023.

[22] WANG S Y, ZHENG L Y, CAI G Z, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using fluorescence labeling and smartphone video processing[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 140:111333.

[23] ZHU X Y, ZHAO Y W, ZHANG Z S, et al. A disposable gold foil paper-based aptasensor for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* with SERS analysis and magnetic separation technology[J]. Microchim Acta, 2021, 188(11):396.

[24] LI L, MENDIS N, TRIGUI H, et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens[J]. Front Microbiol, 2014, 5:258.

- [25] MOLDENHAUER J. Viability-based rapid microbiological methods for sterility testing and the need for identification of contamination [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2006, 60(2):81-88.
- [26] WEN J L, LIU J B, WU J L, et al. Rapid measurement of waterborne bacterial viability based on difunctional gold nanoprobe [J]. *RSC Adv*, 2022, 12(3):1675-1681.
- [27] CLAUSEN C H, DIMAKI M, BERTELSEN C V, et al. Bacteria detection and differentiation using impedance flow cytometry [J]. *Sensors*, 2018, 18(10):3496.
- [28] HUANG X X, UROSEVIC N, INGLIS T J J. Accelerated bacterial detection in blood culture by enhanced acoustic flow cytometry (AFC) following peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2):e0201332.
- [29] BRUECKNER D, KRÄHENBÜHL S, ZUBER U, et al. An alternative sterility assessment for parenteral drug products using isothermal microcalorimetry [J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 123(3):773-779.
- [30] SMITH R, TRESS M V, TUBB C, et al. Evaluation of the ScanRDI® as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method: Comparison of the limits of detection [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2010, 64(4):356-363.
- [31] BAUDART J, GUILLAUME C, MERCIER A, et al. Rapid quantification of viable legionella in nuclear cooling tower waters using filter cultivation, fluorescent *in situ* hybridization and solid-phase cytometry [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, 118(5):1238-1249.
- [32] MILLER M J. Pharmaceutical microbiological quality assurance and control: Practical guide for non-sterile manufacturing [M]. New York: John Wiley Sons Inc. , 2019:429-458.
- [33] BUGNO A, SAES D P S, ALMODOVAR A A B, et al. Performance survey and comparison between rapid sterility testing method and pharmacopoeia sterility test [J]. *J Pharm Innov*, 2018, 13(1):27-35.
- [34] WANG W, KANG S J, VIKESLAND P J. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacterial metabolites for bacterial growth monitoring and diagnosis of viral infection [J]. *Environ Sci Technol*, 2021, 55:9119-9128.
- [35] GUO J X, LIU Y, YANG Y J, et al. A filter supported surface-enhanced Raman scattering "nose" for point-of-care monitoring of gaseous metabolites of bacteria [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(7):5055-5063.
- [36] THORPE T C, WILSON M L, TURNER J E, et al. BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(7):1608-1612.
- [37] BUGNO A, LIRA R S, OLIVEIRA W A, et al. Application of the BacT/ALERT® 3D system for sterility testing of injectable products [J]. *Braz J Microbiol*, 2015, 46:743-747.
- [38] WONG J, DAVIES N, JERAJ H, et al. A comparative study of blood endotoxin detection in haemodialysis patients [J]. *J Inflammation*, 2016, 13:24.
- [39] SU C X, LAU J, YU F. A case study of upper-room UVGI in densely-occupied elementary classrooms by real-time fluorescent bioaerosol measurements [J]. *Int Environ Res Public Health*, 2017, 14(1):51.
- [40] 裴琳, 胡昌勤, 马仕洪, 等. FTIR法用于药品检出菌与药品微生物检验洁净室环境菌的相关性考察 [J]. *药学报*, 2007, 42(11):1189-1194.
- [41] LORENZ B, ALI N, BOCKLITZ T, et al. Discrimination between pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains by means of Raman microspectroscopy [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(30):8241-8247.
- [42] 张冠华, 刘小莉, 黄璐琦, 等. 基质辅助激光解吸电离质谱法在中药领域的应用进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12):247-255.
- [43] 白雯静, 刘兴国, 田妮娜, 等. 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的3种中药材中污染菌的快速鉴定 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(7):2650-2655.

[责任编辑 刘德文]