

最新国家药品
生产验证与质量检验标准
实施手册

和玻璃输液瓶相比,胶塞的表面比较粗糙,从总体上讲,它对微生物、热原物质及其他污染物有更强的吸附力。胶塞本身也经不起互相的摩擦,在清洁过程也不宜使用机械搅拌器,否则有可能损伤它的表面层,造成更多的不溶性微粒。此外,它经受不住去热原处理,一旦在某个环节产生了热原物质,则无法在 180℃ 以上用于热灭菌烘箱对它作去热原处理。难以使用清洁剂也是胶塞难清洁的一个重要原因。长期以来人们企图使用表面活性剂、溶剂、去污剂等辅助手段来处理胶塞,以去除各种污染物,但清洁剂生产厂往往对处方保密,给使用单位带来麻烦——对清洁剂残留的处理成了一个更大的难题,清洁好了,又得证明清洁剂的残留符合要求,从而使制药厂几乎丧失了对使用这类清洁剂的任何兴趣。

3. 硅化处理

胶塞生产过程中通常需在加工工艺的最后一道工序加一些甲基硅油,将胶塞表面作硅化处理。硅化的作用是润滑,可防止胶塞在长期贮存过程中发生粘连及变形。输液生产工厂在胶塞清洁过程中也需要硅化,没有硅化的胶塞润滑性差,在实际灌装过程中难以实现上塞作业自动化,但硅化过度会给注射剂的澄明度带来消极的影响,并给人们留下瓶内壁没有清洗干净的坏印象。这一点是在清洁程序的设计中应于考虑的。美国药典有注射用硅油的标准,应使用符合药典要求的硅油作硅化处理,经硅化处理后,胶塞表面甲基硅油的量一般应控制在 $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下。

(二) 设备要求及清洁方式

洗塞机应用优质耐腐蚀材料(如 316、316L)同一质量水平的不锈钢制造,其表面应经过抛光处理。洗塞机应能把洗塞、硅化及灭菌作业组合成一个连续的处理系统,以消除或减少胶塞在处理过程中可能出现的再次污染的风险。如果洗塞后不立即灭菌,则应将胶塞干燥,以避免长菌及与之相关的热原物质污染程度的增大。

一般洗塞机大都采用气流及水流搅动的手段进行清洁。它们可使胶塞表面的污染物解吸或洗脱,或使沾在胶塞表面的不溶性微粒松弛,然后被水冲走。许多输液生产工厂都把这种最简单而有效的清洁手段称为“漂洗”。现以 Phama WSTB-BSA 40 AL 16 型洗塞机为例进行说明。该机工作原理见图 3-10。

图 3-11 中,所谓的总管是一个大的管道。污水排放、压缩空气、蒸汽、漂洗时的排水管道均安装在大管道内。整个清洁-干燥过程由一简单的程序控制器控制。当装载时,需打开上盖,卸载时,洗塞机需倒转。清洁过程中,水、压缩空气和蒸汽均从底部向上,污水从排水口溢出,经总管内的管道排入地漏。清洁程序:浸泡漂洗→漂洗→硅化→干燥。

新一代的胶塞清洗机清洁原理与上述洗塞机基本相同(图 3-12),它有 20 个洗塞篮,以注射用水为清洁剂。一般的清洁程序是:漂洗排放 3 次→硅化→121℃ 灭菌 20min

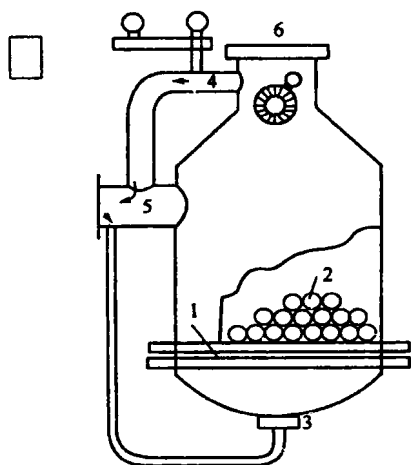


图 3-11 洗塞机工作原理示意图

1-网板；2-胶塞；3-水、压缩空气、纯蒸汽入口；3-排水口；5-总管；6-加料口
 →除菌过滤空气干燥→冷却→出料。这一设备的优点是增加了灭菌的功能，以便在完成清洁、硅化后将胶塞进行菌、干燥并封入已灭菌的塑料袋中，这样可方便内部运输，以致一台洗塞机可供多条大容量注射剂生产线使用，满足企业的实际需要。

(三) 确认和验证

和其他制药设备的验证一样，验证方案应包括验证试验的范围、合格标准、试验结果以及结论。各个工厂应根据本厂的实际情况确定合格标准。以下标准可供参考。

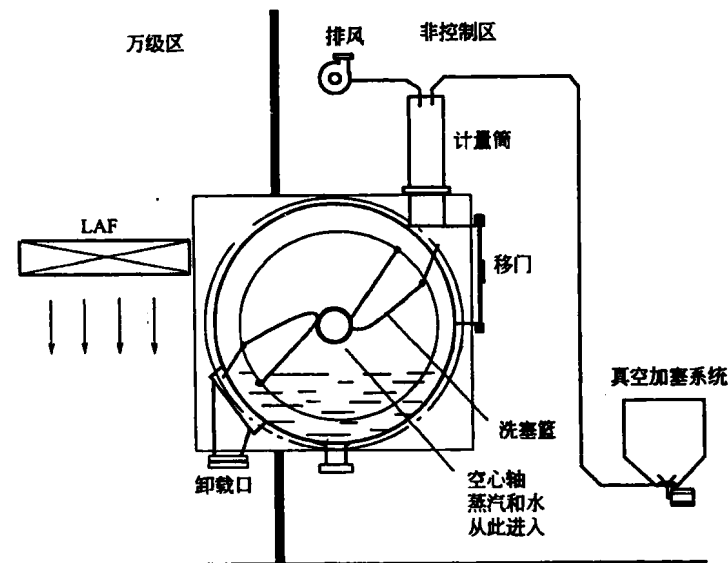


图 3-12 转篮式可灭菌洗塞机工作原理示意图

程序：淋洗-排放 3 次+硅化 1 次+灭菌 121℃20min+高效过滤空气干燥+冷却；每一程序约需 3h

干燥程序前的最终淋洗水应达到如下标准:

菌落 < 10 CFU/100 ml;

热原 < 0.25 EU/ml;

氯化物、不溶性微粒、pH 达到药典标准;

澄明度符合中国药典 2000 年版注射剂通则的要求。

三、灭菌柜

(一) 引言

在验证活动中,弄清 GMP 对设备有什么样的要求,设备在设计及建造中如何满足 GMP 及药品生产工艺的特殊要求是十分重要的。应当在验证活动中十分注意设备的设计、构造和功能。离开了这一点,设备确认就有可能陷于形式。一些验证人员或质量管理人员把注意力集中在一大堆文件上,他们仿效其他企业的做法,或简单抄袭参考书的表格和形式,却忽视了本企业需验证设备或系统的具体情况、设计及建造对质量的影响因素,在验证方案中缺乏足够详细并能反映设备功能的工作原理图或示意图,缺乏测温点的位置图等即是这方面的表现。这类问题带来的后果是验证走过场,验证活动不仅没有为产品质量提供保证,而且造成了某种假象,掩盖了影响质量的风险因素。现以设备灭菌器(又称器械灭菌器)为例进行讨论(图 3-13)。该灭菌器缺一除菌过滤器——缺乏防止被灭菌品在灭菌后遭受二次污染的措施。如将其用于灌装用具或手术用器具灭菌时,会存在风险。在验证中,也许热分布及热穿透试验的结果可以完全符合要求,但因为缺乏除菌过滤器而存在微粒及微生物污染的风险。应当理解,对设备的结构进行研究,了解其运行原理、功能及设计中为符合 GMP 和产品工艺要求所采取的特殊手段是做好验证工作的重要先决条件。在制订灭菌程序的验证方案时,务必弄清热力灭菌的动力学基础及无菌保证的基本概念。

灭菌器是大容量注射剂生产中的关键设备。实施 GMP 认证制度以来,我国制药业设备有了长足的进步。在大容量注射剂生产中常用的灭菌柜有脉动真空蒸汽灭菌器(又称设备灭菌柜),如奥地利的 HDV 1509.21/2S、国产的 MG-0.6 等通常用于过滤器、胶塞、铝盖、灌装机可拆洗部件、灌装区用的手套、口罩、无菌灌装用的工作服等的灭菌。这种灭菌柜一般采用饱和蒸汽作为灭菌介质,并有防二次污染的灭菌冷却系统。

另一类用以灭菌产品的灭菌器有快速冷却灭菌器、水浴喷淋式灭菌器及过热水灭菌器。

快速冷却灭菌器蒸汽直接进入灭菌腔室,灭菌腔室的温度均匀性较差,灭菌程序进入冷却阶段时,由于自来水或纯化水进入腔室底部,和底部的水混合后喷淋产品,存在

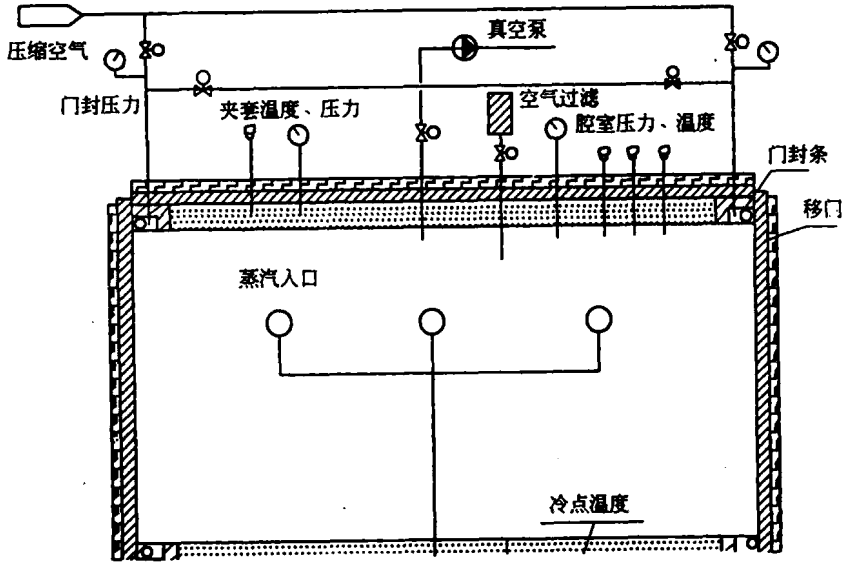


图 3-13 设备灭菌柜工作原理示意图

二次污染的风险，这类设备正逐步被新一代的灭菌器所取代。水浴喷淋式灭菌器(图 3-14)及过热水灭菌器采用纯化水或注射用水作为加热、灭菌及冷却介质，避免了快速冷却灭菌器使用自来水或纯化水直接接触被灭菌产品，可以有效防止产品灭菌后的

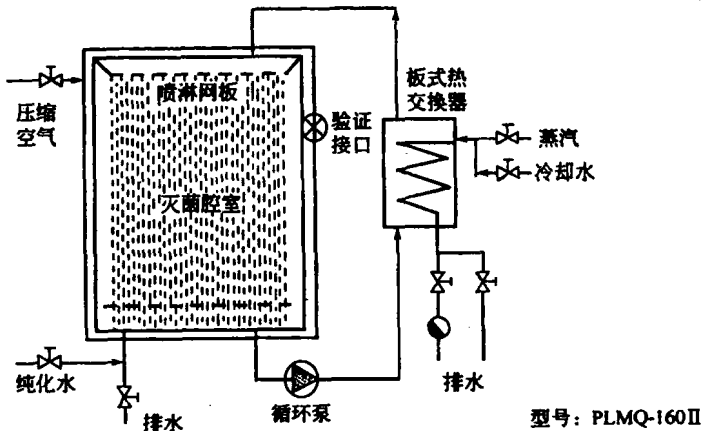


图 3-14 水浴喷淋式灭菌器工作原理图

二次污染问题。它以过热水在腔室内循环对产品不断地进行均匀的喷淋来达到灭菌目的；它借助于洁净压缩空气的作用保持腔室内处于适当的压力状态而防止水的气化，在保证被灭菌产品受热均匀性的同时，又通过自动控制系统确保产品受热时内外压力的基本平衡，减少产品容器灭菌过程中的破损。因此，水浴喷淋式灭菌柜在制药企业得到普遍采用，它可适用于玻璃瓶输液、塑料袋装输液和塑料瓶装输液等产品的灭菌。还有一种灭菌器称为旋转过热水灭菌器，其工作原理和水浴室灭菌器相似。它的突出优点是灭

菌过程中产品受热的均一性很好，目前主要用于较高档次产品的灭菌。

灭菌设备的确认往往需和产品的灭菌程序结合起来同时进行。现以国产快速冷却式灭菌器为例来讨论灭菌程序验证的必要性。这类灭菌柜工作原理可以用图 3-15 表示。

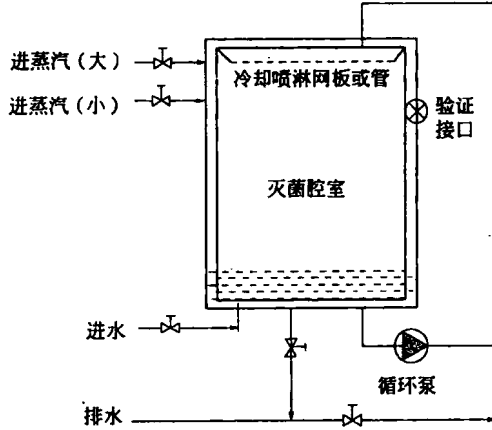


图 3-15 快速冷却式灭菌器工作原理图

灭菌柜的基本灭菌程序为：

装载→升温、进蒸汽置换空气→灭菌→排汽→预热水冷却→卸瓶

对这类灭菌柜进行灭菌实验得知，灭菌过程中，同一时间腔室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。设被灭菌的产品为 5% 葡萄糖，灭菌程序为 $115^{\circ}\text{C} \times 30\text{min}$ ，期望的 F_0 值不低于 8。灭菌过程中，温度是靠腔室中的温度探头来控制的。灭菌柜底部在冷却阶段可用作冷却水的贮罐。冷却水的排水口处在夹套的下部。在灭菌过程中，靠灭菌柜门的下部及排水的升温较慢。当灭菌柜进气口高温点已达到 115°C 时，但在灭菌的前 10min 低温点的平均温度仅为 113°C ，灭菌的第二个 10min 平均温度为 114°C ，在最后的 10min 为 114.5°C 。灭菌程序结束时，灭菌柜内高温点的产品 F_0 已经超过 8，但低温点的标准灭菌值仅达到 6，即这部分产品的灭菌尚未达到预期的要求。要使这一部分的产品达到几大于 8 的要求，应当适当延长灭菌时间或适当提高灭菌的温度。

灭菌柜及灭菌程序验证的目的是：调查确定灭菌过程中冷点的位置，设定灭菌程序有关参数，用试验来证实灭菌运行的可靠性及灭菌程序的重现性，以确保灭菌后产品的污染概率低于 10^{-6} 。

(二) 无菌保证和蒸汽灭菌对数规则的要点

最终灭菌产品的无菌相对标准，即低于 10^{-6} 的微生物污染率（或按理论计算每一百万瓶产品中，染菌产品不得多于一瓶）于 1973 年起已在美国制药及食品加工业开始试行。1976 年 6 月美国 FDA 公布了大容量注射剂的 GMP 草案，要求大容量注射剂灭菌

的最低几值应大于 8，并提出了详细而明确的验证要求。这对蒸汽灭菌工序的验证产生了很大影响。1980 年 F_0 的概念及最终灭菌产品低于 10^{-6} 污染概率（无菌的技术标准）首次引入 USP，我国 2000 年版药典也引入了这一国际标准，对蒸汽灭菌效果的评估从此由半定量成为定量要求。

不同的灭菌柜的性能差别较大，但灭菌过程总包括 3 个基本阶段：升温、保温和冷却，如图 3-16 为 500ml × 1000 瓶旋转式灭菌柜的灭菌曲线。

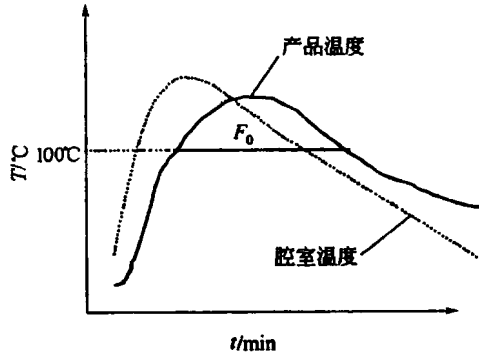


图 3-16 灭菌器腔室温度曲线图

灭菌的效果应从灭菌曲线在 100°C 以上所围的面积评估，即包括升温、保温和冷却 3 个阶段的热效应。这种评估以微生物在灭菌过程中被杀灭所遵循的对数规则为基础。蒸汽灭菌工序的验证涉及 D 值、 Z 和 F_0 值概念。对数规则给灭菌程序的设计提供了十分方便的条件，例如，对一些热稳定性较差的产品，采用不同的灭菌程序可以达到相同的灭菌要求。以下是 F_0 大于 8 的可以选用程序的示例：

110°C	110min	116°C	25 min	119°C	12.6min
113°C	50min	117°C	20min	120°C	10min
115°C	31min	118°C	16min	121°C	8min

(三) 验证及灭菌程序设计的基本要求

1976 年 6 月美国 FDA 公布的大容量注射剂的 GMP 草案曾提出蒸汽灭菌的原则性及技术性的要求，这些要求对灭菌柜及其灭菌程序的验证仍具有一定的指导意义，其要点包括以下几个方面：

- ① 蒸汽灭菌工序应能确保产品达到几不低于 8；
- ② 在灭菌前，待试验的容器中有最高的生物负荷，污染菌应具有最强的耐热性（参见本章附录 3-3）；
- ③ 每一个灭菌柜的每种装载方式及每种规格容器的验证试验均须至少使用 10 个热电偶进行热分布试验；
- ④ 用待试验容器灌装黏度相类似的产品进行热穿透试验，找出容器中升温最慢点的

位置。至少使用 10 个容器，每只均加入适当的生物指示剂并插有热电偶，当灭菌柜的参数已经达到热分布试验已经证实的可重现状态、温度达到设定的灭菌温度时，开始测定 F_0 值直至开始冷却止；

⑤当产品达到灭菌温度直至冷却开始的过程中，温度变化应当保持在 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以内。

应当说明， F_0 不低于 8 的要求是对耐热性较差的产品而言，况且产品的无菌保证与灭菌前产品被污染的程度相关。将 F_0 不低于 8 看做灭菌符合标准，甚至用流通蒸汽下已灭菌产品的无菌检查结果来证明流通蒸汽灭菌的合理性是对我国药典通则附件灭菌法的误解。应当注意，对热稳定性差的产品，并不一定强求几大于 8 的要求，本章热力灭菌动力学基础及无菌保证将对此作专门讨论。

(四) 验证的一般步骤

灭菌柜验证包括预确认、安装确认、校验、运行确认和灭菌程序验证、验证报告(结果和评价)及最终结果的批准。

1. 预确认

订购灭菌柜前应进行详细调查。灭菌柜选型应考虑的主要方面有：装量的大小、灭菌温度及时间的可控制性、灭菌过程中腔室中不同位置升温及降温速度的一致性、灭菌程序的可选择性、控制及记录系统的可靠性及灭菌柜的易操作性等。由于 F_0 值的概念正在为人们所接受和采用，为了更精确的控制灭菌效果，灭菌柜是否具有 F_0 值的计算功能也可作为一项指标在选型时加以考虑。

2. 安装确认

在灭菌柜安装后，应着手进行安装确认，其内容包括如下项目的检查和核对：

①安装是否符合供货单位所提出的标准和《规范》的要求，如灭菌完成后有无防止已灭菌品免受二次污染的措施；

②设备的安装是否符合国家有关压力容器的规定；

③电源、抽真空系统、压缩空气、冷却水等连接是否符合供货单位的要求；

④各种附件及备品（如压力表、温度记录仪、定时器等）的规格、型号是否核对及登记；

⑤辅助设备的规格型号（如纯蒸汽发生器、空气过滤器）的检查及核对等；

⑥关键仪表有无经过批准的校验记录；

⑦非关键仪表有无适当的说明；

⑧设备维修保养规程及使用手册是否按规定要求归档。

3. 温度监控设备的选择和校验

温度和时间是灭菌程序中最为重要的工作参数。灭菌程序验证中必须选用适当的温度监控设备。温度监控设备由两个大的部分组成，一是测温元件，二是测温记录仪。测

温元件一般采用热电偶和热电阻。蒸汽灭菌使用的热电偶应非常耐用。尽管热电偶的种类很多,但一般使用包有聚四氟乙烯的铜-康铜热电偶。热电阻采用铂电阻。这两种测温元件精度应达到 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。这是因为温度计如有 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的误差,将会导致 F_0 值2.3%的偏差。

测温元件在验证试验前后应在 0°C 和 121°C 两个点分别进行校正。 0°C 的点采用冰点槽, 121°C 的点采用恒温油浴。冰点槽采用冰水混合物,冰块应砸成黄豆大小,和水混合后颜色发乌。恒温油浴应事先检查其温度分布情况,确保它在测试过程中达到规定的技术指标。

校正用的标准温度计可采用分度为 0.01°C 的二等标准水银温度计,或同样分度的数字式温度计。验证试验中使用的标准的温度计必须经标准计量管理部门认可。有关标准计量器具的建标工作可参考国家计量局颁布的有关规定办理。

由于验证试验中监控灭菌柜内不同时间不同位置温度变化的测温点多达10~20个,所以最好能选用数字显示并配打印机的多点温度记录仪,如英国施伦伯杰 Schlumberger 公司的3535数据采集仪、美国Kaye仪器公司的验证仪及国产的同类仪器。

4. 运行确认及灭菌程序的验证

运行确认包括设备的检查及通过试运行对灭菌性能的调查试验及设定灭菌程序的重复性试验。运行确认的结果应能为灭菌程序所有重要的控制参数的确定提供实验依据。

应当根据待灭菌品的种类、待灭菌品性质(如耐热性)及影响灭菌的因素(如黏度或热穿透性)及装载的方式等因素来设定的灭菌程序。

运行确认中应当检查:

- ①在设定的蒸汽压力和温度范围内,蒸汽、水、压缩空气或液体无渗漏;
- ②门的联锁系统安全可靠;
- ③公用介质(如产品灭菌用的冷却水)的微生物污染水平是否达到设定的要求;
- ④灭菌柜正常运行所需的各种操作规程是否建立或已有草案。

(1) 热分布试验 热分布试验是调查灭菌性能的一项重要试验,以弄清灭菌过程中,腔室内各个不同位置的温差状况,为下一步的热穿透试验提供实验依据。

这项试验应分两步进行,第一步是作空载的热分布调查,由于装载对灭菌过程中的热分布状态有一定的影响,所以在此基础上需进行第二步试验,即装载的热分布试验。热分布试验的要点如下。

①选用10~20个热电偶或热电阻作温度探头,编好号,然后将它们固定在灭菌柜腔室的不同位置并用特氟龙密封带和硅胶密封在灭菌柜内。温度探头的安放位置应包括可能的高温点(如蒸汽入口处)及低温点(如冷凝水排放口)。另外,应有一只探头放在灭菌柜温度控制探头处,一只放在靠近温度记录控制探头附近,其余则均匀分布于灭

菌柜腔室内，以使温度的监测具有好的代表性。应注意热电偶焊接的尖端不能与腔室的金属表面接触，否则会影响测定的准确性。在装载热分布试验中，装载应尽可能使用待灭菌产品或类似物并注意不要将温度探头接入待灭菌的容器中，而应在它的周围。

②按初步设定的灭菌程序如 $121^{\circ}\text{C} \times 15\text{min}$ 或 $115^{\circ}\text{C} \times 35\text{min}$ 进行灭菌。值得注意的是，热分布试验中采用的各个参数及装载方式应与正常生产所采用的相同。

③每种装载方式至少应进行 3 次重复性试验。对试验获得的数据进行整理分析并在此基础上确定装载的冷点的位置。

④试验前后都要将温度探头放入冰点槽和油浴里校正。

⑤一般情况下，可以在几次空载试验初步确定冷点位置后，进行最大和最小的装载的试验，如产品有 1000ml、500ml、250 ml 及 100ml 4 种规格的，可只作 1000ml 和 100ml 的两种规格的试验，其余两种可以不作。

对实验数据作统计分析，最冷点和腔室平均温度间差值应不超过 $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 。温差如果超过 2.5°C ，说明设备性能太差或存在某种故障。造成这种不良状况的原因在于设计、安装、装载方式或控制手段上。例如，排气管路阻塞可导致灭菌过程中蒸汽中夹杂有空气，从而产生冷点。没有抽真空功能的灭菌柜非常容易出现这类问题，小型的上排气式蒸汽灭菌器更是如此。为了改善灭菌柜的功能，有些灭菌柜中增设了风扇，使进入灭菌柜腔室的蒸汽在腔室内均匀分布，有的设计成旋转式、过热水喷淋式、旋转过热水喷淋式等。

(2) 热穿透试验 对于灭菌生理盐水这类热稳定性产品而言，灭菌程序只要能确保达到大于 6 无菌保证值即可，不必担心灭菌程序是否赋予了产品过高的 F_0 值。但对于一些热稳定性较次的产品而言，他们对灭菌的有特殊的要求；一方面，灭菌程序应当赋予产品一定的几值，以确保产品大于 6 的无菌保证值；另一方面，灭菌程序又不致使产品受热过度而造成部分降解/药液颜色加深，以致同一灭菌批次的产品出现不均一性或不同灭菌批次的产品出现明显差异。换言之，热穿透试验是灭菌柜及灭菌程序对产品适用性的一项专门试验。

热穿透试验的步骤及要求 and 装载的热分布试验大体相同，其主要差别在于温度探头放置方式不同，即它们应当插在待灭菌的产品中，而那些插有温度探头的产品应当放在下述位置：

①由热分布试验确定的冷点位置；

②蒸汽入口处或由热分布试验确定的其他高温点位置；

③灭菌柜温度控制探头附近；

④温度记录探头处（如果灭菌柜的温度自动控制和温度记录不是共用温度探头时）；

⑤另需有记录腔室温度的探头，此探头不应插入产品中，其位置则在温度控制探头附近。

此外，如果热分布试验的结果重现性良好时，所用的温度探头数可酌情减少。热穿透试验至少需进行 3 次。温度探头使用前均应在冰点槽和油浴中进行校正。

(3) 生物指示剂验证试验/微生物孢子的挑战性试验 对热穿透试验结果的统计分析可得出灭菌程序的运行参数，从而确定了用某个灭菌柜对某一品种的灭菌程序。接着要进行的便是生物指示剂的验证试验，即将已知 D 值的微生物孢子定量地接入产品，然后按产品的灭菌程序灭菌，以证明“灭菌程序是否确实能赋予产品所设定的 F_0 值”。这项试验的要求、步骤及结果评价请见本章附录 3-3 “大容量注射剂湿热灭菌工艺的生物指示剂验证”。

当对安装确认、校验、运行确认和灭菌程序验证的各种结果进行回顾检查表明：

- ①灭菌程序重现性好，在热穿透试验获得的 F_0 基本一致；
- ②有好的热分布状态，冷点的几值和产品几的平均值之间的差值不超过 2.5；
- ③生物指示剂验证试验达到要求；
- ④灭菌程序能确保产品达到设定的 F_0 。

上述各项均符合要求时，灭菌柜及灭菌程序的验证即告完成，可批准交付生产使用。

对灭菌柜的确认和验证的上述讨论是以大容量注射剂产品为中心展开的，对设备（器械）灭菌柜而言，不同的装载情况对灭菌效果的影响较大，需进行不同装载状况下的热分布及热穿透试验，例如，将过滤器灭菌时，应当将滤芯内温度变化作为考察的内容。这类灭菌器的冷却通常采用抽真空、通过热交换器或放空的办法，由于被灭菌品通常有好的耐热性，因而对灭菌柜的性能要求相对可低一些。它的确认和验证可以参照上述原则进行。下面是建议的灭菌程序：

无菌工作服	121℃	35min
T形胶塞、铝盖	121℃	40min
过滤器	121℃	40min
可拆洗的大容量注射剂及小针灌装机的部件小针配制罐等	121℃	40min

四、过滤设备

(一) 概述

在大容量注射剂生产工厂中常用的滤器有垂熔玻璃滤器、砂滤棒、膜滤器、钛棒式过滤器、板框压滤器等。一些过滤器存在不便清洁、难以灭菌及装配较为麻烦等缺点，它们在制药工艺过程中的应用受到限制并逐渐被膜滤器所取代。膜滤器使用微孔滤膜作过滤材料，因此也叫微孔滤膜过滤器。常见的微孔滤膜过滤器有两种；圆盘形过滤器和

圆筒形过滤器。微孔滤膜材质的种类有醋酸纤维膜、硝酸纤维膜、聚酰胺滤膜、醋酸纤维与硝酸纤维混合酯滤膜、聚四氟乙烯滤膜、聚偏二氟乙烯滤膜等。它们的适用性也各不相同,例如聚四氟乙烯、聚砜和尼龙过滤器比较稳定,适用于过滤气体及有机溶剂,而醋酸纤维素和聚偏二氟乙烯滤膜适用于过滤蛋白质溶液。大容量注射剂生产中使用得最广泛的是过滤水溶液用的聚砜过滤器。本节将不讨论产品或工艺开发部门应进行的微孔滤膜对药液适用性试验,而把讨论的重点放在除菌过滤器的验证试验上^[4]。

过滤灭菌的验证和热力灭菌的验证有很大区别。热力灭菌的参数(如温度、时间及压力)均可以进行全过程监控。然而,过滤灭菌全过程中关键设备无菌过滤器的参数(如孔径的大小、孔径的分布、滤膜在使用过程中的完好性及除菌效率)尚无法进行全过程的监控。无菌过滤器去除微生物的能力只有用诸如平均直径为 $0.3\mu\text{m}$ 的缺陷假单胞菌(*P. Diminuta*)这类标准菌进行挑战性试验来证实。由于挑战试验是一项破坏性试验,因此,不得不开发一些能够用于监测滤膜的孔径和除菌效率的物理测试方法。这类物理测试方法包括起泡点试验和扩散流量试验等方法。

过滤系统验证的哲理:在实际生产工艺条件下确认无菌过滤器起泡点试验的临界压力及压力保持试验的参数及控制标准,用缺陷假单胞菌进行挑战性试验以确认符合这些参数的过滤器的除菌过滤能力,确认控制标准并交付日常生产使用。

(二) 世界卫生组织 GMP 的有关要求

药品生产中,过滤系统通常用于最终灭菌产品及无菌过滤产品的生产。前一种情况旨在降低产品的污染水平(生物负荷),属大容量注射剂生产中工艺控制的一项重要措施,后一种场合是产品的过滤灭菌。1992年版世界卫生组织 GMP 的要求对过滤系统的要求有以下两个方面。

1. 对过滤器要求

- ①不得使用有纤维脱落的过滤器,严禁使用含有石棉的过滤器;
- ②过滤器不得滤除药液的组分,或向药液释放物质;
- ③过滤器的完好性试验应使用适当的方法进行检查,如在每次使用的前后用发泡点试验进行检查。

2. 对系统使用的工艺要求

- ①与其他灭菌法比较,过滤法有潜在的风险。所以应使用双重过滤法进行过滤,或在灌装前采用已事先灭菌的除菌过滤器进行再次过滤的办法;
- ②一个过滤器的使用时间不应超过一个工作日,否则应进行验证;
- ③验证时应测定已知体积药液通过过滤器的时间及压差。生产中与此验证数据有明显差异时,应进行调查。结果应记入批记录中。

上述双重过滤法系指使用两个无菌过滤器串连过滤的办法。

(三) 微孔滤膜过滤器除菌(滤过)机理及其影响因素

各种过滤器滤除微生物的机理迄今尚没有被人们完全认识。现在有过筛、截留、吸附、架桥及静电俘获 5 种主要的理论来解释过滤的机理,其中占优势的是过筛理论。过筛理论认为,滤膜具有筛状的结构,同一编号的滤膜其孔径相同,过滤过程中大于滤器孔隙的微粒全部被截留在滤膜的表面。截留理论认为,颗粒不仅会截留在滤膜的表面,也会截留在滤器的深层,尤其是砂滤棒、垂熔玻璃等深层滤器。深层滤膜所截留的颗粒往往小于滤膜空隙的平均孔径,因此人们认为滤器还存在静电俘获或吸附作用。在过滤过程中,针状或粒状的坚固颗粒会在过滤介质的孔隙上面或孔隙内集成具有间隙的致密滤层并允许滤液通过,这种现象被称为架桥。但是,扁平状软的以及可压缩的颗粒,易产生滤膜微孔的堵塞现象,造成过滤困难。

影响滤膜过滤特性的因素很多,如微生物的种类、大小及数量、滤膜的孔径、滤液的 pH、离子的强度、表面张力等。此外,黏度、温度、过滤的持续时间、过滤的压力、膜的厚度及过滤膜的面积等也会影响到滤器的截留效果。

影响膜滤器使用寿命的一个重要因素是微生物的繁殖,在长时间的过滤过程中,微生物以细胞分裂的形式不断繁殖,它们最终能透过滤膜;使已经滤过的药液再次污染。所以,同一个过滤器使用不得超过一个工作日。

(四) 微孔滤膜过滤器的物理试验

1. 压力保持试验 - 起泡点试验

(1) 原理 起泡点试验以过筛理论为基础。这个理论假设滤膜由许多互相平行且孔径相同的毛细孔组成,这些毛细孔垂直于滤膜表面。

当滤膜湿润时,产生了毛细管现象。

设毛细孔的直径为 D ,液体的表面张力为 γ ,液体和毛细孔壁之间的夹角为 θ 。此时,根据拉普拉斯等式,圆周任何一点表面张力的分力为:

$$f_r = \gamma \cos \theta$$

总的表面张力为:

$$F_r = \pi D \gamma \cos \theta$$

当在毛细孔上面施加的气体压力逐渐增加至临界压力时,毛细孔内的液体刚能被排出,于是毛细孔内液面两侧的力相平衡(图 3-17):

$$p\pi (D/2)^2 = \pi D \gamma \cos \theta$$

设在毛细孔内液体是完全浸润的,达到临界压力时 $\theta = 0$ 即 $\cos \theta = 1$

化简后得到

$$p = 4\gamma / D$$

从上式可以看出,使液体通过滤膜毛细孔所需的临界压力反比于它的孔径并取决于液体表面张力的。从下面 ASYPOR 筒式过滤器的不同孔径下起泡点试验及压力保持

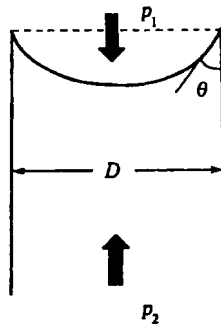


图 3-17 滤膜毛细管现象图

值数据可以看出三者的关系。

孔径 μm	最低起泡点压力/MPa	压力保持试验值/MPa
0.1	0.67	0.48
0.2	0.34	0.24
0.45	0.24	0.17

一定的临界压力值可以用来判断滤膜孔径大小及滤器的完好性。如滤器在使用过程中受损，孔径变大，临界压力就会降低，如在使用前后均处在完好的状态，则起泡点试验中的临界压力应保持不变。

(2) 试验方法 将微孔滤膜过滤器用液体充分浸湿后，逐步加大气体的压力至发泡点临界压力的 80%，将系统密闭，在规定时间内观察并记录压力的下降情况。继续升压，直至在过滤器下侧浸入水中的管中有稳定的气流发生。记录气泡第一次出现时压力的读数（图 3-18）。

(3) 参考标准

压力保持试验：0.26MPa，10min 内压降 < 5%

起泡点压力（临界压力）：0.31MPa

(4) 讨论 压力保持试验及起泡点试验均以溶液表面的毛细管现象为基础。在压力保持试验中，一旦过滤系统进入正常测试状态，过滤膜充分湿润，加压并将系统封闭后，当系统施加一定的压力时，气体会从高压一侧向低压一侧扩散，造成高压侧压力的下降，这一现象与不同压力下气体在液体的溶解度不同有关。因此在压力保持试验中，规定了压力降的范围，气体扩散问题将在下节作进一步的讨论。如在规定时间内压力下降值超过标准，则说明滤膜孔径超标或在使用过程中损坏，或系统出现其他漏点需要采取适当措施。

在压力保持试验结束后，继续升压直至在过滤器下侧浸入水中的管道中有稳定的气流发生，以确认临界压力值。这样做的好处是利用一个系列试验同时检查两个重要参

加大气体的压力至发泡点

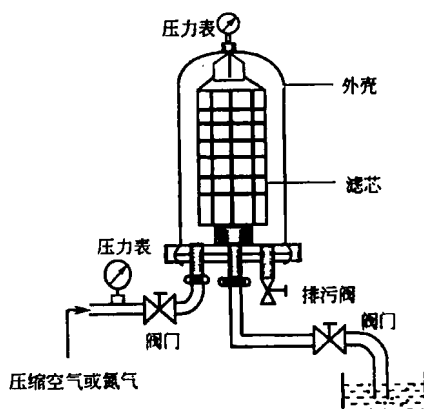


图 3-18 起泡点试验装置示意图

数，增加了试验的可靠性。

在取得了相当的经验后，压力保持试验及起泡点试验也可以单独使用，例如，在过滤器使用前采用起泡点试验检查，而在过滤结束后则采用压力保持试验进行检查。

应当看到，上面这一公式是以若干假设为依据的。尽管滤膜结构的功能和毛细孔在一定程度上相似，但滤膜实际上并不具有互相平行而且孔径相同的毛细孔结构，更不用说毛细孔的孔径全都相同、液面和毛细孔壁之间的夹角全都等于零了。因而公式 $p = 4\gamma/D$ 并不能用于准确地计算滤膜的孔径，以此确认它对微生物的滤除能力。将无菌滤膜的孔径 $0.2\mu\text{m}$ 及注射用水的表面张力 $7.2 \times 10^{-4} \text{N/cm}$ 代入 $p = 4\gamma/D$ ，可从理论上计算出该膜起泡点的临界压力为 1.44MPa ，实测值约为 0.31MPa ，理论计算数与实测数相差甚大。

应当注意，某种微孔膜过滤器在给定的药液及其他工艺条件下确定了发泡点试验的，临界压力后，还应用生物指示剂对其进行挑战试验，只有在通过挑战试验的条件下，临界压力才能成为该条件下发泡点试验的判断标准。

除上述情况外，进行压力保持试验 - 发泡点试验还应注意以下几点。

①应将系统中的空气赶净，以确保滤膜充分湿润；

②为了使本试验的结果能直接用来评价过滤系统的完好性，在生产设备安装过程中应尽可能考虑到过滤器应进行起泡点试验的要求，以至这项试验可以在过滤作业的前后在生产系统中完成；

③过滤器灭菌处理将对滤膜表面活性基有一定影响，从而使过滤材料的可湿润性以至起泡试验的读数产生某种变化；

④试验用压力表应定期校正；

⑤被过滤液体的表面张力是测定的关键因素。因此，应用待过滤的产品进行试验以

确定待过滤产品的起泡点，不应简单地把厂方提供的参考数据作为判别标准；

⑥直径为 293mm 的大表面膜式过滤器，在压力下，起泡点试验用的气体会从过滤器上方透过滤膜向过滤器下方的低压区扩散，并形成气泡，易造成误判。对于筒式过滤器而言，开始的起泡点气泡会累积在过滤器的中心，而不是离开过滤器。在这种情况下，所观察到的起泡点的压力值比实际的临界压力高，容易造成误判。因此，对操作人员进行培训是至关重要的。

2. 扩散流量试验

(1) 原理 Fick's 规则认为，在一定压力下，气体在液膜中的扩散过程可以分为 3 个阶段：①扩散气体分子在高压侧溶解；②扩散气体分子在液膜由高浓度方向向低浓度方向迁移；③气体分子在低压侧逸出。溶液中气体穿过滤膜的扩散速度及气体穿过滤膜的浓度梯度、扩散系数、空体积因子之间存在如下关系式：

$$Q = D\phi dc/dx$$

式中 D ——试验气液系统的扩散系数；

ϕ ——空体积因子；

dc/dx ——穿过滤膜的浓度梯度；

Q ——试验气体的扩散流速度或摩尔速度。

滤膜的孔隙率、气体的溶解度、压力、膜的厚度、气体在液体中的扩散系数及温度均对扩散速度产生影响。 dc/dx 的微分式可以改写成 $(C_1 - C_0) / t$ ，式中 C_1 为上游的气体浓度， C_0 为低压侧试验气体的饱和浓度， t 为膜的厚度，于是可以化成

$$Q = D (C_1 - C_0) \phi / t$$

根据亨利 (Henry's) 定律，浓度梯度和气液系统的溶解系数 H 及膜两侧的压差 Δp 有符合关系式：

$$C_1 - C_0 = H\Delta p$$

在一个系统中， D 、 F 、 t 及 ϕ 为常数，因此可得到

$$Q = K\Delta p$$

从这里可以得出结论，在低于起泡点试验的临界压力时，气体扩散的摩尔数和所加的压力成正比。这样，根据压差和流速，即可确定滤膜的孔径。气体扩散流速与压力的关系可参见图 3-19。

(2) 试验方法 将待试验的滤膜安装在滤器架中，充分湿润滤膜，并将过滤器内的水排去。使用空气或氮气作试验气体，逐步加压，使系统压力达到起泡点临界压力的 80%，然后定量测定气体的流量。

(3) 讨论 如果除了过滤器膜层外，当在滤膜及支持层形成另一个水层时，气液系统的扩散系数会发生变化。大面积的筒式过滤器易产生这种现象并导致扩散速度明显降低，造成误判。

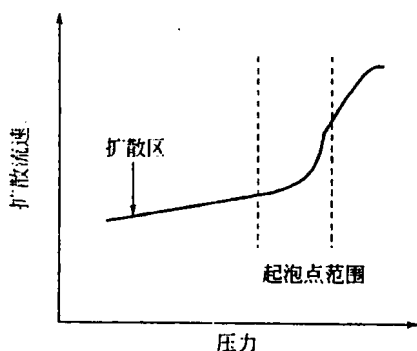


图 3-19 气体扩散流速与压力关系图

接近临界压力值时，滤膜的液体变薄，同一压力下气体扩散量增大，即气体扩散流速与压力的线性关系会发生变化。

气体扩散流量试验通常在过滤器生产厂进行，随着测试仪器的普及，企业也已逐步开始使用这类设备作过滤器完好性检查。

(五) 微生物挑战试验

用来检测除菌过滤器去除溶液中微生物能力最贴切的办法是进行生物指示剂挑战性验证试验。这项试验装置的示意图见图 3-20。

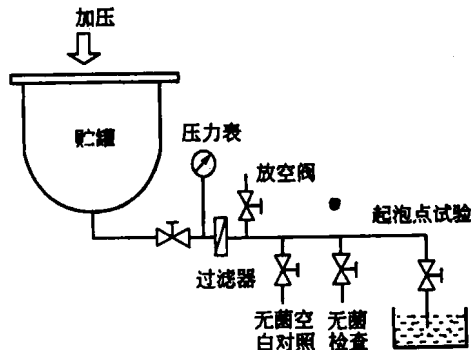


图 3-20 除菌过滤器微生物挑战试验示意图

1. 试验条件

此试验中，可以使用生理盐水或蛋白胨作阳性对照。

(1) 生物指示剂 采用缺陷假单胞菌 *P. diminuta* (ATCC 19146)，它是一种革兰阴性杆菌，平均直径为 $0.3\mu\text{m}$ 。这种菌因其细胞小，总能透过 $0.45\mu\text{m}$ 的膜并污染已经滤过的蛋白质。在适当的培养条件下，它能在短时间内大量繁殖成单细胞形态。由于它的生化活性很小，因而用作验证试验的安全性好。

(2) 菌液的浓度 应能保证每平方厘米有效过滤面积达到 10^7 个菌的挑战水平。之所以选择这个浓度进行挑战试验，一则是因为滤膜单位面积的微孔数目也处在这一数量