



浅析水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用*

绳金房¹, 李辉¹, 马仕洪², 杨晓莉¹, 胡昌勤^{2**}

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 西安 710065; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:以美国药典(USP)收录的1112章节“水分活度测定在非无菌制剂中的应用”为参考,从水分活度的概念,测定原理与方法、与微生物的关系以及在药品质量控制中的应用、意义、问题和不足等角度,介绍和分析水分活度测定在非无菌制剂中的应用。USP率先将水分活度应用于制药领域微生物控制,代表了非无菌制剂的微生物控制由微生物限度测试逐渐向微生物风险评估下的参数放行转变的发展趋势,其理念更为科学合理,控制方法更为简便灵活。对水分活度的理解和认识有助于推动《中华人民共和国药典》2020年版相关内容的增订与推广。

关键词:水分活度;美国药典;中华人民共和国药典;微生物控制;非无菌制剂;药典增订

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)10-1837-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.26

Application of water activity determination of microbial control in nonsterile pharmaceutical products*

SHENG Jin-fang¹, LI Hui¹, MA Shi-hong², YANG Xiao-li¹, HU Chang-qin^{2**}

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: The application of water activity determination of nonsterile pharmaceutical products which is relative to microbiological control in USP 40 was taken as reference. The application of water activity determination of nonsterile pharmaceutical products was introduced from the concepts of water activity, the principle and method of determination, the relationship with microorganisms, the application, significance, problems and shortcomings and development trends of drug quality control. USP pioneered the microbiological control standards with water activity applications in the pharmaceutical industry, which represents the developing trend of microbial control of non-sterile agents from a comprehensive microbiological limit test to the evolution of parameters under microbial risk assessment. The control method became simpler and more flexible. The idea became more scientific and reasonable. Exploring and understanding knowledge of water activity will help to promote the revision and development of relevant content of *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* 2020 edition.

Keywords: water activity; USP; *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*; microbiological control; nonsterile pharmaceutical products; pharmacopoeia revision

* 国家药典委员会课题(15)水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用

** 通信作者 Tel: 13910109199; E-mail: hucq@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: 13379253836; E-mail: shengkangjia@163.com

微生物指标是反映药品安全性和有效性的重要指标^[1],而水在药品生产中用量大,使用广,用于生产过程及药物制剂的制备^[2],药品中不可避免地含有水分。长期以来,水分含量是反映药品质量安全和稳定的一个重要参数。然而,用于控制微生物导致的变质,水分活度(water activity)是比水分含量更重要的一个参数,它是产品中微生物可利用水的量度^[3],是影响微生物生长的关键因素之一。过低或过高的 pH,营养缺乏,含某些表面活性剂,添加的抑菌剂以及低水分活度等产品属性,都将有助于防止微生物生长繁殖^[4]。美国药典(USP) <1112> 水分活度测定在非无菌制剂中的应用于 2006 年发布^[5],用以指导水分活度在非无菌制剂微生物控制中的应用,包括一系列微生物生长需要的水分活度数据和基于产品水分活度的微生物限度检查建议,推荐水分活度的测量方法等内容^[6]。本文浅析非无菌制剂水分活度测定的应用,探讨应用水分活度以实现药品的微生物控制。

1 水分活度概述

水分活度(a_w),是相同温度下产品水蒸气压(P)与纯水蒸气压(P_0)的比值。它在数值上等于封闭系统中由产品产生的相对湿度(RH)的 1/100。RH 可通过直接测量蒸汽压或露点的方法获得,也可通过传感器间接测量,传感器的物理或电学特性会随着所处环境的相对湿度的变化而变化。水分活度和平衡相对湿度(ERH)之间的关系由以下等式表示:

$$ERH = a_w \times 100\%$$

水分活度是物理化学术语,反映产品中水的能量状态,表示水与产品成分之间结合的紧密程度, a_w 值介于 0~1。

水分活度测定一般采用物理或化学方法,最常用的方法有水分活度仪测定法和恒定相对湿度平衡法(康卫氏皿扩散法)。国际上多采用仪器测定法^[4,7-9],我国食品安全国家标准一直以来均采用恒定相对湿度平衡法(康卫氏皿扩散法)^[10-13],现行版《食品安全国家标准食品水分活度的测定》首次刊载仪器测定法作为第二法。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015 年版刊载了费休氏法等 5 种水分测定方法^[14],但尚未刊载水分活度的测定方法。目前,水分活度测定常用的 3 种方法是露点/冷面镜法、电子湿度计法和相对平衡湿度法。

露点/冷面镜法是 USP、欧洲药典(EP)^[15]、日本药局方(JP)^[16]、美国分析化学家协会(AOAC)、国际

标准化组织(ISO)等推荐的测定水分活度的标准方法,使用此法进行水分活度测定时,需要对其适应性进行评价、验证和校准。这些仪器通常使用如表 1 所列的 25 °C 饱和盐溶液校准。

表 1 用于校准水分活度测定仪器的标准饱和盐溶液

Tab. 1 Standard saturated salt solutions used to calibrate water activity determination instruments

饱和盐溶液(saturated salt solution)	ERH/%	a_w
硫酸钾(K_2SO_4)(potassium sulfate)	97.3	0.973
氯化钡($BaCl_2$)(barium chloride)	90.2	0.902
氯化钠($NaCl$)(sodium chloride)	75.3	0.753
硝酸镁($Mg(NO_3)_2$)(magnesium nitrate)	52.9	0.529
氯化镁($MgCl_2$)(magnesium chloride)	32.8	0.328

电子湿度计法通常采用电子湿度传感器测量水分活度,是通过测量密闭的样品顶部空间达到平衡后的温度和蒸汽压来实现的^[17-18]。测量时应严格控制测量样品与传感器之间的温度^[19]。恒定相对湿度平衡法(康卫氏皿扩散法)在密封、恒温的康卫氏皿上,试样中的自由水与水分活度较高和较低的标准饱和溶液相互扩散,达到平衡后,根据试样质量的变化量,求得样品的水分活度。在没有水分活度仪的情况下,这是一个很好的替代方法,不足之处是工作量大,分析烦琐,平衡时间较长。

2 水分活度与微生物生长的关系

1953 年 William James Scott 发现了水分活度影响微生物生长^[20-21],1957 年提出了微生物生长所需的最低的水分活度限值,并明确了是水分活度而不是水分含量影响微生物生长^[22]。目前这一概念已经作为预测微生物生长,反映产品稳定性和安全性的参数而被广泛认可。降低水分活度将会导致微生物生长停滞期的延长,代谢活性的降低,生长繁殖速率的降低,细菌内生孢子和霉菌孢子活性的降低,产生毒素的减少,以及细菌孢子耐热性增加等作用^[23-24]。

在微生物学中细菌、酵母菌和霉菌的新陈代谢、繁殖、孢子萌发和生存需要可利用水,水分活度是反映存在于产品中微生物新陈代谢的可利用水(非结合水或自由水)的量度^[25]。因此水分活度是预测产品中潜在微生物生长繁殖的有力工具。

水分活度可反映产品中潜在微生物的生长繁

殖状况。一定的水分活度环境仅支持特殊类型的微生物生长。革兰阴性菌生长所需最小水分活度一般在 0.91~1.00 范围内,而革兰阳性菌、酵母菌和霉菌生长的最低水分活度要求低于革兰阴性菌,可以在更干燥条件下生存。较高水分活度 ($a_w > 0.85$) 环境中,细菌会与真菌竞争营养物质,细菌的生长超过真菌。革兰阴性菌中包括某些致病微生物,如铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门氏菌在 $a_w < 0.91$ 的产品中不会增殖或存活,而革兰阳性菌如金黄色葡萄球菌将在 $a_w < 0.86$ 时不会增殖,黑曲霉在 $a_w < 0.77$ 时不会增殖。此外,包括最耐受高渗的酵母菌和耐旱真菌在内的所有微生物在 $a_w < 0.60$ 时不会增殖。表 2 中所列是在 25 °C 时一系列与制药相关的代表性微生物生长所需的最低水分活度。这些 a_w 数据已被科学文献确认和证明,且适用于原料、辅料和成品^[25]。

表 2 代表性微生物生长所需的最低水分活度 (a_w)

Tab. 2 Water activities (a_w) required to support the growth of representative microorganisms

细菌 (bacteria)	a_w	霉菌和酵母菌 (molds and yeast)	a_w
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	0.97	黑根霉 (<i>Rhizopus nigricans</i>)	0.93
蜡样芽胞杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	0.95	毛霉 (<i>Mucor plumbeus</i>)	0.92
A 型肉毒梭菌 (<i>Clostridium botulinum</i> , Type A)	0.95	红酵母 (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>)	0.92
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>)	0.95	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	0.90
产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)	0.95	拟青霉 (<i>Paecilomyces variotti</i>)	0.84
绿色乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus viridescens</i>)	0.95	产黄青霉素菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	0.83
沙门菌属 (<i>Salmonella</i> spp.)	0.95	烟曲霉 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	0.82
产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>)	0.94	青霉菌 (<i>Penicillium glabrum</i>)	0.81
枯草芽胞杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0.90	黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	0.78
微球菌溶酶体 (<i>Micrococcus lysodekcticus</i>)	0.93	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	0.77
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	0.86	鲁氏酵母(嗜高渗酵母) [<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (osmophilic yeast)]	0.62
嗜盐细菌 (halophilic bacterium)	0.75	耐旱霉菌(xerophilic fung)	0.61

3 水分活度在非无菌制剂微生物控制中的应用

通过测量和控制药品处方的水分活度,可以减少或消除微生物增殖风险。在稳定储存条件下水分活度是药品的固有属性。在科学的微生物风险评估的基础上,可根据水分活度制定有针对性的个性化微生物控制方案,如全面的微生物限度检查或减少日常检查。应注意的是使用水分活度进行微生物控制,必须遵循严格的 GMP,以确保微生物的最低负载。这种微生物控制理念为药品微生物控制提供了新的思路 and 方向。USP<1112> 提供了药品处方对微生物污染影响的指导,降低药品水分活度对预防潜在微生物的增殖大有裨益;非无菌制剂的处方、生产步骤和测试应反映这一参数。

非水液体或固体剂型由于其低水分活度而不支持孢子萌发或微生物生长,其微生物监测的频率可以通过审查产品的历史测试数据和证明原材料、水、生产过程、制剂和包装的微生物控制有效性来确定。历史测试数据包括在产品开发、生产、过程验证和足够的产品批次(至少 20 批)常规测试中的微生物监测数据,以确保产品极小的或无微生物污染的可能。

水分活度远低于 0.75(例如:片剂,胶囊,非水液体药品,软膏和栓剂等剂型)的药品将是减少微生物限度检查和稳定性评价极佳的研究对象。在进行药品生产时如原辅料微生物指标优良,生产环境不产生微生物污染,本身具有减少微生物的生产过程,制剂有抗微生物活性,以及生产场所已建立了与其产品相关的低生物负载的历史测试数据时,建立合理的微生物风险评估体系,通过水分活度反映微生物稳定性十分有效。然而,单独的水分活度测量不能作为减少微生物限度检查的理由。表 3 是基于水分活度的代表药剂和非处方药(OTC)的推荐微生物限度检查策略。原料药的微生物限度检查与此类似。

4 测定水分活度的意义

微生物生长有最低水分活度要求,低于此要求的微生物将不能生长。因此,水分活度控制作为微生物风险控制的关键环节,也是影响药品稳定性的关键参数。通过设计和控制药品水分活度,优化处方,可准确的评估药品的安全性和稳定性,降低微生物增殖风险。不同水分活度的药品中的微生物生存行为对于

表 3 基于水分活度的代表药剂和非处方药 (OTC) 的推荐微生物限度检查策略

Tab. 3 Microbial limit testing strategy for representative pharmaceutical and OTC drug products based on water activity

产品 (product)	水分活度 (a_w)	最大潜在污染物 (greatest potential contaminant)	测试建议 (testing recommended)
鼻吸入剂 (nasal inhalant)	0.99	革兰阴性菌 (Gram-negative bacteria)	TAMC, TCYMC, 不得检出金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 (TAMC, TCYMC, absence of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>)
洗发水 (hair shampoo)	0.99	革兰阴性菌 (Gram-negative bacteria)	TAMC, TCYMC, 不得检出金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 (TAMC, TCYMC, absence of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>)
抗酸剂 (antacid)	0.99	革兰阴性菌 (Gram-negative bacteria)	TAMC, TCYMC, 不得检出大肠埃希菌和沙门氏菌 (TAMC, TCYMC, absence of <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i> spp.)
局部乳膏剂 (topical cream)	0.97	革兰阳性菌 (Gram-positive bacteria)	TAMC, TCYMC, 不得检出金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 (TAMC, TCYMC, absence of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>)
口服液 (oral liquid)	0.90	革兰氏阳性菌和真菌 (Gram-positive bacteria and fungi)	TAMC 和 TCYMC (TAMC and TCYMC)
口服悬浮液 (oral suspension)	0.87	真菌 (fungi)	TAMC 和 TCYMC (TAMC and TCYMC)
局部软膏 (topical ointment)	0.55	无 (none)	减少测试 (reduced testing)
润唇膏 (lip balm)	0.36	无 (none)	减少测试 (reduced testing)
阴道和直肠栓剂 (vaginal and rectal suppositories)	0.30	无 (none)	减少测试 (reduced testing)
片剂 (compressed tablets)	0.36	无 (none)	减少测试 (reduced testing)
液体填充胶囊 (liquid-filled capsules)	0.30	无 (none)	减少测试 (reduced testing)

注 (note): TAMC=需氧菌总数; TCYMC=霉菌和酵母菌总数。表中列出的不同剂型的水分活度是代表性的, 促使在开发测试策略之前测试它们各自的产品 (TAMC=Total aerobic microbial count; TCYMC=Total combined yeast and mold count. The water activities cited in Table 3 for the different dosage forms are representative, and companies are urged to test their individual products before developing a testing strategy)

药品微生物控制非常重要。对于制药工业, 非无菌制剂水分活度与以下方面有关: (1) 药品处方以及抑菌体系的抑菌有效性; (2) 药品处方中易于化学水解的活性药物成分的降解; (3) 药品处方 (尤其是液体、膏、乳液和霜) 易受微生物污染的程度; (4) 提供了减少微生物限度检查, 依照通则非无菌制剂微生物限度检查法筛查药品有效性、稳定性和控制菌释放的理论依据。低水分活度会防止微生物在药品上的生长繁殖。

符合当前 GMP 生产要求的药品水分活度较低, 没有或几乎没有微生物污染的风险, 在这种情况下, 日常的全面的微生物限度检查没有意义。非水性液体制剂或固体药剂由于其低水分活度, 不支持孢子萌发和微生物生长, 其微生物监控频率取决于产品的历史测试数据和原料、水、生产过程的微生物污染监测数据^[26]。在科学的微生物风险评估的基础上, 采用

水分活度测定进行微生物监控, 建立合理的微生物控制策略及设计性能优良的药品对于节约成本, 提高效率, 提升产品质量具有重要的指导意义。

5 局限与问题

尽管水分活度有助于微生物污染的风险分析, 但不是唯一指标, 应考虑其他因素, 以确定产品是否需要进一步的微生物限度检查。值得注意的是水分活度是反映微生物生长繁殖的指标, 而不是微生物有无的指标, 低水分活度与初始微生物负载无关, 耐受性更强的微生物包括可产生芽孢的梭菌及杆菌、沙门氏菌和丝状真菌等, 尽管在低水分活度时不会繁殖, 但仍然可能存在于产品中。因此水分活度是微生物风险评估的有力工具, 是对现有非无菌制剂微生物控制体系的有力补充, 不能完全代替微生物限度检查, 对于水分活度较高, 而又不适于降低水分活度的非无菌

制剂,全面的微生物限度检查对保证产品的安全性和有效性仍是十分必要和重要的。

水分活度测定在非无菌制剂中的应用可逐步推进生产企业对药品微生物控制水平的提升,以及解决由大量的无价值检验造成的资源浪费,有助于提高生产效率,降低风险,节省成本。然而,我国制药领域尚未建立水分活度测定的方法,利用水分活度控制微生物生长的应用仍为空白。因此,亟待制定水分活度测定在非无菌制剂中的应用指导原则,《中华人民共和国药典》2020年版计划增订的“水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用”相关内容,必将进一步完善我国药品微生物控制体系,以推动我国药品微生物控制的发展迈上新台阶。

参考文献

- [1] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1101
YANG XL, LI H, MA YY, *et al.* Interpretation of the microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration test of Chinese Pharmacopoeia 2015 edition[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(6): 1101
- [2] 杨晓莉,李辉,绳金房. 中、美、英、欧药典制药用水微生物检查法对比研究[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5): 515
YANG XL, LI H, SHENG JF, *et al.* Comparative study of the microbiological test of pharmaceutical water by using ChP, USP, EP and BP methods[J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(5): 515
- [3] SCOTT VN, CLAVERO RS, TROLLER JA. Measurement of water activity (a_w), acidity, and brix[M]//FRANCES PD, KEITH I. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. 4th Ed. Washington D. C: American Public Health Association, 2001: 649
- [4] USP 40-NF 35. Vol I [S]. 2017: 106, 1445
- [5] USP 29-NF 24 Second Supplement [S]. 2006: 3802
- [6] PORTER D. General information 1112 microbiological attributes of nonsterile pharmaceutical products—application of water activity determination[J]. Pharmacopeial Forum, 2002, 28(6): 2009
- [7] AOAC978.18 Water Activity of Canned Vegetables in Official Methods of Analysis [S]. 1995
- [8] ISO 21807-2004 Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs—Determination of Water Activity [S]. 2004
- [9] ISO29621-2010 Cosmetics Microbiology Guidelines for the Risk Assessment and Identification of Microbiologically Low-risk Products, Switzerland [S]. 2010
- [10] 中国商业部. GB 9695.12-1988 肉与肉制品水分活度测定 [S]. 1988
China's Ministry of Commerce. GB 9695.12-1988 Meat and Meat Products Method of Water Activity Determination [S]. 1988
- [11] 国家进出口商品检验局. SN0180-92 中国进出口商品检验行业标准食品水活度测定方法 [S]. 1992
China National Import and Export Commodity Inspection Bureau. SN0180-92 Method of Determination of Water Activity of Food [S]. 1992
- [12] GB/T 23490-2009 食品水分活度的测定 [S]. 2009
GB/T 23490-2009 Determination of Water Activity in Foods [S]. 2009
- [13] GB 5009.238-2016 食品安全国家标准食品水分活度的测定 [S]. 2016
GB 5009.238-2016 National Food Safety Standards of Food and Water Activity Determination [S]. 2016
- [14] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 103
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 103
- [15] EP 9.0. Vol I [S]. 2017: 369
- [16] JP 17. Vol I [S]. 2016: 108
- [17] RAHMAN MS. Water activity and sorption properties of food [M]// Food Properties Handbook, Boca Raton: CRC Press, 1995: 1
- [18] RAHMAN MS, SABLANI SS. Measurement of water activity by electronic sensors [M]// RONALD W, TERRY EA, HAEHUNG A, *et al.* Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001: A2.5.1
- [19] REID D. Factors to consider when estimating water vapor pressure [M]//RONALD W, TERRY EA, HAEHUNG A, *et al.* Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001: A2.5.1
- [20] SCOTT WJ. Water relations of staphylococcus aureus at 30 °C [J]. Aust J Biol Sci, 1953, 6(4): 549
- [21] CHRISTIAN JHB, SCOTT WJ. Water relations of salmonellae at 30 °C [J]. Australian J Biol Sci, 1953, 6(4): 565
- [22] SCOTT WJ. Water relations of food spoilage microorganisms [J]. Adv Food Res, 1957, 7: 83
- [23] MURRELL WG, SCOTT WJ. Heat resistance of bacterial spores at various water activities [J]. Nature, 1957, 179(4557): 481
- [24] FRIESEL RR, CUNDELL T. The application of water activity measurement to the microbiological attributes testing of nonsterile over-the-counter drug products [J]. Pharmacopeial Forum, 1998, 24(2): 6087
- [25] FRIESEL RR. The application of water activity (a_w) measurement to the microbiological attributes testing of raw materials used in the manufacture of non-sterile pharmaceutical products [J]. Pharmacopeial Forum, 1999, 25(6): 8974
- [26] CUNDELL T. The role of water activity in the microbial stability of non-sterile drug products [J]. Eur Pharm Rev, 2015, 20(1): 58

(本文于 2017 年 11 月 14 日收到)