

Analysis and Discussion on Microbiological Monitoring of Purified Water by Drug Inspection Institutions

Xiaomin Ling, Yanfei Zhong, Haiming Liang

Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou Guangdong
Email: 495635979@qq.com

Received: Mar. 20th, 2020; accepted: Apr. 3rd, 2020; published: Apr. 10th, 2020

Abstract

Objective: Microbial monitoring of the purified water system of the drug inspection agency to understand the microbes of the test water. **Methods:** Sampling was conducted at the main outlet, the main return outlet and each use point of the purified water, the test was conducted according to the microbial detection method under the purified water section of *Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 Part II*, and microbial monitoring was conducted regularly for 3 months. **Results:** The total outlet and total return outlet of purified water, microbiological limit are in line with the provisions; at 38 points of use, only 9 points of use are in compliance with the microbiological limit in 13 tests. **Conclusion:** The preparation, storage and distribution of purified water should be able to prevent the breeding and reproduction of microorganisms. In order to ensure the quality of test water and ensure that all points of use of purified water can be used, comprehensive control of purified water microorganism limits is required.

Keywords

Drug Inspection Institutions, Purified Water, Microbiological Monitoring, *Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015*

药品检验机构对纯化水微生物监测的分析与探讨

凌晓敏, 钟燕飞, 梁海明

广东省药品检验所, 广东 广州
Email: 495635979@qq.com

收稿日期：2020年3月20日；录用日期：2020年4月3日；发布日期：2020年4月10日

摘要

目的：对药品检验机构的纯化水系统进行微生物监测，了解试验用水微生物情况。方法：在纯化水总出水口、总回水口和各使用点进行取样，按《中国药典2015年版·二部》纯化水项下微生物检测方法进行检测，连续3个月定期进行微生物监测。结果：纯化水总出水口和总回水口，微生物限度均符合规定；38个使用点，仅有9个使用点在13次检验中微生物限度符合规定。结论：纯化水的制备、储存和分配应能防止微生物的滋生和繁殖，为确保试验用水质量，保障各纯化水使用点均可使用，需全面控制纯化水微生物限度合格。

关键词

药品检验机构，纯化水，微生物监测，中国药典2015年版

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

纯化水作为中国药典规定的试验用水，在药品检验机构广泛应用于药品检验分析各个领域，可用于各种化学试剂、诊断试剂的配制，各种仪器、设备、容器的清洗等，纯化水的质量直接关系到实验结果。药品生产质量管理规范(2010年修订)第99条规定：纯化水、注射用水的制备、贮存和分配应当能够防止微生物的滋生[1]，可以看出纯化水要求在符合其他质量标准的同时，也强调了对微生物的控制，因此，对纯化水的微生物进行监测显得很重要。为更好地加强纯化水的微生物监测，保障实验室试验用水的质量，确保试验结果的可靠性和有效性，现依据《中国药典2015年版·二部》纯化水项下微生物限度检测方法对某药品检验机构新建成的纯化水系统进行为期3个月定期的微生物限度监测并对监测情况进行分析探讨。《中国药典2015年版·二部》规定：纯化水为饮用水经蒸馏法、离子交换法、反渗透法或其他适宜的方法制得[2]。该药品检验机构纯化水系统采用反渗透法制备，反渗透法是利用膜处理技术，有效去除无机盐、有机物、细菌、热原、病毒、悬浊物等[3]。

2. 试验仪器与材料

2.1. 主要仪器设备

Milli-Q® CLX 7000 分析仪进水系统(Milli)，MIR-254-PC 生化培养箱(Panasonic)，1379 生物安全柜(Thermo)，HTY-602 集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司)，SCP6 PLUS 菌落计数器(英国 BIBBY)。

2.2. 培养基

R2A 琼脂培养基(批号 3104827)，pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液(批号 190128)，上述培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司。

2.3. 样品来源及取样方法

样品来源：总出水口 2 个、总回水口 2 个、实验室区域 38 个使用点出水口(东边实验室 17 个、西边实验室 21 个)。取样频率：总出水口与总回水口每周二次取样监测，其他出水口每周一次取样监测。取样方法：取样前，各取样点打开阀门排水 5 min，用已灭菌玻璃瓶直接取水，每个取水点取 2 瓶水样，每份取样量约 100 mL，取样结束立即盖好玻璃瓶盖。取样到检测的过程时间需要加以严格控制，应在取样结束 2 h 内完成检测。

3. 试验方法与结果

3.1. 试验方法

按照《中国药典 2015 年版·二部》纯化水项下规定[2]：采用薄膜过滤，取水样 1 mL 加至 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液 100 mL 中混匀，通过孔径 0.45 μm 的薄膜过滤器过滤，取出滤膜，菌面朝上，贴于 R2A 琼脂培养基平板上。同时取 pH 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液代替试验组中的纯化水样品按试验组方法操作，作为阴性对照。将培养皿倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 5 d，菌落计数。阴性对照不得有菌生长。

3.2. 试验结果

《中国药典 2015 年版·二部》纯化水项下规定：微生物限度标准为 1 mL 供试品中需氧菌总数不得过 100 cfu [2]。1 mL 样品中菌落总数超过 300 cfu，将不点计，表述为 >300 cfu/mL。如表 1 所示，总出水口和总回水口微生物限度检测结果均符合规定。如表 2 所示，东边实验室 17 个取样点，其中有 4 个取样点每次检测均符合规定，分别为 E-6、E-14、E-16、E-17；2 个取样点每次检测均不合格，分别为 E-3、E-4；其他 11 个取样点均出现部分检测结果不符合规定。如表 3 所示，西边实验室 21 个取样点，其中有 5 个取样点每次检测均符合规定，分别为 W-2、W-3、W-4、W-11、W-21；3 个取样点每次检测均不合格，分别为 W-5、W-6、W-13；其他 13 个取样点均出现部分检测结果不符合规定。各点合格率详见表 4。结果表明，该药品检验机构新建成的纯化水系统微生物限度合格率较低，可取水的使用点较少，仍需进一步排查出现不符合规定的原因，进行整改。

Table 1. Microbial limit detection data for total water outlet and total water return (unit: cfu/mL)

表 1. 总出水口和总回水口微生物限度检测数据(单位: cfu/mL)

| 取样时间 | 菌落数 | | | |
|------------|--------|--------|--------|--------|
| | 总出水口 1 | 总出水口 2 | 总回水口 1 | 总回水口 2 |
| 2019-01-14 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2019-01-17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-01-21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-01-24 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 2019-01-28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-02-12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-02-18 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2019-02-21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-02-25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-02-28 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Continued

| | | | | |
|------------|---|---|---|---|
| 2019-03-04 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-03-07 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-03-11 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2019-03-14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-03-18 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2019-03-21 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2019-03-25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-03-28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2019-04-01 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 2019-04-08 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 2019-04-11 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 2019-04-15 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 2019-04-18 | 0 | 4 | 1 | 0 |

注：总出水口 1 和总回水口 1 代表东边实验室纯化水罐总出水口和分配系统总回水口，总出水口 2 和总回水口 2 代表西边实验室纯化水罐总出水口和分配系统总回水口。

Table 2. Microbial limit detection data of 17 purified water use points in the eastern laboratory (unit: cfu/mL)

表 2. 东边实验室 17 个纯化水使用点微生物限度检测数据(单位: cfu/mL)

| 取样时间 | 菌落数 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | E-1 | E-2 | E-3 | E-4 | E-5 | E-6 | E-7 | E-8 | E-9 | E-10 | E-11 | E-12 | E-13 | E-14 | E-15 | E-16 | E-17 |
| 2019-01-14 | >300 | 117 | 136 | >300 | 120 | 33 | 114 | >300 | 65 | 123 | >300 | 292 | 93 | 89 | 119 | 0 | 55 |
| 2019-01-21 | >300 | >300 | 151 | >300 | 64 | 42 | 29 | >300 | 142 | 276 | >300 | >300 | 57 | 69 | 120 | 1 | 24 |
| 2019-01-28 | >300 | 141 | 134 | >300 | 18 | 33 | 206 | >300 | 169 | 125 | >300 | >300 | 221 | 64 | 254 | 11 | 10 |
| 2019-02-12 | 143 | >300 | >300 | >300 | 67 | 22 | 83 | >300 | 264 | 134 | 148 | 93 | 76 | 35 | 79 | 52 | 24 |
| 2019-02-18 | >300 | >300 | >300 | >300 | 13 | 11 | 13 | >300 | >300 | 58 | 112 | >300 | 55 | 44 | 73 | 2 | 8 |
| 2019-02-25 | 174 | >300 | >300 | >300 | 12 | 10 | 24 | >300 | >300 | 89 | 107 | 181 | 44 | 16 | 24 | 3 | 11 |
| 2019-03-04 | 111 | 281 | >300 | >300 | 48 | 23 | 16 | >300 | 205 | >300 | 121 | 162 | 33 | 15 | 27 | 1 | 3 |
| 2019-03-11 | 162 | 274 | >300 | >300 | 20 | 5 | 72 | >300 | 90 | 211 | 227 | >300 | 39 | 16 | 9 | 8 | 21 |
| 2019-03-18 | 223 | 272 | 202 | >300 | 7 | 10 | 185 | >300 | 66 | 167 | 144 | >300 | 17 | 10 | 15 | 2 | 9 |
| 2019-03-25 | 19 | 272 | >300 | >300 | 13 | 6 | 7 | >300 | 43 | 76 | 45 | >300 | 15 | 40 | 28 | 10 | 3 |
| 2019-04-01 | 51 | 153 | 173 | 215 | 29 | 20 | 21 | >300 | 60 | 277 | 226 | >300 | 23 | 16 | 17 | 9 | 15 |
| 2019-04-08 | 134 | 88 | >300 | >300 | 26 | 17 | 32 | >300 | 106 | 162 | 98 | 162 | 68 | 8 | 25 | 11 | 66 |
| 2019-04-15 | 98 | 187 | >300 | >300 | 42 | 51 | 137 | 52 | >300 | 272 | 195 | 148 | 166 | 57 | 77 | 16 | 46 |

Table 3. Microbial limit detection data of 21 purified water use points in the west laboratory (unit: cfu/mL)

表 3. 西边实验室 21 个纯化水使用点微生物限度检测数据(单位: cfu/mL)

| 取样时间 | 菌落数 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | W-1 | W-2 | W-3 | W-4 | W-5 | W-6 | W-7 | W-8 | W-9 | W-10 | W-11 | W-12 | W-13 | W-14 | W-15 | W-16 | W-17 | W-18 | W-19 | W-20 | W-21 |
| 2019-01-14 | 63 | 15 | 39 | 29 | 144 | 265 | >300 | 96 | 142 | 119 | 38 | 97 | >300 | 19 | 53 | >300 | >300 | 175 | 159 | 68 | 28 |
| 2019-01-21 | 32 | 7 | 7 | 9 | >300 | >300 | >300 | 76 | 219 | 88 | 81 | 27 | >300 | 5 | 50 | >300 | >300 | >300 | >300 | 65 | 55 |

Continued

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|----|----|----|------|------|------|------|------|------|----|------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|----|
| 2019-01-28 | 28 | 8 | 4 | 4 | 178 | >300 | >300 | 121 | 108 | 135 | 44 | 202 | >300 | 5 | 45 | >300 | >300 | 169 | 80 | 45 | 29 |
| 2019-02-12 | 25 | 21 | 14 | 17 | 118 | >300 | 195 | 23 | >300 | >300 | 40 | 296 | >300 | 21 | 25 | >300 | >300 | 158 | 156 | 247 | 74 |
| 2019-02-18 | 23 | 3 | 19 | 15 | >300 | 262 | >300 | 161 | 107 | 133 | 46 | 68 | >300 | 7 | 79 | >300 | >300 | 241 | 120 | 37 | 52 |
| 2019-02-25 | 8 | 11 | 22 | 39 | >300 | >300 | >300 | 22 | 106 | 162 | 43 | 49 | >300 | 47 | 69 | >300 | >300 | >300 | 135 | 36 | 12 |
| 2019-03-04 | 36 | 5 | 5 | 7 | 159 | >300 | >300 | 97 | 194 | 83 | 7 | 9 | >300 | 107 | 52 | >300 | >300 | >300 | 185 | 40 | 26 |
| 2019-03-11 | 192 | 17 | 16 | 7 | 107 | >300 | >300 | 79 | 82 | 112 | 7 | 29 | >300 | 51 | 73 | >300 | >300 | >300 | 280 | 98 | 25 |
| 2019-03-18 | 51 | 7 | 16 | 5 | 226 | >300 | >300 | 66 | >300 | 128 | 40 | 1 | >300 | 49 | 106 | >300 | >300 | >300 | 118 | 43 | 31 |
| 2019-03-25 | 31 | 11 | 13 | 3 | 106 | 266 | 191 | >300 | 198 | >300 | 14 | 3 | >300 | 21 | 42 | 29 | 22 | 21 | 37 | 21 | 32 |
| 2019-04-01 | 106 | 24 | 15 | 3 | 128 | >300 | 74 | 137 | >300 | 64 | 7 | 10 | >300 | 39 | 29 | >300 | >300 | >300 | >300 | 22 | 13 |
| 2019-04-08 | 21 | 43 | 9 | 10 | 195 | >300 | 160 | 233 | >300 | 98 | 38 | >300 | >300 | 38 | 108 | 108 | 147 | 138 | 197 | 54 | 30 |
| 2019-04-15 | 31 | 39 | 52 | 2 | 122 | >300 | 131 | 263 | >300 | 248 | 34 | 18 | >300 | 33 | 74 | 196 | 167 | 247 | 238 | 58 | 31 |

Table 4. Qualified rate of microbial limit detection at each use point of laboratory purified water**表 4.** 实验室纯化水各使用点微生物限度检测合格率

| 取样点 | 检测总次数 | 合格次数 | 不合格次数 | 合格率(%) |
|--------|-------|------|-------|--------|
| 总出水口 1 | 23 | 23 | 0 | 100.0 |
| 总出水口 2 | 23 | 23 | 0 | 100.0 |
| 总回水口 1 | 23 | 23 | 0 | 100.0 |
| 总回水口 2 | 23 | 23 | 0 | 100.0 |
| E-1 | 13 | 3 | 10 | 23.1 |
| E-2 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| E-3 | 13 | 0 | 13 | 0.0 |
| E-4 | 13 | 0 | 13 | 0.0 |
| E-5 | 13 | 12 | 1 | 92.3 |
| E-6 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| E-7 | 13 | 9 | 4 | 69.2 |
| E-8 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| E-9 | 13 | 5 | 8 | 38.5 |
| E-10 | 13 | 3 | 10 | 23.1 |
| E-11 | 13 | 2 | 11 | 15.4 |
| E-12 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| E-13 | 13 | 11 | 2 | 84.6 |
| E-14 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| E-15 | 13 | 10 | 3 | 76.9 |
| E-16 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| E-17 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| W-1 | 13 | 11 | 2 | 84.6 |

Continued

| | | | | |
|------|----|----|----|-------|
| W-2 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| W-3 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| W-4 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| W-5 | 13 | 0 | 13 | 0.0 |
| W-6 | 13 | 0 | 13 | 0.0 |
| W-7 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| W-8 | 13 | 7 | 6 | 53.8 |
| W-9 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| W-10 | 13 | 4 | 9 | 30.8 |
| W-11 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |
| W-12 | 13 | 10 | 3 | 76.0 |
| W-13 | 13 | 0 | 13 | 0.0 |
| W-14 | 13 | 12 | 1 | 92.3 |
| W-15 | 13 | 11 | 2 | 84.6 |
| W-16 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| W-17 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| W-18 | 13 | 1 | 12 | 7.7 |
| W-19 | 13 | 2 | 11 | 15.4 |
| W-20 | 13 | 12 | 1 | 92.3 |
| W-21 | 13 | 13 | 0 | 100.0 |

Table 5. Total qualification rates of microbial limit testing for purified water use points in east and west laboratories
表 5. 东边实验室和西边实验室纯化水使用点微生物限度检测总合格率

| 取样区域 | 总检测次数 | 总合格次数 | 总不合格次数 | 总合格率(%) |
|------------------|-------|-------|--------|---------|
| 东边实验室 17 个纯化水使用点 | 221 | 110 | 150 | 49.8 |
| 西边实验室 21 个纯化水使用点 | 273 | 139 | 134 | 50.9 |

4. 讨论与分析

经过 3 个月定期的跟踪监测, 由表 1、表 2 和表 3 可见, 使用频次高的使用点出现微生物限度合格率高, 如总出水口、总回水口, 东边实验室的 E-14、E-16、E-17 (微生物室培养基配制间、衣物洗涤间), 西边实验室的 W-2、W-3、W-4、W-21 (玻璃仪器清洗室、微生物室洗涤间), 这些点用水量大, 用水频率高, 在监测周期内合格率达 100.0%, 表明管道内水流保持流动, 维持稳定的管道流速, 缩短纯化水的储存时间, 能有效抑制微生物生长繁殖, 有利于微生物控制。

由于实验室区域内取样人员不同, 在实际取样过程中, 放水时间不一, 导致检测结果有差异。取样时放水时间较长的实验室, 合格率较高, 如 E-14、E-16、E-17、W-21 这几个取样点都由同一个取样人员取样, 放水时间达到 10 min, 微生物限度检测合格率均达到 100.0%, 表明使用点管道内的水在残留一定时间后, 有利于微生物滋生繁殖, 在取样时应该延长放水时间, 确保排空管道内残留水样。取样前可用 75% 乙醇在取样口内外擦拭对取样口进行消毒, 取样口暴露于一般区域环境中, 容易受到污染, 如果不

消毒, 附在取样口内外的微生物可能会随着水流进入灭菌瓶, 造成对样品微生物限度检测的干扰[4]。

由表 1 和表 4 可见, 该检验机构纯化水系统的总出水口和总回水口在 23 次检测中均符合规定, 几乎都无菌落出现, 合格率 100.0%, 表明总出水口和总回水口消毒灭菌效果较好, 有效控制了微生物的滋生繁殖。表 2、表 3、表 4 和表 5 可见, 38 个纯化水使用点, 仅有 9 个点在 13 次检验中均符合规定, 合格率 100.0%, 东边实验室总合格率 49.8%, 西边实验室总合格率 50.9%。综合来看该机构纯化水系统整体合格率较低, 可用水的使用点较少, 另使用点在出现多次不符合规定时, 出现合格时, 菌落总数也是趋近于标准规定值(100 cfu/mL), 如 E-2、E-12、W-9; 反之使用点出现多次符合规定时, 出现不合格时, 菌落总数也是略高于标准规定值(100 cfu/mL), 如 E-5、W-14。综合考虑温度、湿度、储存时间、取样人员、放水时间等对纯化水中微生物生长繁殖的影响, 对合格率较高的使用点应重点排查环境、人员等的影响, 尽量避免外在因素对微生物限度检测造成干扰。由于微生物检测结果滞后于水的使用, 对出现不符合规定的出水点先不使用, 暂时启用总出水口接水送水工序, 确保实验室试验用水质量符合规定。

药品生产质量管理规范(2010 年修订)第 101 条: 应当按照操作规程对纯化水、注射用水管道进行清洗消毒[1]。对储罐和管道要采取适当方法定期清洗和消毒灭菌。第 98 条: 纯化水、注射用水储罐和输送管道所用材料应当无毒、耐腐蚀; 储罐的通气口应当安装不脱落纤维的疏水性除菌滤器; 管道的设计和安装应当避免死角、盲管[1]。管路中的纯化水必须在完全湍流的状态下才能抑制微生物的生长, 流速过低, 给微生物滋生提供了温床, 管路的管道是否光滑平整, 管材是否安全无毒, 这些都会影响纯化水水质, 甚至造成微生物污染的危险[5]。综合表 1、表 2、表 3 和表 4 可见, 不符合规定的取样点在多次取样后仍不合格, 应重点排查纯化水管道是否出现死角、盲管, 管道流速、管道材质等是否符合规定。同时应加强对设备进行检查、维护和更新, 定期更换除菌过滤器的滤芯, 防止形成生物膜。鉴于该药品检验机构是新建立的纯化水系统, 而且经过 3 个月定期监测, 合格率较低, 应制定纯化水微生物风险监控控制方案, 累积长期监测数据, 以便系统掌握水质微生物情况, 有效控制微生物污染风险, 确保实验室试验用水质量。

参考文献

- [1] 卫生部. 药品生产质量管理规范(2010 年修订) [Z], 2010.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典 2015 年版·二部[Z], 2015.
- [3] 仲剑锋, 于天明. 纯化水制备工艺在制药生产中的应用分析[J]. 化学工程与装备, 2010, 3(3): 59-61.
- [4] 李华, 龙亚秋, 杨芳. 医院制剂生产中纯化水的制备与质量控制[J]. 中国药业, 2012, 21(8): 59-61.
- [5] 叶勋, 马涛, 王一敏, 等. 对医药纯化水管道系统设计的探讨[J]. 医药工程设计, 2011, 33(4): 19-22.