

外用液体药用高密度聚乙烯瓶无菌检查法的研究

郑小玲¹, 梁法勇¹, 田卓², 钱凌¹, 李珏¹, 李樱红¹, 王知坚^{3*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 药品微生物检测与预警重点实验室, 杭州 310004; 2.中华人民共和国大连海关, 大连 116000; 3.浙江省药品化妆品审评中心, 杭州 310012)

摘要: 目的 建立外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)无菌检查方法, 并进行方法适用性检查。方法 洗脱液为灭菌生理盐水, 参照中国药典 2015 年版通则 1101 中医疗器具的取样量进行取样, 加入 1/2 标示容量的氯化钠注射液, 振摇 30 s, 合并提取液, 薄膜过滤法检查。结果 无菌检查前处理研究中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉 5 种菌的洗脱回收率符合中国药典要求; 方法适用性试验中试验菌生长均良好。结论 本法取样量和样品前处理科学有效, 适用于外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)的无菌检查。**关键词:** 无菌检查; 高密度聚乙烯瓶; 前处理研究; 薄膜过滤法

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)06-0730-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.017

引用本文: 郑小玲, 梁法勇, 田卓, 等. 外用液体药用高密度聚乙烯瓶无菌检查法的研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 730-733.

Study on Sterility Test Method of External Liquid Medical High-density Polyethylene Bottle

ZHENG Xiaoling¹, LIANG Fayong¹, TIAN Zhuo², QIAN Ling¹, LI Jue¹, LI Yinghong¹, WANG Zhijian^{3*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Testing and Risk Warning of Pharmaceutical Microbiology, Hangzhou 310004, China; 2.Dalian Customs District P.R. China, Dalian 116000, China; 3.Zhejiang Province Drug Cosmetics Review Center, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a sterility test method for external liquid medical high-density polyethylene bottle(for extensive burns and severe skin damage), and check the suitability of the method. **METHODS** The sterilized saline was used as a eluent. According to the sampling amount of medical devices in general rule 1101 of Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition, 1/2 labeled volume of sodium chloride injection was added, and the sample was shaken for 30 s. The extracts were combined and examined by membrane filtration. **RESULTS** The eluting recovery rates of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* in the study of pretreatment for sterility test were in line with the requirements of Chinese Pharmacopoeia. The growth of the tested bacteria was good in the method suitability test. **CONCLUSION** This method is scientific and effective in sample quantity and sample pretreatment. It is suitable for sterility test of external liquid medical high-density polyethylene bottle(for large area burn and severe skin injury).

KEYWORDS: sterility test; high-density polyethylene bottle; pretreatment study; membrane filtration

药品的包装材料及容器与药品直接接触可能会影响药品的质量, 包装材料的微生物污染也是影响药品质量的风险因素, 因此为了确保药品的安全有效, 必须严格控制包装容器的微生物污染程度^[1-2]。原国家食品药品监督管理总局 2015 年在前期药品包装材料标准基础上汇编出版了《国家药包材标准》, 标准中对直接接触药品、不洗即用且无后续灭菌工艺的药包材规定了微生物限度或无菌检查项^[3-5]。现行药包材标准中的无菌检查项目仅简单规定检验方法参照《中华人民共和国药典》2015 年版(以下简称“中国药典”)的相关规定, 但实质上并未做好 2 个标准的衔接工作, 导致药包材无菌检查在实际操作中遇到较多问题, 如取样量与中国药典不一致及未按中国药典要求进行方法适用性试验, 因此供试品前处理的合理性、

无菌检查方法的选择等方面皆有待完善。外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)作为无菌制剂的高温易变形包装材料需进行无菌检查。本实验以外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)为对象进行无菌检查的方法研究, 通过取样量、供试品前处理和无菌检查方法适用性等研究, 对本品的无菌检查方法进行全面的修订完善, 提高本品种无菌检查的操作性和适用性, 加强药包材的使用安全性。

1 材料

1.1 仪器

ME2002E 电子天平(瑞士梅特勒-托利多); MLS-3781-PC 高压蒸汽灭菌器(日本三洋); SF450 灭菌箱、IF450 恒温培养箱、ICP55 低温培养箱均

作者简介: 郑小玲, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: 18058705307
(0571)81061206 E-mail: wangzhijian822@163.com

E-mail: 88920169@qq.com *通信作者: 王知坚, 男, 主任药师 Tel:

购自德国 Memmert; 生物安全柜(力康生物医疗); HTY-2000B 型集菌仪、FC502 一次性使用集菌培养器均购自杭州泰林。

1.2 菌株

枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(F)44102]、生孢梭菌[CMCC(B)64941]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]和黑曲霉[CMCC(F)98003]均购自中国药品生物制品检定所。Bioball Multishot 550 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* NCTC 10400)、黑曲霉(*Aspergillus niger* NCPF 2275)、白色假丝酵母(*Canidia albicans* NCPF 3179)、大肠埃希菌(*Escherichia coli* NCTC 12923)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* NCTC 10788)定量菌球均购自法国梅里埃公司。

1.3 培养基与试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA, 批号: 1064583)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA, 批号: 1063405)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB, 批号: 1062394)、硫乙醇酸盐流体培养基(FTM, 批号: 1068745)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB, 批号: 1065575)均购自广东环凯微生物科技有限公司; 以上培养基适用性检查均符合中国药典 2015 年版规定^[6]。洗脱液灭菌生理盐水(青岛蓝雁生物技术有限公司, 批号: LP18061509)。

1.4 样品

外用液体药用高密度聚乙烯瓶(塑料类)3 种规格: 10 mL, 批号: 20160607, 20161108, 20170621; 30 mL, 批号: A20180160, A20180161, A20180162; 180 mL, 批号: 20180301, 20180302, 20180303, 分别来自宁波市舜德医疗科技有限公司、浙江华诺公司和浙江康泰医药包装有限公司。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的新鲜培养物至 TSA 中, 33 °C 培养 18 h; 接种枯草芽孢杆菌新鲜培养物至 TSA 斜面, 33 °C 培养 18 h; 接种生孢梭菌的新鲜培养物至 FTM 中, 33 °C 培养 18 h; 接种白色念珠菌的新鲜培养物至 SDB 中, 23 °C 培养 2 d; 接种黑曲霉的新鲜培养物至 SDA 斜面, 23 °C 培养 7 d。每种新鲜培养物按不同实验要求稀释制备菌悬液, 菌悬液含菌均为 $\leq 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Bioball Multishot 550 枯草芽孢杆菌(*Bacillus*

subtilis NCTC 10400)、黑曲霉(*Aspergillus niger* NCPF 2275)、白色假丝酵母(*Canidia albicans* NCPF 3179)、大肠埃希菌(*Escherichia coli* NCTC 12923)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* NCTC 10788), 以上定量菌球均按使用说明书复溶, 含菌约 $500 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 无菌检查前处理研究

2.2.1 供试品的接种 取已灭菌且充分解析 3 种规格(10, 30, 180 mL)的外用液体药用高密度聚乙烯瓶。每种规格各 3 批。每批产品需取 25 个样品作为供试品, 每个供试品按下列方法分别接种制备, 每个供试品同法操作 5 次。将试验菌 Bioball Multishot 550 枯草芽孢杆菌菌悬液 0.1 mL(约含菌 50 cfu)接种到瓶的内壁上, 均匀滴洒在瓶的内壁。之后旋上盖子, 置于 50 °C 烘箱晾干。

将试验菌 Bioball Multishot 550 黑曲霉菌悬液、白色假丝酵母菌悬液、大肠埃希菌菌悬液和金黄色葡萄球菌菌悬液各取 0.1 mL(约含菌 50 cfu)接种到瓶的内壁上, 均匀滴洒在瓶的内壁, 之后轻旋上盖子。

2.2.2 供试品前处理洗脱 取供试品标示容量 1/2 的洗脱液(灭菌生理盐水 $\leq 100 \text{ mL}$)缓慢注入已接种的供试品中, 振荡 30 s, 将洗脱液转移到集菌培养器过滤, 取膜培养, 即为试验组。取未接种的供试品同法操作为供试品对照组。

同时接种上述枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的菌悬液各 0.1 mL 到 2 个 TSA 上进行计数, 接种上述黑曲霉和白色假丝酵母的菌悬液各 0.1 mL 到 2 个 SDA 平板上进行计数, 作为接种的定量总菌数。即菌液对照组。

2.2.3 培养 细菌接种在 TSA 平板于 33 °C 培养 3 d, 霉菌和酵母菌接种在 SDA 平板于 23 °C 培养 5 d。

2.2.4 结果 试验组中的大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉 5 种菌在不同规格样品中的回收率均 $>70\%$, 符合中国药典要求, 表明本品的无菌检查前处理可采用“2.2.2”项中供试品前处理洗脱的方法。结果见表 1。回收率/%=[(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数] $\times 100\%$ 。

2.3 无菌检查方法适用性试验

2.3.1 方法 试验组: 取已灭菌且充分解析的 3 种规格的外用液体药用高密度聚乙烯瓶, 10, 30, 180 mL 规格的样品批号分别为 20160607,

A20180160, 20180301。每批产品需取 120 瓶(其中规格 180 mL 的取 60 瓶), 20 瓶一组分成 6 组。规格 10 mL 和 30 mL 样品的试验如下: 每瓶中加入 1/2 标示容量的氯化钠注射液, 振摇 30 s, 合并 20 瓶的提取液, 在提取液中加入上述制备好的菌悬液各 1 mL, 薄膜过滤至一张膜, 再加 FTM 或 TSB 至滤筒内。规格 180 mL 样品的试验如下: 每瓶中加入 1/2 标示容量的氯化钠注射液, 振摇 30 s, 合并 20 瓶的提取液, 上述 20 瓶的提取液平均过滤至 2 张膜, 在提取液中加入上述制备好的菌悬液各 1 mL, 薄膜过滤, 再加 FTM 或 TSB 至滤筒内。上述滤筒分别置规定温度培养 5 d, 观察结果。

表 1 5 种菌的回收率结果

Tab. 1 Results of the recovery of five kinds of bacteria %

规格	批号	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
10 mL	20160607	94	82	96	87	83
	20161108	91	89	86	83	83
	20170621	85	89	91	86	85
30 mL	A20180160	96	73	96	82	81
	A20180161	93	84	86	79	81
	A20180162	85	82	84	77	79
180 mL	20180301	92	95	91	82	83
	20180302	86	85	88	82	79
	20180303	89	84	82	80	81

对照组: 另取一装有同体积培养基的滤筒, 加入等量试验菌, 同试验组培养, 观察结果。

2.3.2 结果 取“2.1”项下适宜浓度的菌悬液, 按平皿法测定菌落数, 每株试验菌平行制备 2 个平皿。计数结果见表 2。

表 2 菌落计数结果

Tab. 2 Results of the colony count cfu

项目	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	生孢梭菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
平皿 1	49	39	30	22	27	57
平皿 2	34	46	36	16	28	66
平均	42	42	33	19	28	62

外用液体药用高密度聚乙烯瓶的无菌检查适用性试验结果见表 3。试验组各容器中试验菌生长情况与对照管比较, 结果均生长良好。表明本样品的无菌检查方法可以采用“2.2.2”项中供试品前处理法结合薄膜过滤法, 且供试品的检验量在本检验条件下无抑菌作用。

表 3 无菌检查适用性试验结果

Tab. 3 Results of sterility suitability test

批号	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	生孢梭菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
20160607	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	-++++
A20180160	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	-++++
20180301	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	-++++

注: “+”代表有菌生长;“-”代表无菌生长。

Note: “+” stands for bacterial growth;“-” stands for aseptic growth.

2.3.3 外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)的无菌检查法 本品可参照中国药典 2015 年版通则 1101 中医疗器械的取样量进行取样, 加入 1/2 标示容量的氯化钠注射液, 振摇 30 s, 合并提取液, 照无菌检查法(中国药典 2015 年版通则 1101)薄膜过滤法检查, 应符合规定。

2.3.4 样品无菌检查结果 取表 1 中 9 批外用液体药用高密度聚乙烯瓶按“2.3.3”无菌检查方法进行试验, 9 批样品均无菌生长。

3 讨论

参考国内外相关的法规指南和实际操作的安全便捷, 药包材的无菌检查方法主要有直接接种法和浸提法结合薄膜过滤法^[6-8]。现行的《国家药包材标准》中无菌检查均采用浸提法结合薄膜过滤法。其实因为浸提法结合薄膜过滤法可能会人为造成微生物的转移损失或者因为操作繁琐造成假阳性结果, 如果产品性状允许, 无菌检查方法应优先考虑采用直接接种法。本课题组经过研究确认, 如预灌封注射器组合件(带注射针)等药包材的无菌检查法更适合采用直接接种法。而外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)因构造和规格较大等原因不适用于直接接种法, 所以采用浸提法结合薄膜过滤法。

2002—2004 年先后颁布的药品包装材料标准中需进行无菌检查的药包材有 6 种, 根据不同种类无菌检查的取样量分别为 11 个或 6 支, 主要是参照了中国药典 2000 年版药品上市检验中无菌检查的取样量。2015 年版颁布的《国家药包材标准》对此未进行修订。无菌检查取样量的确定需要考虑产品污染率和无菌检查通过率。取样量越大, 当存在污染时, 无菌检查通过率就越低。中国药典 2015 年版无菌检查的取样量就是按照上述关系确立, 对出厂检验和上市监督检验的无菌检查取样量有不同的规定。国外药包材很多都按医疗器

械管理, 无菌检查方法也参照医疗器械检验。鉴于检验结果的代表性和科学性, 药包材无菌检查的取样量可借鉴中国药典 2015 年版通则 1101 无菌检查法中医疗器械的取样量。同时也应该考虑各种因素(如环氧乙烷灭菌的残留量)可能会造成无菌检查结果的假阴性, 所以应增加阳性对照的取样量。由于药包材批生产量基本都>1 000 个, 参照中国药典 2015 年版通则 1101 无菌检查法, 一般药包材无菌检查的出厂检验量最少为 60 个(支), 上市监督检验量应为 30 个(支)。

外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)在现行标准中的无菌检查的取样量为 11 个, 如果参照中国药典 2015 年版通则 1101 无菌检查法中医疗器械的取样量, 出厂检验中接种每种培养基至少 20 个, 采用浸提法结合薄膜过滤法进行无菌检查。规格>100 mL 的外用液体药用高密度聚乙烯瓶出厂检验可取样 20 个, 混合提取液薄膜过滤至 2 张膜后, 分别接种至 FTM 和 TSB。其对应的阳性对照组取样 20 个。而外用液体药用高密度聚乙烯瓶根据不同的规格, 其无菌检查的出厂检验量应为 60 个或 40 个, 上市监督检验量应为 30 个。

由于外用液体药用高密度聚乙烯瓶的规格较大, 故洗脱液的量定为 1/2 标示容量。无菌检查取样量参照药典医疗器械的取样量后是之前的好几倍, 振摇洗脱时间如果还是按照现行标准的 5 min, 则 60 个瓶子需要振摇 300 min。无菌检查振摇洗脱时间过长, 操作繁琐且容易造成污染, 因此将每瓶的振摇时间定为 30 s, 并进行金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和

黑曲霉 5 种代表性菌株的回收率考察研究, 5 种菌分别代表了革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、芽孢菌、酵母和霉菌。供试品前处理洗脱研究表明振摇 30 s 每种菌的洗脱回收率都符合要求, 因此可将洗脱液定为 1/2 标示容量, 振摇洗脱时间定为 30 s。无菌检查方法适用性试验结果证明本研究建立的无菌检查方法适用于外用液体药用高密度聚乙烯瓶(大面积烧伤及严重损伤皮肤用)。

REFERENCES

- [1] ZHU L H, LING L. Applicability verification of microbial limit test method for different drug packaging materials[J]. *Shanghai Med Pharm J*(上海医药), 2017, 38(9): 73-75.
- [2] ZHOU J Q, MEI D. Influence of pharmaceutical packaging materials on quality and safety of medicines[J]. *Adv Drug React J*(药物不良反应杂志), 2011, 13(1): 27-31.
- [3] KUANG P L. Discussion about membrane filtration method in microbial limit test for packaging materials of drug[J]. *Drug Stand China*(中国药品标准), 2006, 7(1): 42, 70.
- [4] LIU Q, ZHANG Y, GAO H. Biosafety suggestions in current *National Drug Packaging Containers(Material) Standard*[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2012, 32(10): 1889-1902.
- [5] ZHAN H L, MA S H, DAI H, et al. Analysis of the microbial contamination status of medicinal plastic bottles for oral liquid[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 32(6): 1100-1105.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 140-149.
- [7] ISO 11737-2, Sterilization of medical devices-Microbiological methods-Part 2: Test of sterility performed in the validation of a sterilization process[S]. 2009: 9-10.
- [8] World Health Organization. WHO Technical Report Series No. 902, Annex 9 Guidelines on packaging for pharmaceutical products[R]. 2020.

收稿日期: 2020-02-08
(本文责编: 沈倩)