药用压缩二氧化碳气体的微生物检查

张乃斌，沈 振，胡文红，冯丹阳，丁 勃*

（山东省食品药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，产业技术基础公共服务平台，山东济南 250101）

摘要：在生产碳酸氢钠林格注射液时，需通过充二氧化碳气体调节注射液 pH 值，因此需对气体中的微生物限度进行控制。该试验使用 2 种采样方法和 3 种培养方式，对 3 批二氧化碳压缩气体进行微生物限度检查。使用针孔式压缩空气微生物采样器对过滤后二氧化碳压缩气体采样（气体流量 1 000 L，采样体积 1 000 L），培养基为胰酪大豆胨琼脂培养基，于 30 ～ 35 ℃培养 5 d，检测结果均 <1 cfu/m^3，符合 A 级洁净环境对浮游菌的要求。在其他采样方式和培养条件下，也均未检出微生物。这说明二氧化碳压缩气体污染微生物的风险较小，生产中使用的过滤器能够有效去除气体中的微生物。

关键词：碳酸氢钠林格注射液；二氧化碳；微生物限度检查；压缩气体

中图分类号：TQ460.6 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)08-1057-05

引用：张乃斌 , 沈 振 , 胡文红 , 等．药用压缩二氧化碳气体的微生物检查［J］．中国医药工业杂志 , 2025, **56**(8): 1057-1061.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.08.012

Microbial Examination of Compressed Carbon Dioxide Gas for Pharmaceutical Use

ZHANG Naibin, SHEN Zhen, HU Wenhong, FENG Danyang, DING Bo*

(*Industrial Technology Foundation Public Service Platform, NMPA Key Lab. for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Food and Drug Inspection and Research Institute, Jinan 250101*)

ABSTRACT: During the production process of sodium bicarbonate Ringer's injection, carbon dioxide gas is used to adjust the pH of the injection, thus requiring control of the microbial limit of the gas. This study employed two sampling methods and three cultivation conditions to conduct microbial limit testing on three batches of compressed carbon dioxide gas. Using a pinhole compressed air microbial sampler, the filtered compressed carbon dioxide gas was sampled at a flow rate at 100 L/min with a total sampling volume of 1 000 L. Pancreatic casein soy peptone agar was used as the culture medium, which was incubated at 30 – 35 ℃ for 5 days. The test results showed that a concentration of less than 1 cfu/m^3, meeting the requirements for planktonic bacteria in class A clean environments. No microorganisms were detected under other sampling methods or cultivation conditions, indicating that the risk of microbial contamination from compressed carbon dioxide gas was low, and the filters used in production could effectively remove microorganisms from the gas.

Key Words: sodium bicarbonate Ringer's injection; carbon dioxide; microbial limit test; compressed gas

碳酸氢钠林格注射液是由多种电解质成分（含钠、钾、镁、钙离子）组成的复方制剂，其中的电解质配比与血浆接近，主要用于循环血量和组织间液减少时细胞外液的补充校正，以及代谢性酸中毒的纠正。作为第五代平衡盐类晶体液，其采用独特的碳酸氢盐缓冲体系，代谢不经过肝、肾，而是通过呼吸代谢，适用于肝肾功能不全患者的液体治疗，优势显著。碳酸氢钠林格注射液具有抗酸作用，常用于治疗消化不良，胃酸分泌过多、糖尿病酮症酸中毒，以及严重肾脏病、循环衰竭、心肺复苏、体外循环引起的或原发性乳酸性酸中毒等[1—2]。

因为碳酸氢钠的性质不稳定，易分解而使溶液 pH 值升高，所以生产最后阶段会通过充入过量的压

收稿日期：2024-12-09

作者简介：张乃斌，男，硕士，从事药品质量控制研究。

通信作者：丁 勃，男，主任药师，从事药品研究与开发。

缩二氧化碳（通常存储于 40 L 气瓶中，经过滤器过滤除菌后使用），将碳酸氢钠林格注射液的 pH 值调至 5.5 ～ 7.5[3]。《药品生产质量管理规范》规定[4]，进入无菌生产区的生产用气体（如压缩空气、氮气，但不包括可燃性气体）均应经过除菌过滤。直接接触原辅料、内包装材料和压缩空气源的微生物限度达标与否，成为直接影响产品质量的重要因素[5—6]。

因二氧化碳压缩气体的特殊工艺用途，需对其微生物限度进行控制，但目前国内外均没有统一、法定的医药级压缩空气微生物质量标准和检测方法。本研究参考现行的《压缩空气》系列推荐性国家标准[7—9]、ISO 发布的《压缩空气——第七部分：活微生物杂质含量的试验方法》[10]，以及相关文献[11]，分别采用传统采样法和仪器采样法，检查过滤前后压缩二氧化碳的微生物限度，建立微生物限度检查方法。微生物限度的设定则参照 ChP 2020 年版四部通则 9205《药品洁净实验室微生物检测和控制指导原则》中关于 A 级洁净区浮游菌的限度要求，以期为药用气体及药品气体制剂中微生物的研究提供参考。

1　仪器与试药

CG100A 型压缩空气微生物采样器（广东环凯微生物技术有限公司）。

胰酪大豆胨琼脂（tryptic soy agar，TSA）培养基（北京三药科技有限公司，批号 2302012）；胰酪大豆胨液体（tryptic soy broth，TSB）培养基（上海诺狄生物科技有限公司，批号 7373221222-7）；氯化钠（天津科密欧化学试剂有限公司，批号 20210618）；聚山梨酯 80（湖南尔康制药股份有限公司，批号 101720240303）。以上培养基均通过验收和适用性检查。

大肠埃希菌［CMCC(B)44102］、金黄色葡萄球菌［CMCC(B)26003］、铜绿假单胞菌［CMCC(B)10104］、枯草芽孢杆菌［CMCC(B)63501］、白念珠菌［CMCC(F)98001］、黑曲霉［CMCC(F)98003］，均来源中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心，工作菌种为第 3 代。

取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和白念珠菌的新鲜培养物，用 0.9%无菌氯化钠溶液稀释并制成每 1 mL 含菌数 100 ～ 1 000 cfu 和不大于 100 cfu 的菌悬液。取黑曲霉的新鲜培养物，加入含聚山梨酯 80（体积分数为 0.05%，下同）的 0.9%无菌氯化钠溶液 5 mL 将孢子洗脱，吸出孢子悬液至无菌试管内，再用含聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含孢子数 100 ～ 1 000 cfu 和不大于 100 cfu 的孢子悬液。

二氧化碳压缩气体（规格为每瓶 40 L，批号 230201101Q001、220511101Q001、210805101Q001，使用单位为山东某药业有限公司）。

2　方法与结果

2.1　针孔式压缩空气微生物采样法

2.1.1　过滤前压缩空气采样

取消毒湿巾，擦拭针孔式压缩空气微生物采样器的表面、气体分散头、多孔采样头和培养皿座，进行消毒。在压缩二氧化碳的终端用气位置，减压阀一端连接压缩二氧化碳取样装置，另一端连接电子气体流量计，然后将消毒后的针孔式压缩空气微生物采样器采样管与电子气体流量计相连。

调节减压阀，将气体流量稳定在 50 L/min，将 90 mm 的 TSA 平板置于采样器培养皿座中，盖上多孔采样头和气体分散头，采样时长为 2 min，采样体积为 100 L。取采样后的 TSA 平板，于 33 ℃培养 5 d，计数。每批次压缩二氧化碳随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

2.1.2　过滤后压缩空气采样

取消毒湿巾，擦拭针孔式压缩空气微生物采样器的表面、气体分散头、多孔采样头和培养皿座，进行消毒。在压缩二氧化碳的终端用气位置，减压阀一端连接压缩二氧化碳取样装置，另一端连接电子气体流量计；然后将电子气体流量计连接过滤器一端，将消毒后的针孔式压缩空气微生物采样器采样管与过滤器的另一端相连。

调节减压阀，将气体流量稳定在 100 L/min，将 90 mm 的 TSA 平板置于采样器培养皿座中，盖上多孔采样头和气体分散头，采样时长为 10 min，采样体积为 1 000 L。取采样后 TSA 平板，于 33 ℃培养 5 d，计数。每批次压缩二氧化碳随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

2.1.3　试验组设置

试验组：取过滤后压缩空气采样组的 TSA 平板，

共 5 份，分别加入每 1 mL 含菌数 100 ～ 1 000 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉菌悬液 100 μL，涂布均匀后于 33 ℃培养 5 d，然后计数。

菌液组：取未使用过的TSA平板，同试验组操作，培养后计数。

2.1.4 方法适用性试验

按“**2.1.3**”项下的分组情况，对每一试验菌逐一进行针孔式压缩空气微生物采样法方法适用性试验，以确认所用方法适于压缩气体的微生物检验，结果如表 1 所示。根据方法适用性试验结果，5 种试验菌的回收比值均在 0.5 ～ 2.0，说明针孔式压缩空气微生物采样器的气体采样方法和培养条件，适用于压缩二氧化碳过滤后的微生物限度检查。

表 1 针孔式压缩空气微生物采样法的方法适用性试验结果

Tab.1 Applicability Test Results of Pinhole Compressed Air Microbial Sampling Method

压缩二氧化碳批号	阳性菌	菌液组菌落数	试验组菌落数	供试品对照组菌落数	回收比值 [1)]
230201101Q001	枯草芽孢杆菌	53	43	0	0.8
	金黄色葡萄球菌	69	75		1.1
	铜绿假单胞菌	45	54		1.2
	白念珠菌	57	49		0.9
	黑曲霉	41	37		0.9

注：[1)] 回收比值 =[（试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数）/ 菌液组菌落数]。

2.1.5 二氧化碳压缩气体的微生物检查结果

按“**2.1.1**”和“**2.1.2**”采样方法分别对过滤前及过滤后的压缩二氧化碳进行检验，结果如表 2 所示，结果显示均无菌落生长，每皿计数结果均为 <1 cfu。

2.2 改良水吸收法

根据水吸收法的原理，结合 ChP 2020 年版四部通则 1105 和 1106 的方法，设计了用于压缩二氧化碳采样的装置，并改良了试验方法，分别采用微生物计数法和直接接种法进行培养观察。

2.2.1 改良水吸收法 - 微生物计数法

（1）过滤前压缩空气采样

准备装有 0.9％氯化钠溶液 500 mL 的三角瓶，以及插有 2 个玻璃管的橡胶塞和硅胶软管，分别包裹并灭菌。将取样口灭菌，依次连接减压阀、电子气体流量计和取样瓶上方的硅胶软管。

调节气体流速至 20 L/min，使气体通过导管进入 0.9％无菌氯化钠溶液中，被洗涤后的空气通过排气口排出，时间为 5 min。取采集后液体，按薄膜过滤法，全部过滤至无菌滤器，取下滤膜后菌面朝上贴于 TSA 平板，于 33 ℃培养 5 d，计数。每批次压缩二氧化碳随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

（2）过滤后压缩空气采样

分别准备装有 500mL 0.9％氯化钠溶液的三角瓶，插有两个玻璃管的橡胶塞和硅胶软管，并分别包裹灭菌。将取样口灭菌，依次连接减压阀、电子气体流量计、过滤器和取样瓶上方硅胶软管。

调节气体流速 20 L/min，使气体通过导管进入 0.9％无菌氯化钠溶液中，被洗涤后的空气通过排气口排出，时间为 5 min，将采集后液体，按薄膜过滤法，全部过滤至无菌滤器，过滤后取下滤膜，菌面朝上贴于 TSA 平板上，置 33 ℃培养 5 d，计数。每批次二氧化碳压缩气体随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

（3）试验组设置

试验组：取采样后装有 0.9％氯化钠溶液 500 mL 的三角瓶，共 5 瓶，分别加入不大于 100 cfu 的金

表 2 过滤前后压缩二氧化碳中的微生物检测结果

Tab.2 Microbial Detection Results in Compressed Carbon Dioxide Gas before and after Filtration

压缩二氧化碳批号	平行试验编号	过滤前			过滤后		
		采样体积 /L	每皿计数结果 /cfu	计数结果 /(cfu·m^{-3})	采样体积 /L	每皿计数结果 /cfu	计数结果 /(cfu·m^{-3})
230201101Q001	1	100	<1	<10	1 000	<1	<1
	2	100	<1		1 000	<1	
220511101Q001	1	100	<1	<10	1 000	<1	<1
	2	100	<1		1 000	<1	
210805101Q001	1	100	<1	<10	1 000	<1	<1
	2	100	<1		1 000	<1	

黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉菌悬液 1 mL，按薄膜过滤法，全部过滤至无菌滤器，过滤后取下滤膜，菌面朝上贴于 TSA 平板，于 33 ℃培养 5 d，计数。

菌液组：另取装有 0.9%氯化钠溶液 500 mL 的三角瓶，共 5 瓶，分别加入不大于 100 cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉菌悬液 1 mL，按薄膜过滤法，全部过滤至无菌滤器，过滤后，取下滤膜，菌面朝上贴于 TSA 平板，于 33 ℃培养 5 d，计数。

(4) 方法适用性试验

按“**2.1.3**”项下分组，对每一试验菌逐一进行改良水吸收法方法适用性试验，以确认所用方法适于压缩气体的微生物检验，结果如表 3 所示。根据方法适用性试验结果，5 种试验菌的回收比值均在 0.5 ～ 2.0，说明改良水吸收法 - 微生物计数法中的气体采样方法和培养条件，适用于压缩二氧化碳过滤前和过滤后的微生物限度检查。

(5) 二氧化碳压缩气体的微生物检查结果

按“**2.2.1**”采样方法分别对过滤前及过滤后的压缩二氧化碳进行检验，结果如表 4 所示。结果显示，均无菌落生长，每皿计数结果均为 <1 cfu。

表 3　改良水吸收法－微生物计数法的方法适用性试验结果

Tab.3　Applicability Test Results of Improved Water Absorption Method-microbial Counting Method

压缩二氧化碳批号	阳性菌	菌液组菌落数	试验组菌落数	供试品对照组菌落数	回收比值 [1)]
230201101Q001	枯草芽孢杆菌	45	46	0	1.0
	金黄色葡萄球菌	71	59		0.8
	铜绿假单胞菌	49	51		1.0
	白念珠菌	52	47		0.9
	黑曲霉	38	35		0.9

注：[1)] 回收比值 =[(试验组菌落数 － 供试品对照组菌落数)/ 菌液组菌落数]。

2.2.2　改良水吸收法 - 直接接种法

(1) 过滤前压缩空气采样

准备装有 200 mL 无菌胰酪大豆胨液体培养基的玻璃瓶，将取样口灭菌，依次连接减压阀、电子气体流量计和硅胶软管。

调节气体流速 10 L/min，使气体通过硅胶软管进入 TSB 培养基中，被洗涤后的空气通过排气口排出，时间为 10 min，将采集后的 TSB 培养基置 33 ℃培养 7 d，观察是否有菌生长，培养基是否混浊。每批次二氧化碳压缩气体随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

(2) 过滤后压缩空气采样

准备装有无菌 TSB 培养基 200 mL 的玻璃瓶，将取样口灭菌，依次连接减压阀、电子气体流量计、过滤器和硅胶软管。

调节气体流速 10 L/min，使气体通过硅胶软管进入 TSB 培养基中，被洗涤后的空气通过排气口排出，时间为 10 min，将采集后的 TSB 培养基于 33 ℃培养 5 d，观察是否有菌生长，培养基是否混浊。每批次压缩二氧化碳随机选取 2 瓶，用于采样和微生物检查，完成 2 组平行试验。

(3) 试验组设置

试验组：取采样后装有 TSB 培养基 200 mL 的玻璃瓶，共 5 瓶，分别加入不大于 100 cfu 的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉菌悬液 1 mL，于 33 ℃培养，观察生长情况。

阳性对照组：另取装有无菌 TSB 培养基 200 mL 的玻璃瓶，共 5 瓶，分别加入不大于 100 cfu 的大肠

表 4　过滤前后二氧化碳压缩气体中的微生物检测结果

Tab.4　Microbial Detection Results in Compressed Carbon Dioxide Gas before and after Filtration

压缩二氧化碳批号	平行	过滤前			过滤后		
		采样体积 /L	每皿计数结果 /cfu	计数结果 /(cfu·m^{-3})	采样体积 /L	每皿计数结果 /cfu	计数结果 /(cfu·m^{-3})
230201101Q001	1	100	<1	<10	100	<1	<10
	2	100	<1		100	<1	
220511101Q001	1	100	<1	<10	100	<1	<10
	2	100	<1		100	<1	
210805101Q001	1	100	<1	<10	100	<1	<10
	2	100	<1		100	<1	

埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白念珠菌和黑曲霉菌悬液 1 mL，置 33 ℃培养，观察生长情况。

(4) 方法适用性试验

按“**2.2.2**”项下试验组进行操作，对每一试验菌逐一进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于压缩气体的微生物检验。另设置无菌 TSB 培养基的阴性对照组，同法试验。结果如表 5 所示。根据方法适用性试验结果，与阳性对照组比较，试验组中加入的 5 种试验菌均生长良好，说明改良水吸收法（直接接种法）中的气体采样方法和培养条件，适用于压缩二氧化碳过滤前和过滤后的检查。

(5) 二氧化碳压缩气体的微生物检查结果

按“**2.2.2**”项下采样方法分别对过滤前及过滤后的压缩二氧化碳进行检验，结果显示，均未有菌生长，培养基未见混浊。

3 小结

本试验使用 2 种采样方法和 3 种培养方式对某公司的 3 批二氧化碳压缩气体进行微生物限度检查。其中，使用针孔式压缩空气微生物采样器对过滤后二氧化碳压缩气体采样 1 000 L，结果为 <1 cfu/m^3，达到了 A 级洁净环境对浮游菌的规定。其他采样方式和培养条件下，均未检出微生物。该结果说明用于试验研究的 3 批次二氧化碳压缩气体污染微生物指标符合要求，生产中使用的过滤器能够有效地去除气体中的微生物。

二氧化碳压缩气体的微生物限度检查可采用针孔式压缩空气微生物采样器进行，气体流量设定为 100 L/min，采样体积为 1 000 L，培养基为 TSA 培养基，30 ～ 35 ℃培养 5 d，计数结果。

本次试验仅对压缩二氧化碳中的微生物污染情况进行研究，并未对其他如压缩空气、氮气等气体进行研究；本次试验虽对气路及压缩气瓶中的气体进行了微生物检查，但不排除气体在生产过程中洁净度较高，生物负载低导致假阴性结果，后续仍需要对药用压缩气体进行微生物挑战试验。未来拟研究向二氧化碳气瓶中添加阳性试验菌，通过气体释放后检测阳性菌的菌落回收情况，以验证方法适用性。

表 5 改良水吸收法 - 直接接种法方法适用性试验结果

Tab.5 Applicability Test Results of Improved Water Absorption Method-direct Inoculation Method

压缩二氧化碳批号	阳性菌	试验分组	培养天数[1)]					试验菌数 /(cfu·mL^{-1})
			1	2	3	4	5	
230201101Q001	大肠埃希菌	试验组	+	+	+	+	+	68
		阳性对照	+	+	+	+	+	
	枯草芽孢杆菌	试验组	+	+	+	+	+	56
		阳性对照	+	+	+	+	+	
	金黄色葡萄球菌	试验组	+	+	+	+	+	74
		阳性对照	+	+	+	+	+	
	白念珠菌	试验组	+	+	+	+	+	47
		阳性对照	+	+	+	+	+	
	黑曲霉	试验组	-	+	+	+	+	39
		阳性对照	-	+	+	+	+	
	阴性对照	TSB	-	-	-	-	-	/

注：[1)]“+”表示混浊或有疑似菌生长；“-”表示未见混浊或无疑似菌生长。

参考文献：

[1] 吴 昊. 碳酸氢钠林格注射液对肝移植患者急性肾损伤和乳酸水平的影响 [D]. 合肥 : 安徽医科大学博士学位论文 , 2023.

[2] 刘 佳. 碳酸氢钠林格液在老年腹部手术术中液体管理的临床研究 [D]. 合肥 : 安徽医科大学硕士学位论文 , 2023.

[3] WEAR J, MCPHERSON T B, KOLLING W M. Stability of sodium bicarbonate solutions in polyolefin bags [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2010, **67**(12): 1026-1029.

[4] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 厂房设施与设备——药品 GMP 指南（第 2 版）[M]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 2023.

[5] 王立江. 制药用压缩空气质量标准及制备系统技术的探讨

（下转第 1076 页）

源［J］. 计量与测试技术 , 2020, **47**(5): 5-6.
［19］ ISO. Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: classification of air cleanliness by particle concentration. ISO 14644-1: 2015［S］. Vernier: ISO copyright office, 2015.
［20］ 暴海霞 , 韦恩泽 , 吴振一 , 等. 尘埃粒子计数器宏粒子发生装置的研制［J］. 计量与测试技术 , 2022, **49**(1): 13-15.
［21］ 黄三明. 容积定量干法分散圆盘式发尘装置研究［C］// 第十二届中国电除尘学术会议论文集. 武汉 : 中国环境保护产业协会电除尘委员会 , 2007.

（上接第 1061 页）

［J］. 中国医药工业杂志 , 2016, **47**(5): 621-628.
［6］ 魏　嵬, 赵　璞. 药品生产用洁净压缩空气的质量控制［J］. 甘肃科技 , 2015, **31**(4): 139-141.
［7］ 国家市场监督管理总局、国家标准化管理委员会. 压缩空气 第 1 部分 : 污染物净化等级 : GB/T 13277.1—2023［S］. 北京 : 中国标准出版社 , 2023.
［8］ 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 , 中国国家标准化管理委员会. 压缩空气 第 4 部分：固体颗粒测量方法 : GB/T13277.4—2015［S］. 北京 : 中国标准出版社 , 2015.
［9］ 国家市场监督管理总局 , 中国国家标准化管理委员会. 压缩空气 第 7 部分 : 活性微生物含量测量方法 : GB/T13277.7—2021［S］. 北京 : 中国标准出版社 , 2021.
［10］ Technical Committee ISO/TC 118, Subcommittee SC 4. Compressed air. Part 7: test method for viable microbiological contaminant content: ISO-8573-7: 2023［S］. Geneva: ISO copyright office, 2003.
［11］ 王海云 , 战玉清. 兽药生产过程中压缩气体微生物检测技术分析［J］. 畜牧兽医科技信息 , 2016, (12): 25-26.