DOI: 10.16016/j.1000-5404.201502057

论著

基于微量量热法的无菌制剂快速无菌检查方法研究

任永申[1,2],张 萍[2],吕宏宇[2],肖小河[1,2] (430074 武汉,中南民族大学药学院药剂学教研室[1];100039 北京,解放军第302医院全军中药研究所[2])

[摘要] **目的** 建立快速灵敏准确的无菌检查新方法,克服现有无菌检查方法检查周期长(14~21 d)、灵敏度低、自动化程度不高、容易引起误判等局限。**方法** 采用微量量热法,以常规方法为参照,对方法灵敏度进行考察,建立基于微量量热法的无菌检查新方法;考察该方法对复方茵陈注射液正常样品、未灭菌样品、灭菌不彻底样品的检查能力。**结果** 微量量热无菌检查法能够在10 h内检出各阳性菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉),检出限度<100 cfu,并能够快速检出模式药物未灭菌样品与灭菌不彻底样品,较常规检查方法更为灵敏快速。**结论** 建立的微量量热无菌检查法灵敏、快速、准确,可实现自动在线监测,可以作为无菌检查的新方法。

[关键词] 微量量热法;无菌检查;无菌制剂;微生物污染;复方茵陈注射液;灵敏度;检测时间
[中图法分类号] R917;R927 [文献标志码] A

Rapid detection of microbial contamination of sterile preparation based on microcalorimetry

Ren Yongshen[1,2], Zhang Ping[2], Lyu Hongyu[2], Xiao Xiaohe[1,2] ([1] Department of Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei Province, 430074; [2]China Military Institute of Chinese Materia Medica, No. 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a rapid and sensitive sterility test method, so as to overcome the limitations of long detection cycle (generally 14 – 21 d), low sensitivity, low degree of automation, and prone misjudgement in conventional sterility test. **Methods** Microcalorimetry was adopted to establish a novel sterility test and compare with the conventional sterility test. Methodology investigation was carried out to ascertain the sensitivity of microcalorimetric sterility test. The discrimination capability of the microcalorimetric sterility test to the norm-sterilized samples (Norm-SS), non-sterilized samples (Non-SS) and sub-sterilized samples (Sub-SS) of Fufang Yinchen injections was further investigated. **Results** The results showed that microcalorimetric sterility test could detect out the positive indicator bacteria such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Clostridium sporogenes* (*C. sporogenes*), *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Aspergillus niger* (*A. niger*) within 10 h with the detection limitation of <100 cfu, and could distinguish the Non-SS and Sub-SS from Norm-SS accurately, rapidly and sensitively. **Conclusion** The microcalorimetric sterility test method is more sensitive, rapid and sensitive than the conventional culture medium turbidity observation method, and automatic online monitoring is possible.

[**Key words**] microcalorimetry; sterility test; sterile preparation; microbial contamination; Fufang Yinchen injection; sensitivity; detection time

[基金项目] 国家自然科学基金(81202935, 81173542)
[通信作者] 张 萍,E-mail: zhp1231@126com ;肖小河,E-mail: pharmacy302@126com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150703.1449.004.html(2015-07-03)

Supported by the National Natural Science Found of China (81202935, 81173542). Corresponding authors: Zhang Ping, E-mail: zhp1231@126com; Xiao Xiaohe, E-mail: pharmacy302@126com

无菌检查是保证无菌生产制剂用药安全的必检项目,也是决定制剂生产周期的重要环节[1-2]。现行药典规定的无菌检查方法包括薄膜过滤法和直接接种法,分别用于有/无抑菌作用样品的无菌检查[3-4]。

但是现行无菌检查方法还存在一定的局限性。首先,无菌检查周期较长,一般14~21 d,延长了企业产品的出厂等待时间,提高了产品的生产和使用成本[5]。其次,现行药典中对无菌检查受观察人员的操作经验影响较大,具有一定的主观性[6];另外,肉眼观察无从识别不引起培养基浑浊的微生物污染,由此可能产生假阴性判断,影响结果的准确性和可靠性。

鉴于上述问题,建立一种能够快速灵敏的无菌检查新方法,提高检查灵敏度、准确度,缩短检查时间,提高检查自动化程度,降低劳动强度,以补充或替代现有方法,已经成为国内外无菌制剂研究的关注热点。根据生物热力学理论,一切生命活动均伴随着能量和物质的代谢与转化,这种能量能够为微量量热系统所检视。在适宜的条件下,微生物的生长呈现明显的规律性和特征性[7],且在较低的微生物浓度时即可灵敏地检视热量的变化,启示可以尝试采用微量量热法建立无菌检查的新方法[8]。本研究以复方茵陈注射液为供试药物,以全封闭集菌培养法为参照,初步建立了微量量热法的无菌制剂微生物污染快速检查方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

复方茵陈注射液(规格50 mL/瓶,批号20100120),包括正常样品(Norm-sterilized Samples, Norm-SS)、未灭菌样品(Non-sterilized Samples, Non-SS)、灭菌不彻底样品(Sub-sterilized Samples, Sub-SS)(100 ℃流通蒸汽灭菌10 min),均由解放军第302医院药学部提供。

1.2 菌种与培养基

金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), CMCC(B) 26003],大肠埃希菌[*Escherichia coli* (*E. coli*), CMCC(B) 44102],铜绿假单胞菌[*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), CMCC(B) 10104],枯草芽孢杆菌[*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), CMCC(B) 63501],生孢梭菌[*Clostridium sporogenes* (*C. sporogenes*), CMCC(B) 64941],白色念珠菌[*Candida albicans* (*C. albicans*), CMCC(F) 98001],黑曲霉[*Aspergillus niger* (*A. niger*), CMCC(F) 98003],均由中国药品生物制品检定所提供;硫乙醇酸盐流体培养基[Thioglycollate medium (TM),批号091020],改良马丁培养基[Modified martin medium (MMM),批号090915],营养肉汤培养基(Nutrient Broth Medium,批号090922),琼脂粉(Powered Agar,批号091022),玫瑰红钠培养基(Sodium Rose Bengal Medium, 批号090912),蛋白胨(Peptone,批号090708),均购于北京三药科技开发公司。

1.3 仪器与材料

3114型TAM air等温微量量热仪(Isothermal microcalorimeter)(TA Instrument, US),TAM Assistant工作站,检测限为4 μW,24 h基线漂移小于±20 μW,检测量程为±600 mW,工作温度为5~90 ℃。SW-CT-2FD双人单面净化台(苏州净化设备厂);NS01-2型全封闭无菌试验过滤培养器(北京牛牛基因技术有限公司,批号20090910);TH2-22台式恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);HTY-Ⅲ型智能集菌仪(杭州泰林医疗器械有限公司);303AB-6型隔水培养箱(上海树立仪器仪表公司),0.45 μm醋酸纤维素酯微孔滤膜(北京化学厂),0.9%无菌氯化钠溶液(石家庄四药集团)。

1.4 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤中,接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐培养基中,30~35 ℃培养18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中,23~28 ℃培养24~48 h,上述培养物用0.9%灭菌氯化钠溶液制成含菌数小于100 cfu/mL的菌悬液;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基斜面中,23~28 ℃培养5~7 d,加入3~5 mL 0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。洗脱液用0.9%无菌氯化钠溶液制成含孢子数小于100 cfu/mL的孢子悬液。

1.5 方法

1.5.1 微量量热法无菌检查[9]

1.5.1.1 培养基无菌性检查 取上述灭菌硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基各10 mL,加入热力学安瓿中,置微量量热仪检测通道,分别于35 ℃和28 ℃下记录空白培养基的热谱曲线(Heat flow)。

1.5.1.2 培养基灵敏度检查 取上述金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单孢菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌的稀释培养物各 1 mL,分别加入含 9 mL 硫乙醇酸盐流体培养基的热力学安瓿中,置微量量热仪检测通道,于 35 ℃下记录各菌株生长热谱曲线。取白色念珠菌、黑曲霉的稀释培养物各 1 mL,分别加入 9 mL 改良马丁培养基的热力学安瓿中,置微量量热仪检测通道,于 28 ℃下记录各菌株生长热谱曲线。

1.5.1.3 供试品检查 取复方茵陈注射液正常样品、未灭菌样品、灭菌不彻底样品各 10 瓶,每瓶各取注射液 20 mL,按样品类别分别混合,薄膜过滤,滤膜用 0.1% 蛋白胨水溶液冲洗 3 次,每次 100 mL,取出滤膜剪为 2 份分别置入装有 10 mL 硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基中;另取正常样品 10 瓶,每瓶各取注射剂 20 mL,照前法过滤、冲洗滤膜,剪为 2 份分别置 10 mL 硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基中,加入小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌和白色念珠菌稀释培养物,作为阳性对照;各安瓿分别置相应微量量热仪通道,记录热谱曲线。

1.5.1.4 结果判断 提取各曲线热动力学参数:最大发热功率 P_{max}、最大发热功率时间 T_{max}、总发热量 H_{total}、总生长周期 T_{total},计算各曲线每 30 min 斜率 k 值;以样品热谱曲线 30 min 内热功率 Power 增大 50 μW、且样品热谱曲线每 30 min 斜率 k 逐渐增大并由负转正时,判定样品有微生物生长;并以 k = 0 时间 $T(k_0)$ 为样品微生物污染检出时间。

1.5.2 全封闭无菌过滤培养法检查[10-11]

1.5.2.1 培养基无菌性检查 取硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基各 10 mL,分别在 35 ℃和 28 ℃ 下培养 14 d,观察培养结果。

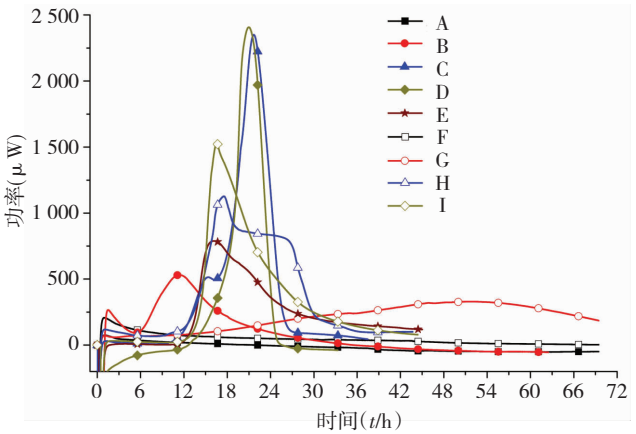
1.5.2.2 培养基灵敏度检查 取每管装量为 10 mL 的硫乙醇酸盐流体培养基 9 支,分别接种小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各 2 支,另 1 支不接种作为空白对照,培养 3 d;取每管装量为 10 mL 的改良马丁培养基 5 支,分别接种小于 100 cfu 的白色念珠菌、黑曲霉各 2 支,另 1 支不接种作为空白对照,培养 5 d,逐日观察,记录培养基浑浊状况。

1.5.2.3 供试品检查 分别取复方茵陈注射液正常样品、未灭菌样品、灭菌不彻底样品各 10 瓶,每瓶各取注射液 20 mL,混合,采用薄膜过滤法(一次性全封闭集菌器,两罐体)过滤,0.1% 蛋白胨溶液 600 mL 冲洗滤膜,于两筒中分别导入硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基;另取正常样品 10 瓶,每瓶各取注射剂 20 mL,照前法处理,并在硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基中加入小于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌和白色念珠菌稀释培养物,作为阳性对照;另取一次性全封闭集菌器以 600 mL 0.1% 蛋白胨溶液冲洗滤膜,分别导入硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基,作为阴性对照;各筒分别置相应温度环境培养,逐日观察,记录培养基浑浊状况。

2 结果

2.1 微量量热法检查结果

2.1.1 培养基无菌性及灵敏性检查结果 采用微量量热法,考察培养基无菌性及灵敏性结果见图 1、表 1;提取各阳性菌生长曲线每 30 min 生长速率 k,结果见图 2。结果表明:(1)空白硫乙醇酸盐流体培养基和空白改良马丁培养基在检测周期内热谱曲线呈基线平行状态,热功率波动小于 20 μW,表明培养基有良好的无菌性;根据热力学参数,热谱曲线各段 k 值均为负值,表明空白培养基发热量呈下降趋势。(2)各阳性菌株均有明显的生长发热,且具有一定的特征性;除白色念珠菌生长缓慢(生长周期越 72 h),其他各菌株均在 36 h 内完成生长周期,表明培养基适合各菌株的生长,具有较好的灵敏性。(3)根据热力学参数,金黄色葡萄球菌最早检出(5.5 h),其次为白色念珠菌(6.0 h),其它各菌株依次在 8.0~9.5 h 内检出;除白色念珠菌 k 值增长较为缓慢外,其它各阳性菌株 k 值变化均较显著。(4)各菌株以大肠埃希菌及铜绿假单胞菌最大发热功率(P_{max})最高,以白色念珠菌最低。



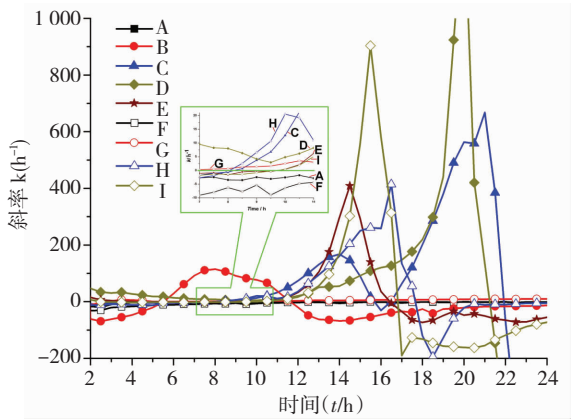
A: 空白 TM; B: 79 cfu *S. aureus* + TM; C: 27 cfu *E. coli* + TM; D: 29 cfu *P. aeruginosa* + TM; E: 20 cfu *B. subtilis* + TM; F: 空白 MMM; G: 44 cfu *C. albicans* + MMM; H: 36 cfu *C. sporogenes* + TM; I: 26 cfu *A. niger* + MMM

图 1 不同阳性菌发热功率曲线

表 1 不同阳性菌热动力学参数

菌种	稀释度	CFU	$T(k_0)$/h	k_{max}/min^{-1}	$T(k_{max})$/h	P_{max}/μW	$T(P_{max})$/h	H_{total}/μJ	T_{total}/h
TM		0	—	—	—	—	—	-1 184.074	70
MMM		0	—	—	—	—	—	1 020.243	70
S. aureus	10^{-8}	79	5.5	114.624	8	530.565	11.411	5 449.686	62
E. coli	10^{-7}	27	8.0	667.548	21	2 349.857	21.667	14 634.810	37
P. aeruginosa	10^{-7}	29	8.5	1 412.546	20	2 407.372	20.961	9 613.451	33
B. subtilis	10^{-7}	20	9.5	408.703	14	787.727	16.108	10 248.962	45
C. sporogenes	10^{-7}	36	8.0	414.370	16.5	1 127.010	17.528	15 453.043	43
C. albicans	10^{-8}	44	6.0	9.830	50.5	329.035	51.728	14 233.816	69
A. niger	10^{-7}	26	9.5	903.670	15.5	1 536.130	16.547	14 378.544	44

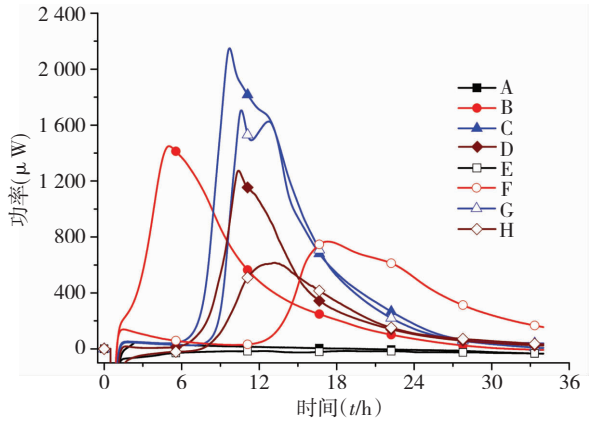
—：未检出



A：空白 TM；B：79 cfu *S. aureus* + TM；C：27 cfu *E. coli* + TM；D：29 cfu *P. aeruginosa* + TM；E：20 cfu *B. subtilis* + TM；F：空白 MMM；G：44 cfu *C. albicans* + MMM；H：36 cfu *C. sporogenes* + TM；I：26 cfu *A. niger* + MMM

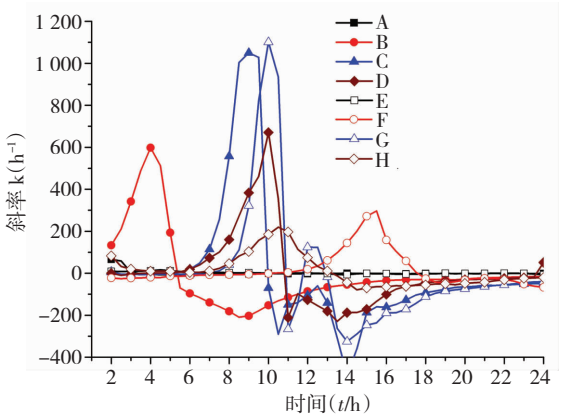
图 2 不同阳性菌热动力学参数斜率-时间(k-t)曲线

2.1.2 供试品检查结果 采用微量量热法，记录各样品热谱曲线；提取热动力学参数，结果见图 3、表 2；提取各样品微量热曲线每 30 min 生长速率 k，结果见图 4。结果表明：(1)热谱曲线显示正常样品通道(Norm-SS + TM/MMM)热谱曲线呈平缓下降趋势，热动力学参数显示正常样品 k 值呈持续负值状态，表明正常样品无微生物污染且培养基无菌性良好；(2)热谱曲线显示阳性对照通道(*S. aureus* + TM，*C. albicans* + MMM)微生物生长良好，表明该条件适合复方茵陈注射液无菌检查，具有较好的灵敏性；(3)未灭菌样品及灭菌不彻底样品均在 6.5 h 内检出，热动力学参数显示未灭菌样品 P_{max} 高于灭菌不彻底样品，提示其污染程度较高，也表明该无菌检查方法对样品污染程度差异的敏感性。



A：Norm-SS + TM；B：*S. aureus* + TM；C：Non-SS + TM；D：Sub-SS + TM；E：Norm-SS + MMM；F：*C. albicans* + MMM；G：Non-SS + MMM；H：Sub-SS + MMM

图 3 不同复方茵陈注射液发热功率曲线



A：Norm-SS + TM；B：*S. aureus* + TM；C：Non-SS + TM；D：Sub-SS + TM；E：Norm-SS + MMM；F：*C. albicans* + MMM；G：Non-SS + MMM；H：Sub-SS + MMM

图 4 不同复方茵陈注射液热动力学参数斜率-时间(k-t)曲线

表 2 不同复方菌陈注射液样品热动力学参数

样品	$T(k_0)$/h	k_{max}/min^{-1}	$T(k_{max})$/h	P_{max}/μW	$T(P_{max})$/h	H_{total}/μJ
Norm-SS + TM	—	—	—	—	—	—
S. aureus + TM	2	597.813	4	1 449.653	5.017	12 426.624
Non-SS + TM	5	1 050.195	9	2 149.121	9.708	16 361.561
Sub-SS + TM	5.5	1 101.199	10	1 274.160	10.392	8 741.553
Norm-SS + MMM	—	—	—	—	—	—
C. albicans + MMM	4.5	670.254	15.5	767.432	17.308	10 052.645
Non-SS + MMM	6	297.024	10	1 705.366	10.614	12 971.938
Sub-SS + MMM	6.5	219.156	10.5	616.537	13.208	5 863.318

—：未检出

2.2 全封闭集菌培养检查结果

2.2.1 培养基无菌性及灵敏性检查 观察各微生物生长状况，结果见表 3，结果表明：各阳性菌株均在规定的检查时限内检出，提示培养基具有良好的无菌性和灵敏性。

2.2.2 样品检查 采用全封闭薄膜过滤法，检查复方菌陈注射液不同样品的无菌性，结果表明：金黄色葡萄球菌阳性对照筒内，微生物生长良好，提示该条件符合无菌检查要求；正常样品均无浑浊现象，表明正常样品无菌性符合要求；未灭菌样品及灭菌不彻底样品有微生物生长，提示样品有微生物污染，表明方法具有一定的灵敏性。见表 4。

表 3 不同阳性菌浊度判断法无菌检查结果

菌种	CFU	时间（h）											
		0	3	6	9	12	15	18	24	48	72	96	120
TM	0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		
S. aureus	87	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+		
E. coli	38	−	−	−	−	±	±	+	+	+	+		
P. aeruginosa	46	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+		
B. subtilis	57	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+		
C. sporogenes	33	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+		
MMM	0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
C. albicans	42	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+
A. niger	79	−	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+

−：未检出浑浊；±：仅见微量浑浊；+：可见浑浊

表 4 不同复方菌陈注射液样品浊度判断法无菌检查结果

样品	时间(h)											
	0	3	6	9	12	15	18	24	48	72	96	120
Norm-SS + TM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. aureus + TM	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Non-SS + TM	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+	+	+
Sub-SS + TM	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+	+
Norm-SS + MMM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
C. albicans + MMM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	±
Non-SS + MMM	−	−	−	−	±	±	+	+	+	+	+	+
Sub-SS + MMM	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+

−：未检出浑浊；±：仅见微量浑浊；+：可见浑浊

3 讨论

无菌检查是无菌制剂和最终灭菌制剂的质量控制关键检查项目，由于现行无菌检查方法存在检查周期长、检查工作量大、容易误判等缺点，近年来建立了新的快速检查方法，如微生物激光散射检测法、PCR 扩增检测法等[12]，但这些方法或易受干扰、或操作繁琐复杂，影响了其推广应用。微量量热法具有灵敏、快速、操作简便、多通道、实时在线监测的优点，适合于对多样品差异状况的平行检测，近年来越来越多的应用于药物质量检测中[13-14]。

研究发现，微量量热法能够明确检出各种药品常见微生物污染（金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌和黑曲霉菌，分别代表了好氧性革兰阳性菌、好氧性革兰阴性菌、厌氧菌及真菌，大肠杆菌、枯草芽孢杆菌代表革兰阴性兼性厌氧菌和好氧性芽孢杆菌，白色念珠菌代表酵母菌），结果具有定量时效性和特征指纹性，对于生长不明显引起培养基浑浊的微生物污染（白色念珠菌、枯草芽孢杆菌等）其检查灵敏度更高。通过过滤集菌，该方法也能灵敏检出具有抑菌作用注射剂样品中的微生物污染，表明方法具有可操作性和推广应用价值。

研究对微量热无菌检查条件进行了考察和优化，通过进一步改善培养基营养状态，同时使之更加适合各类微生物，将有助于提高检查灵敏度并降低检查工作量，更有助于检查效率提高。另外，鉴于目前广泛采用的无菌检查全封闭集菌培养器[15-16]，本研究设计适合微量量热法的全封闭无菌过滤培养系统，开发了全封闭集菌安瓿培养器（专利号 CN 101893589 B）[17]，避免了无菌检查过程对样品的污染，将有助于保证检查的准确性和可推广性。研究同时发现不同微生物的生物热活性曲线具有典型的特征图谱性及生物热动力学曲线，可以作为微生物污染物追踪认定的有效手段，

在生产中具有实际应用意义。

本研究建立的微量量热法可用于实现无菌制剂的快速检查,同时借助于热动力学参数判别,大部分微生物污染物能够在10 h内检出,而延长检测时间至3 d,将能够充分检视全部微生物污染源,较之肉眼观察法的14 d培养期,微量量热无菌检查法可提供一种新的无菌检查参数放行模式[18],将有效地缩短检查周期,减少无菌产品库存周期,从而提高产品生产能力、降低生产成本。研究后期将进一步优化检查条件及判别依据,充分考察方法的可靠性,建立微生物污染在线快速检出与溯源机制,确保无菌制剂生产过程与用药安全,从而赋予微量量热无菌检查法更深入的科学价值和推广应用前景。

参考文献:

[1] 宋勤, 袁林娜. 中国药典与欧洲药典无菌检查培养基灵敏度的比较实验[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(11): 1367-1369.

[2] 肖莉, 廖波. 无菌检查法国内外发展现状及展望[J]. 中国药房, 2008, 19(31): 2461-2464.

[3] 李冰, 赵颖, 文毅. 注射用头孢尼西钠无菌检查方法学研究[J]. 中国药事, 2009, 23(1): 73-75.

[4] 沈波, 冯冬, 马爱霞. 等. 我国大输液行业存在的问题及对策探讨[J]. 药学进展, 2008, 32(10): 463-467.

[5] 马仕洪, 胡昌勤, 戴翠, 等. 判断无菌检查阳性结果有效性的实验探讨[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 727-731.

[6] 张春瑛, 吴蔚, 卢翔, 等. 无菌检查直接接种法不易判断结果品种的方法改进[J]. 中国药品标准, 2002, 3(5): 22-23, 43.

[7] Ren Y, Zhang P, Yan D, *et al*. Application of microcalorimetry of Escherichia coli growth and discriminant analysis to the quality assessment of a Chinese herbal injection (Yinzhihuang)[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012, 2(3): 278-285.

[8] 郜丹, 任永申, 鄢丹, 等. 基于生物热动力学的注射剂无菌检查新方法研究[J]. 药学学报, 2014, 49(3): 385-391.

[9] Tan M, Ren Y, Yan D, *et al*. Detection of microorganisms in different growth states based on microcalorimetry: A challenging test for establishing a rapid and reliable sterility method [J]. J Therm Anal Calorim, 2012, 109(2): 1069-1075.

[10] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 31-32.

[11] 付小平. 智能集菌仪用于小容量注射剂的无菌检查[J]. 中国药师, 2004, 7(7): 567.

[12] 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]. 药学学报, 2007, 42(11): 1189-1194.

[13] 任永申, 鄢丹, 张萍, 等. 基于等温滴定量热法表征的红细胞凝集反应热动力学特性研究[J]. 化学学报, 2011, 69(8): 875-880.

[14] Ren Y, Zhang P, Yan D, *et al*. A strategy for the detection of quality fluctuation of a Chinese herbal injection based on chemical fingerprinting combined with biological fingerprinting[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(2): 436-442.

[15] 黄金环, 杨勇刚, 庞栋. 应用全自动微生物检测系统对血袋抗凝剂无菌检查的验证[J]. 基层医学论坛, 2009, 13(13): 441-443.

[16] 王知坚, 刘咏梅. 无菌隔离舱在药品无菌检查中应用的验证[J]. 中国药事, 2005, 19(2): 79-81.

[17] 鄢丹, 肖小河, 张萍, 等. 一种无菌检查方法及其使用的全封闭集菌安瓿培养器: 中国, CN101893589A[P]. 2010-11-24.

[18] 段文海. 最终灭菌无菌制剂参数放行[J]. 食品与药品A, 2006, 8(11): 59-61.

(**收稿**:2015-02-09;**修回**:2015-03-28)

(编辑 张 维)