

油浴仪测定生物指示剂菌种在氯化钠注射液中 D 值影响因素研究

申景丰¹ 蒋芙蓉¹ 汤平¹ 余卫国¹ 夏博¹ 陈超^{2*}

1. 湖南科伦制药有限公司; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心

摘要: 本文以研究油浴仪法测定 D 值的影响因素为目的, 采用残存曲线法多次测定同一批嗜热脂肪芽孢杆菌在氯化钠注射液中的 D 值, 根据不同条件下 D 值测定结果的比较, 确定 D 值测定的影响因素。通过比较 0.05 mL、0.5 mL、1.0 mL 三种菌液量, 以及毛细管、安瓿瓶两种分装方式的测定结果发现, 安瓿瓶分装 0.5 mL 菌液 6 次测定 D 值均在标示 D 值的 80% ~ 120% 之间, 测定结果准确稳定。因此, 本文建议油浴仪测定 D 值时将菌液分装在安瓿瓶中, 每瓶分装 0.5 mL, 并关注油浴仪温度的均匀性和稳定性。

关键词: 油浴仪; 生物指示剂; 菌种; D 值; 残存曲线法; 氯化钠注射液

在湿热灭菌工艺中, 可以通过检验生物指示剂灭菌后的存活情况来验证灭菌效果^[1-5]。生物指示剂是指将特殊活微生物采用特定方法制备成对特定灭菌工艺有耐受性的一种生物制品, 一般选用比普通微生物有更强耐受性的微生物^[4]。生物指示剂目前主要有三种类型: 芽孢悬液型、自含式、载体型生物指示剂^[6-10]。

评估生物指示剂的关键技术参数主要有总芽孢数、D 值。总芽孢数即产品存活孢子数。D 值指在一定暴露条件下, 将试验微生物杀灭 90% 所需的灭菌时间 / 剂量^[11-13]。D 值越大说明微生物死亡速率越慢, 耐热性也越强。D 值会受到菌种、细菌或芽孢菌悬液的性质、灭菌温度 / 剂量影响, 不受初始细菌数

量的影响。

D 值在灭菌设备的性能确认、特定灭菌工艺的开发、生产过程灭菌效果的检测及评估方面具有重要作用。检测 D 值的方法主要有阴性分数法和残存曲线法^[14], 测定的 D 值应在标示 D 值的

80% ~ 120% 之内。

为验证拟定的灭菌工艺是否能让产品达到要求的无菌保证水平, 本研究以油浴仪测定嗜热脂肪芽孢杆菌在氯化钠注射液中的 D 值为例, 分析油浴过程并确定关键点, 建立油浴仪残存曲线

表 1 嗜热脂肪芽孢杆菌孢子悬液产品信息

名称	嗜热脂肪芽孢杆菌 (ATCC7953) 孢子悬液
批号	SSS-942
规格	10 mL
标示 D 值 (121.0℃)	2.2 min
标示 Z 值	8.2℃
标示含量	2.0 × 10 ⁷ CFU/0.1 mL
来源	美国 Mesalabs 公司

表 2 试验样品

样品	规格	批号
0.9% 氯化钠注射液	100 mL ; 0.9 g	E22050701、S21101107、T21090806、S22010803

表 3 培养基

名称	胰酪大豆胨琼脂培养基
批号	20220225
来源	青岛高科技工业园海博生物技术有限公司

作者简介: 申景丰为本文第一作者, 执业药师, 主要从事药品研发、生产和质量管理; 陈超为本文通讯作者, 主管药师, 主要从事药事管理, 药物制剂研究。

表 4 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
电热恒温培养箱	DNP-9272	上海精宏实验设备有限公司
生物安全柜	BSC-1304 II A2	苏州安泰空气技术有限公司
医用冷藏箱	HYC-650	青岛海尔生物医疗股份有限公司
数显超级恒温油浴锅	HH-SA	金坛市晶玻实验仪器厂
漩涡混悬仪	WH-3	上海沪西分析仪器厂有限公司

法测定 D 值方法，测定嗜热脂肪芽孢杆菌在氯化钠注射液中的 D 值，并根据试验结果指导产品灭菌工艺生物学挑战验证。

1 材料

本实验主要使用以下试剂、培养基和仪器（见表 1、表 2、表 3、表 4）。

2 方法与结果

采用油浴仪测定嗜热脂肪芽孢杆菌在氯化钠注射液中的 D 值，分析油浴过程并确定关键点，建立油浴仪残存曲线法测定 D 值方法。

2.1 油浴仪结构

油浴仪是一种可以设定 100℃ 以上的恒温设备，由机箱、恒温油槽、控温系统等 3 部分组成。油浴仪以硅油为介质，控温系统控制油浴仪的各个位置温度的均一性。结构见图 1。

2.2 供试品 D 值测定试验方法

菌液体积选择 0.05 mL、0.5 mL、

1 mL 三种，其中 0.05 mL 菌液每组共 6 支毛细管；0.5 mL 和 1 mL 菌液每组共 4 支。

2.2.1 孢子悬液的供试品溶液制备

取合格的孢子悬液，加入到氯化钠注射液中，将孢子悬液制备成孢子数为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL 的供试品溶液。其中，0.05 mL/支毛细管的 D 值测定孢子悬液取样体积为 0.05 mL；安瓿瓶测定需要菌液体积孢子悬液体积分别为 0.5 mL 或 1 mL。

2.2.2 分装和密封

采用注射器将 0.05 mL 菌液注射至毛细管中，采用移液器将 0.5 mL、1 mL 菌液转移至安瓿瓶中。采用酒精喷灯对上述样品进行封口，封口时避免酒精喷灯火焰对孢子造成损伤。封口后，进行封口效果检测，排除漏液的样品。

2.2.3 灭菌处理

将制备好的含孢子悬液的供试品分为 7 组，于 121℃ 恒温油浴锅中进行灭菌处理，每组灭菌时间分别为 0 min、2.5 min、5 min、7.5 min、10 min、12.5 min、19 min。灭菌后，样品放入冰水中冷却，并冷藏，在 2 h 内进行残

余孢子计数。

2.2.4 残余孢子计数

将各试验组样品，置于超声波仪上充分混匀，表面消毒后，取出供试品液（尽可能全部取出，无明显残留）。未经灭菌处理的样品在 95℃ ~ 100℃ 水浴热激 15 min（以供试品达到设定温度开始计时），热激完成后取出样品，迅速放入冰水中冷却。采用 10 倍递增稀释法，逐级稀释至适宜梯度进行计数，其余组混匀后直接稀释计数。

2.2.5 数据处理

根据培养计数结果，取灭菌时间为横坐标，存活孢子数的对数值为纵坐标作图，D 值为该直线斜率的负倒数，计算嗜热脂肪芽孢杆菌孢子在溶液中的 D 值。

计算公式： $y=kx+b$ $D_{121℃}=-1/k$ （式中：k 为直线方程式的斜率）。

结果判断：计算出孢子悬液在产品介质溶液中的 D 值与孢子悬液标示 D 值比较，判断所测 D 值是否在标示 D 值的 80% ~ 120% 范围内，线性回归 R^2 需大于 0.80。

2.3 试验结果

采用油浴仪对孢子悬液 D 值测定共 10 次：其中分装 0.05 mL 菌液（采用毛细管分装）试验 2 次；1 mL 菌液（采用安瓿瓶分装）试验 2 次；0.5 mL 菌液（采用安瓿瓶分装）试验 6 次。

2.3.1 0.05 mL 菌液 D 值测定结果

采用毛细管分装 0.05 mL 菌液，样品分为 7 组，每组 6 支，油浴后，进行

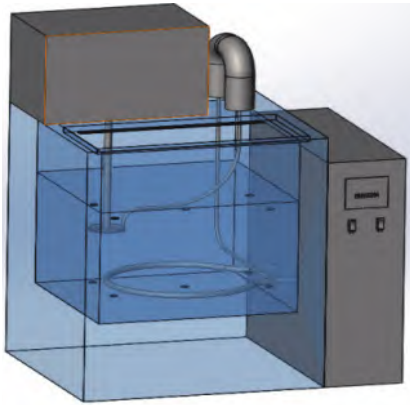


图 1 油浴仪结构图

表 5 0.05 mL 菌液 D 值测定

灭菌时间 (min)	第一次		第二次	
	报告数据 (cfu/mL)	lg 值	报告数据 (cfu/mL)	lg 值
0	6.4×10^5	5.81	4.9×10^5	5.69
2.5	1.8×10^5	5.25	1.2×10^5	5.08
5	1.8×10^4	4.25	9.5×10^3	3.98
7.5	4.1×10^3	3.61	2.9×10^3	3.46
10	1.4×10^2	2.15	5.8×10^2	2.76
12.5	24	1.38	66	1.82

表 6 1 mL 菌液 D 值测定

灭菌时间 (min)	第一次		第二次	
	报告数据 (CFU/mL)	lg 值	报告数据 (CFU/mL)	lg 值
0	5.3×10^5	5.72	1.3×10^5	5.11
2.5	2.5×10^4	4.40	1.9×10^4	4.28
5	3.5×10^3	3.54	3.2×10^3	3.50
7.5	8.1×10^2	2.91	4.4×10^2	2.65
10	2.1×10^2	2.32	1.4×10^2	2.13
12.5	40	1.60	29	1.46

表 7 0.5 mL 菌液 D 值测定

灭菌时间 (min)	第一次		第二次	
	报告数据 (CFU/mL)	lg 值	报告数据 (CFU/mL)	lg 值
0	9.4×10^5	5.97	1.1×10^6	6.04
2.5	3.4×10^4	4.53	2.4×10^5	5.38
5	9.1×10^2	2.96	2.0×10^4	4.29
7.5	13	1.11	1.8×10^3	3.25
10	4	0.60	3.8×10^2	2.57
12.5	1	0.00	19	1.28
灭菌时间 (min)	第三次		第四次	
	报告数据 (CFU/mL)	lg 值	报告数据 (CFU/mL)	lg 值
0	3.2×10^5	5.50	9.0×10^5	5.95
2.5	4.0×10^4	4.60	8.0×10^4	4.90
5	2.0×10^3	3.31	1.1×10^4	4.05
7.5	3.2×10^2	2.51	1.3×10^3	3.10
10	31	1.49	50	1.70
12.5	2	0.30	8	0.90
灭菌时间 (min)	第五次		第六次	
	报告数据 (CFU/mL)	lg 值	报告数据 (CFU/mL)	lg 值
0	8.4×10^5	5.93	6.1×10^5	5.79
2.5	1.6×10^5	5.20	1.3×10^5	5.12
5	8.0×10^3	3.91	1.1×10^4	4.03
7.5	1.3×10^3	3.09	2.2×10^3	3.33
10	81	1.91	79	1.90
12.5	15	1.18	7	0.85

表 8 D 值计算结果

	k 值	R ²	标示 D 值 (min)	D 值 (min)	测定 D 值占标示 D 值的 百分比
0.05 mL (1)	-0.3677	0.98	2.2	2.7	124%
0.05 mL (2)	-0.3066	0.99	2.2	3.3	148%
0.5 mL (1)	-0.4970	0.96	2.2	2.0	91%
0.5 mL (2)	-0.3801	0.99	2.2	2.6	119%
0.5 mL (3)	-0.4127	1.00-	2.2	2.4	110%
0.5 mL (4)	-0.4092	1.00-	2.2	2.4	111%
0.5 mL (5)	-0.3937	0.99	2.2	2.5	115%
0.5 mL (6)	-0.4006	0.99	2.2	2.5	113%
1 mL (1)	-0.3140	0.98	2.2	3.2	145%
1 mL (2)	-0.2920	0.99	2.2	3.4	156%

残余孢子数计数。共试验 2 次，结果见表 5。

2.3.2 1 mL 菌液 D 值测定结果

采用安瓿瓶分装 1 mL 菌液，样品分为 7 组，每组 4 支，灭菌时间间隔为 2.5 min，油浴后，进行残余孢子数计数。共试验 2 次，计数结果见表 6。

2.3.3 0.5 mL 菌液 D 值测定结果

采用安瓿瓶分装 0.5 mL 菌液，样品分为 7 组，每组 4 支，灭菌时间间隔为 2.5 min，油浴后，进行残余孢子数计数。共试验 6 次，计数结果见表 7。

2.3.4 D 值计算

取灭菌时间为横坐标，存活孢子数的对数值为纵坐标，D 值为该直线斜率的负倒数，计算公式： $y=kx+b$ ， $D_{121℃}=-1/k$ （式中： k 为直线方程式的斜率）。D 值计算结果见表 8。

3 讨论

3.1 D 值测定结果分析

根据油浴仪残存曲线法 D 值测定结果分析，由表 8 可知：采用 0.5 mL 菌液体积的试验，测定 D 值为标示 D 值的 91%、119%、110%、111%、115%、113%，均在标示值的 80% ~ 120% 之间，而采用 0.05 mL 菌液体积测定 D 值为标示 D 值的 124%、148%，采用 1 mL 菌液体积测定 D 值为标示 D 值的 145%、156%，均未在标示 D 值的 80% ~ 120% 之间。因此采用 0.5 mL 菌液体积进行 D 值测定较好，测定 D 值更准确。

3.2 不同菌液量之间的比较

不同的菌液体积影响了菌液的分装载体，0.05 mL 菌液体积采用毛细管分装，0.5 mL 和 1 mL 菌液采用安瓿瓶进行分装。① 样本用量比较：采用毛细管进行 D 值测定，每组样品≥ 6 支，安瓿瓶每组

样品 ≥ 4 支,在分装次数上安瓿瓶分装次数少于毛细管,但总体积为毛细管最少。②分装方法比较:毛细管采用注射分装体积,分装时针头需伸入毛细管中,而安瓿瓶采用移液器进行分装,因此采用安瓿瓶分装比毛细管分装更简便。③载体比较:载体不同也会对样品孢子回收率产生影响,毛细管体积小,回收困难,回收率低。④油浴温度的影响:菌液体积越大吸收的热量越多,对油浴温度的影响也越大,对样品的灭菌效果出现较大的影响。

3.3 仪器性能对于D值测定的影响

影响测定嗜热脂肪芽孢杆菌在氯化钠注射液中D值的主要因素为温度、时间,而其中温度对于灭菌效果的影响非常显著。采用油浴仪进行D值测定,油浴仪对温度稳定控制较弱,采用循环管道平衡各位置的温度,受循环泵和硅油流动速度的影响,油浴仪各位置温度均一性较差。由于油浴仪内的样品放置的位置不同,因此每个样本所处位置的温度不完全一致,放入样品后,吸收热量导致局部温度出现下降,灭菌效果下降,可能会对测试结果有一定影响。这也可能是上述实验结果中测定的D值均比标示D值大的原因之一,真实值比测定值小,出现误差。因此,测定D值所需的硬件设备对于D值测定准确性至关重要。

参考文献:

- [1] 张启林,林晶晶.湿热灭菌工艺验证探讨[J].中国医药工业杂志,2021,52(08):1106-1114.
- [2] 韩晗,徐敏凤,魏佳鸣.湿热灭菌课题的相关研究与思考[J].中国药品标准,2019,20(04):298-304.
- [3] 肖璜,马仕洪,崔强等.应用

于湿热灭菌的生物指示剂现状与分析[J].微生物学杂志,2014,34(04):77-79.

- [4] 尚海滨.压力蒸汽灭菌法在中药制剂生产中的应用[J].机电信息,2013(26):33-3851.
- [5] 陈世鹏,董炎超.应用生物指示剂验证蒸汽灭菌器的灭菌效果[J].流程工业,2021(7):51-53.
- [6] 胡昌勤.药品微生物控制体系建设现状与展望[J].中国现代应用药学,2021,38(05):513-519.
- [7] The United States Pharmacopeial Convention.USP36-NF31,1[M].United States:United Book press,2012:536-539.
- [8] 医疗保健产品灭菌生物指示剂选择/使用及检验结果判断指南[S].GB/T 19972-201805/ISO 14161:2009.
- [9] 医疗保健产品灭菌生物指示物第1部分通则[S].GB 18281.1-2015/ISO 11138-1:2006.
- [10] 龚海燕,张明,李倩等.灭菌生物指示剂与指示微生物[J].环境卫生学杂志,2013,3(02):170-174.
- [11] XIAO H, GUO Z L, XIA M F, et al. Investigation of spore counting methods using self-contained pressure biological indicator for steam sterilization[J]. China Pharm(中国药师),2015,18(7):1110-1112.
- [12] 朱冉,许华玉,宋宗华.2020年版《中国药典》四部微生物控制体系的增修订概况及展望[J].中国药理学杂志,2020,55(19):1564-1568.
- [13] 中国药典2020版第四部9208生物指示剂耐受性检查法指导原则
- [14] 马仕洪,王似锦,熊骏等.阴性分数法和残存曲线法测定湿热灭菌用内含式生物指示剂D值的比较[J].中国医药工业杂志,2018,49(05):667-671.

FLYGER®
英国弗莱戈阀门

致力于生物制药行业
阀门应用及解决方案



无论您面临何种工况,
我们承诺为您提供完善的阀门应用及解决方案!

英国FLYGER弗莱戈阀门一直致力于先进流体控制阀门的设计、制造和服务,始终秉承“阀门应用专家,有价值的服务”的价值服务理念;关注并深刻理解客户需求,针对性定制生物制药行业阀门应用及解决方案;为用户提供卓越品质阀门产品和专业的流体控制解决方案。并不断以卓越的产品和价值服务,成就FLYGER和客户的共同价值生态。

球阀 蝶阀 调节阀 隔膜阀 止回阀 截止阀 闸阀
刀闸阀 陶瓷阀 衬氟阀 釜底放料阀 执行机构
特殊定制阀门



销售总部

地址:上海市七莘路1839号
财富108广场北楼20层
电话: +86-21-60712361
传真: +86-21-60712363

成都工厂

地址:四川省成都市经济技术开发区
(龙泉驿)南二路309号
电话: +86-28-85156020
传真: +86-28-85151711

资阳工厂

地址:四川省资阳市高新区兴城大道10号
电话: +86-28-88428198
传真: +86-28-26838136
邮箱: flygersh@flyger.cn
合作热线:18802108887



官方网站



微信公众号

阀门应用专家 有价值的服务

广告