

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.13

兽用化学药品注射剂灭菌工艺探讨

刘艳华, 徐倩, 梁先明

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-12-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0080-06 [中图分类号] S851.66

[摘要] 注射剂是我国兽药普遍使用的一类剂型,其制剂工艺多源于传统工艺,无菌保障意识薄弱,研发的广度和深度方面存在不足,势必导致产品质量下降和临床疗效降低,引发用药隐患。针对兽用化学药品注射剂中问题突出的灭菌工艺,从工艺选择、工艺验证、指示剂使用、数据评判和影响因素等方面进行探讨,并提出建议,以供研发者和生产者参考。

[关键词] 兽用化学药品;注射剂;灭菌工艺

Discuss on Sterilization Process of Injection in Veterinary Chemical Pharmaceuticals

LIU Yan-hua, XU Qian, LIANG Xian-ming

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Injection is a commonly used dosage form in veterinary medicine in China. However, due to the pharmaceutical process is mostly derived from the traditional technology, it is weak in sterility assurance consciousness and insufficient in the breadth and depth of research and development, which results in the decline of the quality of the products and the decrease of clinical efficacy, and then leads to the potential risks of drug uses. The problems of sterilization process of injection in veterinary chemical pharmaceuticals are discussed including the choice of sterilization process, validation of process, indicator used, data evaluation, and influence factors, etc. Some suggestions are recommended in reference.

Key words: veterinary chemical pharmaceuticals; injection; sterilization process

兽用注射剂系指原料药物或与适宜的辅料制成的供注入体内的无菌制剂,可分为注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液^[1]。注射剂因其起效迅速、剂量准确,不经过胃肠道故不受消化系统和食物影响等优点是目前兽药普遍应用的一类剂型。目前我国虽是兽用化学药品制剂大国,但非制剂强

国,在制剂工艺方面与欧美国家相比存在一定差距,尤其是高风险的注射剂,同一品种的产品,即使国内外生产商价格相差悬殊,大中型养殖企业临床上也更倾向于使用价高的欧美国家产品。从目前国内兽用注射剂的注册资料看,灭菌工艺部分存在的问题比较突出,导致注册不能顺利获得批准。究

其原因,除部分已批准注射剂的生产工艺局限于当时认知水平等历史遗留问题外,部分研发和生产者尚滞留在传统的研发经验和生产经验上,无菌保障意识薄弱,对灭菌工艺的广度和深度研究不足,造成产品质量的下降和临床疗效的降低,引发用药隐患。针对问题突出的灭菌工艺(现行兽用生产质量管理规范(GMP)中注射剂按工艺的不同划分为最终灭菌和非最终灭菌注射剂^[2])部分,从注射剂灭菌工艺的选择原则、工艺验证、指示剂使用、验证数据的分析和评判及灭菌效果的影响因素等方面进行探讨,分析灭菌工艺中可能存在的安全性风险,以期对相关研发和生产者提供借鉴和参考。

1 灭菌工艺选择原则

根据产品的稳定性,参考欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)颁布的灭菌工艺决策树^[3-5]进行注射剂灭菌工艺的选择(图 1~图 2)。首选最终灭菌工艺,其无菌保证水平

(Sterility assurance level, SAL) $\leq 10^{-6}$,即产品中污染菌存活概率不大于百万分之一,如果能够耐受过度杀灭法($F_0 \geq 12$, F_0 为标准灭菌时间,即灭菌过程赋予被灭菌产品 121 °C 下的灭菌时间;美国食品药品监督管理局 FDA 和 EMA 规定的过度杀灭法的 F_0 值分别为 12 和 15),则首选过度杀灭法;如果不能耐受过度杀灭的条件,可采用残存概率法($8 \leq F_0 < 12$)^[6]。如果有充分依据证明不适宜采用最终灭菌工艺,可采用无菌生产工艺,其 SAL $\leq 10^{-3}$ 。只要可能,应对非最终灭菌的注射剂做补充性处理,如流通蒸汽。随着认知水平的提高,早期采用的流通蒸汽灭菌目前仅可用于无菌工艺的辅助手段,EMA 指导原则^[3]明确规定,对于灭菌而言,温度低于 110 °C 的热处理是不可接受的。在进行工艺选择时,不能因为选择使用热不稳定包材而降低工艺的 SAL,但也应避免为提高产品的 SAL,不对产品的特性做全面、深入的研究就选择灭菌工艺。

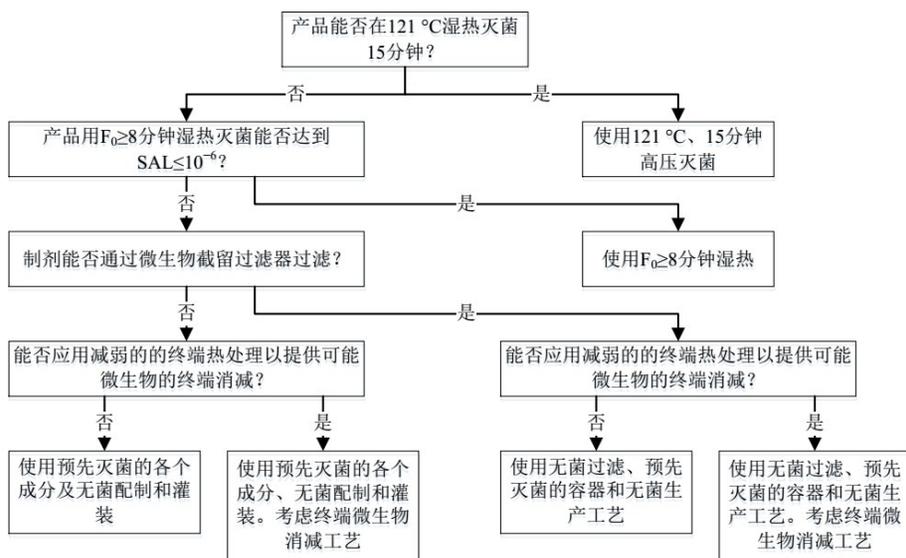


图 1 水性制剂的灭菌工艺决策树^[5]

Fig 1 Decision tree for sterilization choices for aqueous products

2 工艺验证

工艺验证对保障注射剂 SAL 的重要性不言而喻, FDA 实施的最终灭菌工艺的参数放行^[7],即强调工艺的全过程控制,只有经过严格的工艺验证并

按照验证确认的条件进行严格控制的生产过程,才能保障注射剂的 SAL,而不再简单依赖于最终产品的无菌检验报告,因为抽样检验毕竟数量有限,且微生物在产品中分布并不均匀,因此,抽样的结果

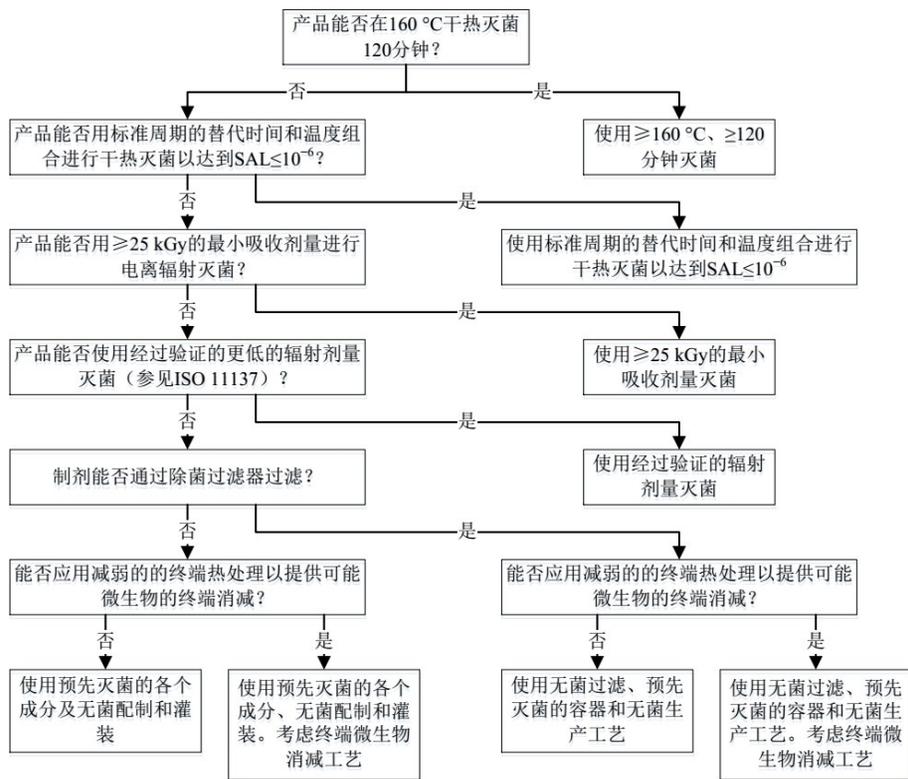


图 2 非水性液体、半固体和干粉制剂的灭菌工艺决策树^[5]

Fig 2 Decision tree for sterilization choices for non-aqueous liquid, semi-solid or dry powder products

不能真实反映整批产品的无菌状态。

2.1 灭菌工艺 通常包括湿热过度杀灭法、残存概率法和辐射灭菌法,根据工艺的不同,验证内容的侧重点有所不同,除共性的微生物负荷、微生物挑战、容器密封系统等验证内容外,湿热灭菌主要包括热分布和热穿透试验等,辐射灭菌需进行产品抗辐射强度等研究。

2.1.1 热分布和热穿透试验 热分布试验是了解整个装载区的温度分布状况,热穿透试验是确认产品内部能达到预定的灭菌程序,通过提交 3 批运行的试验数据证明所采用灭菌程序一致性、重现性符合拟定的标准^[8]。提供灭菌器温度分布的最高、最低值及其相应的 F₀ 值,根据 F₀ 计算公式^[9]:

$$F_0 = \Delta t \sum 10^{(T-121)/Z}$$

式中:Δt 是测量被灭菌产品温度的时间间隔;T 是每个时间间隔Δt 所测得的被灭菌产品的温度;在湿热灭菌时,参比温度定为 121 °C,Z 值为 10 °C。从公式看 F₀ 值随产品温度(T)变化而呈指数变化,

即温度出现很小的差异,都将对 F₀ 值产生显著的影响。一个灭菌程序的总标准灭菌时间 F₀,包括加热和冷却过程,即 F₀ 为“升温+灭菌程序+降温”的积分过程。对于过度杀灭法,虽然产品对热稳定,但产品过热灭菌不仅浪费能源,也会导致热降解趋势增大、稳定性下降、有效期缩短,因此其为相对的过度。对于残存概率法,灭菌程序的 F₀ 值要满足产品可耐受的 F₀ 值范围(F_{最低}~F_{最高}),既要保证装载产品的冷点获得足够的杀灭时间(F_{最低}≥8),也要保证热点符合产品质量要求(≤F_{最高})。由于产品性状、装载方式(最大、最小和典型装载)等不同会带来一定的影响,因此,也需进行相应的验证研究。

2.1.2 微生物负荷 测定被灭菌产品(包括原料、辅料和内包材)中微生物负荷、细菌内毒素水平、生产和灭菌过程中引入的那些可能会对注射剂中的细菌内毒素水平产生影响的因素。为确保注射剂中可接受的细菌内毒素水平,被灭菌产品的微生物污染应尽可能低。对于灭菌工艺,GMP 条件下被灭

菌产品的微生物负荷可接受限度为 10^2 CFU/100g 或 mL(需氧菌总数计数),则无需提供进一步的证据。残存概率法需监测每批产品的微生物负荷;过度杀灭法假设的微生物负荷数量和耐热性一般均高于实际控制要求,不需监测每批产品微生物负荷,仅需定期监测。对于无菌工艺,GMP 条件下被除菌产品的微生物负荷可接受限度不超过 10^1 CFU/100 mL(需氧菌总数计数),每批产品均需进行监测,如果另外安装有预除菌过滤器,则最接近最终容器灌装点的过滤器通常作为除菌过滤器。

2.1.3 微生物挑战试验 工艺验证所用生物指示剂的耐热性和数量应对灭菌工艺构成必要的挑战。主要是对产品中分离的芽孢或环境中形成的芽孢(如采用沸腾试验:100 °C 加热 10 min 判断是否有耐热芽孢存在)与生物指示剂芽孢的耐热性进行比较,以证明污染菌的耐热性小于生物指示剂的耐热性。验证时,指示剂的微生物用量应比日常检出的微生物污染量大、耐受性强,以保证灭菌工艺留有安全余量。

2.1.4 抗辐射强度研究 除提供与辐射剂量相关联的辐射前微生物负荷研究,还需确认不同装载方式下灭菌产品吸收的最小和最大辐射剂量,最小剂量应保证达到的灭菌要求,最大剂量意味着超过该值的产品不可接受,使实际的辐射剂量达到 SAL 的要求。

2.2 无菌工艺 通常包括除菌过滤和无菌分装工艺,验证内容除提供微生物负荷、微生物挑战试验、培养基模拟灌装试验外,前者还需提供除菌过滤系统验证,后者需提供产品的无菌验证试验。

2.2.1 除菌过滤系统验证 包括过滤系统相容性测试、过滤前后滤膜完整性测试和滤膜的微生物截留量测试。此外还应明确工艺的具体过程控制,如过滤体积、过滤时间、放置时间等关键工艺参数范围。

2.2.2 培养基模拟灌装试验 尽可能模拟常规的无菌生产工艺,包括所有对无菌结果有影响的关键操作、生产中可能出现的各种干预和最差条件,各种干预和最差条件的考虑需要体现风险控制理

念。灌装培养基时,每个容器的灌装体积一般为 $1/3 \sim 1/2$ 之间,最多不能超过容器的 85%^[10]。对于冻干粉针的验证,在培养基灌装半压塞后,只需模拟产品进入和移出冻干机的过程即可,而不必模拟冻干过程,以保证一旦有细菌能保持较好的生存能力,同时还应模拟一些可能造成污染的抽真空、充氮等操作。培养基模拟灌装试验需要对所有灌装样品进行培养和无菌检查,其目标是零污染,一旦发现污染,需进行偏差调查,包括污染菌的鉴别、污染情况的评估、是否可以重复进行试验等。该试验是对设备、环境和人员操作的一种系统验证,在线至少灌装 3 批。

3 指示剂使用

指示剂一般分化学监测器和生物指示剂^[11]。化学监测器是对一个或多个关键灭菌参数有响应的装置,可作为定性指示剂,表明产品已灭过菌,其又分为化学指示剂和化学综合指示剂。化学指示剂是以非定量形式提供即时结果作为参数标识(如颜色变化),但不能显示产品是否无菌,不能指示达到的最高温度和持续的时间,只能说明某温度阈值已达到。化学综合指示剂是多参数的化学指示剂,可定量综合指示灭菌程序中的参数,如温度、时间或湿度,可定量反映关键灭菌程序的物理状态,提供与微生物灭活相关量化结果的记录。在湿热灭菌的验证中,化学监测器不能代替生物指示剂和温度/压力/时间等仪器测量。

生物指示剂是一类特殊的活微生物制品,生物指示剂的被杀灭程度,是评价一个灭菌/无菌工艺有效性最直观的指标,可用于确认设备的性能、工艺的验证、生产过程灭菌/无菌效果的监控等。用于验证的生物指示剂一般是细菌的孢子,湿热过度杀灭法常用生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子,残存概率法常用生孢梭菌孢子;辐射灭菌法常用短小芽孢杆菌孢子;过滤除菌法常用缺陷假单胞菌。可使用市售的标准生物指示剂,也可使用由日常生产污染菌监控中分离的耐受性最强的微生物制备的孢子,在使用其做验证时,应确定孢子在实际使

用条件下的 D 值(微生物的耐热参数,系指一定温度下将微生物杀灭 90%所需的时间,以分钟表示),并测定孢子的纯度和数量。

4 数据分析和评判

经过灭菌/无菌工艺后,需要对工艺的性能和产品的稳定性进行分析、评判。

性能确认包括物理确认和生物指示剂确认,确认试验数据符合验证方案中规定的合格标准,如物理确认中最低和最高温度及相应的 F_0 值,最少正常运行的探头数;生物指示剂确认中规定微生物挑战试验中孢子的对数下降值符合预期标准、规定的阳性和阴性对照符合设定要求等。

产品的稳定性研究是考察工艺对产品性质稳定性影响的试验,包括产品的降解、含量测定、pH 值、颜色、缓冲能力和具体产品的质量特性,应符合拟定的质量标准。进行灭菌/无菌工艺前后产品质量的对比研究时,考察项目应全面、考察条件和方法应合理、相关方法应经过验证,同时研究用样品应具有代表性。

5 灭菌效果的影响因素

5.1 工艺设计 随着制药界对药品影响因素认知的不断深入,质量通过检验控制、通过生产过程控制,直至通过良好设计来生产进行控制,即质量源于设计^[11-15]逐渐成为共识,从研发初始就考虑终产品质量,在处方和工艺筛选、参数优化、物料控制等各方面进行深入研究,才能确保产品质量。如早期我国兽用注射剂曾采用的 100 °C 30 min 流通蒸汽工艺,其 F_0 值往往达不到灭菌工艺的要求,在此情况下,即使严格按照工艺生产也不能保证产品的质量。因此,在对药物结构和稳定性进行研究的基础上,对注射剂的灭菌温度和时间等关键工艺参数进行深入研究,积累详实的数据,才能为确定最终工艺参数预留安全的设计空间。对易氧化产品采取除氧、加入抗氧化剂或采用充氮等设计以提高其稳定性。

5.2 微生物负荷 原辅料引入和生产环境存在的微生物数量和耐热性影响灭菌工艺的灭菌效果。

一般注射剂的原辅料应首选注射用级别的原辅料。对尚无市售的注射用原料药,需控制微生物限度、细菌内毒素和不溶性微粒等检查项以提高内控质量标准的安全性;对尚无市售的注射用辅料,注射剂中已有文献支持但尚无符合注射用标准的辅料,根据来源和用量的不同也应制定微生物限度、细菌内毒素等安全性内控指标,必要时还应进行相关的安全性试验研究。

监测生产环境的微生物种类和数量,建立微生物负荷报警和纠偏措施的限度,按 GMP 规范生产的产品实际微生物负荷一般较低,主要是对环境形成的芽孢或从产品中分离的芽孢与生物指示剂的耐热性进行比较,以证明在最差的条件下的灭菌工艺处于安全状态。

5.3 灭菌器选择 灭菌方法和装载方式确定后,根据产品 F_0 范围重现性的需求,选择适宜的灭菌工艺类型和灭菌器。在确保产品灭菌前后完好性前提下,要求灭菌程序的重现性良好。按灭菌工艺类型不同,灭菌器分为饱和蒸汽(预真空、重力法)和空气加压(蒸汽-空气混合气体、过热水)灭菌,前者常用于多孔/坚硬物品灭菌;后者常用于液体装置灭菌。对于湿热灭菌工艺,应依据注射剂液体装载或多孔/坚硬装载、 F_0 控制重现性等选择合适工艺类型的生产设备。如过热水加压灭菌器常用于残存概率法液体装置药品的灭菌,其加热和冷却快速易控,不受产品装载和其他公用设施的影响,被灭菌产品的 F_0 范围窄,重现性好。

5.4 其他因素 饱和蒸汽、蒸汽-空气混合物和过热水等不同加热介质对热传递速率和热分布等存在一定的影响;容器的特性和几何形状等影响热转移速率;在生产过程中与注射剂直接接触的部分辅助物料如不锈钢器皿、管道、服装等灭菌工艺的无菌保证水平等均会对灭菌效果产生或多或少的影

综上所述,注射剂灭菌工艺的研究是一个系统的质量管理体系,最终灭菌工艺是将最终密封的产品进行适当的灭菌来生产无菌注射剂,无菌工艺是在无菌环境下,通过无菌操作(除菌过滤、分装)来

生产无菌注射剂,二者由于在实现产品无菌的方法上有本质上的差异,导致其最终产品的无菌保证水平不同,因此,应将灭菌工艺降解引起的风险与无菌生产引起的风险进行权衡,同时还需考虑产品的剂量和降解产物的性质,对选择的工艺进行全面的获益风险评估。随着欧美“质量源于设计”研发理念的推行,随着对注射剂认知的不断深入,强调注射剂的设计和过程控制,将风险管理运用到产品研发、生产全过程直至整个产品的生命周期,才能确保兽药的安全、有效、质量可控。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(一部)二〇一五年版[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopeia. Veterinary Pharmacopeia of the people's Republic of China (Volume I) 2015 edition [S].
- [2] 中华人民共和国农业部令 第 11 号. 兽药生产质量管理规范[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Regulation No. 11. Good Manufacturing Practices for Veterinary Drugs [S].
- [3] EMA. Guideline on the sterilization of the medicinal product, active substance, excipient and primary container [EB/OL]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/04/WC500204724.pdf
- [4] EMA. Decision trees for the selection of sterilization method [EB/OL]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003520.pdf
- [5] EMA. 药品、活性物质、辅料和内包材灭菌指导原则 [EB/OL].
EMA. Guideline on the sterilization of the medicinal product, active substance, excipient and primary container [EB/OL]. <http://www.cde.org.cn/guide.do?method=showGuide&id=45728>
- [6] 国家食品药品监督管理局. 化学药品注射剂基本技术要求(试行) [EB/OL].
China Food and Drug Administration. General technical requirement for Chemical injection (for Trial Implementation) [EB/OL]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0844/27800.html>
- [7] FDA. Guidance for Industry: Submission of Documentation in Applications for Parametric Release of Human and Veterinary Drug Products Terminally Sterilized by Moist Heat Processes [EB/OL]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072180.pdf>
- [8] FDA. Guidance for Industry for the Submission Documentation for Sterilization Process Validation in Applications for Human and Veterinary Drug Products [EB/OL]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072171.pdf>
- [9] 陈晓莉, 赵慧玲. 注射剂灭菌工艺研究存在的常见问题及几点思考 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(9): 780-783.
Chen X L, Zhao H L. Common problems and related considerations of sterilization process of injection [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2009, 18(9): 780-783.
- [10] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 灭菌/无菌工艺验证指导原则(征求意见稿) [EB/OL].
Center for Drug Evaluation, CFDA. Sterile, aseptic Process Validation Guideline (Exposure Draft) [EB/OL]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=198>.
- [11] PDA (Parenteral Drug Association). Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control [J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2007, Supplement 61 (No. S-1).
- [12] 王明娟, 胡晓茹, 戴忠, 等. 新型的药品质量管理理念“质量源于设计” [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(8): 948-954.
WANG Ming-juan, HU Xiao-ru, DAI Zhong, et al. A New Concept of Pharmaceutical Management System-quality-by-design [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(8): 948-954.
- [13] ICH. Q8 (R2) (Pharmaceuticals - Quality) August 2009; Pharmaceutical Development [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf
- [14] ICH. Q9 (Pharmaceuticals - Quality) November 2005; Quality Risk Management [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf
- [15] ICH. Q10 (Pharmaceuticals - Quality) June 2008; Pharmaceutical Quality System [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf