

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.018

某制药车间无菌工艺模拟试验研究

杨惠毛,田治文,范利华

(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,浙江 绍兴 312500)

摘要:目的 分析在工艺、物料、设施、设备和人员确定的条件下,某制药车间生产无菌产品的能力,并识别生产过程中的薄弱环节。方法 根据国家药品监督管理局发布指南中提出的无菌工艺模拟(APS)试验“最差条件”,在正常工作条件边缘下对工艺条件进行APS试验设计,并完成培养基模拟灌装试验。结果 APS试验包括无菌培养基配制、无菌培养基灌装、冻干压塞、轧盖、培养与检查、促生长试验、环境监测、模拟灌装后清洗等步骤。在此条件下,灌装完成的产品均无微生物生长;对培养14 d后的样品进行微生物促生长试验,科氏葡萄球菌、膝黄微球菌、坚强芽孢杆菌、胶红酵母菌、奥斯陆莫拉氏菌和耐盐枝孢菌均生长良好。结论 制药车间的日常无菌灌装工艺、环境、洁净室操作人员的无菌操作技术等规范,有助于保障生产药品的质量和无菌性。

关键词: 无菌工艺;模拟试验;培养基模拟灌装试验;无菌产品;工艺流程;促生长试验

中图分类号:R926 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)21-0077-05

Aseptic Process Simulation Test in a Pharmaceutical Workshop

YANG Huimao, TIAN Zhiwen, FAN Lihua

(Zhejiang Medicine Co., Ltd. Xinchang Pharmaceutical Factory, Shaoxing, Zhejiang, China 312500)

Abstract: Objective To analyze the ability of a pharmaceutical workshop to produce the aseptic products under the specific conditions of process, materials, facilities, equipment and personnel, and to identify the weak links in the production process.

Methods According to the "worst conditions" of aseptic process simulation (APS) test in the guidelines issued by the National Medical Products Administration, the APS test was designed for the process conditions under the above "worst conditions", and the media - fill simulation test was conducted. **Results** The APS test included aseptic medium preparation, aseptic medium fill, lyophilization and tamping, capping, culture and inspection, growth promotion test, environmental monitoring and washing after the media - fill simulation test. Under this condition, no microorganism grew in the filled products. The samples cultured for 14 d were selected for the microbial growth promotion test, which showed that *Staphylococcus cohnii*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus firmus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Moraxella osloensis* and *Cladosporium halotolerans* all grew well. **Conclusion** The standardization of the daily aseptic fill process, environment and aseptic operation technology of the operators in the clean room of the pharmaceutical workshop is helpful to ensure the quality and sterility of the produced drugs.

Key words: aseptic process; simulation test; media - fill simulation test; aseptic product; process flow; growth promotion test

目前,市场上非终端灭菌产品越来越多,各国对无菌工艺验证的要求也越来越高。2016年至2018年,山东省共完成无菌制剂《药品生产质量管理规范》(GMP)认证94家/次,其中非最终灭菌产品企业54家/次,占57.45%^[1]。即使所有与产品无菌性有关的设备部件、容器及原料都经过有效的灭菌处理,仍有可能因各种原因导致产品被污染,产品无菌性得不到保证。故无菌生

产工艺的无菌性评估验证必须从整体考虑,其中培养基模拟灌装试验是有效的方法。2010年修订版GMP无菌药品第四十七条要求:“无菌生产工艺的验证应当包括培养基模拟灌装试验。”^[2]《药品GMP指南(无菌药品)》要求,“为确保无菌产品的无菌性,灭菌和无菌灌装工艺须经过充分验证”“应采用培养基代替药品进行灌装对无菌工艺进行验证”^[3]。基于各项法规和车间实

第一作者:杨惠毛,女,大学本科,工程师,研究方向为制剂生产管理,(电子信箱)yanghuimao@zmc.top.com。

evaluation of agarwood quality[J]. J Nat Med, 2020, 74(1): 98-105.

[11] XIE B, LUO HT, HUANG XL, et al. Pharmacokinetic studies of six major 2-(2-phenylethyl) chromones in rat plasma using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry after oral administration of agarwood ethanol extract[J]. J Sep Sci, 2021, 44(12): 2418-2426.

[12] 顾宇丹,张倩,霍会霞,等. HPLC-DAD测定沉香药材中沉香四醇的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(12): 2643-2646.

[13] GAO M, HAN XM, HUANG JQ, et al. Simultaneous determination of multiple active 2-(2-phenylethyl) chromone analogues in agarwood by HPLC, QAMS, and UPLC-MS[J]. Phytochem Anal, 2021, 32(3): 412-422.

[14] 李远彬,王玲娜,邓幸运,等. 沉香的醇浸出物和沉香四醇含量测定及品质分类[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 70-75.

[15] 王茜. 不同产区沉香的化学成分特征及其可识别性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2020.

(收稿日期:2022-03-17;修回日期:2022-05-21)

际情况,为确认一个新的设施、生产线或工艺的冻干粉针车间,会进行至少3次连续成功的无菌工艺模拟(APS),并每6个月进行1次持续工艺评估^[3],每次至少1批,作为对无菌操作人员卫生水平及无菌操作水平的检定。故本研究中从培养基选择、影响因素考察、试验过程及试验结果等方面对培养基模拟灌装试验展开研究。现报道如下。

1 验证前准备

1.1 相关设备及其工艺均应事先通过确认或验证^[4]

洁净生产区环境须通过静态验证,空气的悬浮粒子、浮游菌、沉降菌及表面微生物均应符合相应规定;所用物料(西林瓶、胶塞、铝盖)通过相关灭菌验证;主要生产设备(灌装压塞机、无菌隔离器等),以及与生产相关的其他辅助工艺(湿热灭菌、干热灭菌等)均通过确认或验证;操作人员的操作行为需经严格培训,并通过考核。

1.2 培养基选择与微生物生长性能

营养肉汤培养基或胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体培养基均适用于培养基模拟灌装试验^[4],故初步选定3% TSB液体培养基作为模拟灌装用培养基。为使其能充分适用于本生产车间,参考文献^[5]制订《洁净区厌氧菌测试方案》,以检测车间生产环境中的微生物。依据洁净区环境监测规程,由专业人员对洁净区的沉降

菌、浮游菌和表面微生物进行取样和监测。微生物按基因测序方法鉴定,细菌按16S rDNA方法鉴定,真菌按rDNA-ITS扩增法鉴定,结果所有采集到的微生物均可在TSB液体培养基中生长良好,故确定本次APS试验的培养基为TSB液体培养基。其中,腐生葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、土壤罗斯氏菌、沃氏葡萄球菌、科氏葡萄球菌均为需氧菌或兼性厌氧菌,耐冷假单胞菌为需氧菌。

2 APS试验设计与结果

2.1 最差条件选择

《无菌工艺模拟试验指南》中规定:“最差条件并不是指人为创造的超出允许范围的生产状况和环境。为了确认无菌工艺风险控制的有效性,应通过风险评估并结合无菌生产工艺、设备装备水平、人员数量和干预等因素来设计模拟试验最差条件。”^[6]美国注射剂协会(PDA)发布的*Process Simulation for Aseptically Filled Products*规定:“应对预期的干预进行评估,以确定微生物风险的数量和对产品或工艺的影响。由于干预的复杂性和执行频率,对产品 & 工艺会产生较高的风险,APS试验中的干预应高于正常频率。”故进行APS试验最差参数选择和干预操作选择,并进行最差条件挑战。详见表1和表2。

表1 无菌工艺模拟试验最差参数选择

Tab. 1 Selection of the worst parameters of the APS test

控制项	最差条件	选择理由
配液、灌装系统	灭菌后存放时限 提前24 h灭菌	正常工作条件边缘下,为最差条件
器具、胶塞灭菌	灭菌后存放时限 提前24 h灭菌	正常工作条件边缘下,为最差条件
灌装隔离系统	环境灭菌后存放时限 提前24 h灭菌	正常工作条件边缘下,为最差条件
真空冷冻干燥机	灭菌后存放时限 提前24 h灭菌	正常工作条件边缘下,为最差条件
药液配制、 储存过程	配制水温度	30~35 ℃ 微生物生长最适温度
	药液pH	7.3 ± 0.2 微生物生长最适pH
	药液保存温度	常温 保证微生物能生长
	无菌药液存放时间	24 h 最长产品无菌药液存放时限为24 h,正常工作条件边缘下,为最差条件
灌装	灌装量控制	容器体积的1/3~1/2 ^[6] 保证产品通过倒置和旋转接触到所有内表面并有足够氧气支持微生物生长,以利于培养基的观察
	灌装速度	商业化生产速度 与商业化生产速度一致
	灌装时限控制	12 h 最长产品生产时限为10 h,正常工作条件边缘下,为最差条件
人员	最多12个,包含质量保证(QA)、质量控制(QC)、维护、管理、生产操作人员和摄影师	执行无菌工艺模拟(APS)最大人员数量和过程中模拟正常的饭休、换班等正常操作,为最差条件
设备自动灌装、加塞、取样、称重	增加人为干扰,在不灌装培养基的情况下运行生产线	人为干预会增加微生物和微粒污染的风险,为最差条件
冻干	培养基分布	分布于冻干机上、中、下板层 增加培养基在冻干箱内的分布会增加微生物和微粒污染的风险,为最差条件
	冻干操作(进箱、出箱、加塞)	冻干箱内停留时间不短于4 h后进行加塞 停留时间过短,不能挑战最差条件;停留时间过长,培养基的促生长能力减弱

表2 无菌工艺模拟试验干预操作选择^[7]

Tab. 2 Selection of the intervention operations of the APS test^[7]

可能存在的异常	次数	时长	干预类别	筛选依据	模拟方法
进瓶转盘过渡板	1	2~3 min	固有干预	1)生产前的必须操作	将手伸入手套箱,旋转手轮,向下翻转进瓶转盘过渡板
培养皿拆包、传递	1	32~55 min		2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	将手伸入手套箱,取下培养皿,剪开包装,取出平皿进行标记,并传递至取样点
动态沉降菌监测	4	1分钟/(人·碟)		1)生产中的必须操作	生产前,打开事先放置好检测沉降菌的培养皿盖,放置时间到达4h后对各监测点的培养皿进行更换,连续监测
动态浮游菌监测	3	1分钟/(人·碟)		2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	将事先准备好的培养皿置浮游菌监测装置内,进行在线浮游菌监测。采样结束后,从监测装置中取出平皿,放至暂存架上,待生产结束,一并取出
胶塞下料	1	30 s		生产前的必须操作	点击灌装间胶塞控制面板上的出料按钮,打开胶塞象鼻子旋转气缸,旋转调速钮,自动进行出塞操作
陶瓷泵排空、 取样	1	≥20 min	固有干预	生产前的必须操作	选择所有泵,点击“排液允许”,使药液充满药液进液管路
	1	4~10 min		1)生产前的必须操作	将手伸入手套箱,将药液接受盒放至灌装针头下方进行排空操作;将取样瓶放至接液盒排口下方,接取药液。取样结束,在接液盒排口下方放置接液容器
	1	*		2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	进行接液,待目视软管内无明显气泡后排液结束,取下接液盒,降下针架。取出的样品传递至快速传递接口(RTP)桶传出
				1)生产后的必须操作	将手伸入手套箱,将药液接受盒置灌装针头下方,选择所有泵,点击“排液允许”“开始排液”进行排空操作,至灌针无药液排出后取下接液盒,降下针架
				2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	
在线称重	13	*	固有干预	生产时的必须操作	在灌装压塞机触摸屏上点击“称重模式”,选择“单次称重1~16”,点击称重开始,进行自动装量检测
在线取样	3	*		1)生产时的必须操作	在设备触摸屏上点击取样,对灌装头进行取样操作,随后将手伸入手套箱,将培养基按顺序放入取样盒中,打开在灌装隔离系统内的RTP卡箱,将取样盒放入RTP桶内传出
				2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	
胶塞卡住轨道	12	30 s	纠正性干预	1)生产中的可能操作	在操作屏上手动停止胶塞振荡斗,将手伸入手套箱,拿镊子将卡住的胶塞取出
	5	1~3 min		2)该操作可能影响灌装隔离系统内气流流型,对灌装隔离系统内A级环境造成影响	在操作屏上手动停止胶塞振荡斗,将手伸入手套箱,用镊子或针将卡住的胶塞取出
输送带带倒瓶/ 卡瓶	15	1~3 min			在操作屏上手动停止进瓶输送带,将手伸入手套箱,拿镊子夹住西林瓶,放到转盘边上的收集盒里,并剔除处理过程中镊子碰到的西林瓶
	12	30 s			
处理称重星轮处 炸瓶	13	4~6 min			清理破瓶附近的瓶子到收集袋中,用工具(镊子/不锈钢条)清理碎瓶屑后,用剪刀剪开洁净袋袋口,用镊子从洁净袋中取出清洁布,用清洁布擦拭
处理灌针处炸瓶	13	4~10 min			清理破瓶附近的瓶子到收集袋中,用工具(镊子/不锈钢条)清理碎瓶屑后,用剪刀剪开洁净袋袋口,用镊子从洁净袋中取出清洁布,用清洁布擦拭。用工具对针头位置进行调整
剔废产品处理	35	2~6 min			将手伸入手套箱,拿镊子夹住需剔废产品,将瓶内药液倒入指定废液容器内,并将西林瓶放到收集袋里;剔废时若瓶子倾倒,导致药液倒入剔废盒,则用剪刀剪开呼吸袋,用镊子取出丝光毛巾,对剔废盒进行擦拭;若为称重超限剔废产品,则用镊子进行全压塞,放在指定位置,灌装结束后进行离线称重

注:*由设备自动控制,无固定值。

Note:* refers to the time is automatically controlled by the equipment,without fixed data.

2.2 APS 试验

APS 试验操作流程见图1。具体操作如下。

无菌培养基配制:配制3% TSB 液体培养基,按30 g TSB 冻干粉配制成1 000 g TSB 液体培养基比例配制。按比例取一定量的注射用水置配制罐中,并冷却至30~35℃。按比例称取TSB冻干粉,溶于配制罐中,搅拌溶解,

pH 控制为 7.3 ± 0.2 ,经 $0.45 \mu\text{m}$ 和 $0.20 \mu\text{m}$ 滤芯过滤后进入无菌储罐。最差条件的存放时限后经终端 $0.20 \mu\text{m}$ 除菌滤芯过滤至高位罐,进行无菌灌装加塞操作。

无菌培养基灌装:培养基灌装过程按产品生产工艺操作要求进行模拟,按表1模拟最差的灌装条件和表2模拟固有干预操作和纠正性干预操作,并确保所有模拟干

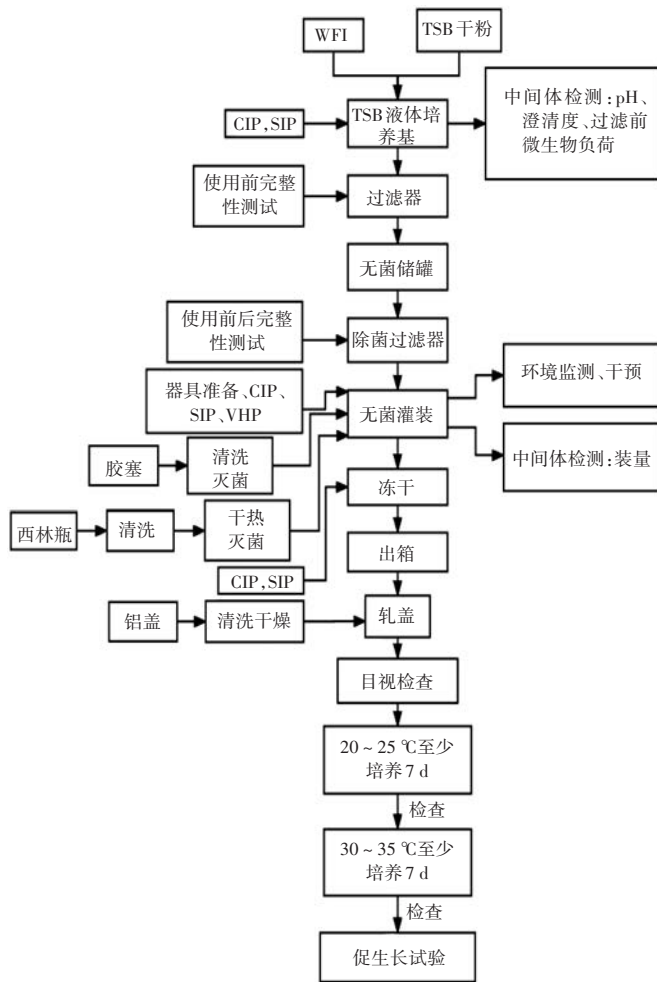


图1 无菌工艺模拟试验操作流程

Fig. 1 Operation flow of the APS test

预操作在培养基药液灌装时进行。基于风险评估设计,将所有灌装半压塞好的培养基药液运送至冻干箱,并平均分布于冻干箱上、中、下板上[6]。整个灌装过程中的剔废品应全部编号并拍照。由质量管理人员对无菌隔离器中的整个灌装过程进行全程观察,并详细记录灌装过程中灌装岗位人员非计划性操作情况。且对整个模拟灌装过程进行全程摄像,便于后续分析和解决问题。

冻干压塞:样品全部进入冻干箱后,关好冻干机小门,对冻干箱抽真空至0.05 MPa^[8],存放于冻干机内模拟冻干时间,关闭蘑菇阀和抽真空系统,用经除菌过滤的压缩空气破空后再次抽真空至0.05 MPa,关闭抽真空系统,压塞后破空。

轧盖:对从冻干箱出来的培养基灌装产品进行轧盖。轧盖前剔废的未加塞西林瓶及完整性有缺陷的西林瓶(如西林瓶破裂、漏液)均不送最终培养,但必须每瓶编号并拍照,根据剔废原因标记。

培养与检查:充分摇晃待培养品(确保接触西林瓶内表面)后,倒立放置,于20~25 °C培养室内至少培养7 d;观察后,正放置于30~35 °C的培养室内至少培养7 d^[9]。检查

须由具有资质的人员执行,如中途检查在培养室外进行,应对检查时间进行补偿,保证培养的总时间。在检查和转运过程中,若出现意外碎瓶,应拍照并记录^[10]。培养基模拟灌装试验的目标遵循EU GMP Annex 1: *Manufacture of Sterile Products DRAFT 20200220* 提出的“目标应为无微生物生长。任何被污染的单元应致使工艺模拟失败”。

培养基培养后促生长试验:对培养至少14 d结束后的样品取样并进行促生长试验,采用2020年版《中国药典(三部)》要求的5种标准菌(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌)进行促生长测试。此外,采用环境分离菌进行促生长测试,环境分离菌筛选原则有,选取日常环境监测中典型的微生物及出现频率较高的微生物;尽可能从关键区域回收的微生物中选用,如灌装间等;特定环境菌从近期收集到的微生物中选取,尽量在近6个月内,最长不超过12个月。依据《美国药典43版》1113、2020年版《中国药典(四部)》9204 微生物鉴定指导意见和《伯杰氏系统细菌学手册》,本车间每6个月对回收的微生物样本进行鉴定。结果见表3。

表3 洁净区微生物鉴定结果

Tab. 3 Results of microbial identification in the clean area

菌属	形态学分类	占比(%)
细菌	葡萄球菌属 革兰阳性球菌	38.52
	微球菌属 革兰阳性球菌	16.94
	莫拉氏菌属 革兰阴性好氧菌或微好氧杆菌或球菌	4.37
	芽孢杆菌属 革兰阳性产孢杆菌或球菌	3.55
真菌	芽枝霉属 霉菌	41.67
	红酵母菌属 酵母菌	16.67

环境监测与模拟灌装后清洗:对整个模拟灌装过程进行环境监测,确保洁净区的环境在动态中符合GMP要求。模拟灌装结束后,按车间相关清洁规程对设备进行清洁,分别用淋洗法和擦拭法对设备淋洗水和设备表面进行取样,进行残留、微生物限度、细菌内毒素检测^[11],以确定不会对下次生产产生影响。

2.3 APS 试验结果

本次 APS 试验中,灌装完成的产品均无微生物生长;且对培养14 d后的样品进行微生物促生长试验,科氏葡萄球菌、藤黄微球菌、坚强芽孢杆菌、胶红酵母菌、奥斯陆莫拉氏菌和耐盐枝孢菌6种环境分离菌均生长良好。表明本次 APS 试验成功,该批操作人员按此生产工艺生产的产品无菌性可靠。

3 讨论

该冻干车间基于2010年版GMP无菌药品附录、PDA发布的 *Process Simulation for Aseptically Filled Products* 等法规和指导性技术报告,对整个生产工艺、