

聚乙二醇400微生物限度检查方法学验证

车亚云

南京威尔药业集团股份有限公司 江苏 南京 210000

【摘要】根据《中国药典》2020版四部聚乙二醇400的特性制订检验方法和检验条件,按制定的方法进行试验,根据验证结果判断是否符合验证标准。若符合,按验证的方法和条件进行聚乙二醇400产品的微生物限度检查;若不符合,重新建立制订检验方法和检验条件,再进行验证,直至验证结果符合设立的验证标准。

【关键词】聚乙二醇400;微生物限度检查;培养

【DOI】10.12252/j.issn.2096-627X.2021.12.745

1 供试品与仪器

聚乙二醇400三批 20211101 20211102 20211103

电热恒温鼓风干燥箱 电热恒温振荡器

水浴锅 直径9cm培养皿

立式灭菌器 无菌刻度吸管(10ml、1ml)

电子天平 试管18×180

具塞三角瓶 生物安全柜 菌落计数器

生化培养箱 霉菌培养箱

2 培养基、稀释剂及试剂

2.1 培养基(见表一)

表一 培养基

名称	批号	生产厂家
胰酪大豆胨琼脂对照培养基	135025-201402	中国食品药品检定研究院
沙氏葡萄糖琼脂对照培养基	135013-201001	
胰酪大豆胨琼脂培养基	210706	北京三药科技有限公司
沙氏葡萄糖琼脂培养基	210914	

2.2 稀释剂

0.9%无菌氯化钠溶液

pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液

0.05%(ml/ml)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液

2.3 验证用菌株(见表二)

表二 验证用菌株

菌液名称	编号	传代次数	来源
枯草芽孢杆菌	[CMCC(B)63501]	第三代	实验室转种
金黄色葡萄球菌	[CMCC(B)26003]	第三代	
铜绿假单胞菌	[CMCC(B)10104]	第三代	
白色念珠菌	[CMCC(F)98001]	第三代	
黑曲霉	[CMCC(F)98003]	第四代	

3 方法

参照《中国药典》2020版四部通则1105非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法。

3.1 验证用菌液制备

3.1.1 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌菌液制备

接种金色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中,30~35℃培养18~24小时。将上述培养液1ml加0.9%无菌氯化钠溶液9ml,采用10倍递增稀释法,稀释至 10^{-4} ~ 10^{-7} ,制成每1ml含菌数不大于10000cfu和100cfu的菌悬液,做活菌计数备用。

3.1.2 白色念珠菌菌液制备

a. 接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中,20~25℃培养2~3天;取此培养液1ml加0.9%无菌氯化钠溶液9ml,采用10倍递增稀释法,稀释至 10^{-3} ~ 10^{-5} ,制成每

1ml含菌数不大于10000cfu和100cfu的菌悬液,做活菌计数备用。

b. 接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂培养基中,20~25℃培养5~7天,加入3~5ml含0.05%(ml/ml)聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸至管口包有灭菌棉花且能过滤菌丝的无菌试管内,取1ml加0.9%无菌氯化钠溶液9ml,采用10倍递增稀释法,稀释至 10^{-2} ~ 10^{-5} ,制成每1ml含孢子数不大于10000cfu和100cfu的孢子悬液,做活菌计数备用。

3.2 培养基适用性检查,计数用培养基适用性检查

a. 接种不大于100cfu的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液至胰酪大豆胨琼脂培养基中平板中,每一试验菌株平行制备2个平皿。30~35℃培养需氧菌时间不超过3天,霉菌和酵母菌培养时间不超过5天。

b. 接种不大于100cfu的白色念珠菌、黑曲霉菌液至沙氏葡萄糖琼脂培养基中平板中,每一试验菌株平行制备2个平皿。20~25℃培养时间不超过5天。

c. 接种不大于100cfu的白色念珠菌、黑曲霉菌液至沙氏葡萄糖琼脂对照培养基中平板中,每一试验菌株平行制备2个平皿。20~25℃培养时间不超过5天。

3.2.2 结果如下:(见表三、表四)

表三 需氧菌计数用培养基适用性检查结果

菌液	胰酪大豆胨琼脂培养基平均数	胰酪大豆胨琼脂对照培养基平均数	被检培养基占对照培养基的比值	结果
金黄色葡萄球菌	67	70	0.96	符合规定
铜绿假单胞菌	66	69	0.96	符合规定
枯草芽孢杆菌	48	51	0.94	符合规定
白色念珠菌	44	48	0.92	符合规定
黑曲霉	52	56	0.93	符合规定

表四 霉菌和酵母菌计数用培养基适用性检查结果

菌液	沙氏葡萄糖琼脂平均数	沙氏葡萄糖琼脂对照培养基平均数	被检培养基占对照培养基的比值	结果
白色念珠菌	58	60	0.97	符合规定
黑曲霉	51	54	0.94	符合规定

3.2.2 结果分析

被检培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在0.5~2范围内,且菌落形态大小应于对照培养基上的菌落一致。被检培养基符合规定。

3.3 供试液制备

无菌条件取10ml聚乙二醇400加入预热至40℃无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH7.0)至100ml,置电热恒温振荡器上振

摇均匀，制成1: 10的供试液。

3.4微生物计数方法学验证

a. 试验组：取1: 10供试液9.9ml加入0.1ml含有1000CFU试验菌液；

b. 供试品对照组：取1: 10供试液9.9ml加入0.1ml稀释液；

c. 菌液对照组：测定所加的试验菌数，取9.9ml稀释液加入0.1ml含有1000CFU试验菌液。

d. 取试验组1ml置直径90mm的无菌平皿中，倾注15~20ml温度不超过45℃溶化的胰酪大豆胨琼脂和沙氏葡萄糖琼脂，每株试验菌每种培养基各制备2个平皿。混匀待凝固。

e. 取供试品对照组1ml置直径90mm的无菌平皿中，倾注15~20ml温度不超过45℃溶化的胰酪大豆胨琼脂和沙氏葡萄糖琼脂，每种培养基各制备2个平皿。混匀待凝固。

f. 取菌液组1ml置直径90mm的无菌平皿中，倾注15~20ml温度不超过45℃溶化的胰酪大豆胨琼脂和沙氏葡萄糖琼脂，每株试验菌每种培养基各制备2个平皿。混匀待凝固。

g. 各组已凝固胰酪大豆胨琼脂的平皿倒置30-35℃培养需氧菌时间不超过3天，将各组已凝固沙氏葡萄糖琼脂20-25℃霉菌和酵母菌培养时间不超过5天。

3.4.1结果判断

试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值应在0.5-2范围内。（见表五、表六）

3.4.2结论

根据常规法平皿法测定聚乙二醇400的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数，方法适用性检查符合规定。

3.5供试品的检查

3.5.1检验量

一般随机抽取不少于2个最小包装的供试品，混合，取10ml。

3.5.2供试品的计数检查

取1: 10供试液10倍稀释1: 100、1: 1000三个稀释级。各稀释级供试液1ml，置直径90mm的无菌平皿中，倾注15-20ml温度不超过45℃溶化的胰酪大豆胨琼脂，取1: 10、1: 100供试液两个稀释级，各稀释级供试液1ml，置直径90mm的无菌平皿中，倾注15-20ml温度不超过45℃溶化的和沙氏葡萄糖琼脂，每株试验菌每种培养基各制备2个平皿。混匀待凝固。需氧菌胰酪大豆胨琼脂平板30~35℃培养3~5天，霉菌和酵母菌沙氏葡萄糖琼脂平板20-25℃培养时间过5~7天。

3.6结果如下（见表七）：

3.6.1结果判定

观察菌落生长情况，点计平板上生长的所有菌落数，计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数，点计菌落数后，计算各稀释级供试液的平均菌落数，按菌数报告规则报告菌数，若同稀释级两个平板的菌落平均数不小于15，则两个平板的菌落数不能相差一倍或以上。需氧菌总数测定宜

表五 方法适用性检查结果

需氧菌总数计数		金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
试验组	1	65	67	66	60	62	58	45	42	44	52	58	59	40	42	39
	2	59	61	62	56	58	56	47	40	46	54	52	53	36	40	35
	平均	62	64	64	58	60	57	46	41	45	53	55	56	38	41	37
菌液对照组	1	69			62			46			59			45		
	2	71			65			44			62			41		
	平均	70			64			45			60			43		
供试品对照组	a	平均			0			0			0			0		
	b	平均			0			0			0			0		
	c	平均			0			0			0			0		
(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组=		0.89	0.91	0.91	0.91	0.94	0.89	1.02	0.91	1	0.88	0.92	0.93	0.88	0.95	0.86

表六 方法适用性检查结果

霉菌和酵母菌计数		白色念珠菌			黑曲霉		
		1	2	3	1	2	3
试验组	1	57	54	53	46	42	47
	2	61	51	51	42	40	41
	平均	59	53	52	44	41	44
菌液对照组	1	58			45		
	2	56			47		
	平均	57			46		
供试品对照组	a	平均			0		
	b	平均			0		
	c	平均			0		
(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组=		1.04	0.93	0.91	0.96	0.89	0.96

表七 供试品计数检查结果

聚乙二醇400批号	平皿号	需氧菌各稀释级菌落数			阴性对照	平皿号	霉菌和酵母菌各稀释级菌落数		阴性对照
		1: 10	1: 100	1: 1000			1: 10	1: 100	
		第五天	第五天	第五天			第七天	第七天	
20211101	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	2	0	0	0
	平均数	0	0	0	0	平均数	0	0	0
20211102	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	2	0	0	0
	平均数	0	0	0	0	平均数	0	0	0
20211103	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	2	0	0	0
	平均数	0	0	0	0	平均数	0	0	0

选取平均菌落数小于300cfu的稀释级、霉菌和酵母菌宜选取平均菌落数小于100cfu的稀释级，作为菌数报告的依据，取最高的平均菌落数，计算1ml供试品中所含的微生物数，取两位有效数字报告。如各稀释级的平板均无菌落生长，或仅最低稀释级的平板有菌落生长，但平均菌落数小于1时，以<1乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

4 结论

根据以上验证结果，用常规平皿法测定聚乙二醇400需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的检查，验证过程中发生的异常情况，按照《偏差处理程序》进行处理。再验证时，检验条件发生改变可能影响检验结果。

参考文献

[1]《中国药典》2020版四部1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法

(上接第1391页)

[2] UNESCO ICT Competency Framework for Teachers [EB/OL]. [2016-8-29]. <http://www.unesco.org/new/en/communication-and-information/access-to-knowledge/unesco-ict-competency-framework-for-teachers/>.

[3] ISTE. Standards for teachers. [DB/OL]. [2016-06-30]. <http://www.iste.org/standards/standards/standards-for-teachers>.

[4] 何克抗等. 教育技术学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2009: 93-94.

[5] 罗婷婷. 教育信息化发展背景下关于“教师信息素养”研究的文献综述[J]. 开封文化艺术职业学院学报, 2020, (7).

[6] 姜安琪, 孔凡贵, 梁宇晨, 李建新. 中小学教师信息素养: 问题与策略[J]. 世界教育信息, 2020, (8).

[7] 雷军, 王迪, 刘琼. 融媒体时代教师信息素养培育路径研究[J]. 教育评论, 2020, (5).

[8] 王涛. 教育信息化背景下高校教师信息素养的培养路径[J]. 师资建设, 2020年1月.

[9] 武澎. 美国高校信息素养教育研究[D]. 开封: 河南大学, 2009.

[10] Michael B. Eisenberg, Laura Eisenberg

Robinson, Laura I. Robinson, The Super 3: Information Skills for Young Learners[M]. Worthington: Linworth Publishing, 2007.

[11] 蒋维西. “技术反哺”: 老教师信息素养提升的重要途径[J]. 教育理论与实践, 2017, 37(26): 30-33.

[12] 胡钦太, 刘丽清, 张彦. 教育信息化2.0时代教师信息素养提升路径[J]. 中小学数字化教学, 2019, (11): 22-25.

[13] 桑国元, 董艳. 论“互联网+”时代教师信息素养内涵演进及其提升策略[J]. 电化教育研究, 2016, (11): 108-112.

[14] 罗婷婷. 教育信息化发展背景下关于“教师信息素养”研究的文献综述[J]. 开封文化艺术职业学院学报, 2020, (7).

[15] 姜安琪, 孔凡贵, 梁宇晨, 李建新. 中小学教师信息素养: 问题与策略[J]. 世界教育信息, 2020, (8).

[16] 雷军, 王迪, 刘琼. 融媒体时代教师信息素养培育路径研究[J]. 教育评论, 2020, (5).

[17] 王涛. 教育信息化背景下高校教师信息素养的培养路径[J]. 师资建设, 2020年1月.