

Validation of Moist Heat
Sterilization Processes:
Cycle Design, Development,
Qualification and Ongoing
Control

Technical Report N₀1 (Revised 2007)

Supplement

Vol. 61, N₀ S-1

© 2007 by PDA

P D A

Parenteral Drug Association



湿热灭菌的验证:

灭菌程序的设计, 开发, 确认和日常监控

2007年增补, 第一卷 N₀.S-1

美国注射剂协会
制药科学与技术杂志

编写委员: 中国医药设备工程协会技术委员会

发行单位: 中国医药设备工程协会

湿热灭菌程序的验证：灭菌程序的设计、开发、确认以及日常控制

目录

1.0 引言	4
1.1 范围	4
2.0 术语	5
3.0 灭菌科学	11
3.1 灭菌模式	12
3.1.1 耐热参数 (D_T)	13
3.1.2 温度系数 (z值)	15
3.1.3 灭菌率 (Lethal Rate) 和累计杀灭时间 (lethality, F)	16
3.2 灭菌指示剂	20
3.2.1 生物指示剂 (BIs)	20
3.2.2 化学监测器	21
3.3 热力学和蒸汽质量	22
3.3.1 温度和热量	22
3.3.2 蒸汽	28
3.3.3 纯蒸汽质量的测试	28
4.0 灭菌程序的开发	30
4.1 设计方法	30
4.1.1 灭菌程序设计方法中残存曲线的应用	31
4.2 装载类型	34
4.2.1 多孔/坚硬装载的定义	34
4.2.2 液体装载的定义	34
4.3 灭菌程序	35
4.3.1 饱和蒸汽灭菌程序	35
4.3.2 空气加压程序	38
4.4 灭菌程序的开发	40
4.4.1 多孔/坚硬装载灭菌程序的开发	40
4.4.2 液体装载灭菌程序的建立	45
4.5 稳定性研究	48
5.0 灭菌程序的性能确认	48
5.1 物理确认	49
5.1.1 热分布	49
5.1.2 热穿透	49
5.2 生物指示剂确认	50
5.2.1 生物指示剂挑战系统	50
5.2.2 生物指示剂的使用和放置	51
5.3 灭菌程序性能确认合格标准	52
5.4 等效灭菌器	53
5.5 分组法	54
5.5.1 典型产品法	54
5.5.2 典型容器规格/装量法	54

5.5.3 典型物品法.....	54
5.5.4 典型装载法.....	54
6.0 日常工艺控制.....	55
6.1 常规放行.....	55
6.2 灭菌器系统的适用性试验.....	55
6.3 变更控制.....	55
6.4 灭菌程序定期再确认.....	56
7.0 参考文献.....	56

1.0 引言

PDA 的原始技术报告第一期“蒸汽灭菌程序的验证”于 1978 年出版，它为一代制药科学家和工程师介绍了蒸汽灭菌的原理。原文的重点是湿热灭菌的微生物学和工程设计，本修订版仍以此为中心，并通过更新以包括近代出现的课题。本报告参考了最新的科技出版物、国际法规文件、期刊文章、技术论文和书籍，从中可查得更多详细并有说服力的数据和资料。

特别工作小组的主要目的是编写一个湿热灭菌的科学技术报告，它可在所有监管的法规环境中加以应用。报告并不立足于阐述区域性法规的要求，而是向工业和监管部门提供最新的科学建议。应将本报告看作一个指南。本文无意确立湿热灭菌验证的标准，它只是对现有参考文献作系统的回顾和总结。

特别工作组由欧洲和北美工业界和监管方面的专家组成，以保证所述方法、术语和做法具有良好的科学性，以致可以在全球范围内加以应用。本技术报告曾以草案的形式，在公开征求意见后出版，以保证其作为一个有价值的资料，能够指导工业界的蒸汽灭菌。

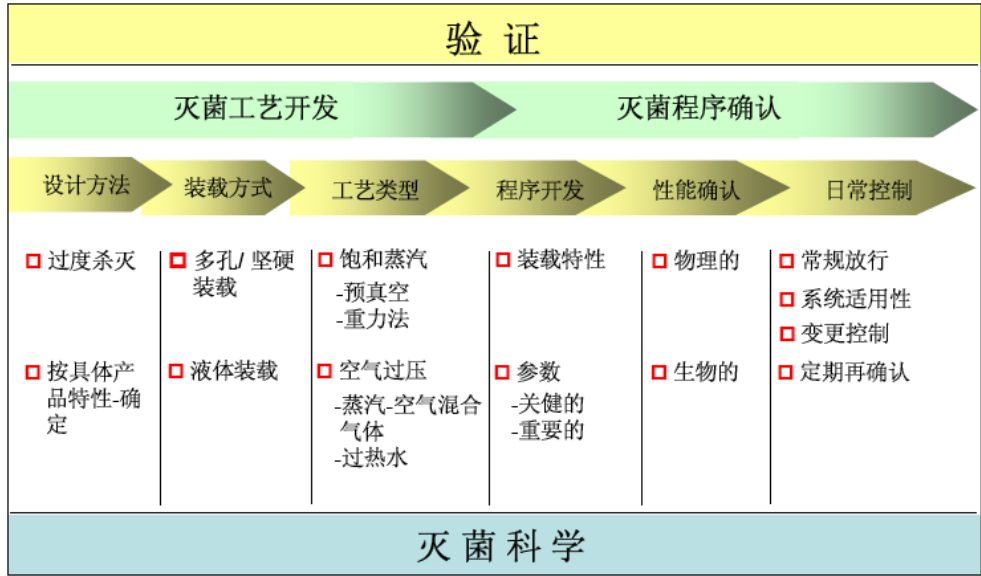
本技术报告总体目标是提供理解湿热灭菌科学所需的必要信息及技术细节，为制订灭菌方针提供方便。

1.1 范围

新的标题“湿热灭菌的验证--灭菌程序的设计、开发、确认和日常监控”反映了本技术报告的重点放在生产上。

报告按逻辑次序编排，从灭菌科学的原理/要素开始，然后是灭菌程序的开发和灭菌程序的确认，见图1.1-1。

图 1.1-1 灭菌科学的应用



为便于理解报告的内容，本文开头就列出了技术性术语（包括同义词）。围绕“验证”这一总的主题，按图 1.1-1 的程序讨论了包括热力学（第 3.0 节）在内的微生物学、灭菌科学和灭菌程序，因为它们本指南图 1.1-1 所述内容的基础。

工艺开发（第 4.0 节）-- 介绍了药品生产中实际应用的灭菌程序（过度杀灭和按具体产品特点来确定程序）的设计理论。可用决策树来指导怎样选择各类产品最恰当的灭菌程序。为了方便评估灭菌工艺不同阶段的风险，列出了液体和多孔/坚硬¹装载灭菌工艺参数示例表。本节指导产品或物品的湿热灭菌法的使用者，如何将灭菌科学的理论应用于实际。

灭菌工艺的性能确认（第 5.0 节）-- 是灭菌程序验证的核心。采用物理和生物指示剂（下文有时会采用 BI 表述）二种方法来阐述一个生产企业或其他设施灭菌程序的性能确认。它在讨论中包括了必要的实践和科学理论，以证明灭菌系统达到了所要求的杀灭效果（lethality）。

日常监控（第 6.0 节）-- 阐述日常性能监控的要求，以保持灭菌程序的受控状态。本节还包括变更控制、系统适用性及定期再确认的内容。

并不要求将本技术报告中所述概念，应用于包括医院在内的实验室或者其他无cGMP 要求的单位。本技术报告中没有包括其他一些重要因素，如设施、设备、维护保养、公用工程和分析方法的确认。

2.0 术语

每个公司对术语的使用不尽相同，有一些术语将来可能会发生变化。然而，在一个公司内，验证方案中所采用的术语必须清晰、明确，易于理解。监管部门的指南可能会采用另一些定义，应考虑这种情况。本技术报告采用以下术语并同时附上相应的定义及必要的同义词。

空气检测器 Air Detector

安装于饱和蒸汽灭菌器上用以检测灭菌器腔室中空气的装置。

空气增压灭菌程序 Air Overpressure Sterilization Process

指在大于饱和蒸汽压的控制压力下运行的湿热灭菌程序，通常用压缩空气使灭菌腔室达到所需的压力

空气去除试验 Air Removal Test

用于评估灭菌器空载条件下空气去除和蒸汽穿透的一种试验（例如，Bowie-Dick 测试法，DART，Lantor Cube，Browns 测试法），此类灭菌器用于多孔/坚硬物品类装载的灭菌。

生物指示剂挑战系统 Biological Indicator Challenge System

一个含有纯的特定的菌株的活的微生物测试系统，此系统对某一灭菌程序具有规定的耐受性。(1) [同义词：BI Challenge System-生物指示剂挑战系统，Microbial Challenge-微生物挑战，Microbiological Challenge System-微生物挑战系统]

¹ 译注：原文为 Porous/hard goods loads，曾考虑译成多孔/固体装载，但在本指南中，这类装载包括过滤器、胶塞、软管、拖把、工作服、塞子、清洁器具或设备的更换部件，hard goods loads 可指设备的更换部件，如灌装针头等，故译为坚硬装载。

生物指示剂确认 **Biological Qualification**

采用生物指示剂来证明整个装载（被灭菌品）始终能达到所规定生物杀灭时间（ F_{BIO} 值）的试验。它是性能确认的组成部分。

分组法 Bracketing Approach

将待试验的产品和（或）装载按其特性（如粘度、容器规格、装量、物品大小、装载方式）在上和（或）下限进行确认及验证的科学方法

仪器的校准 **Calibration**

采用与相关标准或者源于国内或国际的标准进行比较，以证明一项仪器或设备所得结果符合规定限度标准的活动。

灭菌器腔室 **Chamber**

灭菌器用以放置被灭菌物品的主要组成部分。灭菌器腔室是一个有额定压力的容器。

灭菌器腔室的冷点 **Chamber Cold Spot**

在灭菌程序中，装载区域中被灭菌品 F_0 值最低和/或热分布试验中温度最低的位置。

灭菌器腔室的升温时间 **Chamber Heat-Up Time**

从蒸汽进入灭菌器腔室 开始 至加热介质达到设定灭菌温度的时间。

腔室检漏试验 **Chamber Leak Test**

为评估真空条件下灭菌器腔室中是否有空气渗入而进行的试验。[同义词：Vacuum Leak Test 真空检漏试验]。

化学指示剂 **Chemical Indicator**

系指根据受热导致物理或化学变化的原理，显示一个或多个预定变量的试验系统（2）²。

多变量化学指示剂 **Chemical Integrator**

能定量地反映灭菌程序中多个变量（尤其是时间、温度和某些情况下的湿度）累计变化的系统³

冷却阶段 **Cool-Down Phase**

指灭菌程序中灭菌完成之后的阶段。通常须定义冷却阶段的参数，以符合有些用户对被灭菌品冷却和干燥的技术要求。

容器的冷点 **Container Cold Spot**

指灭菌程序中，密封液体容器中 F_0 最低的位置。

蒸汽干度 **Dryness Fraction**⁴

一个蒸汽样品 中，实际潜热与饱和蒸汽理论潜热之比。

² 括号内均指参考文献

³ 译注：参见 USP <1029> **STERILIZATION—CHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL INDICATORS AND INTEGRATORS**

⁴ 所谓干度，是指每千克蒸汽中含有干蒸汽质量的百分数。Dryness Fraction 与 Dryness Value 为同意词。

干度值 Dryness Value

近似蒸汽干度且无单位的测试值。

D_T 值 D_T -Value 耐热参数⁵

在规定的灭菌条件下，使所用生物指示剂的数量下降一个对数单位，或杀灭 90%所需的时间。在湿热灭菌中，D 值总需注明参照温度，即以 D_T 表示。例如，一个 $D_{121^\circ\text{C}}=1.4$ 分钟的生物指示剂系统，表示在 121℃ 下，杀灭 90%的芽孢需要 1.4 分钟。

平衡时间 Equilibration Time

指灭菌器的参照测试点（通常是排水口）达到最低灭菌温度开始，到装载中所有点均达到灭菌温度之间的时间间隔。它体现了灭菌器去除装载中空气并对其进行加热的能力。通常要求将热穿透探头放置在多孔/坚硬装载中才能对此进行评估。

灭菌保温阶段 Exposure Phase

系指灭菌程序中，为获得设定杀灭效果，保持设定灭菌温度的持续时间（保温时间或保温阶段）。

F 值 F-Value (lethality Factor) 累计杀灭时间

系灭菌效力的度量值。 $F_{(T, Z)}$ 是在规定的Z值下，一个灭菌程序赋予一被灭菌物品在参照温度T℃下的等效灭菌时间，简称T℃灭菌时间。

F_{phy} 系指以灭菌程序的物理参数计算的物理杀灭时间。 F_{physical} -- 是灭菌率L对时间的积分值。L（灭菌率）用公式： $L=10^{(T-T_{\text{ref}})/Z}$ 计算。

注意：参照温度121.1℃在数学上近似250°F，为简化计算，本文此后将采用121℃。

F_0 值（标准灭菌时间），是指Z取10℃时，一个湿热灭菌程序赋予被灭菌品121.1℃下灭菌的等效灭菌时间。例如，当生物指示剂的z取10℃， $F(T=121.1^\circ\text{C}, z=10^\circ\text{C})$ 赋予产品8分钟的程序，或 F_0 为8，与一个116℃灭菌25.9分钟方形灭菌波是等效的， F_0 均为8。

F_{BIO} 系指灭菌程序的生物杀灭时间。它是生物指示剂挑战试验系统中微生物实际杀灭效果的量度。生物杀灭时间可以 $D_T \times LR$ 计算获得，这里， D_T 是生物指示剂系统以T度为参照温度下的D值，LR是灭菌过程中生物指示剂实际的对数单位下降值（ $\log L_0 N_0 - \log N_F$ ）。

阴性分数法 Fraction-Negative Methods

阴性分数法是指根据生物指示剂的初始菌数（ N_0 ）以及有效暴热时间建立二点存活曲线获得的数据并依此确定 D_T 值的方法。有效暴热时间是指试样灭菌的时间范围，在此范围内被灭菌的一组试样，应得到两个相反的结果，即一些样品为阳性，另一些样品则为阴性。

重力置换程序 Gravity Displacement Process

以冷空气比进入腔室的蒸汽重而沉降在腔室底部原理而运行的灭菌程序。当蒸汽进入腔室时，将冷空气及冷凝水通过疏水器从底部排出。

⁵ 在ISPE的工业蒸汽灭菌的文献中，D=Decimal Reduction，下降一个十进制的级别（对数单位）。

半周期灭菌程序的确认 Half-Cycle Qualification

用灭菌时间的50%来证明灭菌程序效率的确认方法。将半周期灭菌程序达到的物理和生物杀灭时间乘以2，即可获得整个灭菌程序的杀灭时间。

热量 Heat

物体和其环境之间因温差而转移的能量。

热穿透 Heat Penetration

为评价灭菌器腔室内传递给被灭菌品能量而进行的温度测试。热穿透测试时，探头应放置在被灭菌品上或被灭菌品中。

加热阶段 Heat-Up Phase

指灭菌程序达到灭菌温度前的阶段。应制订这个阶段的工艺参数（如排除空气及预热），以满足用户具体装载方式的要求。

泄漏率 Leak Rate

在腔室检漏测试时，测得的进入灭菌器腔室空气的量的速率。泄漏速率不得超过一定限度，否则，在去除空气或真空干燥阶段会妨碍灭菌程序的正常运行。

液体装载 Liquid load

指密闭在容器的液体产品。能量透过容器传递给药液从而实现产品的灭菌。

装载区 Load Zone

指灭菌腔室内可放置被灭菌物品的区域。

最大装载 Maximum load

一个灭菌器内允许的最大装载量。

最小装载 Minimum Load

一个灭菌器内允许的最小装载量。

最低可接受程序 Minimum Acceptable Cycle (MAC)

在操作规程中规定装载获得最低 F_0 的程序。

混合装载 Mixed Load

指对灭菌有不同挑战要求的多类装载。例如有些装载需挑战去除空气的能力，另一些则需挑战其数量。

湿热 Moist Heat

指用于灭菌的蒸汽、蒸汽-空气混合物以及过热水。

不凝性气体 Non-condensable Gases

系指不能凝结成液态并在灭菌条件下不会释放潜热的空气和其他气体。

运行参数 Operating Parameters

用来定义每一个灭菌阶段（如加热、灭菌和冷却）且需要加以控制和正确测试的参数（如时间、温度和压力）。

关键参数 Critical Parameters

需要控制和/或测量且与产品的安全和功效相关的参数。关键参数不合格时，被灭菌产品不得放行。

重要参数 Key Parameters

需控制/和测试以保证灭菌在“受控状态”正常运行⁶的参数。重要参数不合格时，需进行调查并有说明合理处理装载的文件和记录。

过度杀灭程序设计法 Overkill Design Approach

只需要很少产品⁶生物负荷信息的灭菌程序设计法--在假设⁶生物负荷最差情况下，来确定使被灭菌品达到微生物存活概率 10^{-6} 的杀灭时间。使用本设计法时，性能确认方案必须能够证明 F_{BIO} 和 F_{PHY} 均大于 12 分钟。

参数放行 Parametric release

根据有效的控制、监测以及灭菌工艺验证的数据资料，对产品的无菌保证进行评价，以替代根据成品无菌检查结果的无菌放行系统。

热穿透测温探头 Penetration Probe

与装载接触或放入液体容器内，用以测试装载或液体温度的探头。

物理确认 Physical Qualification

性能确认中用以证明达到预定物理要求的那部分内容，包括全部装载始终如一地达到热分布和热穿透的要求。

多孔/坚硬装载 Porous/Hard Goods Loads (PHG)

系指通过与饱和蒸汽直接接触而杀灭其中微生物的被灭菌物品。多孔/坚硬装载包括过滤器、胶塞、软管、拖把、工作服、塞子、清洁器具或设备的更换部件。

预真空程序 Pre-vacuum process

一个需要用真空泵或其它机械系统去除空气后才开始灭菌的灭菌程序。此方法尤其适用于夹带空气的物品，如胶管、过滤器和灌装机的部件。

非无菌单元的概率 Probability of a Non-Sterile Unit (PNSU)

描述灭菌后非无菌单元/产品出现概率的数字。在制药工业中，预期的设计终点是非无菌单元出现的概率 $\leq$ 百万分之一，即 $PNSU \leq 10^{-6}$ 或更优。[同义词：无菌保证水平（SAL）]

灭菌程序的性能确认 Process Performance Qualification⁶

指有文件及记录的确认，以证明一个系统，根据书面的预先确定的技术标准并在规定的运行环境中运行时，能够始终如一地完成或控制所要求的灭菌活动。

⁶ 本指南 1.1 表中只有灭菌工艺，如不提灭菌，易误解成整个生产过程（包括称量、配液、过滤、灭菌、包装等）了，因此加了“灭菌”二字。

按产品特性设计灭菌程序的方法 Product-specific Design Approach

根据装载上或装载中生物负荷的特性和产品的耐热性设计灭菌程序的方法，产品的灭菌程序所规定的灭菌时间，可使产品达到 10^{-6} 的非无菌概率。

纯蒸汽/清洁蒸汽 Pure Steam

其冷凝水符合美国药典专论“注射用水”（WFI）要求的蒸汽。（4）

耐热性测试仪 Resistometer

一个设计用以确定一个灭菌程序物理和/或化学变量的设备。它以前的正式名称为生物指示剂耐热性评估仪（biological indicator evaluator resistometer—BIER vessel）。主要用于实验室对 D 值和 z 值的测试。（5）

常规运行的程序 Routine Operating Cycle

指日常灭菌运行的各种参数。为了获得更高的无菌保证水平，日常运行的灭菌程序的灭菌时间要大于最低可接受的灭菌程序。

饱和蒸汽 Saturated Steam

指处于水蒸发曲线对应点压力及温度的蒸汽。它是蒸汽中不夹带液态水，处于汽液平衡状态的蒸汽。[同义词：干饱和蒸汽]

饱和蒸汽程序 Saturated Steam Process

指采用饱和蒸汽为灭菌介质，主要用于多孔/坚硬装载的灭菌程序。

蒸汽-空气混合气体的灭菌程序 Steam-Air Mixture (SAM) process

一个以空气和蒸汽混合物为加热介质的灭菌程序，它通常用于液体灭菌。引入空气的结果是造成空气加压的条件。

灭菌 Sterilization

指用以使一个产品达到规定微生物存活概率的工艺过程。

无菌保证水平 Sterility Assurance Level (SAL)

指灭菌后，一个被灭菌品中（或上）单个活菌存在的概率。[同义词：PNSU]

说明：SAL 取的量值通常为 10^{-6} 或 10^{-3} 。用这个量值来评价无菌保证时， 10^{-6} 比 10^{-3} 的灭菌保证水平要好得多。（6）

灭菌程序 Sterilization Cycle

指使物体成为无菌的一系列运行参数（例如时间、温度、压力）和条件组成的程序。

灭菌运行 Sterilization Run

指灭菌程序的运行⁷

过热蒸气 Superheated Steam

在一定压力下，其温度高于水蒸发曲线所指示温度的蒸汽。

⁷ 译注：也可理解为灭菌的次数。

过热水 Superheated Water

指在 100℃ 以上并需一定压力才能保持液态的水。

过热水程序 Superheated Steam Process

指在空气加压条件下，以过热水为加热介质持续循环的灭菌程序。这个程序中，加压是为了保持水的液体状态。[同义词：水喷淋、水浸没、水淋、蒸汽-空气-水循环程序]

存活曲线 Survivor Curve

在设定的条件下，微生物存活数随暴露于灭菌剂时间的增加而减少的曲线图。

系统适用性评估 System Suitability Evaluation

证明灭菌系统日常运行受控而定期频繁地进行的各种物理评价(如腔室的完整性或空气的去除)。

温度 Temperature

温度是热能的度量。

热分布 Temperature Distribution

指对腔室中整个装载区域加热介质温度的测试。

最终灭菌 Terminal Sterilization

系指产品在其无菌密封系统中的灭菌。(8)

验证 Validation

一个能够科学地确保生产工艺生产出合格产品的有文件和记录证明的程序。验证的证据应通过验证方案的合理设计并对数据资料进行科学、全面评估获得，这些数据资料最好始于工艺的开发阶段，直至商业化生产。

最难灭菌的装载 Worst-Case Load

系指经确认为最难灭菌的装载方式。它是灭菌程序控制策略及装载特性的函数(如装载数量、装载方式、或去除空气)。对于多孔/坚硬装载而言，最难灭菌的装载未必是最小或者最大装载。

z 值 z-value

使 D 值变更一个对数单位温度需调节的度数。它可用正累计一个灭菌程序在加热和冷却阶段随温度变化的杀灭时间。

3.0 灭菌科学

本节阐述灭菌程序的设计、开发和确认所采用的各种科学手段。

3.1 灭菌模式

实验表明，在恒定的热力灭菌条件下，同一种微生物的死亡遵循一级动力学规则（也叫存活曲线）（9）。微生物死亡速率是微生物的耐热参数 D 和杀灭时间的函数，它与灭菌程序中微生物的数量无关。存活曲线可以用下面的半对数一级动力模式来表示：

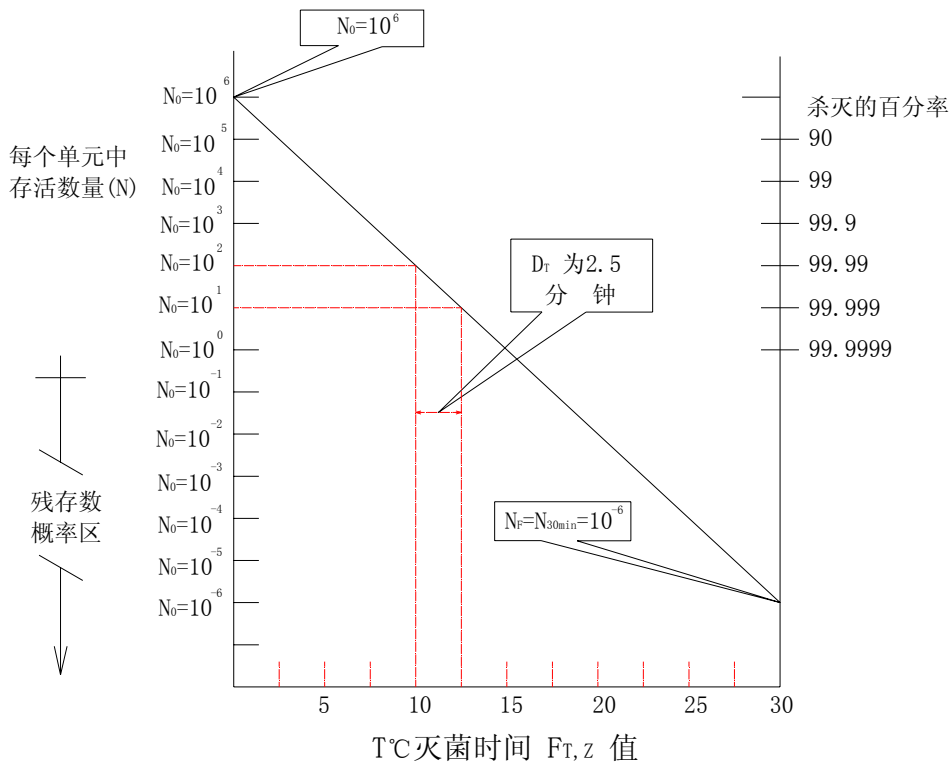
$$\lg N_F = -F_{(T,z)} / D_T + \lg N_0 \quad [\text{等式 1}]$$

式中：

N_F	灭菌 F 分钟后微生物存活的数量
$F_{(T,z)}$	灭菌程序在确定的温度系数 z 下的 $T^\circ\text{C}$ 等效灭菌时间
D_T	微生物以分钟为单位的 $T^\circ\text{C}$ 耐热参数。说明：该特定温度必须与 F 值计算中所采用的温度相一致
N_0	初始微生物的数量

图 3.1-1 系生物指示剂的上述半对数存活曲线的图解。

图 3.1-1 半对数模型的微生物存活曲线



在图 3.1-1 中， D_T 是存活曲线斜率的负倒数；因此，它体现了微生物存活数与灭菌时间（ F 值）之间的关系。 F 值是该模式中以表示湿热灭菌时间的参数。根据定义， F 值以参照温度表示，因此，它真实代表了灭菌程序在该灭菌温度下的杀灭时间（ $T^\circ\text{C}$ 等效灭菌时间）。由于常规的灭菌程序一般不会是方形波（即在灭菌程序中，被灭菌品不可能瞬间达到设定的灭菌温度，精确保持此温度，然后瞬间完成冷却），因此，在半对数模式中，需要用 z 值（温度系数）来计算不同温度下的灭菌率。本文将在 3.1.1-3.1.3 节中，对这些术语（ D_T 、 z 、 F

值、 L) 作详细介绍。

为了将半对数存活曲线科学地应用到灭菌中去，试验必须采用同类菌株，并在恒定的 F 值（或能计算等效灭菌时间 F 值）下进行。

半对数模式并不能精确地与所有微生物灭菌试验的结果相吻合；(10) 但是迄今为止，并没有发现其他的模式能够与所有微生物灭菌的试验数据完全吻合。一种模式或数学关系式之所以实用，一般应具备三个条件 (a) 对系统（灭菌程序）有代表性；(b) 能预示系统的功能；(c) 有一定道理，易于理解和应用。

微生物存活曲线的图示，恰当地以示例方式描述了存活曲线等式（等式 1）的应用。可直接用半对数存活曲线模式或用作图方法来分析实验数据，设计灭菌程序。此半对数模式符合上述要求，可用于湿热灭菌实验数据的分析及设计。利用它，可进行双向计算—从微生物灭菌的实验数据的来推算物理参数，从物理参数来计算预期的微生物存活数据。

该模式在灭菌程序设计中的应用将在 4.1 节中讨论。此模式在灭菌程序生物指示剂验证中的应用将在 5.2 节中介绍。

3.1.1 耐热参数 (D_T)

湿热灭菌中，在规定的灭菌条件（如 $T^\circ\text{C}$ ）下，使生物指示剂的数量下降一个对数单位，或杀灭 90% 所需的时间。 D_T 是图 3.1-1 中所示存活曲线斜率的负倒数。 y 轴上一个对数单位的变化表示微生物存活数 10 倍的变化；因此， D_T 值是存活曲线微生物变化一个对数单位时， x 轴上位移的时间或 F 值（等效灭菌时间）。

应当注意，严格说来， D_T 值并不是任何一种微生物的遗传特性。当用一级动力学存活曲线模式来描述生物指示剂对某一灭菌剂的耐受特性时，才获得 D_T 的经验数值。参阅 3.2.1 节，该节将对可能影响生物指示剂耐热性的各种因素进行讨论。

有二种方法可从存活曲线确定 D 值：1) 直接计数法；2) 利用二点数据法 (N_0 及由阴性分数法在额定灭菌时间范围内计算而得的另一个点)。

3.1.1.1 直接计数法

此法要求在灭菌时，不要将生物指示剂全部杀灭，灭菌后，即对残存的芽孢计数。然后，在半对数曲线上将结果以存活数对灭菌时间（等效~~暴~~热时间）作图，再根据曲线的斜率确定 D_T 。 D_T 值即是最佳数据点所组成直线的负倒数。必要时，可通过线性回归分析，来确定最佳曲线的斜率。

微生物残存曲线示例

用图 3.1-1 的数据，可得到以下生物指示剂 (BI) 残存曲线的等式：

$$\begin{aligned}\lg N_F &= -F_{(T,z)}/D_T + \lg N_0 \\ \lg N_F &= -F/2.5 + \lg 10^6\end{aligned}$$

还可使用此等式来计算灭菌 F 分钟后，预计的孢子数 N_F 。如果灭菌时间的物理参数是 30 分钟， N_F 为 10^{-6} ，也就是说，灭菌 30 分钟后，孢子存活概率为一百万分之一，计算式如下：

$$\begin{aligned}\lg N_F &= -F/2.5 + \lg 10^6 \\ \lg N_F &= -30/2.5 + \lg 10^6 \\ \lg N_F &= -12 + 6 \\ \lg N_F &= -6 \\ N_F &= 10^{-6}\end{aligned}$$

也可将此等式重排，根据灭菌后生物指示剂的测得的残存数来计算灭菌时间 F （杀灭时间）

$$\begin{aligned}F &= \frac{(\lg N_0 - \lg N_F) \times D_T}{\lg 10^6 - \lg 2 \times 10^3} \times 2.5 \text{ 分钟} \\ F &= (6 - 3.3) \times 2.5 \\ F &= 6.75 \text{ 分钟}\end{aligned}$$

带格式的：德语(德国)

3.1.1.2 阴性分数法

阴性分数法采用 N_0 及 **额定灭菌时间范围** 中的一个点组成一条线，由此确定 D_T 值。**额定灭菌时间范围** 是指在灭菌的某个时间区域内，一组平行的试样会呈现两种结果的区域，即一些为阳性结果，另一些为阴性结果。有两个主要的方法可用于分析阴性分数法的数据，以确定残存曲线二点的 N_F 值：

- Holcomb-Spearman-Kärber 法。在此方法中，将 **额定灭菌时间范围** 所有的数据通过加权平均法合并起来，得到与每个生物指示剂 N_F 平均存活数为 0.56 相对应的平均时间（11，12，13）
- Stumbo-Murphy-Cochran 法（14）。此法要用 Halvorson-Ziegler 的最大可能数法（15）对 **额定灭菌时间** 区域中的每个数据逐个分析，来确定每一组数据的 N_F ，然后确定 D_T 值。再对这些 D_T 值求平均值，以确定测试的 D_T 值。

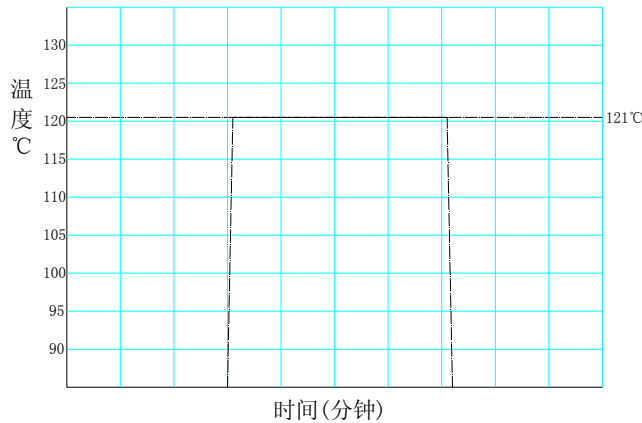
Holcomb-Spearman-Kärber 法能够计算 D_T 值可信度的范围，供评估试验数据的质量和可靠性参考。

需要特别注意的是，应用统计学方法计算 D_T 值时，需严格遵循统计分析的规则。试验中采用的生物指示剂应是平行试样，且必须来自同一生物指示剂的批号。如果是企业自己制备试样，则试样应该取自同一批生物指示剂的悬浮液，且制备方式完全相同。试验中的培养计数步骤应完全一致。唯一的变量只是蒸汽灭菌的时间。

此外，对每组某一灭菌时间平行试验的样品而言，试验必须保证每个试样的灭菌时间相似。通常用耐热性测试仪在实验室中完成此试验。当样品不是实际的平行试样时，不宜采用这类测试方法。例如，当生物指示剂分布在整个灭菌腔室时，不应当用这些方法来评价生产用灭菌器中 BI 的杀灭情况。在此种情况下，因整个灭菌器中灭菌率的均一性难以保证，因此，不能将这些生物指示剂试样看成平行样品。

在 D_T 值测试中，保证每个灭菌试验条件的一致性至关重要。一个正常运行的耐热性测试仪是实现一致性理想的机械装置，因为它可以产生近似于脉冲的方形波，加热和冷却时间极短（见图 3.1.1.2-1）。

图 3.1.1.2-1 耐热性测试仪的典型温度曲线



在以下情况下，通常有必要测试 D_T 值：

- 按产品特性设计灭菌程序需要确定产品分离菌的耐热特性时(产品分离菌通过热休克⁸获得)；
- 评价处方变更对耐热性的影响时；
- 在常规生产中，需要确定从生产环境分离出耐热菌的耐热特性时；
- 当需要确定作为生物指示剂用的直接接种到物料或产品中的耐热孢子的 D 值时。

3.1.2 温度系数 (z 值)

孢子耐热性随温度变化而变化的特性可用 z 来表示。 z 值是 D_T 值变更一个对数单位时，温度需调节的度数。它类似于半对数模式中的温度系数。在比较不同温度下对孢子的灭菌率时，需要用 z 来计算 F 值。

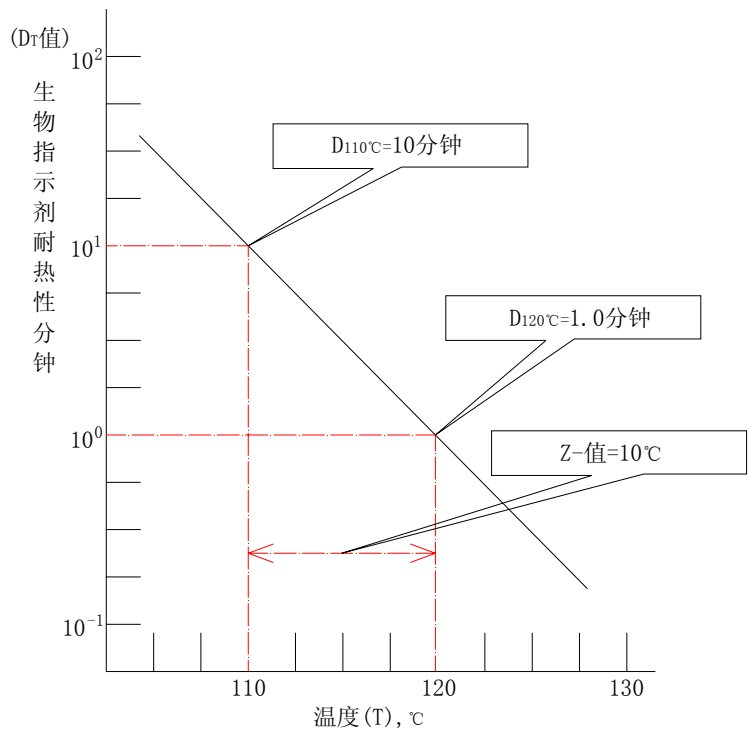
例如，生物指示剂挑战系统的 $z=8^\circ\text{C}$ ，即温度每变化 8°C ， D_T 值将会改变一个对数单位。如果生物指示剂挑战系统的 $D_{121^\circ\text{C}}$ 为 1.6 分钟，那么 $D_{129^\circ\text{C}}$ 即为 0.16 分钟， $D_{113^\circ\text{C}}$ 为 16.0 分钟。温差的正确测量单位是开氏温度，在任何情况下，开氏 (Kelvin) 温度变化 1°C 与摄氏 (Celsius) 温度变化 1°C 是完全一致的。为了简化起见，本文将全文采用摄氏温度。

湿热灭菌通常总设定在一个小的温度范围以内，例如 $110\text{--}135^\circ\text{C}$ 之间，因此，在实际使用中，通常将经验测试值 z 看作一个常量(16)。常规灭菌程序设计和评估中 z 取 10°C 或 18°F 。在对比平衡灭菌赋予产品的物理杀灭时间和生物杀灭时间 F 值的试验中，必须使用实际的生物指示剂的 z 值来计算物理杀灭时间 F_T 。

z 值可由几种方法确定；然而，采用得最多的方法还是通过 D 值的测试来确定 z 值。在不同温度下测得一组 D 值，取对数，然后以 y 轴为 D ， x 轴为温度作图。将数据点连成一条直线。 z 值是 D 值改变一个对数单位所对应温度变化的度数，例如由 2.0 分钟变为 0.2 分钟，或者由 0.3 分钟变为 3.0 分钟。与 D 值类似， z 值为此直线斜率的负倒数，参见耐热性曲线 (图 3.1.2-1)。(17) 在应用 z 值时，要根据预期的用途，采用摄氏温度 (开氏) 或华氏温度 (Fahrenheit) 来表述，并考虑好温度的数值范围。

⁸ 译注：指 $80\text{--}100^\circ\text{C}$ 下加热 10-15 分钟，指南后文中有说明。

图 3.1.2-1 耐热性曲线



3.1.3 灭菌率 (Lethal Rate) 和累计杀灭时间 (lethality, F)⁹

在湿热灭菌中，所有生物学的测量，无非是将参照温度下 (T_{ref}) 的等效灭菌时间与该温度下对微生物的杀灭时间相关联。采用 z 来计算灭菌率，测试时间-温度并将获得的数据累计，这样也就获得了灭菌工艺的模式。

各种灭菌器是设定在特定温度下运行的，然而，实际温度可能会在目标值上下一定的范围内波动。这个波动有时可能并不体现在灭菌程序的记录上，它取决于记录设备的精密度和灵敏度。尽管这个波动通常不大，但对 F 值的可能会有明显的影响，尤其是灭菌温度大部偏在目标值的一侧时，影响更为明显。 F 值的计算考虑了所有偏离目标温度的波动情况，以减少单个温度观察值对杀灭时间 (delivered lethality, 总等效灭菌时间) 的影响。杀灭时间是灭菌程序中灭菌率的累计值 (积分值)。

3.1.3.1 灭菌率 (L , Lethal Rate)

⁹ 因讨论的对象是灭菌，所以考虑取“灭菌率”的提法。**Lethality** 原拟译作杀灭力，但中文中率与力的音相似，难以区分，故考虑译作“杀灭时间”。累计杀灭时间这种提法有助于理解原意。如果是 121°C 下灭菌， z 取 10°C，则可理解为标准的灭菌条件，与 F_0 相呼应并称为 F_0 为标准灭菌时间，与中国药典一致，它已包括了“累计”的内涵。需要指出另一个问题是 121°C 是饱和蒸汽压为 2 个大气压时所相应的温度。当取其它灭菌温度时，则应标出具体的灭菌温度。

为了理解如何确定一个灭菌程序的杀灭时间（ F 值），有必要首先理解灭菌率（ L ）。灭菌率可以通过以下等式计算得到：（18，19，20）

$L_{(T_{ref},z)}=10^{(T-T_{ref})/z}$	[等式 2]
式中：	
T = 被加热的物体的实际温度	
T_{ref} = 参照温度	
z = 试验生物指示剂的 z 值（如未知，则取 10℃）	

灭菌率是一个指数函数，因此，很小的温度变化就会对灭菌率产生明显的影响。例如，一个 $z=10^{\circ}\text{C}$ 的生物指示剂系统中，温度降低 1℃，会使灭菌率减少大约 20%。这可采用以下方法计算：

$$L=10^{(120-121^{\circ}\text{C})/10}=10^{-0.1}=0.79$$

因此， z 值=10℃的生物指示剂系统，如以灭菌率来表示的话，120℃下灭菌 1 分钟相当于 121℃下灭菌 0.79 分钟。

3.1.3.2 F_{physical} 值（ $F_{\text{物理}}$ ）--物理灭菌时间¹⁰

F 值是一个灭菌程序杀灭时间的量度。 $F_{(T_{ref},z)}$ 是参照温度 T_{Ref} 和温度系数 z 下以灭菌率计算，被灭菌物品获得的等效灭菌时间。由物理数据（时间和温度）计算得到 F 值也可以 $F_{\text{物理}}$ 来表示。

F 值是整个灭菌程序中灭菌率的积分值。说得实际一点，这个积分值是通过梯形模式的数字累计而得：

$$F_{T_{ref}}=d(\sum L) \quad \text{[等式 3]}$$

式中：

d =每次温度读数之间的间隔时间

L =经计算的各个温度下的灭菌率

时间-温度示例表阐述了分步计算灭菌率和杀灭时间 F 值的方法。市售的数据采集设备中有程序，可自动完成计算并报告灭菌程序的 F 的增值和累计值。因用以确定灭菌率 L 的 z 本身准确性不高，可规定积分开始和结束的最低温度（例如 100℃）。在灭菌阶段，灭菌实际温度应接近所用的参照温度（ T_{ref} ），这点十分重要。

时间-温度示例			
表 3.1.3.2-1 时间-温度、相应的灭菌率 L 及累计值 F （ $T^{\circ}\text{C}$ 灭菌时间）			
I	II	III	IV
灭菌时间(t)	物品温度(T)	灭菌率(L)	标准灭菌时间(F_{Physical})
d =时间间隔=1 分钟	腔室设定温度=122℃	$z=10^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{ref}}=121^{\circ}\text{C}$	$F=\sum L \times d$

¹⁰ 在表 3.1.3.2-1 中，物理灭菌时间即标准灭菌时间。

分钟	℃	$T^{\circ}\text{C}$ 每分钟所相当 T_{121} 下的分钟数	分钟
0	30.0	0.000	0.000
1	30.0	0.000	0.000
2	30.0	0.000	0.000
3	60.0	0.000	0.000
4	87.0	0.000	0.000
5	102.0	0.012	0.012
6	112.0	0.123	0.135
7	116.0	0.309	0.444
8	118.5	0.550	0.994
9	120.0	0.776	1.770
10	121.0	0.977 ¹¹	2.747
11	121.5	1.096	3.843
12	121.5	1.096	4.939
13	111.0	0.098	5.037
14	91.0	0.001	5.038
15	61.0	0.000	5.038

第 I 列是灭菌程序的时间(t)。在标准灭菌时间计算时 (第 IV 列), 温度读数的间隔时间取 $d=1$ 分钟。

第 II 列是被灭菌产品的温度(T), 注意腔室温度设定为 122°C 。

第 III 列是计算的灭菌率(L), 采用的参照温度为 121°C , z 取 10°C 。 L 是 $T^{\circ}\text{C}$ 下灭菌一分钟所相当的标准灭菌时间。图 3.1.3.2-2 表示灭菌率-灭菌时间的曲线。

第 IV 列是标准灭菌时间(F_{PHY}), 它是灭菌率乘以间隔时间的累计值 ($F=\sum L \times d$), 也是灭菌率 L 曲线下所围的面积 (积分值) (图 3.1.3.2-2)。

此灭菌程序 F_{PHY} 计算的物理灭菌时间是 5.038 分钟。图 3.1.3.2-1 中的产品温度数据以灭菌率 L 表示时, 与 121°C 下 5.038 的方形波等值。

图 3.1.3.2-1
时间-**灭菌**温度曲线示例

¹¹ 译注：原文为 0.977，按公式 $L=10^{(121-121)/10}$ 计算， L 应为 1。其它文献资料中为 1。

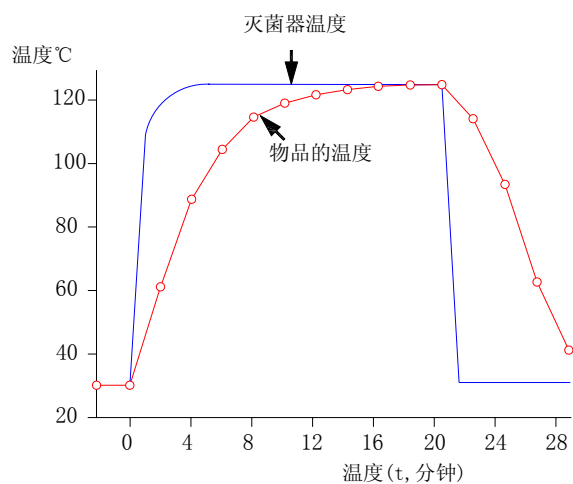
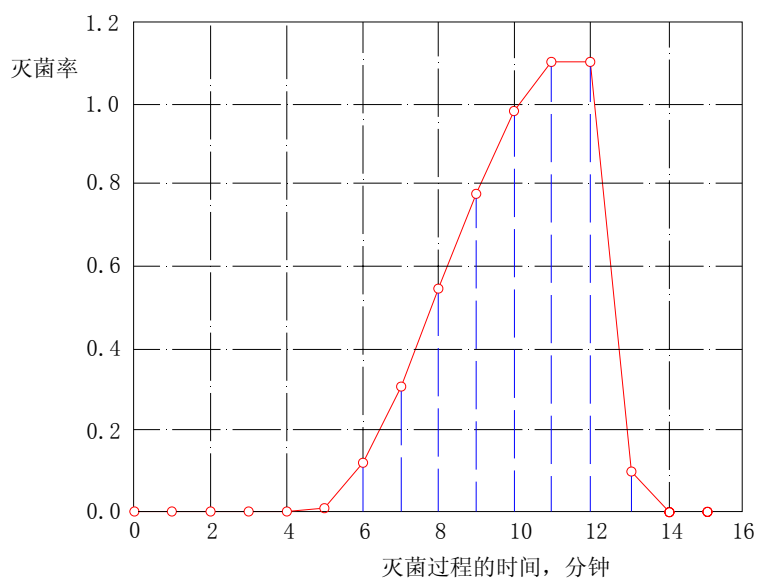


图 3.1.3.2-2 灭菌率曲线示例



3.1.3.3 F_0

F_0 是指蒸汽灭菌程序赋予一个容器或产品 121°C 下的标准灭菌时间。计算中, z 取 10°C。
(21)

说明: 计算 F_0 所用的参照温度是 121.1°C, 与 250°F 基本等值。为了简化, 本技术报告中 F_0 将以 121°C 作为参照温度。

不管在什么场合, 凡提到 F_0 时, 温度都指 121°C。例如, 一个 F_0 为 8 分钟的程序, 不

管被灭菌物品/产品的实际温度和时间是多少，灭菌程序的效力--标准灭菌时间都是 8 分钟。

3.1.3.4 $F_{\text{Biological}}$ (F_{BIO}) 生物杀灭力¹²

表示生物指示剂系统测得的实际杀灭效果（以 $T^{\circ}\text{C}$ 等效灭菌时间表示）。 F_{BIO} 可由以下等式计算得到：

$$F_{\text{BIO}} = D_T \times LR \quad [\text{等式 4}]$$

式中：

D_T = 参照温度下生物指示剂的 D 值

LR = 灭菌程序使生物指示剂下降的对数单位

3.2 灭菌指示剂

灭菌指示剂有多种，它们有不同的设计形式，可用于灭菌程序的开发、确认和监控。下面将介绍灭菌指示剂的种类和应用方式。

3.2.1 生物指示剂 (BIs)

生物指示剂以其死亡所遵循的具有可预见性对数规则为基础，来确定并记录微生物存活概率的合格标准。生物指示剂的选定，取决于所用的灭菌方法和所选择的灭菌程序。因为生物指示剂是确定杀灭效果的关键材料，因此，生物指示剂应当具有可预测性和重现性。

在过度杀灭程序的确认过程中，最常采用生物指示剂是嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*，以前的名称为 *Bacillus stearothermophilus*)；也可采用其他对湿热灭菌耐热性强的微生物。在采用“按产品特性设计灭菌程序”方法的确认过程中，典型的生物指示剂包括：*Clostridium sporogenes* (生梭芽孢杆菌)、*Bacillus smithii* (史密氏杆菌，以前叫做凝结芽孢杆菌) 和 *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌 5230)。(22)

所选用生物指示剂的数量应比产品或物品的生物负荷高，耐热性应比生物负荷强。只能采用芽孢来做蒸汽灭菌程序的挑战性试验。这些孢子必须达到一定的纯度（基本没有生长态菌、微小的残骸和团块），有确定的耐热特性，其母代菌株应该从公认的菌种库购买。

最好利用经校准的能产生脉冲波的物理加热设备（如耐热性测试仪）来测试生物指示剂的耐热性。(23) 生物指示剂挑战系统有多种形式可供选用，包括孢子悬浮液、纸质载体（如孢子条或菌片），以及其他形式的载体（如金属的孢子片，孢子线或安瓿）。

如果通过供应商审计确立了供货商分析证书的可信度，而且生物指示剂没有什么变更，那么可采用供货商提供的生物指示剂的耐热性数据，而不必对每批生物指示剂的耐热性进行测试。(24) 由于可能的运输及处理方面的问题，在接收孢子时，应对孢子的浓度进行计数。应采用与供货商同样的计数方法计数，以减少影响孢子准确计数的因素，这点非常重要。

¹² 译注：杀灭力，其实是指灭菌效果，不过以一定灭菌温度下的时间来表达。生物杀灭力 *Delivered lethality* 总合了 BI 的对数下降值及其耐热性，但它与无菌合格标准不是一回事。

生物指示剂计数的稳定性和耐热参数 (D_T 值) 测试应在其有效期内进行。应根据灭菌程序期望的杀灭要求 (desired lethality) 及所采用的验证程序来决定生物指示剂的实际数量和耐热性 (见第 5 节)。

生物指示剂挑战系统的 D 值不仅与所用的种类或菌株相关, 而且与测试的环境因素有关, 这些影响因素包括但不限于以下方面:

- 测试系统(如孢子是悬浮在液体中, 还是经干燥附着在坚硬载体上? 在加热过程中, 孢子周围有什么样的环境和特性?)
- 孢子悬浮所处的介质
- 测试温度
- 内包装材料
- 加热和冷却滞后没作校正对灭菌时间的影响
- 加热和培养计数之间的温度、时间和环境条件
- 用来培养计数灭菌后孢子的培养基
- 培养条件

生物指示剂系统的测试操作, 包括设备控制和技术人员的变动, 都可以导致 D 值偏大或偏小的结果。

在验证试验中, 应对实际条件下生物指示剂的耐热性进行评估, 这点十分重要。因为生物指示剂所处的溶液或载体对生物指示剂的耐热性有影响。例如, 在氯化钠或氯化钾存在的情况下, G₊嗜热脂肪杆菌的耐热性会增强; 在二价钙离子和镁离子存在的情况下, B.凝结芽孢杆菌的耐热性也会增强; 在钾离子存在的情况下, C.梭状芽孢梭菌的耐热性会增强。(25) 螯合剂的存在(如柠檬酸)也会影响耐热性。强螯合剂可以竞争性作用周围的离子, 使包衣式芽孢的耐热性产生变化。(26) 在接种的载体上(例如纸或橡胶), 也可观察到相似的耐热性差异。

直接接种至基质/载体时, 要确保生物指示剂保留在预定的接种区域以内并且在接种过程中不受损失。多次小量接种比一次性大量接种好控制, 后者不小心会出现漂移。

药典(如美国药典、欧洲药典)有生物指示剂的专论来规定其标准, 可用这些专论对湿热灭菌进行评估。在美国, 不要求在工业灭菌步骤中采用药典收录的生物指示剂。在其他国家和地区, 建议考虑当地的法规的监管要求。原文: compendia (e.g. USP, Ph Eur) contain monographs defining BIs that may be used in evaluating moist heat sterilization. In the U.S., it is not a requirement to use a compendial BI for industrial sterilization processes. In other regions and countries it is recommended that consideration is given to local regulatory expectations.

3.2.2 化学监测器

化学监测系统是对一个或多个关键灭菌参数有响应的装置。它们可作为定性指示剂, 证明一个产品已灭过菌了。如对化学指示剂的反应作了定量化处理, 它们还可用来回答更为复杂的问题。不管它们的设计形式如何, 在湿热灭菌程序的验证中, 化学监测系统不能代替生物指示剂和温度/压力/时间的物理测试。

3.2.2.1 化学指示剂

化学指示剂是以非定量形式反映灭菌程序参数的装置。化学指示剂能以持久不变标识（如颜色变化）的形式提供即时的结果，用来表示装载或产品已灭过菌。

化学指示剂不能表示产品是否无菌。它们只能说明曾达到某个温度限度，但不能指示最高温度及其持续时间。在装载中放置足够的化学指示剂，能避免已灭菌品和未灭菌品之间产生混淆，这一点是至关重要的。有多种形式的化学指示剂可供选择，如胶带、纸条或小安瓿等。

3.2.2.2 化学综合指示剂（Chemical integrators）¹³

化学综合指示剂即是多参数的化学指示剂，它可以定量综合地指示湿热灭菌程序中的参数——通常是温度、时间，有时候也可以是湿度。它们可以定量地反映关键灭菌程序的物理状态，提供与微生物灭活相关的有量化结果的记录。

应用多参数的化学指示剂时，应清楚地了解它们的优缺点：

- 能同步监测湿度的化学综合指示剂可以获得被监控程序中灭菌条件的补充性信息，但它不太适用于常见的温度和压力监控式的灭菌器；
- 可以指示灭菌程序验证中整个装载达到的热分布状况；
- 不能独立地用于灭菌程序的确认（cycle qualification）。

3.3 热力学和蒸汽质量

了解热力学（thermo-dynamics）基础对湿热灭菌的设计和控制在很有必要的。在一定温度下，不同加热介质的内能有很大差别。过热水、饱和蒸汽、蒸汽/空气混合物含有的热能是不同的。在日常生产的灭菌程序中，必须达到在灭菌程序设计中确定的饱和蒸汽温度和压力之间的严格关系，以保证灭菌的效果。以下将阐述灭菌程序具体参数的重要性。

3.3.1 温度和热量

温度是热能的度量。热量是物体及其周围环境之间因温差而发生能量转移的结果。

应当理解，在同一温度下，不同加热介质（如饱和蒸汽、空气、蒸汽混合物或过热水）所含的热能差异极大。

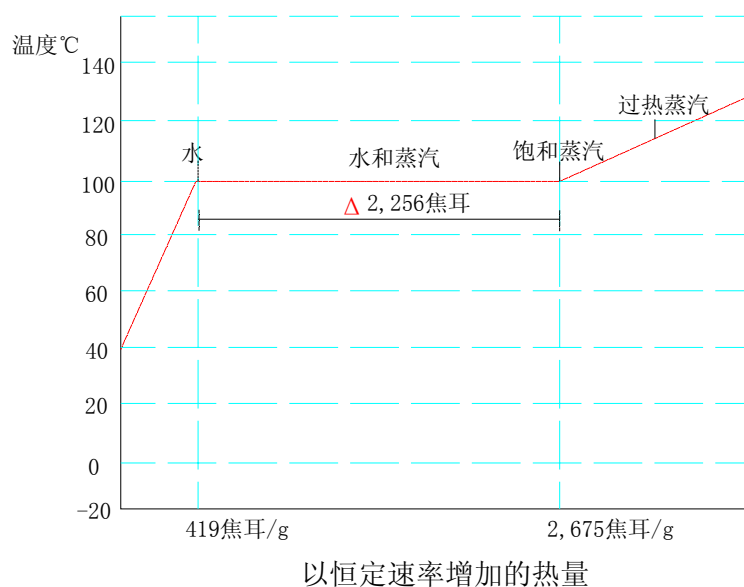
蒸发/冷凝是饱和蒸汽灭菌中热能传递给被灭菌品的主要的手段。1 克 100℃ 的饱和蒸汽含有 2,675 焦耳/克的能量。这是 100℃ 的水所含能量（419 焦耳/克）¹⁴和蒸发所需热能（2,256 焦耳/克）或蒸汽冷凝释放热量之和。在 100℃ 时，1 克蒸汽冷凝时，可将 2,256 焦耳的热量传递给物体。

¹³ 译注：如 Fo 试纸，它能在一定湿度条件下，对温度、时间有响应且有粗略地累计灭菌率 L 的功能。

¹⁴ 译注：1cal=4.1868J（焦耳）

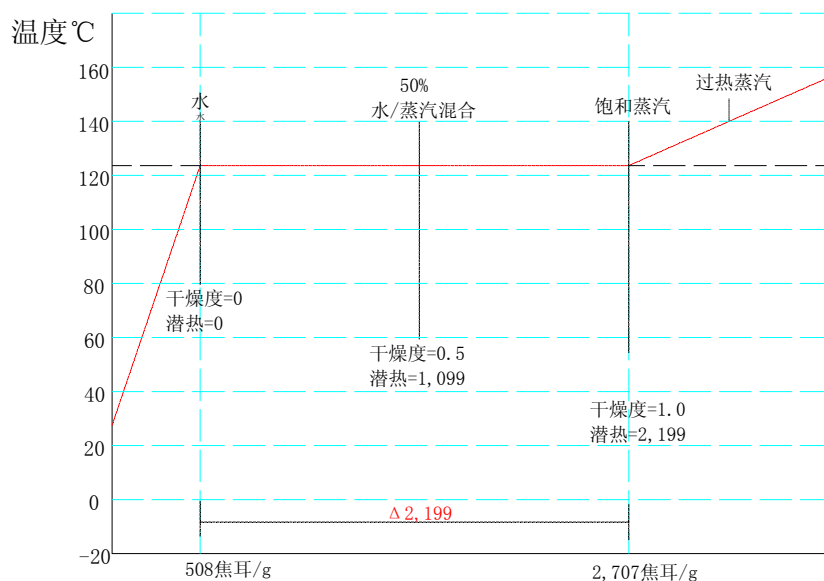
图 3.3.1-1 所示水的加热曲线，可证明这个现象。(27) 在 25℃ 和一个标准大气压下，1 克液态水的温度改变 1℃ 时，需要 4.1 焦耳的热量。随着能量吸收，水的温度将升高，直至到达 100℃。在 100℃ 及一个标准大气压下，温度保持不变，直到水再吸收 2,256 焦耳能量而全部变为蒸汽。在过程倒过来运行时，即蒸汽冷凝成水时，能量会传递给物体。以下简图描述了由水变为蒸汽的物态变化的热力学，图没按刻度准确地绘制。

图 3.3.1-1 一个标准大气压下水的加热曲线 (27)



在两个大气压下，当水的温度达到 121℃ 时，再吸收 2,199 焦/克才会变为饱和蒸汽，如图 3.3.1-2 所示。

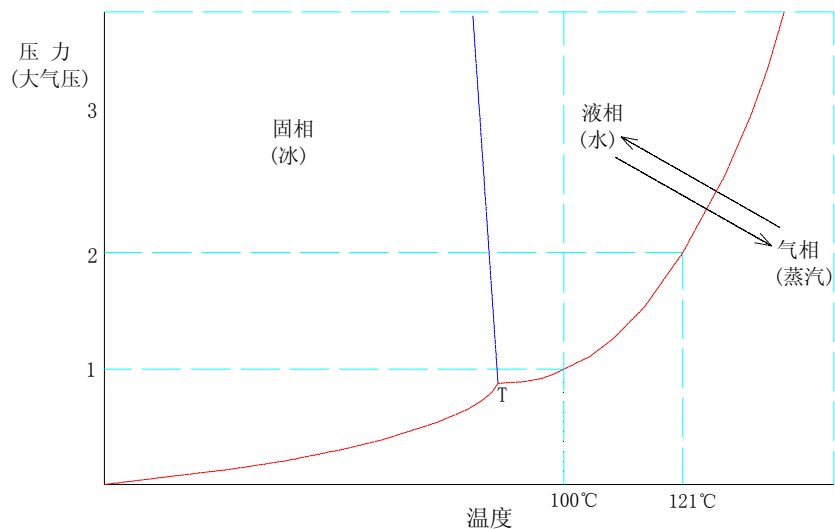
图 3.3.1-2 2 个大气压下水的加热曲线 (27)



在 2 个大气压的示例中（图 3.3.1-2），当水和蒸汽处于“动态平衡”时，水和蒸汽之间的相变是 2,199 焦耳能量转移的结果。当水和蒸汽在特定压力和温度下处于平衡状态时，才会发生这个现象。

在简化的压力和温度状态曲线图中（图 3.3.1-3），（28）红色曲线表示水和蒸汽的平衡状态。可根据此曲线上的点来计算并得到蒸汽表，然后将它与运行结果进行比较，以确定系统处于动态平衡，且蒸汽属“饱和”状态。当蒸汽饱和时，曲线上一个特定温度下，只有一个对应的压力值。图 3.3.1-3 中标出了两个压力点：一个大气压下的温度约为 100℃，两个大气压下温度约为 121℃。

图 3.3.1-3 温度和压力曲线图（三相点图）



通过计算并将动态平衡下的对应的温度、压力列出，可得到饱和蒸汽表。一定温度和压力下水及饱和蒸汽所含的能量是确定的，因此，可以列入表中。表 3.3.1-2 为美国机械工程师学会（ASME）国际蒸汽表。（29）

表 3.3.1-2 饱和蒸汽表

水及饱和蒸汽的性质（公制）				
温度 °C	压力 巴**	焓（内能）焦耳/克		
		水 h_L	Δh^*	蒸汽 h_v
100	1.013	419	2256	2675
115	1.692	483	2216	2699
120	1.987	504	2202	2706
121	2.026	508	2199	2707
125	2.322	525	2188	2713

水及饱和蒸汽的性质（美国常用单位）				
温度 °F	压力 磅/英寸 ² **	焓（内能）英热单位/磅		
		水 h_L	Δh^*	蒸汽 h_v
212	14.71	180	970	1150
240	24.99	208	952	1160
250	29.84	218	945	1164
260	36.45	228	938	1167
270	41.87	238	931	1170

*蒸汽冷凝或水汽化的潜热（ $\Delta h = h_v - h_L$ ）

**1 个大气压=1.013 巴=14.71 磅/英寸²

应检查任何饱和蒸汽灭菌程序的压力和温度，以保证数值与蒸汽表中基本一致。如果不一致，就可能表示灭菌过程中，饱和蒸汽冷凝的热效应没有完全发挥作用。此情况下，传递

的能量会少于表 3.3.1-2 中计算得到的能量。

能量传递的方式可以是传导、对流和辐射，它们可以单独发生或同时发生。

3.3.1.1 传导

传导是以分子振动的形式传递能量，总体上不需要物体的任何运动。在灭菌学中，这个方法应用于以下情况：

- 能量通过容器壁传递给被灭菌的液体
- 能量通过与灭菌介质的直接接触传递到物体表面（例如蒸汽或热水）

3.3.1.2 对流

对流是与运动流体的接触而产生的能量转移。

容器中被灭菌的液体自然流动时，称为自然对流。如果通过风扇或泵促使液体流动时，即为强制对流。

3.3.1.3 辐射

辐射是能量以电磁波形式的传递。

辐射是真空干燥阶段能量传递的主要手段，但在灭菌阶段，当夹套的温度略高于腔室温度时，它更加有助于产品的加热。

3.3.1.4 热转移速率和加热介质的热容量比较

从加热介质到封闭容器之间的热量传递取决于多种因素，包括容器和加热介质之间的温差、容器的特性和几何形状，以及总的传热系数。传热系数是一个包括加热介质热力学特性的多变量函数。在前面章节的内容中，提到了介质热容量的差别和保持饱和蒸汽的重要性，这里，主要介绍一下由介质到被灭菌品的热转移，并对每个方式的热容量作了比较。（见表 3.3.1.4-1）

通常每种灭菌方式都有一个最理想的加热系统。饱和蒸汽的加热速度最快。在某些情况下，比如大型的软包装，过热水浸泡/淹没式灭菌方法的效率更高¹⁵。

表 3.3.1.4-1 灭菌工艺的能力和要求的总览

灭菌程序	热传递速率	是否要求循环	热分布挑战 ¹⁶	装载说明
饱和蒸汽	高	否	低	多孔/坚硬装载及液体装载；总压不需要高于饱和蒸汽压

¹⁵ 译注：目前国内过热水喷淋法广泛应用。所谓浸泡往往是半浸泡形式加喷淋，也需要循环泵。淹没式可能是连续灭菌方式。

¹⁶ 译注：原文为 Temperature distribution challenge，指对热分布的挑战，意指对影响热分布的要求。

蒸汽-空气混合物		与蒸汽和空气的比例、流速相关	要	高	液体和某些多孔/坚硬装载；总压高于饱和蒸汽压
过热水	空气加压喷淋	中等程度与流速相关	要	中	液体装载；总压高于饱和蒸汽压
	空气加压浸泡	高，但与低流速相关	要	中	液体装载；总压高于饱和蒸汽压

表 3.3.1.4-2 至表 3.3.1.4-4 列出了蒸汽、水、三种比例的蒸汽/空气混合物的热容量 (30)。热容量是当蒸汽、过热水、蒸汽-空气混合物下降 1°F 时释放出的热量。此数值以每磅和每立方英尺来 (BTU/lb°F 和 BTU/ft³°F，BTU=British Thermal Unit，英国热量单位) 表述。

对图表中数据的分析说明，从热容量的角度（更有意义的对比）看，过热水和蒸汽的加热能力是相似的，这二种加热介质的热容量相似，都很高--蒸汽是因为有潜热，而过热水则是因为其质量大。然而，在过热水灭菌法中，热量的转移很大程度上依赖于容器中周围介质的强制运动。蒸汽不需要强制循环，因为蒸汽相变，变成几乎是同一温度的冷凝水，且有更多的蒸汽来补充。

蒸汽-空气混合物对容器的传热速率是空气-蒸汽的比例、整个灭菌器中加热介质的强制循环的函数。与加压条件下过热水或蒸汽灭菌相比，单位体积的蒸汽-空气混合物所具有的热容量要低得多。但是，对一个经适当开发的灭菌程序而言，蒸汽-空气混合物不失为有效的灭菌剂。

表 3.3.1.4-2 饱和蒸汽

温度	潜热量 (Δh) latent Heat Capacity	
	BTU/lb. °F	BTU/ft³°F
212°F	970.3	36.1
250°F	945.3	68.3

表 3.3.1.4-3 水

温度	热容量-heat capacity	
	BTU/lb. °F	BTU/ft³°F
212°F	1.001	59.87
250°F	1.003	58.98

表 3.3.1.4-4 蒸汽-空气混合物

温度	热容量-heat capacity					
	60%蒸汽		75%蒸汽		90%蒸汽	
	BTU/lb.°F	BTU/ft³°F	BTU/lb.°F	BTU/ft³°F	BTU/lb.°F	BTU/ft³°F
°F						

212°F	13.06	0.61	19.94	0.86	27.6	1.10
250°F	11.56	0.72	17.21	1.12	24.29	1.65

3.3.2 蒸汽

湿热灭菌可采用多种蒸汽，它包括但不限于工厂蒸汽、生产用蒸汽和纯蒸汽。由于它们的应用各不相同，因此，应说明什么情况下选用哪种蒸汽最为合适。

3.3.2.1 公用蒸汽 (Plant steam)

工厂蒸汽指一般的工业蒸汽，将生产的工业蒸汽分配并应用于各种能量转移，如设施、水和生产中加热，或者驱动发动机或涡轮机。对于湿热灭菌而言，如果腔室中的蒸汽并非来自夹套，则通常认为灭菌器的夹套可采用工厂蒸汽。在过热水灭菌方法中，工厂蒸汽也用于热交换器非洁净的一侧加热过热水。

3.3.2.2 工艺蒸汽 (Process steam)

工艺蒸汽和工业蒸汽相类似，所不同的是，工艺蒸汽的源水不得加入有挥发性添加剂(胺或肼)。当容器已经完成灌封，需灭菌时，可用工艺蒸汽对液体产品作湿热灭菌。

3.3.2.3 纯蒸汽 (Pure steam)

纯蒸汽(有时叫做洁净蒸汽或高质量蒸汽)的冷凝水须符合药典注射用水要求(WFI)。(31)纯净蒸汽主要通过特定设计的纯蒸汽发生器生产，或用多效蒸馏水机的第一个柱生产，多效蒸馏水机的供水应采用符合化学质量要求的水。

药典中规定的软水、去离子水和纯化水，均可生产纯蒸汽。为系统的正常运行，需要注意对蒸汽分配系统作适当设计、安装及蒸汽疏水阀和排气口的维修保养。要避免冷凝水的累积。多孔/固体物品的灭菌，始终应采用纯净蒸汽。

3.3.3 纯蒸汽质量的测试

饱和蒸汽灭菌的半对数模式有一个假设，即饱和蒸汽中没有不凝性气体以及过热现象。湿蒸汽、过热蒸汽和含有不凝性气体的蒸汽，对多孔/固体物品程序的灭菌率有潜在的不良影响。蒸汽的质量对饱和蒸汽灭菌中灭菌率 L 影响的大小，取决于蒸汽质量偏离理想蒸汽状态的程度以及装载中被灭菌品的类型。

对于多孔/固体物品的灭菌而言，由于灭菌器的供汽属确认的内容，应按公司内部的确认真方针或按照适用的法规要求，对灭菌器供汽的质量特性定期、重复地进行测试及评估。(32)

3.3.3.1 不凝性气体

不凝性气体是蒸汽发生器生产的蒸汽中可能夹带的气体。这些不凝性气体(比如空气、氮气和二氧化碳¹⁷)使蒸汽从纯的、汽相状态的水成为蒸汽和气体的混合物。

3.3.3.2 干燥度和干燥值

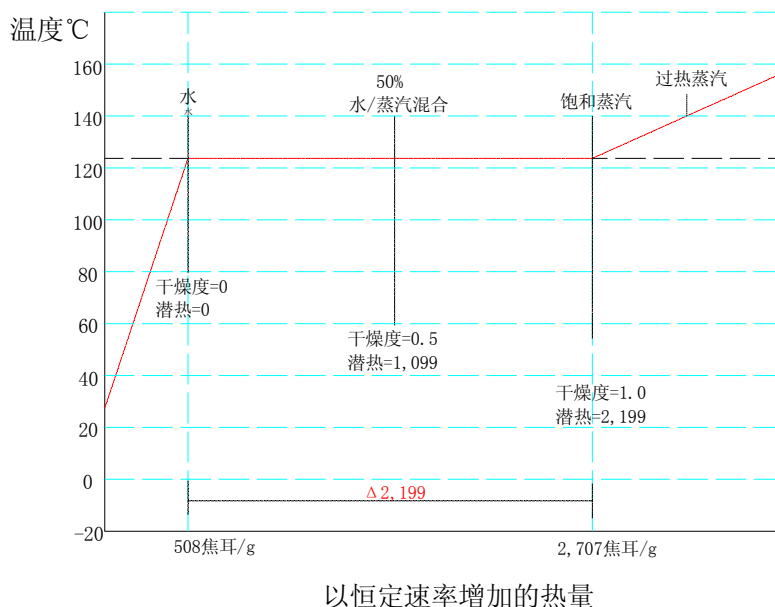
¹⁷ 译注：在灭菌、纯蒸汽、注射用水制备过程中，其温度高于室温，因此，二氧化碳也列入了不凝性气体。

蒸汽的干燥值（一个干燥百分值的测试）是饱和蒸汽灭菌程序所用蒸汽中携带液相水量的测试值。干燥值为 0 表示有 100%的水，干燥值为 1.0 表示不含液相水的干燥蒸汽。除了使某些被灭菌品潮湿外，干燥值小于 1.0 的蒸汽所含的能量会明显小于纯的饱和蒸汽。可通过测试获得干燥值--通常是近似值。

蒸汽的干燥度与它的潜热密切相关。潜热水平在 50%的蒸汽，其干燥度为 0.5，表示混合物中水和蒸汽的比例为 50:50。因此，只有蒸汽是百分之百时，它才是干蒸汽，其干燥度为 1.0。（33）

图 3.3.3.2-1 显示了在热转移过程中如果干燥分数小于 1.0 相应的能量损失。当 100%的水处于 121℃时，没有潜热，干燥分数为 0。当 50:50 比的蒸汽/水混合物处于 121℃时，干燥分数为 0.5，潜热为 1,099 焦耳/克。当 100%的蒸汽处于 121℃时，干燥分数为 1.0，潜热为 2,199 焦耳/克。

图 3.3.3.2-1 2 个大气压下的干燥度（绝对值）



3.3.3.3 过热

过热蒸汽是指在任何给定压力下，高于水蒸发平衡曲线所示温度的蒸汽。半对数模式的微生物灭活过程，要求采用饱和蒸汽，即灭菌应处在所达到压力（2.0 节）点的平衡温度。过热蒸汽对微生物的灭菌率小于该温度下的预期的灭菌率。

造成过热的主要原因有：

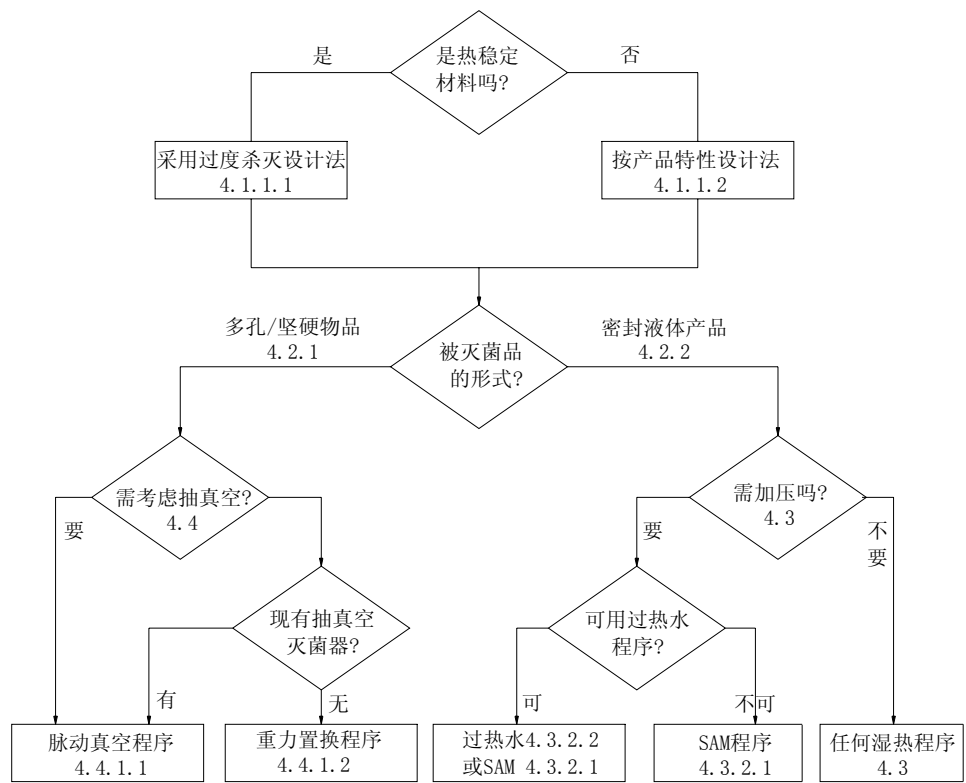
- 在使用点附近压力的下降
- 灭菌器夹套的温度高于腔室的温度

4.0 灭菌程序的开发

灭菌程序开发的目的是建立一个灭菌程序，以满足设计要求。本节按确定设计要求、确定装载类型、选择工艺并确定工艺参数的程序加以阐述。

已制订了一个决策树（见图 4.0-1），以指导读者选择灭菌程序的设计方法，并确定灭菌程序。决策树对关键产品及工艺过程需考虑的问题作了总结，并在此基础上，就灭菌程序设计方法及建立灭菌程序各个步骤提出了各种建议。

图 4.0-1 湿热灭菌程序决策树



SAM=蒸汽及空气的混合物

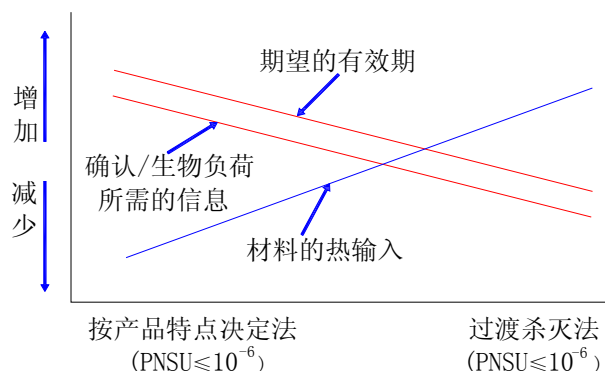
4.1 设计方法

灭菌程序设计的方法主要有两种：过度杀灭设计法（overkill design approach）和按产品特性设计的方法（product specific design approach）。两种方法都可以使被灭菌的产品和材料达到相同的无菌保证水平。本节将讨论利用两种设计方法中的一种，使用半对数模式来计算所需灭菌程序的杀灭时间。

在灭菌程序的设计中，从两种设计方法中选择哪一种，在很大程度上取决于被灭菌产品

或材料的热稳定性。如图 4.1-1 所示，与按产品特性设计的方法相比，过度杀灭法所需被灭菌品开始生产阶段和日常监控阶段生物负荷的信息较少。过度杀灭法要求的热能比较大，其后果是被灭菌品降解的可能性增大。

图 4.1-1 灭菌方法的比较



与过度杀灭法相比，按产品特性设计的方法所需的信息量要大得多，包括被灭菌品生产开始阶段及常规生产阶段的信息、指示菌（对灭菌程序呈现强耐热性的试验菌）以及生物负荷的信息。只有积累了这类有价值的信息后，才能制定比过度杀灭法低的热力灭菌程序。

使用较低的热力灭菌程序还有一个好处，即有利于被灭菌品的稳定性，使产品的有效期延长。正是因为这个原因，按产品特性设计的方法更适合那些处方耐热性较差的最终灭菌产品。

在第 5 节中，将使用半对数模式来确定适当的生物挑战试验，以证明产品获得了所需的杀灭时间。第 5.2 节将讨论确认被灭菌品物理和生物杀灭时间（ F_{PHY} 和 F_{BIO} ）都达到设计标准的方法。

4.1.1 灭菌程序设计方法中残存曲线的应用

可将下面的半对数残存曲线等式应用于两种灭菌程序的设计中，以确定达到理想终点（ N_F ），即非无菌单元的概率（PNSU）为百万分之一所需的杀灭时间。

$$\lg N_F = -F_{(T,Z)} / D_T + \lg N_0 \quad (\text{等式 1})$$

将 F 值重排得：

$$F_{(T,Z)} = (\lg N_0 - \lg N_F) \times D_T$$

从设计的角度来看，过度杀灭法和按产品特性设计法在 D 和 N_0 的取值上是不相同的。

4.1.1.1 过度杀灭设计法

过度杀灭法的目标是确保达到一定程度的无菌保证水平，而不管被灭菌品初始菌的数量及其耐热性如何。假设初始菌的数量及耐热值如下：

$$N_0=10^6$$

$$D_{121^\circ\text{C}}=1 \text{ 分钟}$$

$$z=10^\circ\text{C}$$

为了达到必要的非无菌单元的概率 PNSU,

$$N_F=10^{-6}$$

利用上面的这些数值，可以计算出达到设计要求的 F_{PHY} 和 F_{BIO} 如下：

$$\begin{aligned} F_0 &= D_{121^\circ\text{C}} \times (\lg N_0 - \lg N_F) \\ F_0 &= 1.0 \text{ 分钟} \times (\lg 10^6 - \lg 10^{-6}) \\ &= 12 \text{ 分钟} \end{aligned}$$

这样，利用半对数模式以及上面假设的数据，一个用过度杀灭法设计的灭菌程序可以定义为“一个被灭菌品获得 F_{PHY} 和 F_{BIO} 至少为 12 分钟的灭菌程序”。第 5.1 和 5.2 节将讨论该设计目标如何从物理和生物的角度加以验证。

欧盟在最终灭菌制剂的法规中，将对过度杀灭定义为“湿热灭菌 121°C 下 15 分钟”。(34)

很少发现自然生成的微生物的 $D_{121^\circ\text{C}}$ 值大于 0.5 分钟。过度杀灭设计法假设的生物负荷和耐热性都高于实际数。大多数微生物的耐热性都比较低，因此，过度杀灭的灭菌程序能杀灭它们，提供很高的无菌保证值。由于该方法已经对生物负荷及耐热性作了最坏的假设，因此从技术角度看，对被灭菌品进行常规的初始菌监控就没有多大必要了。

4.1.1.2 按产品特性设计法

通常说来，不耐热产品/物品的灭菌就不能使用过度杀灭设计法。这种情况一般是药品的最终灭菌。一个灭菌程序必须恰当地杀灭生物负荷，但不应导致产品不可接受的降解。灭菌程序的确认就需研究产品的生物负荷和耐热性。一旦确定了生物负荷和耐热性，就可以设计出一个能达到 PNSU 为 10^{-6} 的灭菌程序。

在设计时， N_0 和 D_T 的取值要根据生物负荷的分析，另需加上安全余地，它取决于 1) 专业判断 2) 生物负荷数据的范围，以及 3) 对产品生物负荷常规测试的程度。

按 cGMP 规范生产的产品实际生物负荷应该是很低的，每个容器 1-100 个菌。通常说来，只有环境中形成的芽孢或从产品分离的芽孢才需要测试 D 值。将产品在 80-100°C 下加热 10-15 分钟，可以筛选掉耐热性差的微生物。 D_T 值的选择应将生物负荷试验中检出的最耐热菌的安全余地考虑在内。所选定的安全余地反过来又与生物负荷和耐热性测试的频率和程度相关。例如，如果观察到产品生物负荷中最强耐热菌的 D_T 是 0.3 分钟，所选的 D_T 值为 0.4

分钟，那么就有必要在日常监控中进行耐热性测试。反过来，如果选择 D_T 值为 1.0 分钟（与过度杀灭设计中估计的 D_T 值相似），那么从技术上来看，对被灭菌品进行常规生物负荷监控就不那么必要了。下表将列举按产品特性设计方法的补充性示例。

按产品特性设计方法示例：

示例 1		
	a) 产品初始菌测试 耐热菌 $N_0 < 10^1$ /单元 $D_{121^\circ\text{C}} < 0.25$ 分钟	
	b) 灭菌程序设计中使用的数值 $N_0 = 10^2$ 个微生物 $N_F = 10^{-6}$ (PNSU) $D_{121^\circ\text{C}} = 0.4$ 分钟	
	c) 计算残存概率 PNSU 达到小于 10^{-6} 的标准灭菌时间 $F_{121^\circ\text{C}} = (\lg N_0 - \lg N_F) \times D_T$ $(\lg 10^2 - \lg 10^{-6}) \times 0.4$ 分钟 = 3.2 分钟	
在这个例子中，满足产品微生物存活概率 PNSU 要求 F_0 的最小值为 3.2，因为耐热性的设定值（ $D_T = 0.4$ 分钟）仅比产品中检出的微生物的耐热性稍高，因此，应进行初始菌的监控，以保证在生产期间不出现生物负荷或耐热性超过设定值的问题。		
示例 2		
	a) 产品初始菌测试 耐热性菌 $N_0 < 10^1$ /单元 $D_{121^\circ\text{C}} < 0.25$ 分钟	
	b) 灭菌程序设计中采用的数值 $N_0 = 10^2$ 个微生物 $N_F = 10^{-6}$ (PNSU) $D_{121^\circ\text{C}} = 1.0$ 分钟	
	c) 计算残存概率 PNSU 达到小于 10^{-6} 的标准灭菌时间 $F_{121^\circ\text{C}} = (\lg N_0 - \lg N_F) \times D_T$ $(\lg 10^2 - \lg 10^{-6}) \times 1.0$ 分钟 = 8.0 分钟	
在这个例子中，满足产品微生物残存概率 PNSU 要求的最低 F_0 为 8.0。因为所选定的耐热性的设定值（ $D_{121^\circ\text{C}}$ ）是较保守（安全性余地大）的，因此，日常生产生物负荷及耐热性测试可大为减少，但仍需定期进行监控。		

有多种产品采用同一程序灭菌时，可规定按产品特性设计法规定被灭菌品最短的标准灭菌时间（如 $F_0 = 8$ 分钟），而不管单个产品的生物负荷测试结果如何。在此情况下，通常要求

最小的 F_0 值应留有安全余地。然后，对日常生物负荷进行监控，以保证这个确定的灭菌程序始终处于安全状态。在第 5 节 阐述的确认/验证活动中，将说明如何保证被灭菌品始终达到灭菌要求。

4.2 装载类型

灭菌工艺开发的下一个步骤是确定每个具体容器、包装或其他物品准确的物理性质，这类物品一起组成被灭菌的装载。在了解被灭菌品中每个产品的物理性质（如蒸汽的穿透性）的基础上，还可将或被灭菌品的特性进一步分为多孔/坚硬装载或液体产品。在此基础上，再选择适当的灭菌方法（见图 4.0-1）。

4.2.1 多孔/坚硬装载的定义

多孔/坚硬装载是指以直接接触饱和蒸汽来实现灭菌目的的物品。当蒸汽在被灭菌物品的表面冷凝时，发生热量转移。（与灌装液体容器的灭菌不同，湿热蒸汽通过传导和/或对流作用，将能量传递给容器中的内容物）。

制药工业中使用的多孔/坚硬装载包括真正的多孔物（如筒式过滤器和包装的织物）和坚硬物品（如不锈钢器皿和灌装机部件）。不管装载物的内容是什么，通常不采用对每类物品建立特定灭菌程序的做法，而是建立标准化的能够获得最低无菌保证的灭菌程序。

多孔/固体物品包括但不限于下述内容：

- 过滤器*（各种滤膜、筒式过滤器，和深层过滤器）
- 胶塞和其他封闭用聚合材料
- 管道和软管
- 工作服
- 清洁设备
- 设备易损件

注 *过滤器应按供货厂商的建议灭菌。

4.2.2 液体装载的定义

生产中灌封的产品通常是同类型的，由单一规格、单一灌装量的容器组成，而且它们来自于同一批产品。尽管可以采用过度杀灭法，但液体产品灭菌程序通常采用按产品特性设计的方法。如果产品不是水溶液（如一些油类产品），应特别注意，以确保产品湿热灭菌法对它们的适用性。

灌封的液体产品包括但不限于以下内容：

- 最终容器（如小瓶、袋、瓶子、针筒或安瓿）的药液（溶液、悬浮液和/或乳剂）

- 实验后或生产后需处理的含有潜在致病微生物的废液

4.3 灭菌程序

对于湿热灭菌来说，有两种常用的灭种程序：饱和蒸汽灭菌程序和空气加压灭菌程序。饱和蒸汽灭菌程序通常用于多孔/**坚硬**物品，而空气加压灭菌程序通常用于液体产品。下面对这两种灭菌程序作一概述。

4.3.1 饱和蒸汽**灭菌**程序

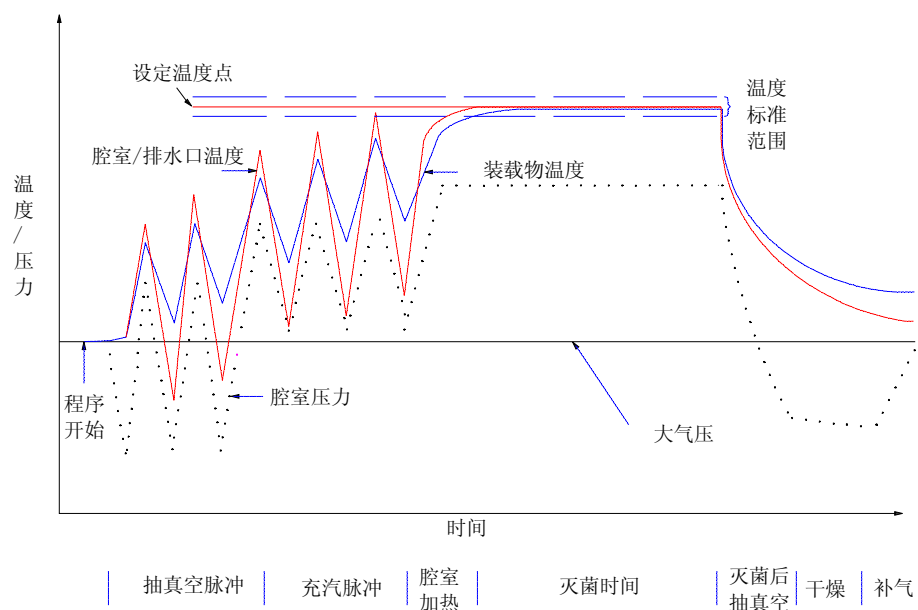
饱和蒸汽**灭菌程序**主要有两种类型：预真空和重力置换。第 3.3.3 节中讨论了饱和蒸汽的原理。

4.3.1.1 预真空程序

饱和蒸汽最常见**的**灭菌程序是预真空程序。该程序是在灭菌阶段开始之前通过机械真空泵或蒸汽喷射器将空气从腔室中**抽走**。预真空程序尤其适用于可以包藏或夹带空气的装载物，比如软管、过滤器和灌装机部件。在制药**行业**中，脉动真空程序常用于难以去除**空气**的多孔/**坚硬装载的**灭菌。

灭菌程序开始之前，**对**装载的处理是很重要的。如果每次抽真空至 0.1 个大气压，那么每个脉冲将使灭菌器内的空气减少 90%或者 1 个对数单位。三**次**脉冲（抽真空-充蒸汽）可获得 3 个对数单位的下降值，有效地将空气去除了 99.9%。为了使装载处于正常状态，可能**另**需正压脉冲（充蒸汽至高于大气压，以避免空气进入腔室）。通过这个方法，提高去除空气的效率，这样平衡时间就会缩短（见 4.4.1.4 小节）。在制定灭菌程序时，要准确地确定脉冲的次数和类型。

图 4.3.1.1-1 预真空程序示例



4.3.1.2 重力置换程序

典型的重力置换程序建立在如下理论上：腔室中的冷空气比进入的蒸汽重，因而将下沉到腔室的底部。蒸汽进入灭菌器腔室迫使空气从腔室底部的排水管排出（和冷凝水一起通过蒸汽疏水阀排出）。排除空气成功与否取决于疏水阀的正确运行和适当的蒸汽分布。蒸汽通过导流板或散流器（例如多孔管）注入灭菌器腔室。如果蒸汽进得过快或分布不合理，装载的顶部或周围可能会夹带空气层。如果进汽过于缓慢，空气受热而扩散入蒸汽中，从而使排除空气更加困难。

重力置换灭菌器排除空气的效率低于其他设计形式的灭菌器，对排气比较困难的产品而言，建议不要采用这类灭菌器灭菌。图 4.3.1.2-1 描述了重力置换灭菌法。红色箭头表示由蒸汽入口进入的蒸汽，它向下置换蓝色箭头所表示的空气，使其经疏水器排出。

一个典型的重力置换程序可用图 4.3.1.2-2 来表述。

图 4.3.1.2-1 重力置换灭菌法

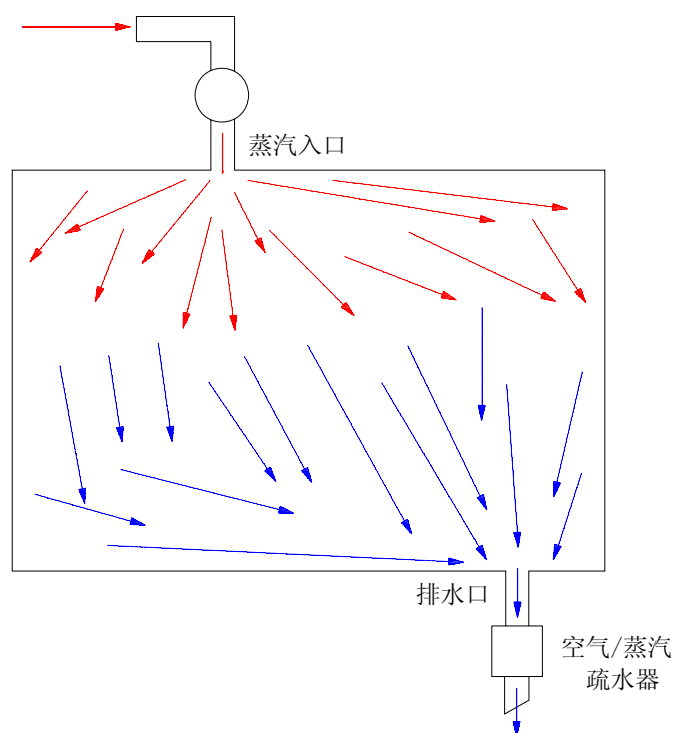
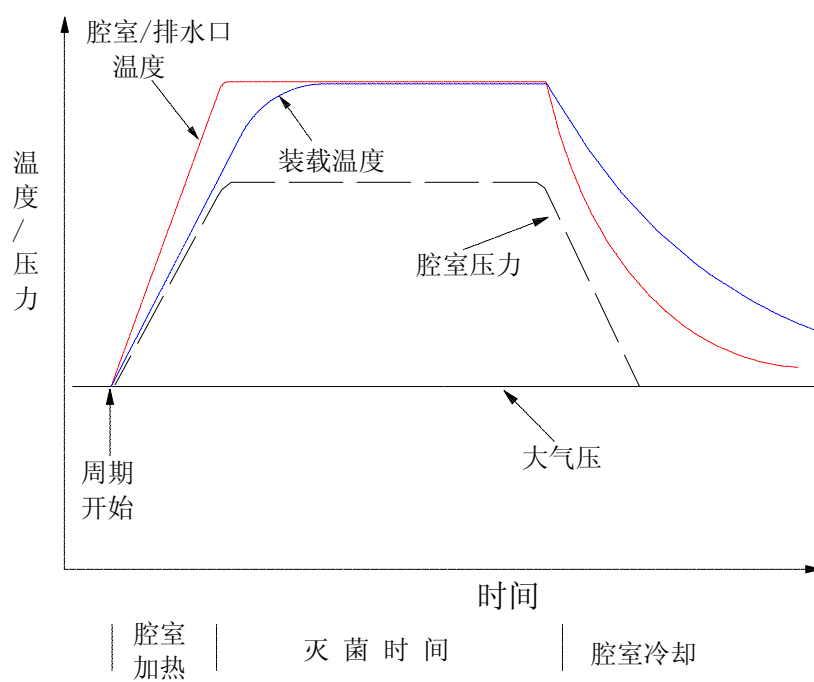


图 4.3.1.2-2 典型的重力置换程序示例



4.3.2 空气加压程序

几乎在所有的液体产品中，液体上部的空间存在有气体（空气、氮气或其他气体）。(35, 36, 37) 当液体加热时，上部的气体膨胀，容器中的压力增大。

对于大多数液体产品而言，如预灌装针筒、一些玻璃瓶或小瓶、塑料袋和半刚性容器，都需要加大腔室的压力，尽可能减少腔室和容器的压差，以保持容器的形状和密封的完好性，如是预灌装针筒，则需保持好胶塞的适当位置。因产品类型不同（如玻璃瓶和塑料袋），补偿容器内部压力所需的空气压力可能有明显的差异。

加压灭菌程序通常采用无油压缩空气。空气质量取决于它的用途。某些场合下，在供气管路中有必要安装除菌过滤器。

以下章节将概述两种常见的空气加压的灭菌程序。

4.3.2.1 蒸汽-空气混合物（SAM）程序

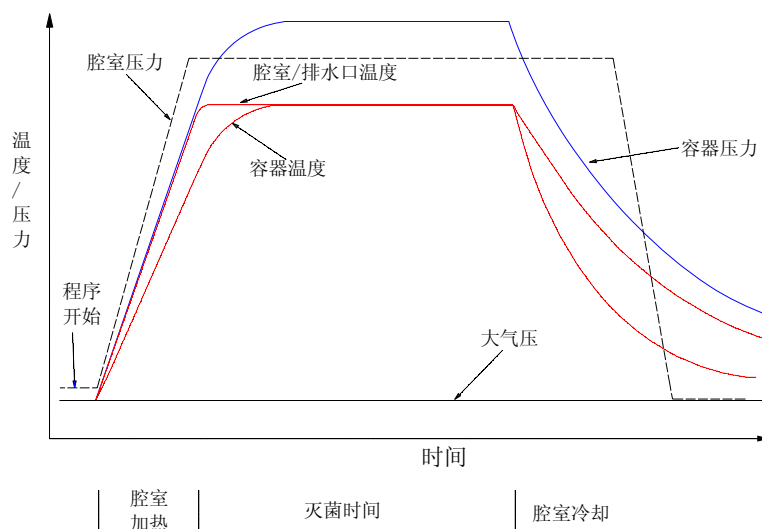
当蒸汽中加入空气，从而产生一个高于一定温度下饱和蒸汽压的压力时，这种灭菌程序即称为蒸汽-空气混合物的灭菌程序。尽管加入空气是必要的，与饱和蒸汽灭菌相比，它的热传递速率低。蒸汽-空气混合物程序必须使蒸汽和空气不断循环，以达到如下目的：

- 防止蒸汽-空气混合物分层并在装载中形成冷点
- 减少冷的容器周围蒸汽-空气混合物中蒸汽的损耗¹⁸

通常采用风扇来使蒸汽-空气混合物循环。图 4.3.2.1-1 表示这个灭菌程序的示例。容器内部压力和温度动力学是容器种类（例如是刚性的，还是非刚性的）、装量、顶部空间的大小和腔室温度的函数。

图 4.3.2.1-1 蒸汽-空气混合物程序示例

¹⁸ 译注：蒸汽不是直接消耗在产品上，灭菌产品，而消耗在产品周边的环境中



蒸汽-空气混合物程序在灭菌后，可以使用多种方法来冷却产品。最常用的方法是向灭菌器夹套或盘管通冷却水，保持空气循环冷却。有些蒸汽-空气灭菌器通过在产品上方的喷淋冷却水使其降温。

4.3.2.2 过热水灭菌程序

对一些产品来说，用过热水循环来灭菌已灌封容器是很有效的方法。过热水循环的方法有多种，最常用的方法是通过泵，将水从灭菌器底部（被灭菌品下方）打入喷淋嘴，不断喷淋、循环。此灭菌方法另有一小的改良方案，是采用水分配器来替代喷淋嘴。

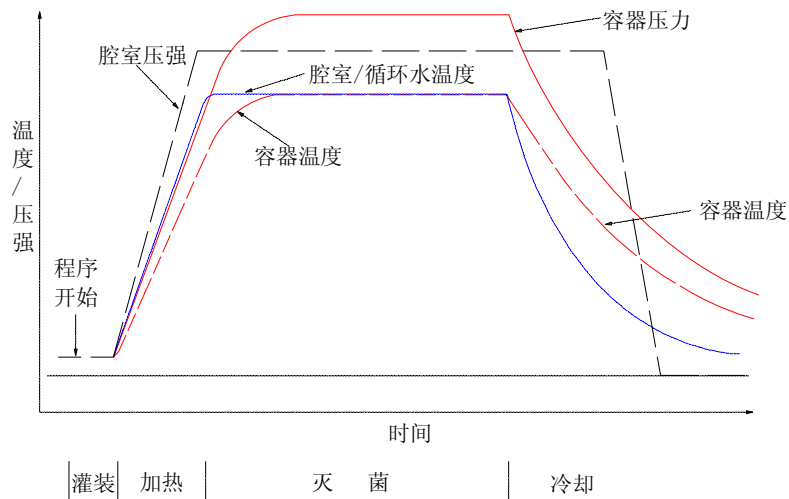
循环水加热和冷却，有二种方法：直接法—引入蒸汽加热，进冷却水冷却；间接法--通过热交换器。使用间接法（通过一个卫生热交换器）时，在热交换器非卫生一侧，几乎任何形式的蒸汽或水都可以使用。间接法是首选的方法，因为直接接触密封容器的水可与产品一起灭菌。

另一种循环过热水灭菌法是将产品完全浸没在水中灭菌。大多数过热水灭菌程序是在灭菌器中以批次方式完成的，但也有使用连续式灭菌器的。

所有这类过热水循环的灭菌程序都使用空气加压。在灭菌过程中，空气的加压是可以控制的。加压的最低值由以下因素决定：采用的温度；保持产品期望特性所需的压力；及保持循环泵正常运行所需的压力。

与其他蒸汽灭菌法相比，循环水喷淋法最大的一个优点是加热和冷却的速率容易控制，如果设定恰当，它不受产品装载和其他公用设施的影响。图 4.3.2.2-1 为过热水灭菌程序示例。

图 4.3.2.2-1 过热水灭菌程序示例



过热水灭菌所用水的微生物水平是最重要的质量特性。水可以在腔室中和装载一起灭菌；在单独的容器中灭菌，保持高的水温；或者通过化学处理，来保持所要求的低的微生物水平。容器内部的压力和温度动力学与容器的类型（刚性的，非刚性的）、装量、顶空体积、腔室温度相关。

水循环为最终灭菌产品提供了有效的冷却方法，因而提高了灭菌器的效率。为了保证产品的稳定性，也许有必要采取这种快速冷却的方法。

4.4 灭菌程序的开发

灭菌程序的开发是确定灭菌程序物理参数的过程。灭菌程序将用于对确定装载方式的被灭菌品进行灭菌。建立灭菌程序的目的是鉴别出关键和重要的操作参数，以致产品或材料在灭菌后能够达到无菌要求且保持其正常的功能。这一开发过程往往列入正式的开发计划并有相应的文件和记录。

4.4.1 多孔/坚硬装载灭菌程序的开发

多孔/坚硬装载灭菌重现性和可预测无菌保证值的最大障碍是单个产品中可能夹带的空气。在进入灭菌阶段之前，确保充分地排除灭菌器腔室和产品中的空气是非常重要的。向灭菌器提供饱和干燥蒸汽是多孔/固体物品灭菌的一项特殊要求，但灌封液体产品的灭菌，则无此特殊要求。

采用生物指示剂和空气试剂盒有助于建立灭菌程序。开发试验取决于对灭菌历史知识及对类似装载/产品灭菌的了解。

为了减少日常确认和再确认的费用，比较实用的做法是采用已开发的灭菌程序，以减少同一公司中所使用不同灭菌程序的数目。在采用这一策略时，公司应分析现有的灭菌程序是否足以保证新的产品能够达到所要求的微生物残存概率且不影响产品质量。

4.4.1.1 装载的最难加热点

在腔室热穿透试验以前，有必要画出装载的分布图，以确定单个被灭菌品中适当的监控点位置。这可称为“热分布测试图”，其目的是确定产品或包装中最难加热的部位。

产品的温度测试应取最难加热的产品（如质量大的、易包藏空气的、长的软管，或这类特性兼备的装载）。作温度探测图时，要比较、考虑装载类型对加热的影响（如比较去除空气及大的被灭菌装载加热的难易程度）并将温度探头放置在最难加热的位置，这点十分重要。

如果灭菌条件和程序相似，热分布试验可在灭菌器（包括实验室用灭菌器）中进行，而不必在大生产所用的灭菌器中进行。可能需要多个温度探头，以适当地测定大量装载中蒸汽的穿透情况。在温度探测试验中，产品应按确定的程序准备。将温度探头放入装载时，要特别小心，因为它可能会对蒸汽的导入人为地造成促进或阻塞作用。

4.4.1.2 装载的准备

多孔/坚硬装载的准备方式可有多种，包括但并不局限于以下示例：

- 用可穿透蒸汽和空气的包装材料将装载包扎（如不脱落纤维的纸或其他聚合包装材料，或二者兼用）
- 加盖但不封闭的装载，桶/盒（它们可以是打孔的不锈钢、或阳极氧化的铝桶/盒，以便于蒸汽进入、空气去除和冷凝水的排放）
- 将装载放在敞开的灭菌车上（不加包扎，或用可穿透蒸汽/空气的材料加以包扎）
- 将装载放在静止或旋转桶式的容器中（如胶塞）

无菌制造工艺中所用的产品必须加以包装或包扎，以便在使用之前保持无菌状态。在大多数情况下，可在 ISO 第 5 类环境（A 级）下储存和处理。可穿透蒸汽的包装材料需兼顾二方面的要求：一是足以去除空气和冷凝水；二是保护产品免遭微生物污染。

在 SOP 中要对装载的准备方法做出详细的说明。严格遵循这些 SOP 规程对确保灭菌是至关重要的。装载的准备包括：清洁、淋洗、干燥、包扎和储存。装载只需要覆盖关键表面（如接触产品的表面），同时应能让饱和蒸汽和空气自由穿透包扎材料。灭菌胶带应尽量少用。

灭菌程序中所用的包扎材料或容器应不脱落纤维和微粒。不应采用铝箔、薄玻璃纸和其他非穿透性材料来包扎以饱和蒸汽灭菌的产品。包扎材料的改变、灭菌器定位的变更，或支架的使用，都可能影响蒸汽与装载的接触及冷凝水的排放。

金属容器应该是不锈钢或者阳极氧化铝。普通的铝材易脱落微粒，不应采用。带有通气口或过滤器的生产设备，其设计应能够确保在灭菌过程中压力迅速达到平衡。在灭菌之前需要确认通气口处于开启的状态，且在去除空气过程中不会被任何用来保护产品的包扎材料所

堵塞。

4.4.1.3 多孔/坚硬装载的装载方式

在运行确认后及性能确认开始前，要确认装载的类型和方式并有相应记录。应考虑灭菌效果和生产效率的以下方面：

- 装载不能接触腔室的内壁
- 采用有孔的架子，以尽可能减小金属容器平面间的接触以及与灭菌车之间的接触，必要时可采用可调节式的支架
- 为方便去除空气、排冷凝水（如将桶倒置）和蒸汽穿透，要明确装载物的方位并有相应记录
- 质量大的装载应放置在灭菌器中较低的架子上，以尽量减少冷凝水所致的潮湿(38)
- 对于多孔/坚硬装载物而言，控制灭菌器中物品的数量是十分重要的。如果预期装载物的量是变化的，则需要确定最小和最大的装载量。一个比较好的分组方法是限定适当的装载量，包括最小装载中最难灭菌的物品
- 如果确认试验表明物品的位置不影响灭菌效果，那么装载方式是可变的
- 应有适当的装载指南，方便操作人员查阅。

4.4.1.4 多孔/坚硬装载运行参数的测定

建立灭菌程序的关键因素是确定运行参数，以满足灭菌工艺设计的目标并确定它们属关键因素或重要因素。表 4.4.1.4-1 列出了工艺参数需考虑的问题：

过程	参数*	应考虑的问题
全过程	夹套的温度和/或压力	夹套温度不能超过或者明显低于腔室的灭菌温度。要控制温度以避免过热或者过冷（冷凝）。通常系重要参数。
升温阶段	真空/脉冲的次数、范围和持续时间（如果适用）	它们决定去除多孔物品中空气和达到适当平衡的时间。通常是关键参数。
	充蒸汽的正脉冲次数、范围和持续时间（如果适用）	蒸汽的正脉冲是（灭菌前）创造装载灭菌条件的有效方法。通常是重要参数。
	腔室加热时间	对于饱和蒸汽灭菌器而言，它与所供的蒸汽相关；可设报警限，对非正常的加热时间报警。
灭菌阶段	灭菌时间	系每个灭菌程序均需验证，并需监控/记录的关键参数。
	温度设定值	这是验证过程中确认的关键控制值。
	独立的排水或腔室温度	系每个灭菌程序均需验证，并需监控/记录的关键参数。
	装载探头的温度	这不属控制参数，且在多孔/固体物品的灭菌中没有广泛应用。
	腔室压力	对饱和蒸汽灭菌而言，可用以确认饱和蒸汽灭菌的条件。可能是关键因素，这要根据控制系统的情况来定。

	装载探头最低 F_0 值	如采用装载探头，这是一个关键参数。
冷却阶段	干燥时间	下列因素可能会提高干燥效率：加热、高真空、脉冲或这些因素的组合。装载有特定的干燥要求时，它是灭菌程序的重要参数。
	补气速率（消除真空的速率）	可以设定，以保护包装和过滤器的完整性；但不具有代表性。是可能的重要参数。

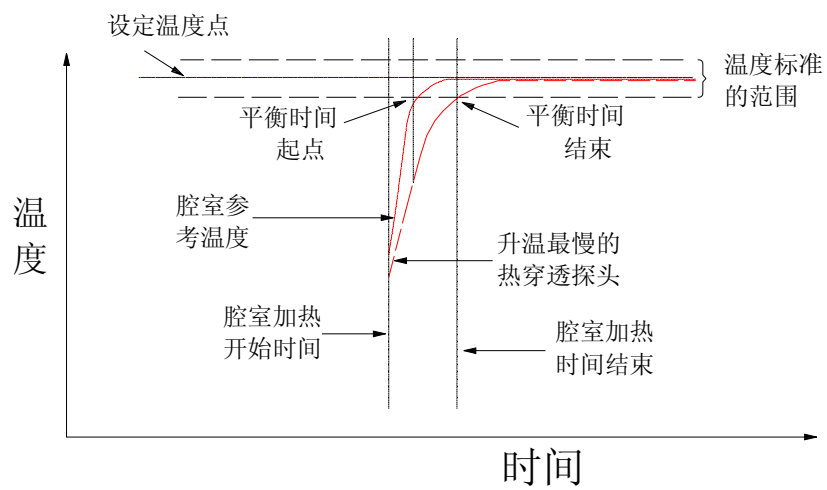
*注：本表的参数可能不全，它不一定适用于市场上所有的灭菌器。

关键参数涉及产品的安全和有效性。关键参数不合格会导致装载拒收的结果。重要参数保证日常灭菌运行处于“受控”状态。重要参数不合格时需调查并有文件证明对装载处
 [理](#)的合理性。

4.4.1.5 平衡时间

[平衡时间与多孔/坚硬装载的状况密切相关，这包括预真空和正脉冲的次数和深度。](#)图4.4.1.5-1 [描述](#)了腔室加热时间和平衡时间的关系。

图 4.4.1.5-1 平衡时间



平衡时间是指腔室（腔室参照温度通常是排水点温度）达到最低设定灭菌温度和装载达到最低设定灭菌温度之间的时间间隔，后者由[加热最慢的热穿透](#)探头测得。这个时间表示去除空气和升温并使装载达到适当灭菌条件的能力。

即使最终达到了设定的灭菌温度，平衡时间的延长也表示去除空气或加热能力的不足。在建立灭种程序过程中，应采取预防措施，尽可能减小平衡时间，这点十分重要。采用以下方法，可[缩短](#)平衡时间：

- 确认装载正确放置，能有效去除空气（如胶管不受挤压）
- 增加真空或蒸汽正脉冲¹⁹的次数

¹⁹ 译注：指充引入蒸汽超过一个大气压的脉冲

- 在真空和/或蒸汽脉冲过程中，增加保持真空和/或蒸汽脉冲的步骤
- 提高真空脉冲的真空度
- 优化装载的蒸汽灭菌条件

如果以上方法都不奏效，则应考虑调整装载的结构（如缩短胶管的长度）。然而，只有在充分考虑到所有其他可能危及无菌风险的因素（如调整会增加无菌组装的操作、人员干预的次数或加大操作的复杂性）后才能进行调整。

4.4.1.6 评价物理杀灭时间 $F_{Physical}$ 和生物杀灭时间 $F_{Biological}$ 的一致性

对于一个灭菌程序而言，当一个生物指示剂的生物杀灭时间可测量时，在同一位置测得的物理杀灭时间和生物杀灭时间应该是相等的。灭菌程序生物指示剂确认的要求是验证样品的生物指示剂试验呈阴性结果；这就要求物理的标准灭菌时间 F_{PHY} 比较大。在这一物理标准灭菌时间条件下，无法测定生物指示剂的生物杀灭时间 F_{BIO} ，因为 BI 在额定灭菌区的范围以外。杀灭生物指示剂所需要的热量可以通过计算得到。如果实际的灭菌时间明显低于所需的物理杀灭时间 F_{PHY} ，灭菌试验将导致生物指示剂呈现阳性的结果。

以下示例简要说明如何使用半对数模式来计算 F_{PHY} 和 F_{BIO} 的一致性。

例 1

如果一个生物指示剂具有以下特性：

$$\begin{aligned} D_T &= 2.5 \text{ 分钟} && (\text{生物指示剂耐热性最高期望值}) \\ N_0 &= 3 \times 10^6 \\ F_{BIO} &= D_T \times LR \\ &= 2.5 \text{ 分钟} \times \lg N_0 \\ &= 2.5 \text{ 分钟} \times 6.47 \\ &= 16.2 \text{ 分钟} \end{aligned}$$

可将等式 1 重新整理，用来计算杀灭生物指示剂，使其达到非无菌单元概率 $PNSU$ 为 10^{-2} ($N_F=10^{-2}$) 的 $T^\circ C$ 灭菌时间 (F_T)。²⁰

$$\begin{aligned} F_T &= \frac{(\lg N_0 - \lg N_F) \times D_T}{\lg 10} \\ &= [(\lg 3 \times 10^6 - \lg 1 \times 10^{-2})] \times 2.5 \text{ 分钟} \\ &= 21.2 \text{ 分钟} \end{aligned}$$

带格式的：德语(德国)

一个物理杀灭时间 F_{PHY} 约为 21.2 分钟的灭菌程序，应杀灭生物指示剂，使其达到百分之一存活概率的水平。如果实际的生物杀灭时间小于这个物理测试的预期值，装载的生物指示剂培养结果呈阳性的概率就会高于百分之一，这意味着蒸汽灭菌可能会造成潜在的问题，并应当努力调查造成这种差异的原因并加以纠正。

请注意，如果是在建立灭菌程序中进行这个评价，生物指示剂的 F_{BIO} 不必由设计中灭菌程序（见 4.1 节）确定的杀灭要求去求得。如果在生物指示剂确认试验（5.2 节）中将 F_{PHY} 和 F_{BIO} 进行对比评估，那么设计会变得更复杂，因为需要对两个目标同时进行评估：1) F_{BIO}

²⁰ 原文注：为进行这类评估，生物指示剂 N_F 的选择是十分重要的，它需要有足够的灵敏度来检出灭菌剂赋予被灭菌品可能的各种问题，与此同时，在灭菌程序正常运行时，所有生物指示剂的存活概率又非常低。看来 N_F 的取 10^{-2} 至 10^{-3} 是平衡这二个标准的最佳选择。

等于或超过设计要求，2) F_{PHY} 和 F_{BIO} 基本一致。

因为没有设计出标准的试验方法来评估 F_{PHY} 和 F_{BIO} 的一致性，因此，文献详细地介绍了几种方法。(39, 40) 应注意，这类评价对工艺的理解程度要深一些，但人们在没作这类评价的条件下，成功地开发并验证了很多灭菌程序。这份技术报告的目的之一是促进程序开发的目标，并激励人们去探索适当的评估方法。

4.4.2 液体装载灭菌程序的建立

封闭容器中溶液的灭菌，是通过加热介质将能量传递给容器内溶液来实现的。液体产品中的水分提供了容器内灭菌所需的湿度。对于悬浮液和乳剂的灭菌，可能需要保持装载的运动状态（如旋转）来促进内部的热循环。腔室中的蒸汽与过热水和压缩空气共同发挥作用（或在浸没-喷淋式²¹灭菌器中，完全由过热水和压缩空气取代，进行灭菌）。这类灭菌方式中，通常不需要排除腔室中的空气就可完成灭菌，但一般要求加热/冷却介质强制循环，以促进装载加热/冷却过程中的热传递。

在建立最终灭菌产品的灭菌程序中，最关注的问题是保证装载中最低温度点获得足够的杀灭时间，此同时，又要保证装载中高温点的产品符合产品质量要求。鉴于这些因素，必须保证：

- 在确认和常规灭菌过程中，装载物要处于相同的位置
- 输入装载的热量应一致，不应过高或过低
- 灌装容器的生物负荷应符合设定标准
- 有足够的空气增压值（如果是采用空气加压），使容器的破损和变形降低到最小程度

制订灌封液体容器类装载的灭菌程序时，应考虑以下因素：

- 用蒸汽、蒸汽-空气混合物或过热水对液体容器的外表面有效地加热，使整个装载物具有相同的灭菌条件
- 在灭菌后，确定装载有效冷却的范围²²，以保护产品的质量特性
- 产品的稳定性
- 容器密封的完整性，通过恰当的压力平衡，尽可能减少容器的破损或变形
- 容器密封系统的界面（药液通道的密封口²³）的灭菌
- 容器内部的热分布情况
- 生物指示剂在产品处方中的耐热性
- 应根据加热介质的类型（饱和蒸汽、蒸汽-空气混合物或过热水）和液体容器的类型（如玻璃容器、软袋、塑瓶）精心设计灭菌器的托盘/支架

4.4.2.1 容器冷点的位置

容器的冷点是灭菌过程中灌封液体容器中最低 F_0 的部位。采用冷点建立灭菌程序的方法是一个比较保守的方法，因为它假设容器中所有的微生物都聚集在冷点，且只在那个位置

²¹ 译注：原文为浸没式 immersion，加喷淋是因国内使用普遍，方便读者理解

²² 译注：灭菌阶段结束后，冷却阶段也应有控制的上下限，如冷却过快，容易引起玻璃爆裂；如是培养基，过慢，则可能影响产品促进微生物生长的能力。

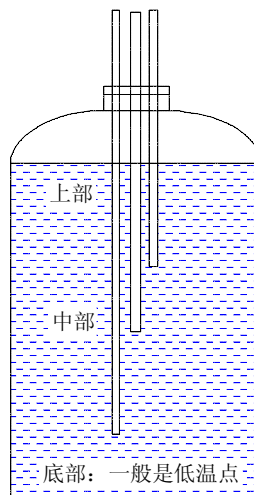
²³ 译注：如胶塞与瓶口的接触界面

的温度下灭菌。

对于大容量注射剂（LVPs）（>100mL）而言，冷点位于产品几何中心和纵轴的底部（如图 4.4.2.1-1 所示），此冷点需要确认。在小容量注射剂（SVPs）（≤100mL）中，冷点的定位并不典型，因为溶液升温的速率几乎与灭菌器相同。

冷点的位置也受容器方位的影响。当容器旋转或摇摆时，可能找不到可辨别的冷点。

图 4.4.2.1-1 液体容器中探头位置示例



4.4.2.2 液体装载的方式

在蒸汽灭菌中，已封闭的、灌封液体的容器在装载时，应考虑以下因素：

- 蒸汽、蒸汽-空气混合物或过热水对装载容器的有效穿透，使整个装载品具有一致的灭菌条件
- 在灭菌后，确定装载有效冷却的范围，以保护产品的质量特性和/或促菌生长的能力²⁴
- 恰当的压力平衡，使容器的破损和变形减小到最小程度
- 如果装载容器大小不同，应明确装载的最少和最多数

灭菌器中灭菌的每种容器及装载规格，均应通过热穿透试验来确认装载的冷区及热区。应采用不同规格的密封、灌封液体的容器，进行多次试验才能完成。在挑战试验期间，对将要试验的装载方式明确地加以定义，这包括装载的密度、支架的位置、层间高度和其他参数。

在这些试验的结尾阶段，需要确立装载方式和监控位置并有相应的文件。有可能可采用同一灭菌程序来灭菌不同规格的容器或容器相同而装量不同的混合装载，但在最终灭菌中这种方法极少采用。

4.4.2.3 液体装载操作参数的确定

²⁴ 译注：例如，指培养基类产品

灭菌程序开发的一个重要方面是确定运行参数，以实现设计目标并确定它们是否属关键参数或重要参数。关键参数与产品的安全和有效性相关。关键参数不合格会导致装载拒批。重要参数可以保证日常灭菌程序在“受控状态”下运行。重要参数不合格需要进行调查，并有文件记录装载处理的理由。表 4.4.2.3-1 中列出了各种参数。

表 4.4.2.3-1 液体产品的典型操作参数

阶段	参数*	说明
整个程序	夹套的温度及/或压力	在过热水循环中，通常不用夹套。如果使用，夹套的温度不应高于灭菌器腔室的温度
	SAM 法中风扇每分钟的转数 (RPM)	最低要求：风扇的故障应能启动警报。转速应是重要参数。
	摇动/旋转速度 (例如 RPM)	最低要求：需要时，摇动/旋转故障 <u>应能</u> 启动警报。摇动/ <u>旋转速度</u> 应看作重要参数。
	过热水循环流速	最低要求：泵的故障应启动警报器。泵的操作应是重要参数
加热	腔室的水位 (过热水法)	要确定最低水位并设报警。系潜在的重要参数。
	腔室加热时间	对于饱和蒸汽灭菌法而言，它与供汽相关。应设加热时间长短的警报限度。系 SAM 和过热水法灭菌潜在的重要参数。
	腔室加热速率 (例如 °C/分)	在任何装载条件下，为使加热时间及热分布具有重现性， <u>应为</u> SAM 和过热水工艺 <u>确定其控制功能</u> ，升温速率要考虑最差 <u>条件</u> 下装载对英国热量单位 BTU 的要求及公用系统的能力。系潜在的重要参数
	升压速率	对于一些使用 SAM 或过热水 <u>灭菌</u> 法的产品而言，保持特定容器的 <u>特性</u> (如形状及针筒中胶塞的位置) 需要有一定的速率。系潜在的重要参数。
灭菌	设定温度点	这是验证过程中的关键控制点
	灭菌时间	如果不使用装载探头，这是一个关键参数。在每个灭菌程序中都需要对这个变量进行确认/监控/记录。
	灭菌过程中腔室的压力	可用以证实饱和蒸汽条件，应作为重要参数。空气 <u>增压灭菌程序的压力</u> 是一个由用户定义的参数。 <u>根据所用控制系统的情况</u> ，它可能是饱和蒸汽潜在的关键参数。
	灭菌期间独立的加热介质的温度	如果不使用装载探头，这是一个关键参数。每次灭菌时，要监控/记录这个温度。
	装载探头时间超过特定的最低温度	可适用于有特定时间/温度要求的产品，以代替 F_0 的要求。这是 <u>一个</u> 潜在的关键或重要参数。
	装载探头的最低 F_0 值	当采用装载探头时，这是一个典型的控制参数。
冷却	装载探头的最小 F_0 值	当采用装载探头时，这是一个关键参数。
	装载探头最大 F_0 值	当采用装载探头时，这是一个关键参数。
	降温速率 (例如 °C/分)	<u>过热水程序开发及 SAM 程序中</u> ，它是控制器的一个功能。

降压速率	对于采用 SAM 或过热水法的灭菌程序而言，保持特定的容器特性（例如形状、注射器塞子的位置）需控制一定的速率。系容器完好性潜在的重要参数。
装载冷却时间	灭菌后，经一定时间，产品达到适当温度，以便进一步加工（如贴签，装箱）。通常不是关键及重要参数。
* 本表所列项目不是包罗万象的，且有些项目并不适用于市售灭菌器的所有程序	

4.5 稳定性研究

无论使用何种设计方法，都需要进行最终灭菌产品的稳定性研究。考察最终灭菌程序对产品性质稳定性影响的试验可包括产品的降解、含量测试值，pH 值、颜色、缓冲能力以及具体产品的质量特性。

灭菌时，杀灭时间和降解都随着时间和温度而累积。这意味着加热和冷却的变化将影响产品的稳定性，同时影响杀灭时间。因此，稳定性研究需要将产品处于最苛刻的灭菌条件下进行。

当灭菌程序有效控制，产品获得相同的 F_0 值时，一般认为此 F_0 值下温度高一些、时间更短一些对产品的不良影响较少，但应对所选灭菌程序的实际影响进行评价。

5.0 灭菌程序的性能确认

灭菌程序的性能确认是为了证明灭菌工艺始终符合灭菌程序的设计标准（4.1 小节）。如图 1.1-1 所示，性能确认接着灭菌参数的开发，它是灭菌程序验证不可分割的组成部分，由以下两方面构成：

- 物理确认，包括热分布和热穿透试验，确认被灭菌品获得了所要求的物理杀灭时间 F_{PHY} 。
- 生物指示剂确认，以适当的生物指示剂，确认所制订的灭菌程序，能使整个装载始终达到所要求的生物杀灭时间 F_{BIO} 。

在灭菌程序确认实施之前，应根据公司的灭菌方针和现行法规要求，完成以下确认和开发活动：

- 灭菌器灭菌的装载类型所需的公用设施（如蒸汽经过适当的质量检验，见 3.3.3 小节、压缩空气或冷却液）已确认
- 灭菌器的确认（设计确认 DQ、安装确认 IQ、运行确认 OQ 或试运转），关键设备（控制系统、监控装置和报警装置）的校准
- 确立灭菌程序中每个阶段的参数（见 4.4 小节）
- 定义装载、装载方式并确定哪些装载要进行确认试验。在做出决定时，还应当考虑最大、最小装载和最难灭菌的物品
- 必要时，进行适当的腔室和装载的热分布试验，以确定进行物理评估及生物指示剂评估测试点的适当位置。

物理和微生物结果之间的一致性为灭菌验证中最重要的部分。对于蒸汽穿透或热穿透因

难的产品来说，仅凭温度和压力测量得到的物理数据尚不能证明已经达到了设定的灭菌要求。例如，物理测量法不能完全证明产品（比如注射器的内腔、针头的保护罩或滤膜）达到了灭菌要求。同样，如果忽略杀灭生物指示剂所需要的物理参数，那么生物指示剂的杀灭并不足以证明一个灭菌程序的适用性。生物挑战的结果应与物理数据相一致，反之亦然。

按照赋予被灭菌品的杀灭时间来衡量，应当从物理和生物两个方面来证明最低的合格灭菌程序（MAC = the minimum acceptable cycle）的合理性。为了保证最低可接受灭菌程序结果的一致性，为确保有一个安全余地，日常运行的灭菌程序一般使用高一些的灭菌温度和/或长一些的灭菌时间。

对于初始确认，为了确认灭菌程序的重现性，需要进行多次平行试验。典型的确认包括每一个装载方式连续三次合格的运行。初始确认之后，需要进行灭菌程序的再确认、日常运行情况的再确认（ongoing event-based requalification）（6.3 小节）以及定期再确认（Periodic Requalification 6.4 小节）。

5.1 物理确认

灭菌程序确认物理试验的主要目标是获取物理数据，以证明所开发的程序始终达到灭菌程序设计时确定的热穿透要求。

5.1.1 热分布

热分布确认的主要目的是证明整个装载区加热介质的分布是均匀的。为了测试热分布情况，温度探头应置于装载区，但不能与装载物或灭菌器硬件（例如灭菌车、支架、托盘）相接触。应有详细描述具体温度探头位置的图形。

在热分布确认试验中，应确认关键和重要的操作参数并有相应的文件和记录。灭菌程序灭菌阶段的合格标准包括：

- 每个探头所测得温度的变化范围
- 不同探头之间测得的温度变化范围
- 探头测得的温度与设定温度之间的差值

5.1.2 热穿透

热穿透确认的目的是证明所需的热量已经转移到装载（比如液体）或材料的表面。应采用热穿透数据来计算物理杀灭时间 F_{PHY} 。

应将热穿透温度探头置于液体容器中的冷点，或经确定多孔/坚硬物品升温最慢，即最难灭菌的位置。

此外，对于液体装载而言，将整个腔室装载区随机地或根据几何方式来选定一些位置，并将探头放置在这些位置以及可能已明确为冷点或热点的位置的容器中。

对于热穿透特性不同的产品组成的多孔/坚硬装载（通常称为混合装载物），探头应置于每个类型中具有代表性的装载物中。对于只有一种类型物质组成的多孔/坚硬装载物（如胶塞），可以采用与液体装载物相同的方法。每个确认装载的温度探头的位置，以及选择此位置的理由，均应有相应的文件及记录。

5.2 生物指示剂确认

灭菌程序确认中生物指示剂确认的主要目标是获取 BI 的有关数据，以证明所开发的灭菌程序实际达到了程序设计中确定的生物杀灭时间。

使用生物指示剂挑战确认试验应遵循如下简明的程序：

- 一个恰当的生物指示剂系统应根据灭菌程序设计阶段确定的杀灭时间（ F 值）来确定/制备，参见 3.2.1 小节 中讨论的内容
- 装载在下限或低于下限的灭菌条件下灭菌
- 灭菌结束后，将 BI 试验系统收回实验室
- 在适宜的介质和条件下，检查每个 BI 挑战试验的残存数
- 对结果进行评价，以确保试验中孢子的对数下降值符合设定的合格标准
- BI 挑战菌应作阳性对照。

5.2.1 生物指示剂挑战系统

为了评价灭菌程序是否达到灭菌程序设计要求中确定的足够的杀灭时间（见 4.1 小节），应当选择恰当的生物指示剂进行挑战试验，以获得有意义的结果。为此，BI 系统（生物指示剂挑战系统）的形式应当随不同的装载形式而异，其耐热性及挑战的规模应适合预期的目的。应使用这些生物指示剂确认的数据来计算灭菌程序的生物杀灭时间 F_{BIO} 。

5.2.1.1 挑战系统中生物指示剂数量和耐热性的确定

可以用半对数模式来确定生物指示剂确认中所用生物指示剂的特性（如数量、耐热性）。所需的杀灭时间应在灭菌程序开发过程中确定。通过等式 1，可以设计出生物指示剂实验系统，以证明实际上灭菌程序已达到了所需要的杀灭时间。应当注意，这是一次 4.1 小节中所述确定产品安全性模式的独立运算。

批注 [d1]: BI 的加入量作为产品的起始浓度处理。将 BI 杀灭的意义是其存活率小于 1，即 N_F 为 $10E0$

批注 [d2]: DH 这是 BI 挑战试验中接种量的计算方法

$$\lg N_F = -F_{(T_Z)}/D_T + \lg N_0 \quad [\text{等式 1}]$$

式中

- F = 灭菌程序设计过程中期望获得的灭菌时间
- D = 挑战试验中 BI(生物指示剂)的耐热性
- N_0 = 生物指示剂的起始浓度
- N_F = 灭菌程序结束后，生物指示剂的存活数量。为了方便计算，如果将生物指示剂杀灭，可以认为存活数小于 1，在此等式中，可以 $N_F=10^0$ 表示。

将等式 1 重排，[可以](#)确定达到生物杀灭时间（ F_{BIO} ）要求时，生物指示剂应取的[最低](#)初始[菌](#)的数量。

$$\lg N_0 = \lg N_F + F/D$$

下一页的表格中提供了生物指示剂确认方法的示例，它描述了杀灭时间（ F ）、生物指示剂数量（ N_0 ）、残存数量（ N_F ）以及 D 值[在计算中](#)的相互关系，[以便确定能用来确认灭菌工艺的生物指示剂系统](#)。这些计算假设灭菌程序是在理想条件下（如空气完全移除、纯饱和蒸汽、生物指示剂数量/耐热性没有变化）。参考 4.4.1.6 小节中有关一致性的讨论，这个一致性应作为确认试验的先导并[在开发过程中就建立](#)。应注意，计算的杀灭时间（ F 值）是灭菌程序的最低杀灭时间，而产品从[最低合格灭菌程序](#)（MAC）[获得的](#)杀灭时间 F 值要大得多。

5.2.2 生物指示剂的使用和放置

对于采用过度杀灭法的灭菌程序，BI 系统主要是嗜热脂肪芽孢杆菌的孢子，接种在待灭菌产品上、纸上、其他适当基质上，或系市售的生物指示剂制品。

按产品特性设计的方法，其热输入量比较低。因此，在确认试验中使用的 BI 的耐热性通常小于嗜热脂肪芽孢杆菌的孢子。在 3.2.1 小节中讨论了湿热灭菌确认中广泛应用的生物指示剂。不管所选挑战菌的耐热性如何，确定生物指示剂系统特性的半对数模式，也可从生物学角度来判断灭菌程序是否符合要求。

5.2.2.1 液体装载灭菌程序的确认

为了对液体装载的生物指示剂进行确认，在密封的、灌封液体的容器和密封件上要接种适当的 BI。液体介质可以是产品或[适当](#)的代用品。如果液体产品含有防腐剂或其他抗生素成分，它们有抑制微生物生长的作用，可能有必要用液体替代品作为悬浮剂。使用何种产品作为悬浮剂需要有试验数据的支持，证明它们不抑制微生物的生长。

BI 通常[被](#)随机地或以几何模式放置在整个装载区的容器中，此外，还应放[置](#)在开发阶段确定的冷点位置。热穿透试验探头应放置在接种容器旁边的容器里，以监测灭菌程序的热输入情况。

5.2.2.2 多孔/坚硬装载灭菌程序的确认

多孔/坚硬装载生物指示剂确认中所用的生物指示剂主要由市场购得，它们可以[放置](#)在纸上、不锈钢、铝或其他基质上。另一种可选的方式，是将孢子接种在设计试样上。密封在安瓿中的生物指示剂可能并不能反映多孔/坚硬装载的实际情况。

将 BI 挑战系统放置在物品加热最慢的部位，通常认为那里也是最难灭菌的部位。举例来说，这些部位可能存在于筒式过滤器的褶皱中，或者在长软管的中部（那里可能夹带空气），或者在蒸汽难以穿透的橡胶塞上。

为了评价 F_{PHY} 和 F_{BIO} 之间的关系，生物指示剂应靠近温度传感器放置。在放置温度探头和 BI 指示剂的时候，要注意避免人为地增加或减少某一区域空气的去除或者蒸汽的穿透。为了得到有代表性的结果，也许有必要在装载中放置两个相同的物体，其中一个插入温度探头，另外一个则含有生物指示剂。

5.3 灭菌程序性能确认合格标准

应在试验方案中清楚地明确物理和生物确认的合格标准。这些标准应根据待灭菌产品的类型、采用的灭菌方法、适当的法规要求以及在灭菌程序开发时确定的运行参数等确定。

典型的物理确认的合格标准示例如下：

- 用热穿透探头测得超过设定温度的最短及最长时间
- F_0 的下限及上限
- 灭菌阶段结束时的最低 F_0 值
- 灭菌阶段的最低和最高压力
- 饱和蒸汽温度和压力之间的关系
- 灭菌阶段腔室的最低和最高温度
- 热穿透温度探头之间的最大温差或 F_0 的变化范围
- 热分布试验中温度探头间的最大温差
- 最长平衡时间
- 最少正常运行的探头数

典型的生物确认合格标准示例如下：

- 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

除符合以上合格标准外，如果灭菌程序开发过程中对 F_{PHY} 和 F_{BIO} 之间的大体一致性没有加以论证，则应在灭菌程序性能确认中进行论证。

灭菌程序确认示例

例 1

采用按产品特性设计的期望的最短物理杀灭时间 (F) 为 6.0 分钟，本确认方案预期生物指示剂残存数 ($N_F=10^0$)， D 值为 1.2 分钟。挑战试验用的生物指示剂初始菌数 (N_0) 可以通过以下方法计算得到：

$$\begin{aligned}\lg N_0 &= \lg N_F + F/D \\ &= \lg 10^0 + 6.0/1.2 \\ \lg N_0 &= 5 \\ N_0 &= 1 \times 10^5\end{aligned}$$

因此，为了保证能达到 $F_{BIO} \geq 6.0$ 分钟的设计要求，最低合格灭菌程序应该完全杀灭 $N_0=10^5$ 、 D 值为 1.2 分钟的生物指示剂。因为已经确定 $F_0=6.0$ 分钟作为产品安全的最低标准灭菌时间，最低合格灭菌程序很可能会超过这个最低的 F_{PHY} 值。

例 2

对于过度杀灭的设计工艺，期望的物理杀灭时间 F_{PHY} 和 F_{BIO} 均大于或等于 12 分钟。如果确认试验中使用耐热性为 2.1 分钟的生物指示剂，那么完全杀灭挑战试验中生物指示剂的最低 (N_0) 可以通过以下方法计算得到：

$$\begin{aligned}\lg N_0 &= \lg N_F + F/D \\ &= \lg 10^0 + 12/2.1 \\ \lg N_0 &= 5.71 \\ N_0 &= 5.2 \times 10^5\end{aligned}$$

因此，能杀灭 $N_0=5.2 \times 10^5$ 、 D 值为 2.1 分钟的生物指示剂的最低可接受灭菌程序，即是经生物指示剂确认的过度杀灭程序 ($F_{BIO} \geq 12.0$ 分钟)。

例 3

可将一个确认试验设计成这样的终点，即没有必要将 BI (N_F) 完全杀灭。如果设计要求为 $F_0=8$ 分钟；生物指示剂的起始数量 (N_0) 为 2×10^6 ； D 值为 2.1 分钟，那么终点 (N_F) 的最大值可以通过计算得到，并仍然可以保证灭菌程序赋予了被灭菌品期望的 F_{BIO} 。

$$\begin{aligned}\lg N_F &= \lg N_0 - F/D \\ &= \lg 2 \times 10^6 - 8.0/2.1 \\ \lg N_F &= 6.3 - 3.8 = 2.50 \\ N_F &= 3.2 \times 10^2\end{aligned}$$

因此，如果最低合格灭菌程序 MAC 能使 D 为 2.1 分钟的 BI 由 $N_0=2 \times 10^6$ 降至 $N_F 3.2 \times 10^2$ (终点值) 时，则证明生物杀灭时间 $F_{BIO} \geq 8$ 分钟。

删除的内容: 低

删除的内容: 于

例 4

也可采用半周期灭菌的确认方法。使用过度杀灭设计方法，采用半周期灭菌法确认时，要求产品/物品获得的最小 F_{BIO} 为 6 分钟， D 为 1.0 分钟的生物指示剂最低灭活数可以通过以下方法计算：

$$\begin{aligned}\lg N_0 &= \lg N_F + 0.5 \times (F/D) \\ &= \lg 10^0 + 0.5 \times (12/1.0) \\ \lg N_0 &= 6.0 \\ N_0 &= 1.0 \times 10^6\end{aligned}$$

因此，如果采用半周期灭菌的确认方法，则须将 D 值为 1.0、数量为 10^6 的生物指示剂杀灭，才能证明 $F_{BIO} \geq 12$ 分钟。

5.4 等效灭菌器

两个或多个设计相似的灭菌器（包括它们相关的公用设施），可确立它们运行的等效性，并减少工艺确认试验的工作量。建议采用比较系统、完善的风险管理方法来证明这一做法的合理性。例如，如果含有多个参数难于控制的灭菌工艺（如预真空工艺），与参数易于控制的灭菌工艺相比，确定等效要困难得多。要减少确认试验，可能需监管部门的批准。在开始时，所有灭菌器必须通过确认灭菌器的运行参数以证明灭菌器之间的等效性。

使用相同的灭菌参数、装载结构（如产品、处方、容器规格、灌装体积、胶塞、设备或

装载方式)并对灭菌器运行的结果进行比较,可确定灭菌器之间运行的等效性。用以进行等效比较的标准还应该包括关键和重要参数、热分布、热穿透、 F_0 范围和微生物的灭活情况。

5.5 分组法

可以将产品处方设计、容器规格、灌装体积、物品或装载分组,以减少确认的工作量。分组法可分为单端分组法(要求鉴别出最差情况)和双端分组法(要求对被灭菌品的结构和配置加以确认)。最差情况的挑战试验需根据科学原理实施,或通过热穿透或生物灭活试验来确定。

5.5.1 典型产品法

可采用典型溶液法(master solution approach)将处方分组,进行生物指示剂确认。将挑战微生物试验中耐热性最大的产品作为一个典型,来代表耐热性差的各种处方的产品。通常用耐热性测试仪来测定耐热性。关于耐热性的测试详见 3.1.1 节 D 值的测试。

可采用典型溶液法将处方分组,进行物理确认。处方中粘度最大的产品的确认可以涵盖低粘度的产品。

5.5.2 典型容器规格/装量法

如果采取同一个灭菌参数,则可将设计类似、不同规格和装量的液体分为一组。采用该方法时,用最大装量的最大容器和最小装量的最小容器作为代表来确认中等规格及中等容器的产品。

5.5.3 典型物品法

也可考虑多孔/坚硬装载的代表性问题。即用最难灭菌的物品来代表较易灭菌的物品。例如,相同材料、直径、管壁厚度、相同的放置方向及包扎的待确认管子,如果长度不同,则可用最长的管子为代表,来确认较短的管子。

5.5.4 典型装载法

多孔/坚硬装载进行分组确认,要求对物品作最长加热时间(因质量大)和或最小和最大装载条件下空气去除的确认试验。就最小装量而言,在确认时,可能只需要做腔室的最大加热和/或空气去除的挑战性试验。

如需操作的灵活性,而导致装载规格/大小变化时,应确定最小及最大装载。每个灭菌器,至少进行三次连续的生物指示剂合格试验。对没有固定的加热及冷却速率/次数的灭菌程序而言,最低装量通常需要进行低热量输入的确认试验,而最大装载则应当进行挑战试验。如果进行风险评估且认为符合要求时,重复试验可以减少。

6.0 日常工艺控制

灭菌程序的开发及性能确认完成以后，需要对灭菌工艺加以监控，以保证灭菌程序处于受控的状态。日常灭菌程序监控计划的重要内容包括：对常规灭菌程序关键和重要参数的回顾检查；确认灭菌器的适用性；制订并实施有效的变更控制、校准、维修保养计划；以及进行灭菌程序的再验证。

6.1 常规放行

在常规灭菌程序中，已确认的标准、关键运行参数合格后，才能放行无菌装载。此外，可能还需要药典无菌检查的合格结果来支持产品的放行。

4.4 小节中讨论了灭菌程序开发过程中确定的关键和重要操作参数，在运行确认和性能确认中，对这些参数进行了确认，以确立灭菌器性能的基线。应当对日常运行的灭菌参数进行评估，确保它们在确认的范围之内。所有关键参数必须合格，才能放行产品。还应当对指示灭菌程序受控的重要参数进行评估。如有一个重要参数不符合，那么，就必须找到比较完整的科学依据来支持产品的放行。不管灭菌器中灭菌的产品是否经参数放行销售，或需要无菌检查或灭菌后作进一步加工，对运行参数的回顾性审核是至关重要的。

6.2 灭菌器系统的适用性试验

系统的适用性应与产品的放行计划融为一体。然而，这类测试的需求和频率是由最终用户根据内部或可能的法规要求来决定的。系统适用性试验通常包括：

- 空气去除的测试：证明空气去除符合以饱和蒸汽预真空程序对多孔装载物进行灭菌的要求。
- 腔室泄漏测试：证明腔室的泄漏速率低于最大允许值。用饱和蒸汽预真空程序对多孔装载物灭菌时，建议进行本试验。
- 空气检测设备：空气检测的合格结果，可以作为饱和蒸汽预真空灭菌程序灭菌多孔/坚硬装载放行的支持性数据。使用经恰当确认的空气检测设备，可减少腔室泄漏检查和空气去除测试的次数。并非所有灭菌器都具备这一测试设备。空气检测设备通常安装在灭菌器腔室的排水管附近。
- 化学指示剂/综合化学指示剂的结果²⁵：合格的结果可证明装载经过灭菌。在某些情况下，它还可以测量灭菌器中具体的时间/和/或温度条件。

6.3 变更控制

为了维持灭菌系统的受控状态，应有一个变更的控制程序。这个程序应该记录灭菌系统

²⁵ 译注：本文中并没有提到其它能够同时累计温度和时间灭菌效果的物理积分器，只提到了化学指示剂/综合化学指示剂。

的变更、产品的变更，以及包括保证任何已确认的控制状态所需试验的文件和记录。

灭菌器腔室的改变、产品支架/灭菌车的设计、装载的排列、灭菌介质的供应/分配系统及灭菌器运行/控制模式的变更，可能有必要进行热分布、热穿透及/或微生物挑战试验。只要证明不影响灭菌器的性能，一个灭菌器系统中相同或相似设备、零件的更换不属于重要变更。

设计、建材、物品或产品的耐受性、质量、排气、处方或包装等产品的变更，可能需要进行热分布、热穿透及/或生物指示剂的再确认。

当对灭菌系统有重要修改时（直至设备退出使用前），或产品对灭菌工艺效果有潜在影响时，可能需要对灭菌程序进行再确认。

变更控制方案应该明确与变更相关的确认文件和记录，包括：

- 对建议变更的详细说明
- 有关变更的理由/基本原理的书面依据
- 关于变更后，对灭菌程序所需试验内容的说明，或变更对灭菌程序效果没有影响的技术性资料（微小的变更）
- 应进行试验的支持性文件，对结果的解释以及结论
- 确认相关文件已经更新
- 质量部门和其他相关部门的代表对变更控制方案的批准

6.4 灭菌程序定期再确认

应定期进行再确认（通常为每 12 个月），以保证产品或灭菌程序没有发生未检出的变更情况。

再确认采用的运行参数和合格标准应与初始确认的相同。按性能确认计划所作试验的支持性文件，必要时应包括原始确认文件中概述的信息。要检查多孔/坚硬物品灭菌中蒸汽质量的标准。再验证的结果应证明灭菌器的性能从开始投入运行后没有发生改变。

再确认试验中应包括最难灭菌的装载。确定灭菌器等效后（见 5.4 小节），可以适当减少再确认的工作量。例如，在使用等效灭菌器对多个产品进行灭菌时，没有必要在每个灭菌器对每个产品一一进行再验证。

再确认也应该包括对各种来源的监控数据的回顾资料（如工程、维修和校准 BI 耐热性测试数据），以证明无偏离确认过程中所建立基线的不良趋势或漂移情况。对变更控制文件的回顾审核应作为再确认工作的一部分。变更控制的信息请参见 6.3 小节。

7.0 参考文献

1. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.3
2. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.6

3. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.6
4. USP 29, NF-24, Pure Steam Monograph (2006) USP 30, NF-25, <1231> Water for Pharmaceutical Purposes (2006) pp 687-706
5. ISO 18472:2006, Sterilization of Healthcare Products – Biological and Chemical Indicators – Test Equipment
6. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.46
7. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.51
8. ISO/TS11139:2006, Sterilization of health care products – Vocabulary. Definition 2.52
9. Rahn, Injury and Death of Bacteria by Chemical Agents, Biodynamica, Normandy, MO, (1945)
10. Pflug, I.J. and Holcomb, R.G., Gomes, M., Chapter 6, Principles of the Thermal Destruction of Microorganisms, S.S. Block (ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation, 5th Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, Pa. (2001) pp 79-129
11. USP 30, NF-25 <55> Biological Indicators-Resistance Performance Tests (2006) pp 81-83
12. ISO 11138-1:2006 Sterilization of Healthcare Products – Biological Indicators
13. Pflug, I.J., Chapter 7-Analysis of Microbial-Survivor Data, Microbiology and Engineering of Sterilization Process, 11th Edition, Environmental Sterilization Laboratory Minneapolis, MN (2006)
14. Stumbo, C.R., Murphy, J.O., Cochran, J., “Nature of Thermal Death Time Curves for P.A. 3679 and Clostridium botulinum. Food Res. (3), (1950) pp 323-346
15. Halvorsen, H.O., Ziegler, N.R., “Applications of Statistics to Problems in Bacteriology,” Journal Bacteriology (25), (1933) pp 101-121
16. Pflug, I.J., Microbiology and Engineering of Sterilization Process, 12th Edition, Parenteral Drug Association (2007)
17. Pflug, I.J., Chapter 6, Gathering Experimental Microbial-Kill Data, Microbiology and Engineering of Sterilization Process, 12th Edition, Parenteral Drug Association (2007)
18. Fundamental Process Control Theory, Instrumentation Society of America (1981)
19. Kemper, C. and Harper, G., Probe Induced Errors, Pharmaceutical Technology (November, 1978)
20. Reed, R.P., Thermoelectric In Homogeneity-Obstacle to Quality, in National Conference of Standards Laboratories, Albuquerque, NM (1998)
21. Pflug, I.J., Chapter 10, General Method of Heat-Process Evaluation, Microbiology and Engineering of Sterilization Processes, 12th Edition, Parenteral Drug Association (2007)
22. USP 30, NF-25 <1035> Biological Indicators For Sterilization (2006)
23. ISO 18472:2006, Sterilization of Healthcare Products – Biological and Chemical Indicators – Test Equipment
24. FDA, Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good

25. Berger, T.J., Nelson, P.A., “The Effect of Formulation of Parenteral Solutions on Microbial Growth – Measurement of D- and z-values”, *PSA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* (49)(1), (1995) pp 32-41

2009-04-12



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