

知识产权与药事管理

化学药品注射剂湿热灭菌工艺的研究与验证

许真玉

(国家食品药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100038)

摘要: 湿热灭菌是注射剂常用的灭菌方法, 湿热灭菌的工艺研究主要包括以药物能否采用湿热灭菌工艺为目标的研究和以确定湿热灭菌工艺的具体灭菌条件或者工艺参数为目标的研究两方面。湿热灭菌的工艺验证包括灭菌柜性能的验证、热穿透试验、灭菌前微生物污染的监控、生物指示剂验证试验、过滤系统的验证和容器密封性试验。主要对化学药品注射剂湿热灭菌工艺的研究与验证的相关内容进行了阐述。

关键词: 注射剂; 湿热灭菌; 工艺研究; 工艺验证

中图分类号: R954

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)05-0301-05

注射剂是指药物与适宜的溶剂或分散介质制成的供注入体内的溶液、乳状液或混悬液及供临用前配制或稀释成溶液或混悬液的粉末或浓溶液的无菌制剂^[1]。无菌是对注射剂重要的质量控制要求之一, 可以采用湿热灭菌工艺和无菌生产工艺保证其无菌, 其中湿热灭菌工艺是首选^[2]。笔者主要对湿热灭菌工艺的研究与验证进行阐述。

1 湿热灭菌的工艺研究

湿热灭菌的工艺研究主要包括两方面内容: 一方面是以药物能否采用湿热灭菌工艺为目标的研究, 另一方面是以确定湿热灭菌工艺的具体灭菌条件或者工艺参数为目标的研究。

1.1 药物能否采用湿热灭菌工艺的研究

湿热灭菌法是利用高压饱和蒸气、过热水喷淋等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法^[1]。用高温杀灭微生物的同时, 可能对药品的理化性质产生影响, 甚至影响其内在质量。所以, 对于药品而言, 考察其能否采用湿热灭菌工艺, 主要是考察药物能否耐受湿热灭菌的高温。

药品是否能耐受高温, 除了与其活性成分的化学性质相关外, 很大程度还与活性成分存在的环境密切相关, 所以需要通过对药品的热稳定性进行综合分析, 然后确定能否采用湿热灭菌工艺。首先要清楚活性成分的化学结构特点, 另外可以通过控制化学反应条件来提高活性成分的稳定性。

1.1.1 活性成分的化学结构特点

通过对活性成分化学结构的分析, 可以初步判

断活性成分的稳定性, 如果活性成分结构中含有一些对热不稳定的结构基团, 则提示主成分的热稳定性可能较差。此时可以通过对其化学结构的进一步分析, 预测活性成分在高温下可能发生的化学反应, 以便在处方工艺研究中采取有针对性的措施, 以保障产品能够采用湿热灭菌工艺。

1.1.2 控制化学反应条件

在对活性成分结构特点进行研究的基础上, 可以有针对性地进行处方研究。如活性成分易发生氧化反应, 则需要考虑是否需要在处方中加入适宜的抗氧化剂, 同时采取充氮的生产工艺; 如活性成分的稳定性与 pH 值相关, 则需要通过研究寻找最利于主成分稳定的 pH 值, 当然此时需要关注该 pH 值在临床治疗时能否接受; 如果主成分是因为某些杂质的存在而影响了稳定性, 则需要通过适宜的手段去除相关的杂质; 如果是主成分在某种溶剂系统中稳定性较差, 则需要考虑更换溶剂系统, 当然此时同样需要考虑所选用的溶剂系统在临床应用时能否被接受; 湿热灭菌的不同灭菌温度和灭菌时间的组合对产品的稳定性要求有所不同, 可以在保证提供所需的无菌保证水平 (sterility assurance level, 简称 SAL) 的基础上, 通过灭菌时间和灭菌温度的调整来确定药物可以耐受的湿热灭菌工艺等。

总之, 需要通过各个方面的研究, 使药物尽可能地采用湿热灭菌工艺。只有在理论和实践均证明即使采用了各种可行的技术方法之后, 活性成分依然无法耐受湿热灭菌的工艺时, 才能选择无菌保证水

平较低的生产工艺。

1.2 具体灭菌条件或者工艺参数的研究

当确定药品可以采用湿热灭菌工艺后,需要研究关键环节的具体工艺参数,如灭菌温度、灭菌时间、灭菌压力、标准灭菌时间(F_0)的最小值及最大值、灭菌前微生物污染的监控等,以确定最佳工艺。

1.2.1 仪器设备及其灭菌方式

灭菌设备对产品的无菌保证至关重要,对灭菌设备的了解是确定灭菌工艺研究和验证程序的基础。近年来,随着灭菌设备在技术上的发展,出现了不同原理的灭菌设备,比如下排式-重力置换式灭菌柜、上排置换式灭菌柜、高真空型灭菌柜、脉动真空式灭菌柜、喷淋式灭菌柜、混合汽-气灭菌柜等等^[3-4]。灭菌柜的用途不同,优缺点也各不一样。需要在对灭菌设备和灭菌原理充分了解的基础上设计灭菌工艺研究和验证的程序。

1.2.2 温度与时间

从无菌保证水平的角度出发,首选过度杀灭法,即 $F_0 \geq 12$ 、 $SAL \leq 1 \times 10^{-6}$ 的湿热灭菌工艺。但在很多情况下,药物不能够耐受过度杀灭法的高温时,可以确定采用残存概率法,即 $12 > F_0 \geq 8$ 、 $SAL \leq 10^{-6}$ 的湿热灭菌工艺。

对于不稳定的药品,当 F_0 值相同时,较高灭菌温度和较短灭菌时间的组合,有利于降低化学反应发生的程度。但同时较高灭菌温度和较短灭菌时间的组合更易受灭菌设备的限制,热分布和热穿透较难控制。所以需要结合产品的热稳定性和灭菌设备的情况对灭菌温度和灭菌时间进行研究。

1.2.3 压力

湿热灭菌工艺是湿度达到饱和时(相对湿度为100%)的一种灭菌工艺。有研究数据表明,温度在90~125℃,相对湿度高于50%或者低于20%时,细菌芽孢较易被杀灭。同时,饱和蒸气的穿透性比干热空气及过热蒸气的穿透性要强得多,这对于热分布的均匀性是很有帮助的。此外,蒸气冷凝时放出的潜热也可以传给待灭菌药品而使之升温,并使其所带的微生物尤其是表明微生物发生水合作用而加速其死亡。

1.2.4 灭菌前微生物污染的监控

不同的灭菌工艺对灭菌前微生物污染水平监控的要求不同。对于过度杀灭法而言,即使不考虑产品灭菌前的污染状况,也能保证 $SAL \leq 1 \times 10^{-6}$ 。但这并不意味着生产过程中对污染可以完全不加控

制。从控制热原的角度,也应当遵循工艺卫生规范,控制产品的微生物污染。对于残存概率法而言,灭菌前微生物污染的监控是对灭菌工艺的无菌保证水平进行评价的重要基础之一。

SAL 是判断灭菌工艺是否可行的标准,SAL 的负对数可称为无菌保证值。无菌保证值的计算公式为:无菌保证值 = $F_0/D - \lg N_0$ ^[5],其中, N_0 为灭菌开始时产品中的污染微生物总数, D 为污染微生物的耐热参数。所以,一项灭菌工艺的无菌保证值与 F_0 、 N_0 、 D 密切相关。

1.2.5 最小及最大 F_0 值

保证产品灭菌的有效性需要一定的 F_0 值,为保障灭菌柜内各个点均可以保证灭菌的有效性,需要关注 F_0 最小值。而对于一些热稳定性较差的药物,过高的 F_0 值意味着局部温度过高,易引起局部产品受热过度而造成药物部分降解,以致同一灭菌批次的产品出现质量不均一。所以在实际生产中,需要控制 F_0 的最大值、最小值、平均值。

当灭菌工艺基本确定,即灭菌温度和灭菌时间基本确定,灭菌前的微生物污染水平也得到监测时,通过热分布试验、热穿透试验,可以获得正常生产状态下的最高和最低温度(即热点和冷点)、最大和最小 F_0 值。通过计算各点的 F_0 值及其差异,可以确定产品的装载情况(包括装载方式和装载量),以及灭菌过程中需要控制的各参数(如灭菌温度和灭菌时间)的变化范围。一般来说,药物的装载情况和各项参数的控制应以能够保证产品的 $\bar{F}_0 \pm 3SD$ 在设定的 F_0 值标准范围内。

由于湿热灭菌存在多种灭菌温度和灭菌时间的组合,而不同灭菌温度和灭菌时间的组合对产品稳定性和质量的影响不同;同样,污染菌在不同的溶液环境(即不同处方)中耐热能力也会有所不同,不同处方在影响主成分的热稳定性的同时,也影响着污染菌的耐热性。所以需要通过以上两方面的研究,确定最适合产品的处方、工艺(包括灭菌工艺)。

2 工艺验证

湿热灭菌工艺基本上可以分为过度杀灭法($F_0 \geq 12$)和残存概率法($12 > F_0 \geq 8$),过度杀灭法和残存概率法都应进行灭菌工艺验证,以保证灭菌后的 $SAL \leq 1 \times 10^{-6}$ ^[6]。

影响产品 SAL 的相关因素非常多,主要包括以下几个方面:厂房设施(包括厂房、空调净化系统、纯化水系统、注射用水系统、氮气系统等)、设备(包括

洗瓶机、洗塞机、灭菌柜、过滤设备、干热灭菌设备、灌封及压盖设备等)、工艺、人员等。其中关于 GMP 管理的内容,这里不再详述,建议参考 GMP 的相关规定执行;仅就与具体产品研究相关的几个方面进行阐述。

2.1 灭菌柜性能的验证

灭菌柜是注射液生产中的关键设备,包括快速冷却灭菌器、水浴喷淋式灭菌器、过热水灭菌器等。在灭菌过程中,同一时间灭菌柜腔室内不同部位的温度以及加热过程中的升温或冷却过程中的降温速度是存在差异的,可以通过热分布试验考察灭菌过程中不同位置的温差状况,为下一步的热穿透式试验提供数据支持。热分布试验包括空载热分布试验和装载热分布试验。

2.1.1 空载热分布试验

通常可以采用 10~20 个热电偶或热电阻做温度探头,进行编号后将它们固定在灭菌柜腔室的不同位置。温度探头的安放位置需要包括可能的高温点(如蒸气入口处)、低温点(冷凝水排放口),灭菌柜温度控制探头处、靠近温度记录探头处,其他的探头可以均匀地分布于灭菌柜腔室内,以使温度的检测具有较好的代表性。温度探头在试验前后均需要在 0℃(冰浴)和 121℃(恒温油浴)进行校正。

2.1.2 装载热分布试验^[7]

一般情况下,可以在几次空载试验初步确定冷点位置后进行装载热分布试验。可以采用热电偶或者热电阻做温度探头,采用的个数和安放的位置同空载热分布试验,注意一定要在空载热分布试验确定的冷点安放温度探头。温度探头安放在待灭菌容器的周围,但不能介入待灭菌的容器。

装载热分布试验可以进行最大和最小装载的试验,应尽可能使用待灭菌产品或者类似物。如果待灭菌产品存在不同包装规格,如 1 000、500、250、100 mL 等时,可以进行最大规格和最小规格的装载热分布试验。如果待灭菌产品存在不同浓度规格,考虑到不同药液浓度对热穿透的影响,需要进行各个浓度规格产品的装载热分布试验。待灭菌产品的装载方式和灭菌工艺的各项参数的设定应与正常生产时一致。每一装载量的热分布试验需要至少进行 3 次。温度探头在试验前后均需要进行校正。

2.1.3 数据的处理

通常情况下,灭菌柜腔室最冷点和平均温度之间的温差应不超过±2.5℃;如果超过,则提示灭菌

柜的性能不符合要求,需要寻找原因并进行改进。随着灭菌柜性能的不断改进以及对生产过程控制要求的不断提高,很多注射剂的生产企业将灭菌柜腔室最冷点和平均温度之间的温差控制在 1.0℃,甚至 0.5℃ 之内,这对保障产品灭菌的有效性是更有利的。

2.2 热穿透试验

热穿透试验是对灭菌柜和灭菌程序对待灭菌产品适用性的一项试验。对于药品而言,灭菌程序既要赋予产品一定的 F_0 值,以保障其 $SAL \leq 1 \times 10^{-6}$,同时灭菌程序又不致使产品受热过度而造成药物部分降解,以致同一灭菌批次的药品质量不均一。

热穿透试验所用的温度探头的数量和安放位置需要根据热分布试验结果确定。一般可以用 10~20 个温度探头。如果热分布试验结果显示重现性较好,温度探头的个数可以酌情减少。温度探头应插入待灭菌药品中,带有温度探头药品的安放位置包括热分布试验确定的冷点和高温点、其他可能的高温点、灭菌柜温度探头附近、温度记录探头处。另外应有记录腔室温度的探头,此探头不应插入药品中,安放在温度控制探头附近。

热穿透试验的步骤及要求与装载的热分布试验基本相同,每一装载量的热分布试验也需要至少进行 3 次。通过热穿透试验可以确定在设定的灭菌程序下,灭菌柜内各个位置的待灭菌产品是否能够达到设定的温度。结合灭菌前微生物污染的检测,可以确定灭菌柜内各个位置的待灭菌产品是否能够获得设定的 F_0 值。

2.3 灭菌前微生物污染的监控

灭菌前微生物污染的监控包括污染菌水平的监测和污染菌耐热性的监测。

2.3.1 污染水平的监测

在正常生产过程中,从每批药品灌装开始、中间及结尾各取适量产品作为监测样品。由于在实际生产过程中所使用的瓶子是清洁干净但未灭菌的,为了防备监测结果超出标准时,能够区分污染的来源,所以进行污染水平监测时所取样的样品应采用事先灭菌的瓶子。然后就可以对取样样品进行培养,计算微生物污染水平值。

根据公式:无菌保证值 = $F_0/D - \lg N_0$ ^[5],当 $D=1$ 、 $N_0=100$ 时, $F_0=8$ 可以保证 $SAL \leq 1 \times 10^{-6}$ 。所以,正常生产时需要控制污染水平为每 100 mL 药液中污染菌不超过 100 个。当微生物的

污染水平超过此标准时,需要调查污染菌的来源并采取相应措施降低无菌均水平至标准之下。但在实际生产中,企业往往能将微生物污染水平控制得很低,这是有利于保障药品灭菌有效性的。

2.3.2 污染菌耐热性的监测

一般可以采用毛细管暴热计时法测定污染微生物的耐热参数 D 值,首先将药品中的微生物分离,将菌膜或者孢子悬浮液分别放入注射用水或者磷酸盐缓冲液中,采用适宜的设备振动使其分散均匀,制备成浓度约为 1×10^8 /mL 的悬浮液,然后在沸水中加热约 10 min 以杀灭可能存在的芽孢繁殖体。再将上述悬浮液注入适宜长度的毛细管中,使每管的菌量为 1×10^6 个孢子,封口,置于校正过的 121°C 的油浴中曝热。每隔 1~3 min 取出 2 支毛细管并迅速冷却,制备孢子溶液,培养后计数。可以根据公式 $\lg N_t = \lg N_0 - t/D$ 计算,其中 N_0 和 N_t 分别为 0 和曝热 t 时间的孢子浓度。

由以上 D 值的测定方法可知,测定所需的仪器并不非常复杂,但需要专业技术人员和经验的积累。在不具备 D 值测定条件时,可以采用测定污染菌的耐热性来代替。

污染菌的耐热性检查可以采用以下的测定方法:先用灭菌的 5% 聚山梨酯充分润湿 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜,然后过滤污染水平监测所取的药液样品,再将此膜移至装有无菌的待监测产品的试管中,在沸水浴上煮沸约 30 min,然后进行培养,观察是否有微生物生长。如果观察到有微生物生长,提示药液中存在耐热菌污染。此时需要测定污染菌的 D 值或采用定时煮沸法将耐热污染菌与已知生物指示剂的 D 值进行比较,并根据污染菌的耐热性对灭菌工艺的可行性进行评估。

2.4 生物指示剂验证试验

湿热灭菌法的生物指示剂验证试验是指将一定量已知 D 值的热孢子接入被灭菌的产品中,在设定的湿热灭菌条件下灭菌,以验证设定的灭菌工艺能否赋予产品所需的标准灭菌时间 F_0 。而进行的试验及评价过程^[8]。生物指示剂验证试验不能代替物理验证,但此项验证工作能够如实反映灭菌工艺条件对微生物的杀灭效果,从而证明该灭菌工艺所赋予产品的无菌保证水平是否符合要求。

2.4.1 生物指示剂的选择

一般情况下,生物指示剂选择的要求是:孢子稳定、非致病菌、易于培养、有效期长、保存及使用方

便、安全性好。针对具体的灭菌工艺和药品,还应注意所用的生物指示剂的耐热性应强于待灭菌药品中的污染菌。

对于湿热灭菌工艺而言,常用的生物指示剂有以下几种:嗜热脂肪芽孢杆菌(D 值 1.5~3.0)、枯草芽孢杆菌(D 值 1.5~3.0)、凝结芽孢杆菌(D 值 0.4~0.8)、梭状芽孢杆菌(D 值 0.4~0.8)^[1]。

因为生物指示剂在不同介质或环境中的耐热性会有所不同,所以对于具体的品种而言,需要测定生物指示剂在该产品中的耐热性。

2.4.2 生物指示剂量的确定

应当根据生物指示剂在待灭菌样品中的耐热性来确定生物指示剂验证试验中需要接种的孢子数量,可以采用存活概率法或者阴性分数法等方法计算需要接种的孢子数量。

2.4.3 生物指示剂的装载

为了准确反映灭菌程序对药品的灭菌效果,验证用生物指示剂通常接种于被验证药品的包装容器中。如果生物指示剂与产品不相容,可以用 pH 和黏度与产品相似的溶液来代替产品。装有生物指示剂的容器应紧挨于装有测温探头的容器,在灭菌设备的冷点处必需放置生物指示剂。灭菌柜的其他部位应装载产品或者同类物,以尽可能地模拟实际生产时的状况。

2.4.4 灭菌

按照设定的程序进行灭菌,验证试验的灭菌温度不能高于产品的实际灭菌温度。

2.4.5 检查和培养

可以根据生物指示剂的生长特性以及验证时的包装方式,采用适当的方法进行检查和培养。如果试验时生物指示剂直接接种在培养基中,灭菌后可以直接进行培养。在其他情况下,需要经过滤或接种等方法处理后再进行培养。不同的生物指示剂所需要的培养条件也各不相同,需要针对使用的生物指示剂确定培养条件。

2.4.6 试验结果的评价

根据生物指示剂的 D 值和接种量推算产品在灭菌过程中实际达到的 F_0 值。采用以下公式进行推算: $F_0 = D \times (\lg N_0 - \lg N_t)$ ^[5]。

验证新的灭菌工艺时,每个产品的每个规格的每一灭菌程序,至少需要连续进行 3 次生物指示剂验证试验。如果试验的重现性好,所有试验的结果均提示 $\text{SAL} \leq 1 \times 10^{-6}$,则验证结果提示该灭菌工

艺为验证合格的灭菌工艺。如果各次验证的结果不一致,需要分析原因,采取相应的改进措施后重新进行验证工作。

2.5 过滤系统的验证和容器密封性试验

过滤系统的验证包括相容性试验、完整性试验、微生物截留能力试验,其中相容性试验主要考察滤器选择是否合理,完整性试验、微生物截留试验与微生物负荷量关系比较密切。对于采用湿热灭菌工艺的药品,主要是通过湿热灭菌过程保证注射剂无菌,并不依靠过滤除菌。但过滤过程与控制微生物负荷以及控制终产品的热原密切相关,所以对于采用湿热灭菌的产品,也需要进行过滤系统的验证。

容器密封性试验包括灭菌过程中的容器密封性试验和贮藏过程中的容器密封性试验。灭菌过程中的容器密封性检查可以采用目检法、盐水渗入试验、染料染色试验。贮藏过程中的容器密封性试验通常采用微生物侵入试验进行考察,在容器内灌入培养基并按照正常生产方式压塞封盖、灭菌、冷却,将容器倒置并将瓶口完全浸没于高浓度的菌液中一段时间,然后将容器外表面消毒后进行培养,观察是否有细菌在容器内生长,如果容器内有微生物产生,则提示容器的密封性不符合要求。

以上对化学药品注射剂湿热灭菌工艺研究与验证的相关内容进行了阐述,希望通过和各界的广泛交流,加深对此问题的认识,更好地服务于实际工作。

参考文献

- 1 中国药典[S]. 二部. 2005.
- 2 EMEA. Decision trees for the selection of sterilization method, annex to note for guidance on development pharmaceuticals [S]. 2000.
- 3 张汝华,屠锡德. 工业药剂学[M]. 北京:中国医药工业出版社,1998.
- 4 戚仕涛,汤黎明,沈华强. 压力蒸气灭菌设备及其质量控制技术[J]. 中国医疗设备,2008,23(1):44-45.
- 5 SFDA. 药品生产验证指南[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- 6 FDA. Guidance for industry for the submission of documentation in applications for parametric release of human and veterinary drug products terminally sterilized by moist heat processes [S]. 2008.
- 7 FDA. Guidance for industry for the submission documentation for sterilization process validation in applications for human and veterinary drug products [S]. 1994.
- 8 PDA. Validation of moist heat sterilization process: Cycle design, development, qualification and ongoing control [S]. 2007.

(收稿日期 2009-06-25)

《中国药学》(英文版)2010年征订启事

《中国药学》(英文版)为中国科协主管,中国药学会主办,北京大学药学院承办的英文综合性药学期刊,国内统一刊号:CN 11-2863/R,国际标准出版物编号:ISSN 1003-1057。《中国药学》(英文版)于1992年创刊,为中国英文版科技期刊数据库来源期刊,被CA《美国化学文摘》、CAJ-CD《中国学术期刊(光盘版)》、《万方数据库》等国内外检索系统收录。报道国内药理学领域的科研成果和国际药理学研究进展,具体包括天然药物化学、合成药物化学、药事管理与临床药理学、药物分析学、生药化学、药剂学、药理学等方面的内容,主要栏目有研究论文、研究简报、综述、研究生论文摘要、学术动态和新药介绍等。

编辑部地址:北京市海淀区学院路38号,北京大学药学院《中国药学》(英文版)编辑部

邮编:100191

邮箱:zgyxe@bjmu.edu.cn; jcps@bjmu.edu.cn

电话(传真):86-10-82801713; 82805496

《中国药学》(英文版)于2010年改为双月刊,为大16开本,80页,每期定价15元,年定价90元(包括邮费)。欢迎广大读者在全国非邮发报刊联合征订,亦可与本编辑部联系订购。

银行汇款

收款单位:北京大学医学部

开户行:工商北京中关村支行东升分理处

帐号:0200006209089112565

邮局汇款

收款单位:北京大学药学院《中国药学》(英文版)编辑部,邮编:100191