

药品微生物限度检查用培养基的配制、灭菌和贮存有效期验证

张颖*,安秀华,王建平,曹凤兰(天士力制药集团股份有限公司,天津 300410)

中图分类号 R446.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-2002-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.29

摘要 目的:规范药品微生物限度检查用5种培养基的配制和灭菌过程,使培养基的整个配制和灭菌过程受控,同时确定培养基的贮存条件和贮存有效期。方法:对贮存0、15、30、45 d的5种常用培养基(营养琼脂、玫瑰红钠琼脂、胆盐乳糖琼脂、曙红亚甲蓝琼脂、MUG培养基)进行相应菌液适用性检查(包括促生长能力、抑制能力、指示能力和无菌性)验证试验。结果:培养基在贮存45 d后的适用性检查结果均满足2010年版《中国药典》对培养基质量控制的要求。结论:通过该验证试验,确立了培养基的配制及适用性检查频次(每个批号1次)、灭菌参数(121 ℃, 15 min)、贮存条件(洁净度为C级的环境)及贮存有效期(30 d)。

关键词 微生物限度检查;培养基;适用性检查;配制方法;灭菌参数;贮存有效期

Verification of the Preparation, Sterilization and Storage Life of the Medium Used in Drug Microbial Limit Tests

ZHANG Ying, AN Xiu-hua, WANG Jian-ping, CAO Feng-lan (Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To standardize the preparation and sterilization procedures of 5 kinds of medium used in drug microbial limit test and determine its storage condition and life. METHODS: The applicability of the 5 kinds of common medium including NA, RBA, BL, EMB, and MUG medium stored for 0, 15, 30 and 45 days were checked (including growth promotion, inhibitory property, indicative ability and sterilization). RESULTS: The applicability test results of the medium stored for 45 days were in line with the requirements for quality control of medium in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). CONCLUSIONS: The preparation and the frequency of applicability (one times per batch), sterilization parameters (121 ℃, 15 min), storage condition (cleanliness environment for class C) and life of the 30 days of prepared medium are confirmed through the verification test.

KEY WORDS Microbiological limit test; Medium; Applicability test; Preparation methods; Sterilization parameters; Storage life

培养基是否合格,对微生物的生长、分离、鉴定及检验结果的正确与否起着至关重要的作用,因此,对培养基的质量控制十分必要。适宜的培养基配制方法、合理存放以及质量控制试验,是提供优质培养基的保证^[1-2]。

2005年版《中国药典》未规定对培养基进行适用性检查,经过修订,2010年版《中国药典》不但规定了培养基需进行适用性检查,而且该版一部附录中规定:“若采用已验证的配制和灭菌程序制备培养基且过程受控,那么同一批脱水培养基的适用性检查实验可只进行一次;如果培养基的制备过程未经验证,那么每一批培养基均要进行适用性检查试验”^[2]。本次验证试验的目的就是通过验证规范培养基的配制和灭菌过程,使培养基的整个配制和灭菌过程受控,同时确定培养基的贮存条件和贮存有效期。

关于该验证试验如何进行,尚未见相关文献报道。本验证试验通过风险评估,选取接近效期的培养基(质量状况最差)进行验证试验,以确保验证试验结果的可信度。

1 材料

1.1 培养基

营养琼脂培养基(NA,批号:110324)、玫瑰红钠琼脂培养基(RBA,批号:100921)、胆盐乳糖琼脂培养基(BL,批号:1011302)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(EMB,批号:100125)均由

北京三药科技开发公司生产;NA对照品(批号:135003-201002)和RBA对照品(批号:135005-201002)由中国食品药品检定研究院提供;MUG培养基(批号:200907)由北京牛牛基因有限公司生产。

1.2 菌种

大肠埃希菌(*Escherichia coli*,缩写为*E. coli*)[CMCC(B) 44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)[CMCC(B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)[CMCC(B) 63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)[CMCC(F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*, *A. niger*)[CMCC(F) 98003]均购自中国食品药品检定研究院。

1.3 仪器设备

Thermo KS12型生物安全柜(美国赛默飞世尔科技公司);KB400型和BD240型生化培养箱[德国宾得亚太(香港)有限公司];JJ200型电子天平(常熟双杰测试仪器厂);XG1.D型脉动真空灭菌柜(山东新华医疗器械股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 试验环境

试验在洁净度为A级的单向流空气的生物安全柜内进行,其环境洁净度为C级。检验过程严格遵守无菌操作。

2.2 培养基的配制方法和灭菌参数

2.2.1 培养基的选择。分别随机抽取接近效期的5种脱水培养基各3瓶,按照2010年版《中国药典》培养基适用性检查中规定的方法,分别进行3次独立试验,每次从5种培养基中各

* 工程师。研究方向:药品检验分析。电话:022-26736299。E-mail: zhangying@tasly.com

选取1瓶进行试验。

2.2.2 配制方法。按照培养基包装上的配制说明,固体培养基称取一定量的培养基置于容量为500 ml的旋盖试剂瓶中,将纯化水加热煮沸后,量取定量纯化水注入装有培养基的试剂瓶中,将培养基溶解,每个试剂瓶配制量300 ml,盖上但不拧紧瓶盖;液体培养基称取一定量的培养基,加入对应量的纯化水,加热溶解后分装于1 000 ml的旋盖试剂瓶中。BL分装量为每瓶900 ml,盖上但不拧紧瓶盖;MUG分装于试管中,每管5 ml,包扎。

2.2.3 灭菌参数。配制、包扎好的培养基,装入脉动真空灭菌柜中,以液体程序(灭菌参数为121 ℃,15 min)进行灭菌,灭菌后测pH值。

2.3 灭菌后培养基的贮存和贮存后使用方法

2.3.1 贮存条件。灭菌后的培养基旋紧密封旋盖,置于C级洁净区中密闭贮存45 d,每天记录洁净区温湿度。结果45 d内温度为18~26 ℃、湿度为40%~60%。

2.3.2 贮存后的使用方法。灭菌贮存后的已经凝固的固体培养基使用前先于微波炉中融化(只能融化1次^[3]),待培养基完全融化后,置于45 ℃左右的恒温水浴锅中,待培养基温度达到45 ℃后使用;灭菌后的液体培养基可直接分装使用。

2.3.3 贮存时间、适用性检查项目和试验菌种。分别选取灭菌后贮存0(即刚灭菌后未凝固的培养基)、15、30、45 d后的5种培养基进行适用性检查,检查项目和试验菌种见表1(表中“√”为考察项,“×”为不考察项)。

表1 各类培养基的适用性检查项目和试验菌种

Tab 1 Examination items and test strains of the applicability test of various medium

培养基名称	无菌性	促生长能力	抑制能力	指示能力	试验菌株
NA	√	√	×	×	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>
RBA	√	√	×	×	<i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i>
EMB	√	√	×	√	<i>E. coli</i>
MUG	√	√	×	√	<i>E. coli</i>
BL	√	√	√	×	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>

2.4 菌悬液的制备

参照2010年版《中国药典》附录^[2]中的方法制备*E. coli*、*S. aureus*、*B. subtilis*、*C. albicans*和*A. niger*的菌悬液,用无菌的0.9%氯化钠溶液制成1 ml含菌数为50~100 CFU的菌悬液。并用NA对照测定各试验组中加入*E. coli*、*S. aureus*和*B. subtilis*的数量,用RBA对照测定各试验组中加入*C. albicans*和*A. niger*的数量。

2.5 培养基适用性检查的试验方法及结果

2.5.1 NA和RBA计数培养基的促生长能力检查。按照表1中的检查项目,取上述制备的5种试验菌菌悬液各1 ml(含菌数50~100 CFU),分别注入无菌平皿中,立即倾注对应的被检培养基和对照培养基,每株试验菌平行制备4个平皿(2个被检培养基和2个对照),混匀,凝固后,NA置于30~35 ℃培养48 h,RBA置于23~28 ℃培养72 h。培养结束后分别计数各平板平均菌落数和菌液回收率,结果见表2(表中“+”表示无菌性检查平板上有菌落生长,“-”表示无菌落生长)。

从表2可以看出,3次试验中3种试验菌在被检NA上的平均菌落数和2种试验菌在被检RBA的平均菌落数均不小于相应对照上菌落平均数的70%,且菌落形态大小与对照上的菌落一致。

表2 NA和RBA培养基适用性检查结果

Tab 2 Results of applicability test of NA and RBA medium

组次	贮存时间, d	NA 促生长能力检查			无菌性检查	RBA 促生长能力检查		
		被检培养基平均菌落数(CFU)/对照培养基平均菌落数(CFU)/菌液回收率(%)				被检培养基平均菌落数(CFU)/对照培养基平均菌落数(CFU)/菌液回收率(%)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>		<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	
1	0	81/84/96	70/73/96	83/84/99	-	63/67/94	51/54/94	-
	15	64/71/90	78/84/93	70/72/97	-	62/73/85	59/64/92	-
	30	70/73/96	81/86/94	74/75/99	-	55/56/98	53/59/90	-
	45	83/92/90	74/81/91	81/86/94	-	69/73/95	62/63/98	-
2	0	70/77/91	79/83/95	73/75/97	-	74/82/90	56/63/89	-
	15	62/69/90	71/75/95	72/78/92	-	65/66/98	67/70/96	-
	30	76/80/95	68/72/94	62/72/86	-	57/61/93	58/62/94	-
	45	75/79/95	59/67/88	58/66/88	-	57/62/92	59/66/89	-
3	0	80/81/99	74/77/96	80/82/98	-	57/62/92	52/55/95	-
	15	77/82/94	79/83/95	67/72/93	-	67/73/92	60/62/97	-
	30	66/67/99	77/80/96	68/71/96	-	66/70/94	57/59/97	-
	45	63/67/94	78/82/95	72/75/96	-	55/58/95	55/59/93	-

2.5.2 EMB固体选择性培养基促生长能力和指示能力检查。取*E. coli*菌悬液0.1 ml(含菌数10~100 CFU)涂布于被检EMB平板上,在30~35 ℃培养18 h,结果见表3、表4[注:表中BL“+”表示试验菌生长良好、培养基浑浊,“-”表示试验菌被抑制、不生长、培养基澄清;MUG(促生长能力)“+”表示试验菌生长良好、培养基变浑浊,“-”表示试验菌被抑制、不生长、培养基澄清;MUG(指示能力)“+”表示有荧光反应,“-”表示无荧光反应;EMB“+”表示试验菌生长良好,且菌落形态符合*E. coli*典型菌落形态,“-”表示无典型菌落或者无菌落生长]。

表3 BL、MUG和EMB培养基加入试验菌后测定结果

Tab 3 Results of test strains added into BL, MUG and EMB medium

组次	贮存时间, d	EMB稀释度/	MUG稀释度/	BL稀释度/	
		平均菌落数(CFU)	平均菌落数(CFU)	平均菌落数(CFU)	
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	0	10 ⁻⁶ /73	10 ⁻⁷ /84	10 ⁻⁷ /84	10 ⁻⁷ /137
	15	10 ⁻⁶ /82	10 ⁻⁷ /71	10 ⁻⁷ /71	10 ⁻⁷ /156
	30	10 ⁻⁶ /70	10 ⁻⁷ /73	10 ⁻⁷ /73	10 ⁻⁷ /162
	45	10 ⁻⁶ /87	10 ⁻⁷ /92	10 ⁻⁷ /92	10 ⁻⁷ /159
2	0	10 ⁻⁶ /69	10 ⁻⁷ /77	10 ⁻⁷ /77	10 ⁻⁷ /162
	15	10 ⁻⁶ /70	10 ⁻⁷ /69	10 ⁻⁷ /69	10 ⁻⁷ /146
	30	10 ⁻⁶ /75	10 ⁻⁷ /80	10 ⁻⁷ /80	10 ⁻⁷ /145
	45	10 ⁻⁶ /74	10 ⁻⁷ /79	10 ⁻⁷ /79	10 ⁻⁷ /137
3	0	10 ⁻⁶ /82	10 ⁻⁷ /81	10 ⁻⁷ /81	10 ⁻⁷ /149
	15	10 ⁻⁶ /78	10 ⁻⁷ /82	10 ⁻⁷ /82	10 ⁻⁷ /163
	30	10 ⁻⁶ /74	10 ⁻⁷ /67	10 ⁻⁷ /67	10 ⁻⁷ /146
	45	10 ⁻⁶ /69	10 ⁻⁷ /67	10 ⁻⁷ /67	10 ⁻⁷ /159

3次试验中试验菌在被检培养基上生长良好,长出紫黑色、菌落中心呈深紫色、稍凸起、边缘整齐、表面光滑湿润、有金属光泽的圆形菌落,其菌落大小、形态特征、指示反应情况均符合*E. coli*的典型特征,与《中国药典》中描述的一致^[2]。

2.5.3 MUG液体培养基促生长能力和指示能力检查。取*E. coli*菌悬液1 ml(含菌数不大于100 CFU)接种到5 ml被检MUG中,MUG在30~35 ℃培养5 h后观察。结果3次试验中试验菌在2种被检液体培养基中生长良好,培养基变浑浊,于365 nm紫外光下呈现荧光反应,测定结果见表3、表4。

表4 BL、MUG和EMB培养基适用性检查结果

Tab 4 Results of applicability test of BL, MUG and EMB medium

组次	贮存时间, d	BL			MUG			EMB		
		促生长能力 E. coli	抑制能力 S. aureus	无菌性 检查	促生长能力 E. coli	指示能力 E. coli	无菌性 检查	促生长能力 E. coli	抑制能力 S. aureus	无菌性 检查
1	0	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	15	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	30	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	45	+	-	-	+	+	-	+	-	-
2	0	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	15	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	30	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	45	+	-	-	+	+	-	+	-	-
3	0	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	15	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	30	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	45	+	-	-	+	+	-	+	-	-

2.5.4 BL液体培养基促生长能力和抑制能力检查。取 *E. coli* 菌悬液 1 ml (含菌数不大于 100 CFU) 接种到 1 瓶 100 ml 被检 BL 中, 置于 30~35 °C 培养 18 h 后观察; 取 *S. aureus* 菌悬液 2 ml (不少于 100 CFU) 接种到另 1 瓶 100 ml 被检 BL 中, 置于 30~35 °C 培养 24 h 后观察。结果 3 次试验中 *E. coli* 在被检培养基中生长良好, 培养基变浑浊; *S. aureus* 在被检培养基中被抑制、不生长、培养基澄清, 详见表 3、表 4。

2.5.5 无菌检查试验。培养基灭菌后, 不接种任何样品, 在对应的培养条件下培养, 结果见表 3、表 4。可以得出, 固体培养基 (NA、RBA 和 EMB) 无菌落生长; 液体培养基 (MUG 和 BL) 澄清, 与对照一致, 均满足无菌要求。

按照“2.2.2”项下方法配制 NA、RBA、BL、MUG、EMB 培养基, 以 121 °C、15 min 的灭菌参数进行灭菌后, 贮存于洁净度为 C 级的环境中, 分别于贮存 0、15、30、45 d 时对培养基的适用性进行考察。试验结果表明 3 次独立试验中, 贮存 45 d 内的培养基, 无菌性、促生长能力、指示能力和抑制能力均符合 2010 年版《中国药典》规定。为了更有把握地确保培养基的质量, 确定 5 种培养基的贮存有效期为 30 d。

3 讨论

3.1 人员对培养基贮存有效期验证的影响

不同实验人员的操作, 特别是配制过程和贮存过程的操作, 会对每批培养基质量的一致性产生影响。验证之后将配制、灭菌、贮存和使用的操作方法详细规定在《培养基配制、灭菌、贮存和使用的标准操作规程》文件中, 指导操作; 验证中的 3 次独立操作由不同的实验人员进行; 为确保验证方法操作的一致性, 应对相关人员进行培训。

3.2 环境对培养基贮存有效期验证的影响

培养基配制和贮存的环境可能会造成培养基的质量差

异。验证试验中培养基配制在室温条件、一般操作间环境下进行; 灭菌后培养基在 C 级洁净区 (湿度在 40%~60%, 温度在 18~26 °C) 内贮存; 验证过程中试验环境均满足洁净区的温湿度要求。

3.3 脱水培养基对培养基贮存有效期验证的影响

原料脱水培养基的不同厂家和不同批号, 会对配制培养基的质量产生显著影响; 原料在使用前的贮存条件和贮存时间也会对配制培养基的质量产生影响。故: (1) 本验证试验固定供应商; 药品检验用培养基均为北京三药科技开发公司生产, 如更换脱水培养基生产商, 则需重新进行本验证; (2) 本次验证选用了同一个批次的脱水培养基, 因此规定, 如生产商不变, 但更换了脱水培养基的批号, 也应重新对该批脱水培养基进行适用性检查; (3) 本次验证选取最差条件者, 即抽取 3 瓶近效期的脱水培养基进行考察。

3.4 灭菌程序对培养基贮存有效期验证的影响

灭菌设备和灭菌参数 (121 °C, 15 min) 的选择, 会对培养基的质量产生显著影响。本验证中使用的灭菌柜通过了性能确认, 并定期开展再确认; 灭菌程序在《培养基配制、灭菌和贮存标准操作规程》文件中明确规定, 灭菌参数严格参照各类培养基的使用说明执行。

3.5 培养基的配制方法、灭菌程序和贮存期验证工作的意义

口服中药制剂微生物限度检查中, 主要检查项目有细菌、霉菌和酵母菌的计数检查以及大肠埃希菌的定性检查, 使用的培养基主要有 NA、RBA、BL、MUG 和 EMB 培养基。故本试验选取使用频率较高的 5 种培养基进行配制方法、灭菌参数 (121 °C, 15 min) 和贮存期的验证试验。通过这次验证试验, 一方面由原来配制每批培养基进行 1 次适用性检查, 变为现在每个批号的脱水培养基只需进行 1 次适用性检查, 仅该项每月可节约 6 d 工时; 更重要的是通过这次验证, 改变了灭菌后培养基贮存期没有数据支持现状, 确认了贮存有效期为 30 d, 不但减少了培养基的配制频次, 而且使培养基的整个配制、灭菌和贮存过程受控, 确保每次配制的培养基满足微生物限度检查的要求。

参考文献

- [1] 苏德模, 胡昌勤, 马越. 美英欧药典微生物限度标准的浅析[J]. 中国药品标准, 2005, 6(3): 20.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010; 附录 80-83, 139-140.
- [3] 吕红. 药品微生物学检查中培养基加热融化次数对菌检率影响的研究[J]. 中国药房, 2006, 17(12): 937.

(收稿日期: 2012-07-31 修回日期: 2012-09-26)

《中国药房》杂志——《剑桥科学文摘》(CSA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅