

药品微生物检验系列干燥培养基的研制和质量控制

沈祥熙 邵惠琴

(浙江省药品检验所,杭州)

摘要 标准化和成品化的培养基在药品微生物检验中非常重要,是保证其检验结果正确性与统一性的基础之一。为建立这一基础,本文研制了药检全系列干燥培养基,并制订了有关的质量控制标准。三年多的试用结果表明,凡按所订质量标准生产的干燥培养基,均符合药检工作的要求,质量可靠,使用方便,省时省力。

关键词 药品微生物检验;药品卫生学检验;干燥培养基

许多发达国家的培养基商品化程度甚高。国内也曾有化妆品微生物检验系列干燥培养基的研制和质量控制的报道^[1]。为使药品微生物检验用培养基标准化和成品化,提高药品质量管理中微生物检验水平,本文对药品微生物检验系列干燥培养基及质量控制进行了研究。现将研究结果简要介绍如下。

材料和方法

(一) 菌种

藤黄八叠球菌 28001 (简称八叠),产芽孢梭状芽孢杆菌 64941 (简称生孢),金黄色葡萄球菌 26003 (简称金葡),大肠埃布氏菌 44102 (简称大肠),绿脓假单胞菌 10104 (简称绿脓),枯草芽孢杆菌 63501 (简称枯草),乙型副伤寒沙门氏菌 50094 (简称沙氏),白色念珠菌(简称白念)。以上菌种均由中国药品生物制品检定所提供。

(二) 培养基

1. 无菌试验用培养基:有硫乙醇酸盐(需、厌气菌)培养基,霉菌培养基,均按中国药典^[2]的配方分别制成干燥培养基。

2. 增菌用培养基:有胆盐乳糖增菌液培养基,肉汤培养基。

3. 鉴别试验用培养基:有伊红美蓝琼脂,十六烷三甲基溴化铵琼脂,麦康凯琼脂,S.S琼脂,克氏双糖铁琼脂,三糖铁琼脂,硝酸盐胨水,

明胶十六烷三甲基溴化铵琼脂,西蒙氏枸橼酸盐琼脂,磷酸盐葡萄糖蛋白胨水,蛋白胨水,5%乳糖发酵液,TMP琼脂,PDP琼脂,半固体培养基。

4. 计数用培养基:有肉汤琼脂,虎红琼脂。

以上2—4项培养基均按《药品微生物学及检验技术》^[3]的配方分别制成干燥培养基与非干燥培养基。

(三) 干燥培养基的质量测定方法

1. 理化性质的测定:观察干燥培养基的各种性状,并测定其pH值和干燥失重百分值。

2. 微生物学测定:无菌试验用培养基按中国药典的方法检查灵敏度^[2]。其他培养基参照《药品微生物学及检验技术》进行测定^[3]:增菌用培养基按规定^[3]均制成100ml(三角瓶装),加入相应的试验菌,检查其增菌效果;鉴别试验用培养基检查规定菌生长特征;计数用培养基检查菌落生长率及其形态特征。

3. 实用效果考核:结合日常药品检验工作,比较干燥培养基与非干燥培养基在药品微生物检验中的使用效果。

结果和讨论

(一) 干燥培养基的理化性质测定结果

每种试验用的干燥培养基各测三个以上批号的产品,分别测定,结果见表1,2。

(二) 干燥培养基的微生物学测定结果

表1 固体培养基的理化性质测定结果

检测项目 培养基	外 观			加热溶解	凝固状态			pH±0.2	干燥失重%
	颜色	颗粒细度	潮块		颜色	透明度	硬结度		
伊红美蓝	蔷薇红	流体状粉末	无	易	紫红	微	划线培养不裂	7.4	<5.5
枸橼酸盐	黄	同上	无	易	绿	微	同上	7.1	<5.0
十六烷溴化铵	米黄	同上	无	易	乳白	半	同上	7.5	<7.0
明胶十六烷溴化铵	米黄	同上	无	易	乳白	半	同上	7.5	<7.0
S.S琼脂	淡棕黄	同上	无	易	桔黄	半	同上	7.4	<5.5
PDP琼脂	米黄	同上	无	易	淡黄	半	同上	7.5	<6.5
TMP琼脂	肉色	同上	无	易	砖红	半	同上	7.5	<5.0
克氏双糖铁	蔷薇红	同上	无	易	桔红	半	同上	7.4	<5.0
三糖铁	同上	同上	无	易	桔红	半	同上	7.4	<5.0
虎红琼脂	粉红	同上	无	易	亮红	半	同上	5.9	<6.5
肉汤琼脂	淡黄	同上	无	易	淡黄	半	同上	7.4	<5.0
半固体琼脂	奶黄	同上	无	易	淡黄	半	不流动可振碎	7.5	<5.0
麦康凯琼脂	肉色	同上	无	易	砖红	半	划线培养不裂	7.4	<5.0

表2 液体培养基的理化性质测定结果

检测项目 培养基	外 观			加热溶解	溶 液 状 态				pH±0.2	干燥失重 %
	颜色	颗粒细度	潮块		颜色	澄明	混浊	沉淀		
硫乙醇酸盐	淡黄	流体状粉末	无	易	淡黄表面粉或蓝	+	-	-	7.2	<5.0
霉菌培养基	米黄	同上	无	易	淡黄	+	-	-	5.9	<5.0
胆盐乳糖	淡黄	同上	无	易	棕	+	-	微量	7.4	<5.0
肉汤培养基	米黄	同上	无	易	棕黄	+	-	-	7.5	<5.0
硝酸盐胨水	米黄	同上	无	易	淡黄	+	-	-	7.3	<5.0
磷酸盐葡萄糖胨水	米黄	同上	无	易	淡黄	+	-	-	7.3	<5.0
蛋白胨水	奶黄	同上	无	易	棕黄	+	-	-	7.1	<5.0
5%乳糖液	黄绿	同上	无	易	紫罗兰	+	-	-	7.4	<5.0

1. 两种无菌试验用培养基共测定18个批号的产品(每种测9批),其灵敏度试验结果完全一致,均符合中国药典的规定^[2]。

表3 无菌试验用培养基灵敏度试验结果

培养基	硫乙醇酸盐培养基		霉菌培养基
试验菌	八叠	生孢	白念
加菌量	60个	10个	30个
生长情况	+	+	+

2. 增菌用及鉴别试验用培养基每种各测试三个批号的产品,结果(表4,5)与非干燥培养

基的试验结果完全相同,均符合要求^[3]。

3. 将大肠、金葡、枯草的16小时液体培养物和白念72小时液体培养物稀释至 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 浓度,分别取1ml稀释液平板法^[4]活菌计数,将干燥的肉汤琼脂和虎红琼脂培养基上所统计50个数据,与非干燥的这两种培养基上所统计的相对应的50个数据进行统计比较, $P > 0.05$,二者菌落生长率无显著差异,说明干燥培养基与非干燥培养基的计数效果基本一致。而且二者菌落均呈现典型特征,完全相同。

(三) 实用效果考核

自1987年10月至1991年2月,试用干燥培养基共检测各种药品3000余批,结果均准确,

表 4 增菌培养基的检测结果

培养基	胆盐乳糖增菌液 (100ml)			肉汤 (100ml)	
试验菌	大肠	绿脓	沙氏	金葡	枯草
加菌量	50—100 个	50—100 个	50—100 个	50—100 个	50—100 个
生长情况	+	+(绿色、菌膜)	+	+	+

表 5 鉴别培养基的检测结果

培养基	试验菌	结 果
伊红美蓝	大肠	紫黑色圆形菌落,有金属光泽,直径 2—2.5mm
伊红美蓝	沙氏	无色半透明圆形菌落,光滑、湿润,稍隆起,直径 2—2.5mm
麦康凯	大肠	粉红色圆形菌落,湿润,突起,直径 2—2.5mm
S.S 琼脂	大肠	红色圆形菌落,光滑、湿润,直径 2—2.7mm
S.S 琼脂	沙氏	半透明圆形菌,中心有黑褐点,边缘整齐,光滑湿润,稍隆起,直径 2—2.5mm
十六烷溴化铵	绿脓	灰白色、扁平、光滑湿润菌落,边缘不齐,周围有绿色色素,大小不一
明胶十六烷溴化铵	绿脓	同上,液化明胶、臭味
克氏双糖铁	沙氏	高层斜面上红并有黑褐色,下黄,且有气泡断层,运动
三糖铁	沙氏	同上
枸橼酸盐	大肠	不生长
枸橼酸盐	沙氏	灰白色菌苔,斜面变为深蓝色
硝酸盐胨水	绿脓	混浊,蓝绿色、产气
蛋白胨水	大肠	混浊,加试剂上层玫瑰红
磷酸盐胨水	大肠	混浊,加试剂变红
PDP 琼脂	绿脓	扁平、光滑,扩散生长,蓝绿色素,氯仿提取后加盐酸呈粉红
TMP 琼脂	金葡	墨黑色圆形菌落,隆起,边缘整齐,有黄色环,直径 0.7—1.6mm
5%乳糖液	大肠	混浊、变黄
半固体	绿脓	沿穿刺线扩散生长,变绿
半固体	沙氏	沿穿刺线扩散成雾状生长

未见任何异常情况。

(四) 干燥培养基的质控标准

从上述试验结果看,达到一定的理化及微生物学指标的干燥培养基能满足药检工作的要求。欲达到这两项指标,生产干燥培养基的单位就必须对其生产原料和生产工艺进行严格控制。

1. 原料: 各种原料必须经过试验后选定,未经试验不得随意更改,进厂后必须按各自制定的标准检验合格后方能投产。尤其是其中的生物试剂,如蛋白胨、胰酪胨、酵母浸出粉等应从严控制。不同厂牌的生物试剂,质量差异甚大。一般说来,进口的优于国产的,但对个别菌

也有例外,如武汉产 503 型蛋白胨比进口的更利于金葡色素的产生。最好针对不同的菌,对某种生物试剂进行一种牌号或几种牌号的配比选择,以达到培养基的高灵敏度和高准确性,才有可能达到高经济效益。如将进口胨与武汉 503 型胨混用,既可保证对金葡菌的高灵敏度,又可保证色素的产生,使菌呈典型生长;又如将进口胨与国产胨合用(1:1)生产无菌试验用培养基,既可保证灵敏度又可大大降低生产成本。另外,在使用国产生物试剂时还应注意控制水分和水不溶性杂质的含量。水分过高会导致生产困难,易使成品潮解变性;水不溶性杂质易导致培养基混浊沉淀,影响培养结果的观察判断。

水分宜控制在5%以下,水不溶性杂质应基本没有。琼脂粉也应作如此控制。各种化学试剂要求略低,但宜使用分析纯级。厌氧指示剂宜采用刃天青。亚甲基蓝则指示不甚明显,观察困难。

2. 生产工艺: 选料→烘干→配料→球磨→半成品检验→分装→成品检验→成品入库。

烘干应彻底,配料应准确,球磨应碎匀。

3. 理化指标: 外观性状及质量的初步鉴别检查应包括颜色、干粉的粉碎情况及溶解性能。液体培养基应控制澄明度,固体培养基应控制透明度及凝固度。进一步的测试控制指标包括pH值和水份含量,前者配方中已明确规定^[3],一定要达到,后者是因干粉容易潮解变质应要求控制的,适宜的水分含量(烘干法)应控制在5%以下。此外,关于部分培养基灰分较高的控制指标似无多大意义。

4. 微生物学指标: 是最重要的一项。主要控制培养基的灵敏度和准确性。液体培养基主要控制灵敏度。因为很大部分菌的液体生长特征不明显,均为混浊、沉淀,较难确定准确的判定指标。对一些典型特征如菌膜、色素、荧光等,也应进行控制。液体培养基的测定方法宜采用通常的做法,即在10ml系列管中,接种对照菌100个、10个、1个各三支,控制10个菌三管均生长这一指标。固体培养基主要通过控制菌落生长率、菌落大小及形态特征来保证灵敏度和准确性。本试验中,固体鉴别培养基均

采用划线或穿刺接种,故只控制了菌落形态特征,未控制灵敏度,有待补充完善。

(五) 小结

试验结果表明,通过严格质控生产的干燥培养基,质量稳定可靠,优于非干燥培养基。非干燥培养基按常规法配制,常因操作不同或原料不同而导致药品检验结果的误差,又难做到每批培养基都进行质控,故使消除误差的措施无法保证。干燥培养基通过严格质控生产,不仅质量稳定可靠,药检结果准确,而且减少了使用者选料、配制、质检等手序,使用时一次称量,加水溶解即可。使用方便,省时省力。

干燥培养基易受潮变性是其存在的主要问题,以无菌试验中霉菌培养基最为突出。建议: ①加强包装的密封性能; ②发展小包装生产,以便开启后一次用完,避免使用过程中受潮; ③使用时尽量缩短开盖时间; ④易受潮的品种如霉菌培养基,启用后宜放入干燥器中保存。此外,由于配制用水不同或启用时间及次数增加,干燥培养基的pH值可能有所降低,应随时略加调整。

参 考 文 献

1. 梁君谋: 微生物学通报, 16(4): 224~227, 1989.
2. 中华人民共和国卫生部药典委员会: 中华人民共和国药典, 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990.
3. 郑钧镛等: 药品微生物学及检验技术, 人民卫生出版社, 1989.