

注射剂无菌保证工艺研究与验证常见技术问题（一）

1、按照欧盟决策树的要求，不能达到 121℃，15 分钟灭菌，可选择 $F_0 \geq 8$ 的残存概率法。请问，若产品能达到 121℃，12 分钟灭菌，是否就不能选择 121℃，10 分钟，同样，能达到 10 分钟，就不能选择 8 分钟，都是 $F_0 \geq 8$ 的情况。

答：从微生物杀灭的数学模型可知，在初始污染相同的情况下，灭菌 F_0 值越大，无菌保证水平越高。因此，显然为降低产品残留微生物的风险，尽量选择高的 F_0 值是顺理成章的。

2、在产品质量稳定的条件下，均能满足 121℃，8 分钟和 115℃，30 分钟，哪个条件应该优先选择呢？

答：不考虑产品理化质量稳定性，理论上这两种条件达到的 F_0 值几乎相等，无所谓优选哪个。但实际生产中，还要考虑灭菌器内产品中热穿透的情况，灭菌器内不同部位的产品实际获得的 F_0 值的差异，不同灭菌批次间产品的 F_0 的差异等。应该选择热分布差异小，产品 F_0 值差异较小的灭菌工艺。

3、申报资料中的灭菌条件为“101℃2℃，灭菌 30 分钟”，这种表示法是否规范？

答：暂不说灭菌条件为“101℃2℃，灭菌 30 分钟”是否规范，“101℃2℃，灭菌 30 分钟”本身不能称为终端灭菌，因“101℃2℃，灭菌 30 分钟”几乎不能计算 F_0 值。灭菌条件的表示可以参照中国药典 2005 年版二部附录 168 灭菌法，121℃15min 或 116℃40min。

4、同品种 10ml、20ml 注射剂，采取相同的灭菌方式是否合适？

答：同品种 10ml、20ml 注射剂，可以采取相同的灭菌方式，但应进行热穿透试验，考察不同体积样品的热穿透是否有一致，同时考虑采用的灭菌方式应能保证大体积产品的无菌保证水平。

5、选择最高无菌保证水平的灭菌工艺，可能会与产品的质量，如有关物质、稳定性等方面有冲突，如何平衡这一矛盾？另外，国外上市的是粉针剂，国内申报时是否还需要进行灭菌工艺的选择研究？

答：实际上，在进行灭菌工艺选择研究过程中就应该进行不同灭菌条件下样品质量变化的研究，选择灭菌工艺的过程也是平衡无菌保证水平和（样品质量）理化指标的过程，在产品有临床需求的情况下，灭菌工艺的选择应以其自身能达到的最高无菌保证水平为原则。对国外上市的粉针剂，国内申报时也应对其采用粉针剂型进行研究，如主药确系对热、对水分不稳定，则可以采用与国外相同的粉针剂；如果主药不是对热、对水分不稳定，则应根据主药的性质选择无菌保证水平高的剂型。

6、最终灭菌工艺的选择原则是首选 $F_0 \geq 12$ ，而不是 $F_0 \geq 8$ ；还是只要达到 $F_0 \geq 8$ 即可？

答：可参考欧盟灭菌工艺选择的决策树。

7、决策树中残存概率法是否亦优先选择 121℃ 的温度条件？

答：不一定，要根据产品的稳定性确定，如果采用更高温度和更短的时间能满足残存概率法时，可能比较低温度，更长时间的灭菌条件对产品更有利。如果产品不能耐受 121℃ 的高温，则可以降低温度，并保证微生物的残存概率小于 10^{-6} 。

8、对热不稳定药品（如蛋白质类、生物制品等），应该直接进行无菌生产工艺的验证。

答：对热不稳定药品（如蛋白质类、生物制品等），首先应对采用的无菌工艺进行研究，是采用除菌过滤+无菌生产工艺，还是采用无菌组装工艺；然后再对无菌工艺进行验证。

9、是否在产品注册申报时就已形成本产品的完整的工艺规程中规定的各项参数的验证？

答：药品注册管理办法规定，申请人在申报“药品注册申请表”后，经药品审评中心审评符合规定的，通知申请人向药品认证管理中心申请生产现场检查，现场检查目的是确认核定生产工艺的可行性，同时抽取 1 批样品，并规定样品的生产应当符合 GMP 要求。由此可见，申报产品注册时，应对用于正式上市产品生产的工艺有了足够的认识。这种认识是建立在产品和工艺开发，扩产、

设备和系统的验证以及验证批的生产整个过程上的。验证批的目的是要证明在规定的工艺参数的范围内，工艺过程能始终生产出合格的产品来。因此，在进行验证批生产前，应已充分了解并能控制工艺中各种关键的可变因素。

10、在进行灭菌工艺验证时，一般会放置一个校验的探头在灭菌柜控制探头旁边，这两者之间的温度差异有什么要求？是否应按校样标准，只允许 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的偏差？

答：一般来说：

a：灭菌器自带的独立的记录探头与监控探头就应完成足够的验证数据，然后对存在的偏差作修正；

b：验证所用的测温探头的精度应优于灭菌器自带的记录探头和监控探头；

c：验证本身的作用之一是对灭菌器自带的监控探头和记录探头进行修正，以便正常使用时达到较为准确的温度值。

目前没有找到“只允许 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的偏差”的说法。

11、在同一条大容量注射剂生产线上，如果有一台灭菌柜，需要进行多个规格产品（如250ml, 100ml）以及不同灭菌参数产品（比如灭菌温度和时间不同）的灭菌，那么在进行验证和再验证的过程中，如何进行热分布以及热穿透的验证设计？是否各种规格、各种灭菌条件均需分别进行验证？

答：一般来说，各种规格、各种灭菌条件均需分别进行验证。

不同规格混合装载的灭菌，除非能够确认很多的相关内容，否则不推荐应用。

12、在对湿热灭菌器进行验证或再验证过程中，进行热分布、热穿透的验证时，如果柜内设置12个或16个热电偶进行温度测试时，找到的冷点在3次验证中可能不同，如果出现这种情况该如何处理？

答：一般来说，空载热分布的冷点应该是在确定的位置周围，否则就可能是设备、压力、空气置换不完全、蒸汽质量等原因引起。

对于装载热穿透，大容量注射剂（LVP， $>100\text{ml}$ ）冷点位于产品的几何中心和沿纵轴位于产品的底部，但需要验证确认。冷点的定位在小容量注射剂中并不典型，因为溶液加热的速率几乎与灭菌器相同。

还有，容器的方向也会影响冷点的位置，当容器旋转或翻转时，可能不存在可辨别的冷点。

如果装载不变，容量相同，蒸汽穿透不存在阻隔等，冷点仍然无法重现，则应检查设备、工艺、压力、蒸汽质量等方面可能存在的确定性。

13、满载热分布和空载热分布对于灭菌效果上体现出的意义有何不同？

答：两项试验都是测量灭菌腔室的温度分布情况，还不反映产品内的温度和热效益的情况，还不能直接反映产品的灭菌效果。但腔室情况显然会影响产品内的情况。验证中依次进行空载热分布、满载热分布、产品热穿透试验。采用这种试验的主要目的是用尽量少的试验次数，尽可能地揭示客观情况。前道试验的结果为后道试验提供信息。

14、满载热分布试验是用空瓶进行还是用装注射用水的输液瓶进行？

答：满载热分布试验是用模拟样品进行。

15、如验证时的装载方式为半载或满载，在以后生产中处于满载和半载之间的是否需要验证？

答：对于处于满载和半载之间的装载方式，建议使用模拟产品填充使其达到满载，从而确保生产时的装载方式与验证时一致。

16、热穿透试验怎么做？

答：热穿透试验的目的是确定灭菌室装载中的“最冷点”，并确认该点在预定的灭菌程序中获得充分的无菌保证值，即菌种残余量 $\leq 10^{-6}$ 及各检测点温度与灭菌室内平均温度的差值 $\leq 2.5^{\circ}\text{C}$ 。对于可能影响灭菌效果的操作情况的变更应做相应的验证，确认操作方法。例如：当在每个灭菌

盘上增加不锈钢盖后，实际产品（溶液）内部的升温时间要比不加盖时慢 2 分钟，因此要在灭菌程序设定时增加 2 分钟的时间。热电偶的放置与满载热分布试验规程一致，将标准热电偶放在灭菌溶液中心部位。

17、热穿透试验中的模拟样品是什么概念，是指实验室小批量样品吗？

答：热穿透试验中的模拟样品是指热穿透性能与真实样品一致的样品，不是实验室小批量样品。

18、微生物挑战试验的生物指示剂的种类需要根据品种选择吗？如何选择？

答：微生物挑战试验的生物指示剂的种类及选择可以参考中国药典 2005 年版二部附录 169 灭菌法。

19、灭菌前微生物污染水平的测定方法？

答：滤膜过滤法是最常用的方法。使用前应通过验证。

20. 产品的微生物限度检测结果为 0CFU，没有发现耐热微生物，那么验证过程中能否采用 D 值稍低的枯草芽孢杆菌作为生物指示剂进行验证？

答：1）、微生物限度的检测结果和选择 D 值稍低的枯草芽孢杆菌作为生物指示剂之间不存在因果关系。

2）、根据提问者的问题，可以认为其采用的是残存概率法的灭菌工艺。对于残存概率法的灭菌工艺可以选择生物指示剂进行残存概率测试，仅仅是因为产品或包装本身不能承受过度杀灭，从而选择比较严格的过程控制，加上产品的初始菌数量控制，或者再加上除菌过滤工艺等等，然后选择生物指示剂进行灵敏度测试，测出平均含菌量 N_0 ，再进行不少于 4 个梯度菌量、足够批次、数量的产品的灭菌前后微生物限度测试（若必需，对不同灭菌时间也要进行测试），寻找并得到大于下降 6 个对数等级的状态参数，在满足 F_0 值在 8~12 之间的条件下，从而推算出 D 值。

21、请问灭菌前微生物污染水平和耐热性（D 值）的测试方法？

答：微生物污染水平通常采用滤膜过滤法截留微生物，再将滤膜转移到固体培养基表面，培养并作微生物计数。应注意过滤的体积、截留微生物的数量，保证足够的检出率（足量的过滤量）和可计数性（截留的微生物太多就没法计数了）。

每批产品都进行的耐热性测试并非 D 值测试，而是所谓沸腾试验——一种定性试验。将截留了微生物的滤膜放入装有同种产品药液的试管中，进行水浴煮沸 15 分钟或更长时间，对该药液进行无菌检查，如阴性则通过，呈阳性，说明污染菌是耐热菌，则需要进一步测 D 值。99% 以上的检品是非耐热菌。

D 值测定相当复杂，请参考《药品生产验证指南》（蓝皮书，国家药监局编）第三篇第三章第一节，有详细介绍。

22、怎样根据 D 值计算接种量？

答：芽孢接种量的计算：

$$N_i = 10^{D_0(\lg N_0 + 6)} / D_i$$

其中 N_i 为生物指示剂耐热孢子接种数量

N_0 为预定产品中灭菌前污染微生物的限度

D_0 为污染微生物允许的最大 D 值

D_i 为生物指示剂耐热孢子在产品中的 D 值

23、对于选择残存概率法最终灭菌的产品，如果灭菌前每批检测微生物限度，而微生物限度检测时间为 72 小时，而实际连续生产的生产周期远远短于 72 小时，其检测结果仅是对灭菌后产品无菌保证水平的参考吗？

答：显然灭菌前微生物含量检查的结果远远滞后于生产过程，其目的不是用于对当批产品的中间控制。

该检查的意义主要有两项：第一，用于评价该批产品的无菌保证水平；第二，长期积累了多批灭

菌前微生物含量的数据后,可以对生产系统在灭菌前的各工艺步骤的微生物污染状况作整体的评估,从而指示该生产体系是否有效地将微生物污染控制在很好的水平,是否需要进行改进等。

24、请问微生物种类、数量研究的方法?所需的设备?如果采用残存概率法,是否在生产过程中必须对微生物水平进行测定,如果引入将增加多少成本?作为大输液生产企业,采用残存概率法,是否要建立专门的微生物实验室检测灭菌前药液微生物污染水平?

答:微生物污染的程度—即数量的检查可以按照药典收载的微生物限度检查方法进行;微生物的种类即鉴别可以从以下几方面依次展开:1)通过肉眼观察菌落形态;2)镜检形态和运动性;3)一般生化试验:革兰氏染色或3%KOH试验;4)生化鉴定(即API试验)鉴别到种。

采用残存概率法时,应该检测产品灭菌前微生物污染水平,包括污染菌的煮沸试验(如100℃,15分钟)和微生物计数。

注射剂生产企业,微生物实验室是必不可少的,其基本功能应包括原辅料的微生物限度检查,产品灭菌前微生物污染量检查,产品无菌检查,细菌内毒素检查,生产环境动态检查(空气微粒、浮游菌和沉降菌计数)。有条件的实验室还可开展以下工作:微生物的鉴别试验(建议企业集团的中心实验室开展API鉴定),生物指示剂的标定(即D值测定,建议企业集团中心实验室开展该项工作)。

25.对于过度杀灭法是否需要进行灭菌工艺验证?残存概率法的产品研发工艺研究与实际生产中验证有何区别?

答:当然需要验证,欧盟CGMP附录第83条:所有的灭菌工艺都应验证。

残存概率法是灭菌工艺的设计,本身就需要验证确认。

26、过度杀灭法是否确定不需进行微生物挑战试验?

答:过度杀灭法的内涵是产品中的微生物下降12个对数,微生物挑战试验是证明微生物的残存概率不大于 10^{-6} ,故过度杀灭法可以不进行微生物挑战试验。

27、最终灭菌产品是否每个申请注册的品种都要单独进行设备验证?是否可以只进行一次设备验证,其它品种可以通用?设备验证资料是否可不附在品种验证资料中,只作为存档备查?

答:最终灭菌产品不一定每个申请注册的品种都要单独进行设备验证,如果注册品种采用相同的或更低的灭菌条件,可以只进行较高温度灭菌条件下的设备验证;针对品种灭菌条件的设备验证资料也应附在品种的验证资料中。

28、非溶液剂型、半固体或粉针剂的灭菌工艺可以计算出类似于F0值的数值吗?可以计算出SAL吗?具体规定是多少?

答:非溶液剂型、半固体或粉针剂的灭菌工艺不可以计算出F0值,但可以计算出SAL,具体可参考欧盟灭菌工艺选择的决策树。

29、关于培养基灌装试验,是针对生产线验证的,还是针对申报产品进行的(每个产品都要灌装三批验证),请问:(1)生产线验证能否代替申报产品的灌装试验(同类品种)?(2)采用何种培养基,硫乙醇酸盐和改良马丁两种培养基都要吗?(3)GMP检查中不同包装规格是否都需要进行三批次的灌装试验?

答:(1)培养基模拟灌装试验应根据产品、包装规格、包装形式的不同而分别进行。例如,如果产品是粉针剂,则培养基模拟灌装试验通常会先灌装液体培养基,然后再灌装模拟产品的无菌粉末(如PEG无菌粉);如果无菌注射液或冻干粉针剂,则只需灌装液体培养基即可;如果包装的规格有2ml、5ml、10ml几种,则即便是同一种产品也需要分别进行各自规格的培养基模拟灌装试验;如果包装的形式有西林瓶或者其他形式(如预充式注射器、安瓿),因采用不同生产线需要分别进行培养基模拟灌装试验。

在具体工作中,考虑到培养基模拟灌装试验实际上是对整个生产线的系统验证,包括生产设备、环境和人员操作等,所以,如果进行培养基模拟灌装试验采用最差条件,即瓶子最大,灌装速度最慢,人员最多,时间长于正常生产的时间等,则也可以不必进行每个产品、每个规格的培养基

模拟灌装试验；如果不是最差条件，则应根据产品、包装规格、包装形式的不同分别进行。

(2) 一般采用广谱的培养基，能促进革兰氏阳性、阴性、酵母菌和霉菌的生长，如大豆胰蛋白胨培养基，厌氧培养基只在特殊情况下使用。

(3) 只有在首次验证时，每种规格需要连续成功进行 3 次培养基模拟灌装试验，以后每年进行 2 次，每次进行 1 批次培养基模拟灌装试验即可。

30、培养基灌装试验中，培养基灭菌后、灌装前，再经滤膜除菌过滤，以观察滤器在消毒安装过程中的无菌效果，是否可行？

答：培养基灌装试验是对包括无菌过滤在内的所有步骤的无菌性保证程度的考察，推荐配制培养基后直接用于无菌过滤及随后的灌装过程，实际操作中要注意防止不溶性颗粒堵塞滤器。

31、培养基灌装试验年度再验证每年两次，每次几批？

答：对于某个产品的年度再验证，通常的做法是每年进行两次培养基灌装试验，每次一批。

32、中国药典 2005 年版无菌培养时间已变为 14 天，培养基模拟灌装后在两个温度的培养试验是否也需延长？

答：总培养时间不得少于 14 天，可以分成两个温度（22.5 度和 32.5 度）各培养至少 7 天，也可以一个温度（22.5 度）直接培养。

33、培养基灌装试验合格标准置信限为 95%，染菌概率 0.1%，请具体解释一下使用哪个统计方法，如何计算查表得出。

答：有关计算公式的详细说明，可参照国家食品药品监督管理局药品安全监管司和药品认证管理中心组织编写的《药品生产验证指南（2003）》（化学工业出版社）一书第 258 页。

有两种计算方法。一种是采用泊松分布的近似值计算公式，即

$$P(X>0) = 1 - e^{-Np} > 0.95$$

其中，P 为置信限，N 为模拟分装瓶数或批量， $p=0.1\%$ （污染概率）

另一种计算方法是更为精确的二项式计算公式，即

$$P(X>0) = 1 - (1 - X)^N$$

其中，P 为置信限，N 为模拟分装瓶数或批量， $X=0.1\%$ （污染概率）

在书中的第 259 页，列有“可信限为 95% 时一次模拟分装中模拟分装量、污染数量与污染概率关系表”，可从该表查出模拟分装数量与污染数量的对应数值。

34、在讲义 72 页第 59 张片子中提到粉针剂、冻干粉针、小容量注射剂工艺验证的异同点中培养基灌装程序的差异主要是指什么，具体怎样做，起始点是哪里，从哪里开始到哪里结束？

答：对于无菌粉针剂，培养基灌装的形式有一些特殊性，如要准备模拟的无菌粉末，分装后用注射器将液体培养基加入瓶中；或将无菌培养基粉末分装，结束后用注射器加入无菌注射用水。但目的仍是考察整个无菌分装过程的无菌保证程度。

35、如何进行容器密封性验证？

答：容器密封性验证常采用物理和微生物学检测手段。物理检测有许多优点，如灵敏度较高、使用方便、检测迅速及低成本等。在产品有效期内，均可使用物理检测方法来确定包装完整性是否符合规定要求。进行包装完整性检测的一个重要原因是确保无菌产品始终保持无菌状态。因此，在产品包装的研发阶段，应考虑采用微生物侵入试验，或采用经验证过的并且比微生物检测更为有效的物理试验方法，来检测产品包装的完整性。但是，对效期内产品的稳定性试验来说，因进行微生物侵入试验较为困难，故建议采用物理检测方法。微生物侵入试验是对最终灭菌容器 / 密封系统完好性的挑战性试验。在验证试验中，取输液瓶或西林瓶（小瓶），灌装入培养基，在正常生产线上压塞、压盖灭菌。然后，将容器密封面浸入高浓度运动性菌液中，取出、培养并检查是否有微生物侵入，确认容器密封系统的完好性。同时，需作阳性对照试验，确认培养基的促菌生长能力。

36、在采用微生物浸泡法进行容器密封性验证时，为什么要事先去除铝盖，请问除去铝盖后，是不是只剩胶塞，那么在试验过程中会不会发生药液泄露而影响验证结果？

答：去除铝盖是为了造成一个更为严格的条件，讲课中以冻干粉针剂为例，通常容器内有较高的真空，不会造成漏液，试验者可根据自己产品的特点判断去除铝盖是否适用。

37、密封性验证中，如铝桶的验证，用培养基验证无法观察结果，是否有其他方法？

答：对于无菌原料的容器，建议尝试物理的方法，如盐水渗入法。

38、密封性验证一般每次取样量是多少，再验证的周期是多少？

答：可以从压盖线上从开始、中间、结束各取至少 10 瓶进行试验，起始验证应考察有效期内不同时间的密闭性，再验证一般一年可进行一次。

39、验证指南中对大输液产品的密封性验证有相关的要求，但对分装及冻干产品无要求，是否不需进行密封性验证？

答：对大容量注射剂、小容量注射剂、粉针剂均应进行容器密封性验证。

40、容器密封性测试是否在安瓿、西林瓶等所有注射剂型中都必须完成？

答：容器密封性测试在安瓿、西林瓶等所有注射剂型中都必须进行。但采用的方法不尽相同，安瓿一般采用物理测试方法，西林瓶则采用物理和微生物学检测方法。

41. 无菌过滤验证目前国内厂家能够做到什么水平？哪种水平是国家认可的？

答：根据国家局药品注册司于 2008 年 1 月 10 日发布执行的《化学药品注射剂基本技术要求（试行）》（二）制备工艺第 4 点有关冻干粉针剂的要求，除菌过滤系统适应性验证试验包括过滤系统相容性测试、过滤前后过滤膜完整性测试、必要时尚需要进行滤膜的微生物截留量测试。

关于灭菌工艺验证工作目前正处于推进过程中，以上是基于目前的认识所提出的阶段性的要求，还将随着对此问题的认知而不断完善。

42、对于滤膜的微生物挑战试验是否需对每一种特定产品进行？这部分试验既然交由生产商进行，对生产商资质是否有要求？即，如何判定供应商提供给我的检测报告是有效的？

答：如果不同产品对于过滤器的通透性影响是不同的，从而导致截留效率的不同，应该对分别进行微生物挑战试验，反之则不需要。

目前，没有对过滤器生产商的资质有法定要求，建议选择已通过行业认证的，其产品在国际国内广泛应用，质量有保证，信用度较高的生产商。所选择的过滤器供应商是否可信是基于药品生产企业对于自己所要生产的产品了解以及对于过滤工艺的了解。过滤器生产商是否法定资质并不是最重要的，最重要的是药品生产企业是否清楚自己选择的过滤器适用于所生产的产品，过滤器的材质是否符合安全性的要求，符合制药的要求，药品生产企业是否清楚自己研发的过滤工艺是否有效。也就是说，只有自己真正理解了过滤的专业知识，了解产品和工艺，才能判定供应商检测报告的有效性。

此外，还可以到过滤器供应商那里亲眼看看检测过程，对供应商进行质量审计，这也有助于增强判断的准确性。

43、除菌过滤使用二个滤芯串联，是否孔径一致？如对主药成分有影响，如何解决？

答：串联的两个除菌过滤器，其滤膜孔径应一致，如果串联的两个除菌过滤滤芯是不同生产批号的，就更好。

如果滤膜对主要成分有影响，应根据过滤系统相容性测试的结果选用其他材质的滤膜，使其对主药成分没有影响。

44、请具体介绍一下过滤器完整性试验的测试方法，如“扩散流试验”。

答：过滤器完整性试验的测试方法应参照供应商说明书提供的方法。如果采用扩散流方法，请根据供应商说明书使用指定的介质润湿过滤器，再与扩散流法的专用仪器、压力气体（压缩空气或氮气）相连接，向过滤器提供供应商说明书确定的压力，专用仪器会自动打印出测试结果，表明

试验通过还是不通过。

45、过滤器验证哪些是生产企业必须进行的？哪些是供应商提供的？

有的老师在讲课中提到“微生物挑战性试验由供应商做，以避免污染产品”，有的老师在讲课中提到无菌过滤器微生物挑战试验，应该在实际的生产参数下进行验证，且微生物截留试验必须在药液中进行，这似乎只能由药品生产企业完成。如何理解？如何进行此项试验更能保证验证的科学价值？

答：两者并不矛盾。过滤器生产厂家都应有自己的实验室，如 Pall 和 Millipore，可以利用药品生产企业提供的药液，选择合适的过滤器并确定实际生产中的过滤参数，并在这些参数范围内进行微生物挑战试验。

46、过滤器使用前起起泡点测试中，使用以后是用注射用水冲洗后测试好，还是直接测试好？

答：起泡点试验需要保持过滤器的充分润湿，在过滤器选择和验证时就应确定润湿的介质）

47、起泡点试验与前向流试验，在过滤器的完整性试验中，是只需选择一种，还是必须两种都作？

答：选择一种即可，但应根据过滤器验证中确定的完整性试验的测试条件和标准进行）

48、如何补救吐温使滤膜孔径变大，以保证药品的安全性？

答：企业应将产品的成分和特性等资料提供给过滤器生产厂家，过滤器厂家根据产品特性选择合适的过滤材质并进行无菌过滤验证）

49、无菌药品应如何监控中间产品的微生物和细菌内毒素污染情况？非最终灭菌？最终灭菌？通常微生物检测需要 4—5 天，而中间产品须当天完成才能决定是否可以进入下道工序。

答：在无菌药品生产过程中，不管是非最终灭菌还是最终灭菌工艺，尽管中间产品的微生物检测需要几天的时间，但是通常不用等微生物检测的结果，可直接进行下一步工序的生产。等中间产品的微生物检验结果出来后，可以根据检测结果采取相应的措施，如中间产品的检验结果合格，则产品可以继续生产直至最终放行，如中间产品的检验结果不合格，则产品不能放行。

50、生产环境的控制：（1）在生产过程中，无菌灌装线上沉降碟的放置是否应在所用操作开始前完成？（2）沉降碟需要暴露多长时间？（3）在讲义 60 页提到的无菌灌装区生产环境监控频率中测试项目“表面微生物”是指哪种检测项目，其内容和标准是什么，监测频率是否是每批一次呢？（4）动态沉降菌检测中，等结果出来已经是 2-3 天后了，如何根据结果进行判断？（5）压缩空气的微生物检测如何很好的进行？

答：（1）是，这样可以监测整个操作过程。（2）欧盟、FDA 的要求是不超过 4 小时，目前我国的要求为 30 分钟，在新 GMP 修订时可能会考虑采用国际通行要求。（3）表面微生物测试是考察如墙面、地面、操作台面、设备等表面的微生物状态，一般采用接触碟或棉拭子的方法，相关的标准请参照欧盟 GMP 附录 1 和 FDA 有关无菌生产工艺的指南。（4）由于微生物培养的特点，批生产时进行的环境微生物监测的结果至少需要等待 2-3 天的时间，一旦发生超标，需要进行全面的分析和调查，以找出造成偏差的原因，并评估对产品的污染风险。（5）由于压缩气体有压力，一般的空气浮游菌采样仪较难直接测定，需要先进行减压，现已有商品化的压缩气体浮游菌采样仪。

51、请问如何建立警戒限或纠偏限？有无相关的计算公式或技术要求？

答：应根据历史的数据，结合不同洁净区域的标准制订。如采用数理统计的方法，一般可以将平均值加上 2 倍的标准差作为警戒限度，加上 3 倍的标准差作为行动限度，限度设定以后，应定期回顾评价，如每年一次。

52、无菌检查不合格时，如有真菌不合格的情况，可能有哪些原因？最有可能的原因是什么？

答：无菌检查出现不合格时，应首先进行无菌试验过程的调查，考虑的因素可包括培养基、试验器材、试验环境、人员操作等，并结合当批产品生产的环境监测结果作出综合的分析判断。

53、如何进行药液储存周期验证，储存周期起点、终点如何确定，使配制完成后→灭菌前，还是

过滤后→灭菌前，取样点如何设置，检验方法及合格判定标准如何确定？

答：进行药液储存时间验证的目的是为了确保药液的微生物水平控制在下道工艺要求范围内并确保对产品的无菌性和内毒素等质量指标无不良影响。一般来讲，配液完成后到无菌过滤前，或过滤完成后到灭菌前（终端灭菌产品）是考察的重点，方法和标准需要根据自己产品的工艺特点确定。

54、轧盖条件是万级制药下的局部保护，这局部保护如何理解？冻干转运是万级下的局部，是指在冻干过程中吗？

答：局部保护就是在轧盖机的正上方有高效空气过滤器，提供单向流保护，这里所说的万级实际是欧盟无菌药品附录中的C级。

参照98版GMP无菌药品附录的要求，冻干转运应该是在万级背景下百级环境中进行的，这通常发生在冻干开始前将已灌装的半加塞产品送入冻干机的冷冻干燥腔室内，或者是冻干结束后将已冻干的产品从冻干机的冷冻干燥腔室内取出送去轧盖，尤其是前者应对产品予以特别的保护，这样才不至于污染未密封的产品。

55、冻干机的湿热灭菌怎么进行？臭氧或甲醛熏蒸不行吗？

答：如果冻干机带有在线灭菌系统的，就可以在每次冻干结束后对冷冻干燥腔室进行湿热灭菌。如果采用臭氧或甲醛熏蒸，应证明这两种方法能达到灭菌的要求，而且其残留量不会对产品质量有不利影响，也不会影响到产品的安全性。此外，采用臭氧有可能加速设备的老化，而采用甲醛熏蒸时，应考虑甲醛的残留以及对人体健康的影响。

56、冻干产品批号以冻干机来确定（98版），如一次配料共两台冻干机冷冻，批号如何确定？

答：根据98版GMP“无菌药品”附录第5条第（3）款的要求，“冻干粉针剂以同一批药液使用同一台冻干设备在同一生产周期内生产的均质产品为一批”，一次配料共两台冻干机冷冻时，应对每台冻干机冻干的产品分别设定各自的生产批号。

57、能否详细介绍一下充氮的效果，如何进行评价？含氧量的测定是在线的还是事后QC测定？所用方法与检测设备？

答：充氮能显著地抑制以氧气为底物的氧化反应，效果取决于反应系统内氧气的含量。含氧量测定有专门的仪器分别用于测定空气中和溶液中的氧，均有在线和离线（实验室）测定设备。比较著名的仪器有：瑞士Orbisphere Laboratories公司的溶解氧仪；丹麦PBI-Dansensor公司的气体氧仪。都有多种精度的在线和离线的型号。

58、请问，可靠的除热原方法有哪些？一般情况下，采用哪种除热原方法较好？

答：活性炭吸附、超滤等方法都对除热源有效果。效果取决于实际条件和产品特性，应通过试验比较、确定。

59、对空间灭菌采用新洁尔灭溶液喷洒、紫外灯照射过夜的方式，该灭菌方法有隐患吗（与环氧乙烷消毒比较）？

答：新洁尔灭对空间消毒是无效的，而且残留固体微粒，并不可取。生产空间也不能用环氧乙烷消毒。可靠的消毒方法是甲醛（福尔马林）熏蒸或臭氧消毒。两种方法的效果取决于空气中活性成分的浓度和存留的时间。

60、一品种已上市多年，未采用终端灭菌工艺，再注册时是否需提供灭菌工艺验证资料，若考察后可以终端灭菌，是否需更改工艺？

答：对未采用终端灭菌工艺的已上市品种，其可以采用终端灭菌工艺，则应进行变更工艺的补充申请，提供相应的研究和验证资料。具体可参照二〇〇七年八月十日国食药监办[2007]504号“关于开展注射剂类药品生产工艺和处方核查工作的通知”的要求。

61、大输液产品现采用残存概率法，以后是否要提高到过度杀灭法？残存概率法是否每批样品都要对灭菌前药液进行微生物检查，并制定相应的标准进行相应的验证？

答：大输液产品采用残存概率法，是否要提高到过度杀灭法，主要还是根据主药的性质和企业付出的生产成本，如果大输液产品质量稳定，可以耐受过度杀灭的灭菌条件，最好还是提高到过度杀灭法，这样既不影响产品的质量，同时又降低了生产成本；因为残存概率法要对每批样品灭菌前药液进行微生物监测及控制。

62、现有的大部分小容量注射剂的灭菌工艺的 F0 值均不能达到 8，对此中心有何措施或规定？

答：国食药监[2008]7 号文附件 1：化学药品注射剂基本技术要求（试行），对 F0 值不能达到 8 的小容量注射剂提出了相应的技术要求，可参照执行。

63、原申报的工艺为大盘冻干或溶媒结晶后再无菌分装，现改成冻干（瓶冻）工艺，应该讲无菌保证水平有提高，现在 CDE 对这类工艺变更的审评要求？

答：首先应该按照《药品注册管理办法》附件 4 要求，进行工艺变更的补充申请，同时参照《上市后化学药品变更研究的技术指导原则》进行工艺变更的研究和验证，提交相应的研究资料。CDE 对这类工艺变更的审评与其他变更申请的技术要求一致，任何变更应对产品的安全性、有效性、质量不产生负面的影响，对无菌产品还应关注无菌保证水平不能降低。

64、在遵循注射剂研发技术指导原则的前提下，创新药申报临床和申报生产阶段对灭菌工艺的验证的要求是否不同？

答：创新药申报临床和申报生产阶段对灭菌工艺验证的要求是不同的。在申报临床阶段不需进行灭菌工艺验证，但需进行灭菌工艺研究，并在 GMP 车间试制临床研究用样品，其灭菌工艺应能评价样品可以达到无菌要求；在申报生产时要求进行灭菌工艺验证，提交相应的验证资料。

65、如整个生产系统的无菌验证已通过 GMP 认证，这部分详细内容是否需体现在注册申报资料中？例如，生产设备、灭菌柜、过滤器等验证是否需体现在申报资料中？

答：生产系统的 GMP 认证资料，一般不需体现在注册申报资料中。但当生产系统的认证与注册品种同时进行，则应将这部分资料作为注册申报资料进行申报。也就是说，灭菌工艺验证资料主要是与品种验证有关的内容。

66、工艺验证资料应该在申报临床还是在申报生产时提供？如果在申报生产时提供验证资料，是否将 8 号资料重新附上，还是可以单独报验证资料？

答：工艺验证资料应该在申报生产时提供。8 号资料的工艺研究内容可以不必重新申报，但应提供工艺的研究结果，并说明在临床期间工艺是否发生了变更，以及工艺验证资料，包括生产工艺验证及灭菌工艺验证资料。

67、对注射剂品种，每年均系统地进行无菌保证工艺再验证，包括：设备的热分布试验、热穿透试验和微生物挑战试验，培养基模拟灌装试验等，请问，申报注射剂品种时，是否可以使用以上再验证的数据，作为 8 号申报资料的数据？

答：注射剂品种每年均系统地进行无菌保证工艺再验证，在申报新的注射剂品种时，有些验证数据可以使用，有些则需要针对品种进行验证，例如，新报注射剂品种采用的灭菌条件与原产品品种相同，或更低，其设备性能（空载热分布）验证数据是可以使用原产品品种再验证的数据，装载热分布、热穿透、微生物挑战试验还应针对产品进行验证，而不能使用原产品品种再验证的数据，因不同的产品，其热分布、热穿透、微生物在其中的耐热性是有差异的。

68、申报资料中未提供无菌工艺验证资料，是否一定要在补充资料中体现？粉针剂需要进行哪些验证工作，申报资料必须体现哪几点？

答：申报资料中未提供无菌工艺验证资料，如果进行了无菌保证工艺验证，可以在提交补充资料时一并提供；粉针剂的验证内容包括：培养基模拟灌装试验、除菌过滤系统适应性试验（过滤系统相容性测试、过滤前后滤膜完整性测试、滤膜的微生物截留量测试），以及容器系统密封性验证等。

69、采用无菌生产工艺的品种，申报临床前的样品，其无菌工艺研发及验证资料是否必须在实际生产设备及环境下进行？

答：无菌工艺研究应在符合 GMP 要求的车间中进行，但无菌工艺验证则必须在实际生产设备及环境下进行。

70、如果生产的产品被抽检“无菌不合格”，而无菌检查又不能随便复试，但对自己的产品质量绝对有信心（比如已经过无菌工艺验证，生产过程中也无偏差），该怎么办。因为无菌检查中所涉及的相关因素也很多，也会影响抽验单位检测结果的可信度、准确度，但无菌检验又不能要求复检。

答：药品管理法第六十七条规定，当事人对药品检验机构的检验结果有异议的，可以自收到药品检验结果之日起七日内向原药品检验机构或者上一级药品监督管理部门设置或者确定的药品检验机构申请复验，也可以直接向国务院药品监督管理部门设置或者确定的药品检验机构申请复验。但对于无菌检验而言，复验的意义不大。