

用直接投入增菌法进行药品包装材料控制菌检查的探索性研究

王文庆, 方良艳*, 国宪虎, 师广波, 郝树彬 (山东省医疗器械和药品包装检验研究院, 国家药品监督管理局医用卫生材料及生物防护器械质量评价重点实验室, 国家药品监督管理局药品包装材料质量控制重点实验室, 济南 250101)

摘要 **目的:** 对复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片、干燥剂等药品包装材料构建微生物限度检查-控制菌检查的新方法, 为加强药品包装材料的微生物质量控制提供一种检测新思路。**方法:** 分别取代表性复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片、干燥剂样品, 用代表性菌株制备人工污染样品, 采用国家药品包装材料标准规定的方法 (以下简称供试液增菌法) 以及本研究建立的直接投入增菌法进行控制菌检查, 计算控制菌检出率。**结果:** 接种菌液浓度较高时, 两种方法的检出率一致, 均为100%; 在接种菌液浓度为 $50 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 直接投入增菌法检出率略高于供试液增菌法, 但经统计学分析, 发现并没有显著差异 ($P>0.05$), 二者的检出率大致相同。此外, 与供试液增菌法相比, 直接投入增菌法在操作过程中具有操作简单、不易污染、未使用微生物过滤装置和滤膜而降低了成本等优势。**结论:** 直接投入增菌法与供试液增菌法具有同样可靠的检出率, 且具有操作简单、不易污染、成本较低等优势, 适合用于复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片、干燥剂等药品包装材料的控制菌检查。

关键词: 药品包装材料; 微生物限度检查; 控制菌检查; 供试液增菌法; 直接投入增菌法

中图分类号: R954 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)01-0078-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.01.010

On the Test of Control Bacteria of Drug Packaging Materials by Direct-input Enrichment Method

Wang Wenqing, Fang Liangyan*, Guo Xianhu, Shi Guangbo, Hao Shubin (Shandong Institute of Medical Device and Pharmaceutical Packaging Inspection, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Medical Materials and Biological Protective Devices, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Pharmaceutical Packaging Materials, Jinan 250101, China)

Abstract **Objective:** A new method for microbial limit and control bacteria tests was established for the inspection of pharmaceutical packaging materials such as composite films, hard films, aluminum foil, bottle caps, gaskets, desiccants and so on in order to find a new detection strategy in strengthening the microbiological quality control of pharmaceutical packaging materials. **Methods:** Representative samples of composite films, hard films, aluminum foil, bottle caps, gasket and desiccants were selected to prepare artificial contamination samples with representative strains. The test solution enrichment method that was also the method specified in the national pharmaceutical packaging material standards and the direct-input enrichment method established in this study

were used for the control bacteria inspection, and the detection rate of control bacteria was calculated. **Results:** When the concentration of the inoculum solution was high, the detection rates of the two methods were the same, both 100%. When the concentration of inoculation solution was $50 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, the detection rate of the direct-input enrichment method was a little higher than that of the test solution enrichment method, but according to statistical analysis, there was no significant difference ($P > 0.05$), so the detection rate of the two methods was almost the same. In addition, compared with the test solution enrichment method, the direct-input enrichment method had the advantages of simple operation, less pollution and reduced cost without using microbial filtration devices and membrane. **Conclusion:** The direct-input enrichment method has the same reliable detection rate as the test solution enrichment method, and has the advantages of simple operation, less pollution and low cost, so it is suitable for the test of control bacteria of the pharmaceutical packaging materials such as composite films, hard films, aluminum foil, bottle caps, gasket and desiccants.

Keywords: drug packaging materials; microbial limit test; test of control bacteria; test solution enrichment method; direct-input enrichment method

对于非无菌药品的包装材料, 由于与内装药品直接接触, 其本身存在的微生物可能会对患者健康造成潜在危害, 如导致药物活性降低, 甚至丧失疗效, 也可能对患者健康造成直接危害, 如导致患者感染等^[1-2]。因此, 为了确保药品的安全有效, 对药品包装材料(以下简称药包材)进行微生物控制是非常有必要的。

现行《国家药包材标准》^[3]中对直接接触药品、不洗即用的非无菌药包材规定了微生物限度检查, 其中对复合膜、硬片、铝箔、瓶盖的检查方法规定先采用擦拭法制备供试液, 对垫片和干燥剂的检查方法规定采用振摇法制备供试液, 然后将供试液采用薄膜过滤后进行增菌培养, 再进行随后的控制菌检查。长期试验过程中发现, 擦拭法和振摇法制备供试液的微生物采集效率较低, 可能会出现检测结果为假阴性的情况; 而且, 薄膜过滤和移膜操作较为繁琐且易污染。

国内对药包材控制菌检测的研究中, 基本围绕对样品进行适用性检查^[4-5]和结果误差分析等^[6], 缺少对标准以外的新方法进行探索研究。为此, 本文借鉴《中华人民共和国药典》2020年版第四部附录1101无菌检查法中的“直接接种法”^[7]的原则, 首次提出让药品包装材料样品直接跟增菌培养基接触进行增菌培养(以下简称“直接投入增菌法”), 以期规避微生物采集效率过低的问题, 提高检出率。

本研究挑选复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片、干燥剂共6种典型样品, 分别接种系列浓度梯

度的质控菌株制作人工污染样品, 比较供试液增菌法和直接投入增菌法的检出率, 为试验人员构建控制菌检查新方法进行探索性研究。

1 试验材料

仪器设备: 生物安全柜(NUAire NU-437-600S)、立式压力蒸汽灭菌器(SYSTEC VE-75)、微生物过滤装置(Millipore Mxp pump01)、电子天平(METTLER TOLEDO MS1602TS)、恒温水浴锅(Polyscience WB10)、低温培养箱(MMM FRIOCELL 400L)、漩涡混合器(IKA MS 3 digital)、拍打式匀浆器(Seward Stomacher 400)、往复式摇床(WIGGEN WS-100D)等。

培养基和试剂: 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA, 广东环凯微生物科技有限公司), 胰酪大豆胨液体培养基(TSB, 广东环凯微生物科技有限公司), 硫乙醇酸盐流体培养基(FT, 美国BD公司), 0.9%无菌氯化钠溶液(山东华鲁制药有限公司)。

试验菌种: 大肠埃希菌(CMCC44102)。

试验样品: 药用低密度聚乙烯袋(500 mm × 500 mm × 0.06 mm, 山东富帛复合材料有限公司); 铝/聚乙烯冷成型固体药用复合硬片(0.30 mm × 210 mm, 无锡市羊尖华强塑料彩印有限公司); 药用铝箔(0.024 mm × 250 mm, 淄博辰昊药用包装材料有限公司); 口服固体药用低密度聚乙烯防潮组合瓶盖(直径30 mm, 石家庄鑫富达医药包装有限公司); 药用聚酯/铝/聚酯封口垫片(直径29 mm, 安阳市华强包装工业有限责任公司);

药用固体纸袋装硅胶干燥剂（山东阜帛复合包装材料有限公司）。以上样品均经辐照灭菌备用。

2 试验方法

2.1 无菌检测

经辐照灭菌后的样品，分别取样（其中复合膜、硬片、铝箔提前用无菌器具及100 cm²无菌金属模板裁成100 cm²大小），加到含有TSB和FT培养基的试管中，按照《中华人民共和国药典》2020年版第四部附录1101无菌检查法进行无菌检查。

2.2 菌液制备

接种大肠埃希菌至TSA中，32.5℃培养18 h。用0.9%无菌氯化钠溶液对新鲜培养物进行梯度稀释，制备多个工作浓度梯度以期区分不同方法的检出率。菌液浓度分别为浓度一300 CFU·mL⁻¹，浓度二150 CFU·mL⁻¹，浓度三100 CFU·mL⁻¹，浓度四50 CFU·mL⁻¹。

2.3 制备人工污染样品

取试验样品复合膜、硬片、铝箔、垫片、干燥剂、瓶盖平放在无菌平皿内（其中复合膜、硬片、铝箔提前用无菌器具及100 cm²无菌金属模板裁成100 cm²大小），用移液器吸取100 μL菌液（每个浓度共用一份菌液），分别分散接种在样品朝上的一面（瓶盖则接种在瓶盖内部），接种完成后进行干燥，作为人工污染样品。

2.4 控制菌检查

2.4.1 供试液增菌法（现行方法）

复合膜、硬片、铝箔、瓶盖：无菌棉签用0.9%无菌氯化钠溶液稍沾湿，擦抹人工污染样品5次，换1支棉签再擦抹5次，共擦抹10次。每支棉签抹完后立即剪断，投入盛有30 mL 0.9%无菌氯化钠溶液的锥形瓶中。全部擦抹棉签投入瓶中后，将瓶迅速摇晃1 min，即得供试液。取供试液进行薄膜过滤，将膜转移至100 mL TSB培养基中进行增菌培养，并进行随后检查。

垫片、干燥剂：取本品10个，置于锥形瓶中，加入0.9%无菌氯化钠溶液100 mL，振摇1 min，即得1:10供试液。取供试液进行薄膜过滤，将膜转移至100 mL TSB培养基中，30~35℃增菌培养18~24 h，并进行随后检查。

2.4.2 直接投入增菌法

将人工污染样品的复合膜、硬片、铝箔剪碎后投入100 mL TSB培养基中，人工污染的瓶盖、垫片和干燥剂直接投入100 mL TSB培养基中，手动振摇1 min后进行增菌培养，并进行随后检查。

2.5 检出率计算及统计学分析

按照以下公式计算2种方法不同浓度梯度的检出率（%）：

$$\text{检出率} = (\text{阳性结果样本数} / \text{样本总数}) \times 100\%$$

对2种方法在浓度四的条件下得到的检出率使用卡方检验进行统计学分析。

3 结果及分析

3.1 无菌检测

对经辐照灭菌后的样品进行无菌检测，分别用TSB和FT培养基培养14天，结果显示均为无菌生长，说明样品可用于接下来的检出率比较。

3.2 检出率的比较

本研究共设置4个菌液浓度梯度，复合膜样品结果显示菌液浓度较高时（浓度一和浓度二），两组的阳性检出率结果一致，均能达到100%；随着菌液浓度的降低，两组的阳性检出率结果出现差异，接种菌液浓度为浓度三和浓度四时，直接投入增菌法的检出率略高于供试液增菌法，见表1。硬片、铝箔、组合瓶盖、垫片和干燥剂的检出率具有相似的趋势，分别见表2~表6。对接种浓度四下2种方法的检出率进行统计学分析，结果显示该浓度下2种方法的检出率没有显著性差异（ $P > 0.05$ ），见表1~表6，说明直接投入增菌法的检出率与供试液增菌法大致相同。

表1 复合膜检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	90% (9/10)	100% (10/10)	—
接种浓度四	45.4% (15/33)	57.9% (22/38)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

表 2 硬片检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	90% (9/10)	100% (10/10)	—
接种浓度四	42.9% (15/35)	54.3% (19/35)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

表 3 铝箔检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度四	46.7% (14/30)	56.7% (17/30)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

表 4 瓶盖检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度四	43.3% (13/30)	56.7% (17/30)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

表 5 垫片检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	80% (8/10)	90% (9/10)	—
接种浓度四	46.7% (14/30)	55% (22/40)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

表 6 干燥剂检出率结果

浓度	供试液增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	直接投入增菌法检出率 (阳性样本数 / 总样本数)	卡方检验
接种浓度一	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度二	100% (10/10)	100% (10/10)	—
接种浓度三	70% (7/10)	80% (8/10)	—
接种浓度四	40% (8/20)	50% (10/20)	$P > 0.05$

注：“—”代表未进行数据分析。

3.3 操作过程等方面的比较

操作过程中，直接投入增菌法将样品剪碎后直接投入培养基，减少了制备供试液、薄膜过滤、移膜等操作，步骤较少，能降低外来污染的可能性。

检测成本方面，直接投入增菌法不需要薄膜过滤装置和滤膜等耗材，降低了成本。

4 讨论

现行《国家药包材标准》^[3]规定非无菌药包材在控制菌检查过程中采用先制备供试液，再进行增菌培养的方式，该方式微生物采集效率较低，存在检测结果为假阴性的可能；同时，薄膜过滤后需要移膜，操作繁琐，易引入外来污染。针对现行标准中发现的问题，本研究借鉴《中华人民共和国药典》2020年版第四部无菌检查“直接接种法”的思路，设计“直接投入增菌法”对样品进行控制菌检查。

复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片和干燥剂类药包材由于其材质、加工工艺等原因，其本身的自然污染率比较低^[8-10]。本研究中发现，在菌液浓度较高时，直接投入增菌法和供试液增菌法均有很高的检出率；随着菌液浓度降低，两组的检出率均出现下降，但是直接投入增菌法的检出率要略高于供试液增菌法的检出率，统计学分析没有显著性差异，说明在检出率方面，直接投入增菌法具有一定的可靠性。除了检出率之外，比较两个方法的操作复杂程度、成本等：直接投入法操作简单，步骤较少，减少了外来污染；直接投入增菌法成本低，减少了薄膜过滤使用的仪器和耗材的费用。虽然薄膜过滤法是一种消除样品抗菌成分的有效手段^[11]，但是截至目前，没有发现声称具有抗菌作用的复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片和干燥剂类药包材，

从这个角度来讲，该类样品可直接投入培养基中，不必采用薄膜过滤法进行试验^[12]。因此，综合考虑检出率、操作过程、外来污染和成本等因素，直接投入增菌法是个可靠的新选择。

本文设计的4个菌液浓度梯度，在制备人工污染样品时经过干燥步骤，干燥会导致部分细菌死亡，且无法对存活的细菌数量进行统计；本文的目的是比较在同一浓度下2种检测方法的检出率差异，因此，在样品相同的处理方式下，死亡的细菌数量对2种检测方法进行对比的影响可以忽略不计。

直接投入增菌法的不足之处：由于现行标准中，药包材的微生物限度检查制备一份供试液即可用于微生物计数和控制菌两个项目的检查；若采用直接投入增菌法进行控制菌检查，则药包材进行微生物限度检查的检验量，除了微生物计数检查时制备供试液的样品量外，尚需额外选取样品进行控制菌检测。

本研究为复合膜、硬片、铝箔、瓶盖、垫片和干燥剂类药包材控制菌检查提供了一种新思路，并为药包材微生物限度检查法的下一步修订工作提供了数据支持。

参考文献：

- [1] 贺小桂, 冷文金. 浅谈加强对直接接触药品的包装材料和容器的质量监控[J]. 中国药事, 2007, 21(4): 222.
- [2] 周健丘, 梅丹. 药品包装材料对药品质量和安全性的影响[J]. 药物不良反应杂志, 2011, 13(1): 27.
- [3] 国家药包材标准[S]. 2015: 103.
- [4] 朱莲花, 凌蕾. 不同药品包装材料微生物限度检测方法适用性验证[J]. 上海医药, 2017, 38(9): 73-75.

- [5] 张艳霞, 骆孟都, 陈光伏. 药品包装用复合膜与铝箔实施微生物限度检验的方法[J]. 人参研究, 2010, 22 (2): 42-43.
- [6] 刘金凤. 分析药品微生物限度检验误差影响因素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24 (2): 188-189.
- [7] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 140.
- [8] 秦继迅. 药包材生产过程中微生物及其他污染的控制措施[J]. 科学咨询: 科技·管理, 2015 (5): 59-60.
- [9] 胡昌勤, 林平华, 许华玉. 实用药品微生物检验检测技术指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [10] 马绪英, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 徐丹. 论药品检验中薄膜过滤法的应用[J]. 中国药物经济学, 2013 (S1): 41-42.
- [12] 刘倩, 张媛, 高华. 对现行《国家药品包装容器(材料)方法标准》中生物安全相关标准的几点修改建议[J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (10): 1889-1897, 1902.
- (收稿日期 2021年9月16日 编辑 王雅雯)