

· 工艺研究 ·

清洁验证中的微生物问题 ——设备表面微生物限度的制定及其检验

陈雯秋

(华瑞制药有限公司质量保证部, 无锡, 214092)

[中国分类号] R117

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-2809(2004)05-0380-03

在药品生产的每道工序完成后, 对制药设备进行清洗是防止药品污染和交叉污染的必要手段。通过有效的清洗, 可将设备表面的残留物减少到不会影响到下批产品的疗效、质量和安全性的程度。清洁验证就是通过科学的方法采集足够的数据, 以证明按规程清洁后的设备, 能始终如一地达到预定的清洁标准^[1]。

清洁后设备表面的残留物质, 可分为化学物质和微生物两大类。有关法规都要求在清洁验证中合理制定化学残留物质和微生物残留的限度。化学物质一般有活性药物成分、降解产物和清洁剂等, 制药企业一般能够根据最低日治疗剂量、最小批量、成品的杂质限量等参数制定出适宜的限度。设备表面残留的微生物水平, 对于产品质量尤其对无菌制剂的影响不可小觑, 虽然多数法规也强调了其重要性, 如 FDA 在《清洁验证的文件指南》中指出: “无论采取何种清洁方法, 设备清洁的微生物问题都必须加以考虑……, 特别要采取措施防止在设备存放期间的微生物繁殖。”^[2]但对于微生物的残留限度, 却少有文献提出合理的制定方法。由于微生物性质的特殊性, 其限度的制定确实有一定难度, 本文旨在为制药企业提供一个思路, 而在实际的清洁验证中还需要结合产品要求和生产情况酌情制定。

微生物与化学物质的性质截然不同。化学物质具有数量上的“不易变性”, 可以假设清洁后残留在设备表面的化学物质全部转移到下一批产品中, 而对于微生物来说, 从上一批清洁后到再次生产前的设备存放期, 表面残留的微生物会有数量上的变化; 开始生产后, 从设备表面汇入下批产品的微生物, 其数量可能会再次发生变化。例如: 清洁完毕对设备进

行干燥, 或者下批产品原料中含抑菌剂, 会大大减少残留微生物的数量; 而如果设备存放期间有适宜的生长条件, 或产品原料中有促进微生物繁殖的营养物质, 则会使之急速增殖; 另一种情况是残留微生物为孢子(即便在干燥的设备表面亦能存活), 或者下批产品是干品(水分极低), 此时微生物数量则不发生显著的改变。

1 微生物限度的制定方法

1.1 微生物限度的理论推导^[3]

由于微生物的特殊性, 清洁验证中设备表面残留微生物限度的制定方法与化学残留物有所不同。本文分三种情况来讨论微生物限度的制定方法。第一种情况: 下批产品的原料及其生产过程既不引起微生物的增殖, 也不造成微生物的减少。第二种情况: 下批产品生产前设备不灭菌, 而产品将接受最终灭菌。第三种情况: 下批产品生产前设备需灭菌。

第一种情况: 因下批产品的原料和生产过程不引起微生物数量的变化, 因此残留微生物限度的设定方法同化学残留物。首先确定下批产品的成品微生物限度。一般以每克产品中允许的菌落数(CFU)计。之后, 根据下批产品的最小批量和设备表面积, 计算单位面积的微生物限度(假设产品被均匀污染)。

如何确定下批产品的微生物限度? 有两个相关信息源, 一个是药厂关于该产品的成品质量标准, 一般会有微生物限度的要求。另外可参考 USP(1111) “非无菌药品的微生物要求”中相关的描述。例如:

固体口服制剂: ≤ 1000 CFU/g液体口服制剂: ≤ 100 CFU/g局部用药: ≤ 100 CFU/g

作者简介: 陈雯秋, 女, 执业药师, 从事工艺开发和工艺验证等

确定了成品的微生物限度后, 然后要考虑该限度中究竟有多少该“归咎”于设备表面的微生物残留。因为原料、内包装材料等也是成品中微生物的来源, 因此应该尽可能地了解原料和内包装材料的微生物水平。举例来说: 对于某一微生物限度为 100CFU/g 的液体口服制剂, 算得由原料造成的最高的微生物污染为 27CFU/g (以每种原料的质量标准中微生物上限计算), 内包装材料造成 3CFU/g, 那么允许由设备表面造成的污染限度为 70CFU/g。考虑一个适宜的安全因子, 假设取 5, 这样由设备表面残留的微生物造成的成品污染限度最终可定为 14CFU/g。也可以采用更高的安全因子, 得出更低的限度值。

当确定了下批产品中由设备表面造成的微生物污染限度之后, 下一步就可确定单位面积的限度值 (CFU/cm²)。这就和化学残留物的计算方法完全一样了:

单位面积的限度 = (LSP × MBS) / SA

其中:

LSP: 下批产品中允许的、来自设备表面的残留微生物限度

(Limit in the subsequent product)

MBS: 最小批量 (Minimum batch size)

SA: 产品接触的设备表面积 (Product contact surface area)

假设某产品的批量为 200kg, 产品接触的设备表面积为 260,000cm², 由刚才推导出的 LSP, 即 14CFU/g, 计算所得的限度值为 11CFU/cm²。

第二种情况: 下批产品生产前设备不灭菌, 而产品将接受最终灭菌。这种情况下, 可以以灭菌前微生物含量限度为基础计算。产品无菌保证值的大小与灭菌工艺的 F₀ 值以及灭菌前微生物的含量有关 (F₀ = D₁₂₁ × (lg N₀ + SAL)), 因此任何一个经验证的灭菌工艺都需要确定允许的灭菌前微生物的限度 (即 N₀), 知晓这个限度后, 下面的计算就和第一种情况一样了: 确定该限度中“归咎”于清洁后设备表面的比例, 再选取安全因子, 然后以最小批量和接触面积算出最终的限度值。对于无菌药品的生产, 设备清洁非常重要, FDA 在验证指南中已经指出: “必须注意通过适宜的设备清洁和存放来控制灭菌前微生物含量, 以保证灭菌或消毒能够达到一定的无菌保证值。”^[2]

第三种情况: 下批产品是无菌操作, 因此设备本身将接受灭菌。这种情况相对简单, 因为在做该设备的灭菌验证时已经制定了表面微生物的限度。不需了解最小批量和设备表面积, 只须以该限度值除以某安全因子, 即得清洁后设备表面微生物限度值。

1.2 结合实际情况制定微生物限度

通常理论推导出的微生物限度往往大大高于实际可达到的清洁水平。一般来说, 良好的清洁规程应能使接触碟每碟小于 25CFU (相当于 <1CFU/cm²)。如清洁不够彻底, 一般每碟会大于 100CFU。例如上述第一种情况中的例子, 计算所得限度值为 11CFU/cm², 如用 25cm² 的接触碟取样, 则相当于每碟 275CFU, 如果企业就将限度定为 11CFU/cm², 显然太宽, 并且该限度是无法用接触碟取样来验证的, 因为一般每碟最多只能数清 250CFU。

那么, 如何制定限度才算合理呢? 应该从多方面考虑对设备表面残留微生物的限制因素, 综合权衡, 取要求最严的限度值。举例来说, 被清洁设备的使用环境如果有微生物要求, 则应予以考虑。欧盟 GMP 在附录 1《无菌药品的生产》中, 对不同洁净区的动态微生物水平提出了建议值, 制药企业可参照类似的标准制定出更详细的内控标准, 如静态、动态分别制定, 关键表面和一般表面分别制定, 警戒标准和纠偏标准分别制定。所谓关键表面, 是指与物料接触的表面或可直接影响产品质量的表面, 显然设备表面是属于关键表面。假设上例中的产品在十万级区生产, 而该企业对十万级区的关键表面要求动态不大于每碟 10CFU, 理论推导出的限度是不大于每碟 275CFU, 二者取其低, 则限度宜定为每碟 10CFU。

另外, 限度值的确定也可根据具体情况细化。例如, 擦拭取样一般用于不平整的表面, 如管路、角落等处, 而这些地方正是最不易清洁的, 也是微生物污染较集中的地方, 此时淋洗水样品的限度值就未必适用于擦拭样品。因此, 宜将设备分为不同的表面, 取不同的安全因子, 分别制定合理的限度值。

企业在撰写清洁验证的方案时, 未必从一开始就能制定出合理的限度。从某种意义上来说, 限度也是需要验证的。不合理的限度值没有实际意义, 过宽的限度会给产品质量带来风险, 过紧的限度会造成资源浪费, 从验证过程中积累的数据会发现原定限度的不合理性, 此时可对限度值做出修改, 但是无论限度的制定还是修改, 都必须在方案中作出科学的

阐述。

2 设备表面残留微生物的取样及检验方法

传统的测量表面微生物的取样及检验方法都可使用:最终淋洗水(通常用膜过滤),棉签擦拭(将棉签中的物质以无菌溶剂溶解下来,然后用倾注平皿法),以及接触碟等。溶剂和培养基的选择取决于预计的微生物是什么种类。一般来说比较关注需氧菌。但是也有需要评价厌氧菌或霉菌的情况。三种取样方法应视情况结合使用。最终淋洗水取样面大,但难以反应真实的污染情况;棉签擦拭能对最难清洁部位直接取样,能弥补淋洗水取样的不足;接触碟比较直观,但是如每碟微生物计数超过 250CFU,则无法计数。

3 结束语

微生物的残留问题在设备清洁验证中不容忽视。良好的清洁规程应该能够减少微生物的残留,除使用清洁剂和充分淋洗外,比较有效的措施包括清洁后的设备干燥,以及保证设备存放期间的环境微

生物水平等。制药企业在做清洁验证时,应自设备刚刚清洁完毕起,放置至预定的存放期之后再延长一段时间,在整个存放期间,密集取样,评价微生物随着时间的增殖情况,从而确定安全的存放时间,确保设备表面微生物在存放期间不进入快速增殖期。

清洁验证中设备表面残留微生物限度的制定,应该满足生产和质量控制的要求,同时应该是清洁规程所能够达到的,并且是检验方法能够检验的。因此,制药企业应该根据具体的产品和生产情况,制定合理的清洁规程,在验证方案中阐述合理的微生物限度,并且选择适宜的检验方法。

4 参考文献

- [1] 朱世斌主编. 药品生产质量管理工程. 北京:化学工业出版社. 2001.360~395
- [2] FDA: Guide to Inspections of Validation of Cleaning Process.1993
- [3] Destin A. LeBlanc. Equipment Cleaning Validation: Microbial Control Issues. Journal of Validation Technology,2002,8(4):336~342
(收稿日期 2004-08-12 修回日期 2004-11-30)

(上接第 384 页)

- [7] Murakami Takao,Chen Chiu-Ming.über die Bestandteile der Rhizome von Woodwardia or-ientalis Sw..Chem.Pharm.Bull..1971,19(1):25~30
- [8] González González A,Carmen Affayate Casasnas M,Candelaria Garcia F,et al.Triterp-enoids from Woodwardia radicans. biochemical systematics and ecology, 2000,28(5):497~499
- [9] Chiu Pei-Lu, Patteron Glenn W, Salt Thomas A. Sterol composition of pteridophytes.Phtochemistry, 1988,27(3):819~822
- [10] Hanu? LO,ezanka T,Dembitsky VM. A trinorsersterterpene glycoside from the North American fern Woodwardia virginica (L.) Smith. Phtochemistry, 2003,63(8):869~875
- [11] ezanka T,Dembitsky VM,Hanu? LO. Two cyclohexenone glycosides from the North American fern Woodwardia Virginica (L.) Smith. Phytochemistry, 2003,63(8):931~937
- [12] 谭文界,魏俊德,肖玉平.单芽狗脊化学成分.中草药,1984(6):6
- [13] BOHM B.A, TRYON. PHENOIC COMPOUNDS IN FERNS(A SURVEY OF SOME FERNS FOR CINNAMIC ACID AND BENIOIC ACID DERIVATIVES). Canadian Journ-al of Botany. 1967,45,585~593
- [14] BOHM B.A. PHENOLIC AMINATION OF SOM
- DERIVATICES). Phytichemistry, 1968,7(10):1825~1830
- [15] GLASS A.D.M., BOHM B.A. A FURTHER SURVEY OF FERNS FOR CZNNAMIC A-ND BENIOIC ACIDS. Phytochemistry, 1969, 8(3):629~632
- [16] 吕归宝,方 瑾,黄乔书.薄层光密度法测定贯众中东北贯众素的含量.药物分析杂志,1988, 8(1):17~20
- [17] 楼之岑,秦 波,主编.常用中药材品种整理和质量研究(北方编).第 2 册. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1995.66~67,89~94.
- [18] 中国医学科学院药物研究所等.中药志.第 2 册.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1988.145
- [19] 郑虎占,董泽宏,余靖主编.中药现代研究与应用.第 4 卷.北京:学苑出版社,1998.3040~3041
- [20] 高增平,王宝华,江海龙等.商品贯众的品种调查.中医药学刊, 2003,21(5):824~826
- [21] Min,Byung-Sun;Tomiyama,Miyuki;Ma,Chao-Mei;Nakamura,Norio. Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of Dryopteris crassirhizoma and their inhibitory effectd on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. Chem.Pharm.Bull.,2001,49(50):546~550

日期 2004-11-25)



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE