

制药企业生产工艺中生物膜及红锈控制策略

生物膜这个词对于大多数人来说是一个很陌生的词汇，不过在制药、医疗等对微生物有严格控制的行业，生物膜却不是一个陌生的存在，那令制药同仁经常感到头痛的水质微生物反复超标跟生物膜是否有关联，跟水系统有长期并存的红锈跟生物膜是否也有关联呢，今天让我们来好好聊聊这些大家头痛的问题。

生物膜的定义

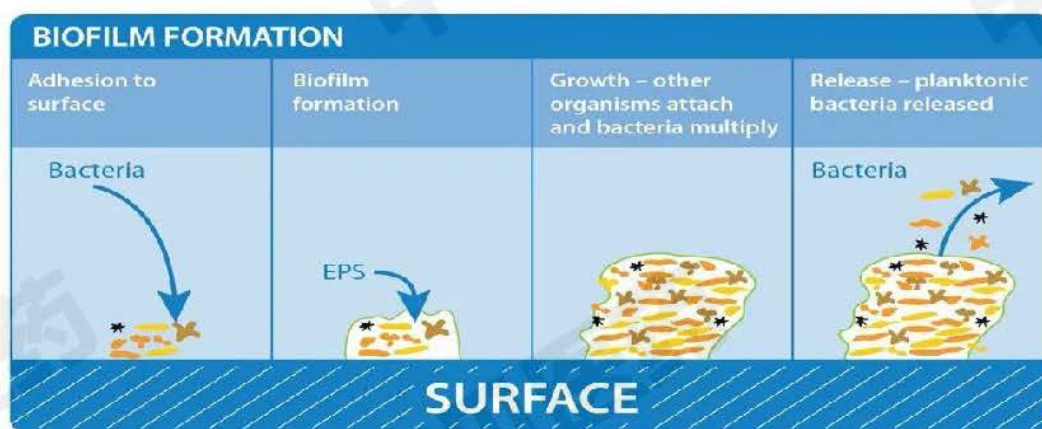
生物膜也叫生物被膜，英文名称 Biofilm，生物膜由微生物分泌的胞外聚合物（EPS），一层薄薄的黏液层组成，在表面形成一种水凝胶或基质，可以为微生物提供安全的庇护所，保护微生物免受外部影响和消毒措施。

生物膜的形成

生物膜通常是一大批或一组不同种类的微生物。当这些微生物在潮湿的环境中粘附于表面时，就会形成。粘附在表面的微生物又分泌细胞外聚合物物质（EPS），这样又会继续粘附其他微生物。这样一来，就使得能够形成复杂的三维结构或微生物团。

生物膜通常遵循相似的形成和传播途径：粘附-表面聚集-增长-分离。生物膜在原本干净的表面（即不含有机和无机污染物的表面）上的发展过程通过以下四个步骤进行：

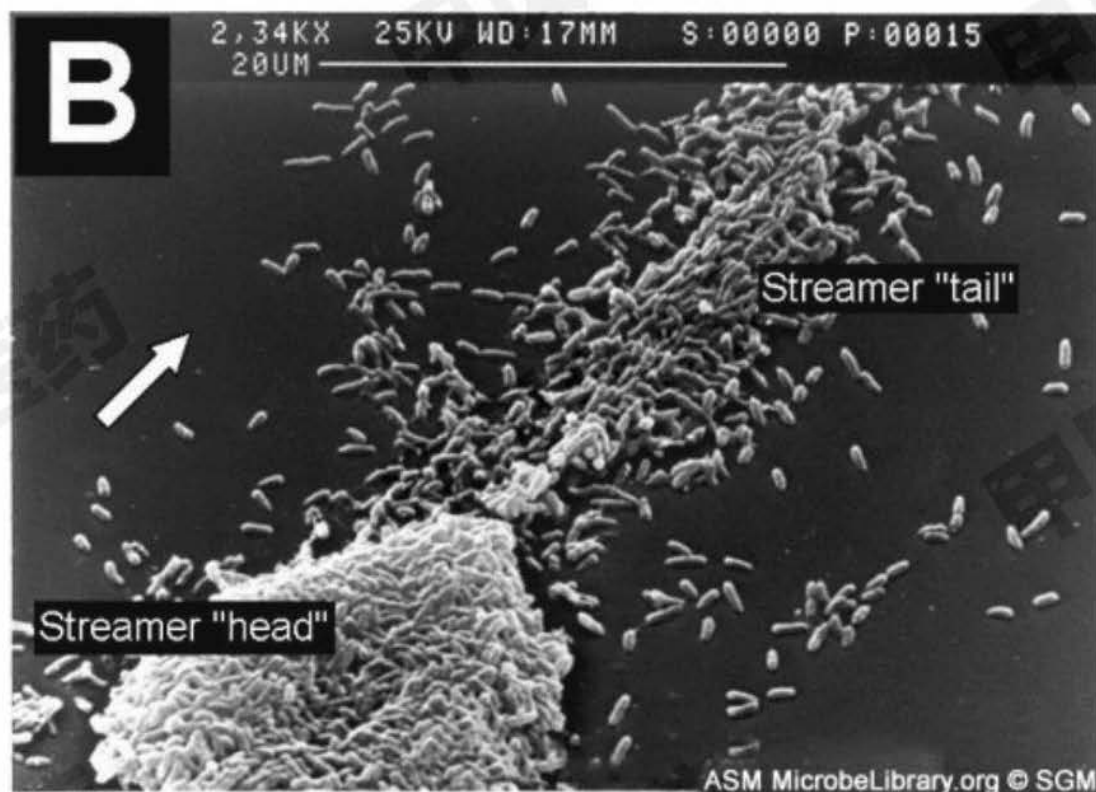
- 1) 吸附微量的有机和无机化合物以形成初始膜，该膜可以在附着的初始阶段充当生物识别因子。
- 2) 微生物对化学梯度进行响应，并由平流运输过程和/或趋化作用介导的可逆的初级附着。
- 3) EPS 的分泌，稳定了附着的微生物群。
- 4) 表面分裂。



生物膜形成过程

系统中形成生物膜的前提条件是微生物在表面吸附，而吸附的前提条件是存在微生物吸附的载体，这个载体可以是有机物或无机物，也可以是不平整的表面，粗糙的表面也会将微生物拦截，然后导致微生物聚集，从而形成生物膜。如果载体是有机物或无机物，证明系统并没有被清洗干净；如果载体是不平整的表面，可能的原因有多种：

- 材质表面的抛光不好，粗糙度 Ra 值高
- 焊接部位表面不平整
- 不锈钢表面腐蚀，产生红锈，不锈钢系统表面的红锈，成为微生物滋生的温床



不锈钢表面腐蚀后的微观图片

基于以上原因，制药设备尤其是水系统中出现生物膜是非常常见的现象，因为目前粗糙度最好的表面 R_a 值是 $<0.4\mu m$ ，不锈钢表面还是存在细小的缝隙，只是肉眼根本看不出，只能借助仪器来检测，但是这些细小的缝隙是能够

截留一些体积较小的微生物的，因为目前已知的最小的细菌的大小在 $0.2\mu\text{m}$ ，所以即使是光滑干净的表面都会有截留微生物的可能，那么如果是表面已经不平整或者出现了红锈颗粒，这样更容易让水中的微生物聚集，从而形成生物膜。所以说，水系统出现了微生物超标，必然有生物膜，但是并不一定有红锈；而如果水系统中出现了红锈，那么必然会有生物膜存在。只是鉴于生物膜的特性，并不容易检测到而已。

生物膜的控制策略

生物膜应该进行有效的预防控制，而不是发现了生物膜后进行事后干预。应该结合现有的生产流程进行风险评估，并制定可行性的方案来进行相应的预防控制和预防生物膜的标准操作，并定期执行，这样才能起到避免生物膜的产生。新版 GMP 指南也新增了关于生物膜控制的相关内容，这将是未来指导制药企业在生产流程控制生物膜的一个方向。

通常预防生物膜的标准操作包含 2 个重要的步骤：一个是有效去除生物膜的步骤，另一个要对系统进行除锈的步骤。

除了对生物膜的微生物进行杀灭，还应考虑生物膜碎片的有效去除，因为这些从不锈钢表面脱落下来的碎片会导致系统中存在的内毒素水平升高，所以，一旦发现生物膜，就要制定有效的去除方式方法来避免可能存在的风险，如果只用消毒剂进行处理，往往达不到理想的效果。

相关的研究表明复合配方碱性清洗剂，可以破坏 EPS 的保护，同时减弱生物膜和物体表面的粘合力作用来是生物膜从表面上脱落，而且复合配方中的表面活性剂会与带负电荷的细菌生物膜相互作用产生灭菌效果。表面活性剂有

亲水基团和疏水基团。细胞膜的主要成分是磷脂，在水中表面活性剂靠近细胞膜，然后和磷脂互相溶解，形成疏水基团在里面，亲水基团在外面的球状结构，将其溶解在水中。实验室研究发现：商业化的碱性清洗剂如 JClean®1000 清洗剂对生物膜的去除率可以达到 99.98%以上，符合去除生物膜的相关标准，同时该产品有相应的毒理报告，并能给客户id提供清洗剂 PDE 数值，方便客户计算允许的残留限度值，满足监管机构的审查要求。

所以，使用合成配方的清洗剂来进行生物膜的清洗去除，可以有效解决制药客户系统中微生物超标、去除生物膜及系统除红锈的问题，也避免了未来监管机构的挑战。

下面为常用的生物膜及红锈去除的方法步骤：

1. 配制可进行生物膜清洗的溶液（例如 5% JClean® 1000 清洗溶液）
2. 清洗：系统和所连接的管路用生物膜清洗的溶液在推荐的温度条件下进行一定的循环清洗操作
3. 排放清洗液
4. 冲洗：用水对系统进行冲洗 3 次，为系统除锈做准备
5. 配制可进行红锈去除及钝化的溶液（例如 20% JClean® 2000 溶液）
6. 冲洗：将 5 步中的溶液在系统和所连接的管路中在推荐的温度条件下进行一定的循环清洗操作
7. 排放清洗液
8. 冲洗：用水对系统进行冲洗 3 次左右
9. 检测最终淋洗水的 pH、电导率、TOC 及钝化效果等