

## 5 质量控制实验室总体描述

### 5.1 职责

#### 【背景介绍】

质量控制涵盖药品生产、放行、市场质量反馈的全过程，负责原辅料、包材、工艺用水、中间体及成品的质量标准和分析方法的建立、取样和检验，及产品的稳定性考察及市场不良反馈样品的复核工作。质量控制的职责也可涵盖产品过程控制。

质量控制实验室的具体工作包括但不限于以下内容：

- 5.1.1 确保实验室安全运行，并符合 GMP 管理规范。
- 5.1.2 根据药典、申报标准及各种法规要求制定原辅料、包材、工艺用水、产品过程控制、中间体及成品的质量标准及分析方法。
- 5.1.3 组织取样、检验、记录、报告等工作。
- 5.1.4 对于检验过程中发现的异常现象应及时向质量保证部及相关生产负责人通报，并调查是否为实验室原因，如确认无可查明的实验室原因，应并协助查找其他原因。
- 5.1.5 保留足够的起始物料和产品的样品（即留样），以便以后必要时对产品进行跟踪检测。
- 5.1.6 根据需要制定稳定性试验方案，并确保其具体实施。
- 5.1.7 确保用有效的体系来维护、维修和校验实验室仪器设备。
- 5.1.8 参加与质量有关的客户审计。
- 5.1.9 参加与质量有关投诉的调查。

#### 5.2 布局

##### 5.2.1 原则

实验室的设计应确保其适用于预定的用途，并能够避免混淆和交叉污染，应有足够的区域用于样品处置、留样和稳定性考察样品存放以及记录的保存。

##### 5.2.2 要求

5.2.2.1 质量控制实验室通常应与生产区分开，生物检定、微生物和放射性同位素的实验室还应彼此分开，无菌检查实验室、微生物限度检查实验室、抗生素效价测定实验室、阳性菌实验室也应彼此分开。

5.2.2.2 实验室的设计必须与生产要求相适应。必须有足够的地方避免混淆和交叉污染。同时还应有足够的区域用于样品处置、留样和稳定性考察样品的存放及记录保存。

5.2.2.3 必要时设置专门的仪器室，使灵敏度高的仪器免受静电、震动、电磁干扰、潮湿等因素的干扰。

5.2.2.4 处理生物或放射性样品等特殊样品的实验室应符合特殊要求。

5.2.2.5 用于微生物检验的实验室应有符合无菌检查法和微生物限度检查法要求的、用于具有开展无菌检查、微生物限度检查等检测活动的、独立设置的洁净区或隔离系统，并为上述检验配备相应的阳性菌实验室、培养室、实验结果观察区、培养基及实验用具准备区、标准菌种储存区、污物处理区

等。

### 5.3 人员

#### 5.3.1 组织架构

质量控制部负责人必须由具有相应的资格和经验的人员担任,可以根据生产规模设立一个或几个化验室,例如微生物实验室、化学实验室、原辅料实验室、包材实验室等。

#### 5.3.2 资质要求

5.3.2.1 负责质量检验的人员应受过适当教育,并经专业技术培训,具有基础理论知识和实际操作技能。

5.3.2.2 质量控制实验室所有人员的职责应当书面规定。

#### 5.3.3 培训

5.3.3.1 应有经质量管理负责人审核或批准的有关培训的 SOP、方案或计划,培训记录应保存。

5.3.3.2 应当由有资格的人员进行有计划的培训,内容至少包括员工所从事的特定操作及和其职能有关的 GMP 知识,并应对培训效果进行评估。

5.3.3.3 进入洁净区域的人员需按规定进行相关培训。

5.3.3.4 培训的分类:

5.3.3.5 新化验员的培训:分配到实验室的新员工(包括转岗人员)应接受岗前培训,考核合格后方可进行独立操作。岗前培训的内容至少涵盖以下内容:部门统一的 GMP 管理培训;指定岗位的岗位职责;指定岗位应知应会的标准操作规程、质量标准和分析方法的学习等。

5.3.3.6 在岗化验员的再培训:应定期组织化验员进行 GMP、其他法规要求,以及专业技术知识、标准操作规程等的培训;应组织化验员对新发布的标准操作规程的学习;质量控制部负责人可以根据工作需要安排化验员参加权威机构或仪器供应商组织的专业知识培训;如有必要,质量控制部负责人或其授权的人员可定期组织进行化验员知识及技能的考核。

### 5.4 文件系统

5.4.1 分类 质量控制实验室的文件应符合 GMP 第八章《文件管理》的原则。大体可分为以下几类文件:

5.4.1.1 质量标准及分析方法。

5.4.1.2 取样操作规程和记录。

5.4.1.3 实验室样品的管理规程。

5.4.1.4 检验记录、原始数据、超标结果的处理

5.4.1.5 检验报告或证书。

5.4.1.6 环境监测操作规程和记录。

- 5.4.1.7 生产用水的监测操作规程和记录。
  - 5.4.1.8 检验方法验证方案及报告。
  - 5.4.1.9 实验室分析仪器的使用、校准和维护的操作规程及记录。
  - 5.4.1.10 实验室分析仪器的确认方案及报告。
  - 5.4.1.11 实验室试剂的管理规程及配制、使用记录等。
  - 5.4.1.12 标准品的管理规程及标定、使用记录等。
  - 5.4.1.13 菌毒种的管理规程及记录。
  - 5.4.1.14 实验室剧毒物品易制毒的管理规程及记录。
- 5.4.2 要求 质量控制部实验室的所有文件应受控管理，包括起草、修订、发放、存档、销毁等。下面对 5.4.1 中的内容逐项描述：
- 5.4.2.1 质量标准和分析方法应和注册/申报中的一致或高于注册/申报标准，可以增加注册/申报标准以外的附加检验项目。
  - 5.4.2.2 应该有关于原辅料、包装材料、中间体及成品的取样规程，应**包括经授权的取样人、取样方法、所用器具、取样量、取样后剩余部分及样品的处置和标示，以及为避免因取样过程产生的各种风险的预防措施等**。应做好取样记录，内容至少包括样品名称、批号、取样日期、取样量、取样人等。
  - 5.4.2.3 应该有样品的管理规程，包括样品的接收、传递、储存和销毁过程。
  - 5.4.2.4 检验记录的内容必须和质量标准/分析方法一致，**检验记录应涵盖检验过程的所有信息。所有检验记录应该受控管理。**
  - 5.4.2.5 **全部的原始数据和计算必须受控管理，不得随意转抄，更不能擅自将受控记录更换或销毁。**检验记录必须由**第二人复核，负责对原始记录的准确性、完整性和规定标准的符合性进行复核**。如因意外情况将某页原始记录污染或损坏，需要更换和转抄原始数据时，必须经主管人员认可后到记录管理员处领取新的空白记录（新的记录编号要与原来的加以区分）进行更换。所有转抄数据必须在另外一人进行复核，转抄人及复核人应在转抄记录上签名、签日期。原记录须保存在该批记录的后面，作为本批记录的一部分，不得丢弃或销毁。
  - 5.4.2.6 如果以纸质记录为存档文件，原始数据如色谱图、光谱图等应打印出来，签字并附在批检验记录中。由仪器打印的数据（如：水分滴定结果、温湿度记录等），化验员应在最终结果后签字确认。**易褪色打印数据，如热敏打印数据，应有复印件保存。**
  - 5.4.2.7 如使用电子数据处理系统、照相技术或其它可靠方式记录数据资料，应有所用系统的详细规程；记录的准确性应经过核对。如果使用电子数据处理系统，应建立系统受权管理，任何更改情况均应有记录便于追踪；应使用密码或其它方式限制数据系统的登录；关键数据输入后，应由他人复核。用电子方法保存的批记录，应采用磁带、缩微胶卷、纸质副本或其它方法进行备份，以确保记录的安全，且数据资料在保存期内应便于查阅。

- 5.4.2.8 与批记录相对应的所有控制记录必须至少保存至产品有效期后一年，确认和验证、稳定性考察的相关记录和报告等重要文件不得销毁。
- 5.4.2.9 实验室偏差和超标结果应如实记录，并进行相应的调查。详细要求可见第 14 章《超出标准的实验结果》。
- 5.4.2.10 检验报告或证书
- 5.4.2.11 根据需要对每一批所检验产品出具检验报告单。
- 5.4.2.12 检验报告单应当提供所检验产品的名称、批号，必要时包括其规格和报告日期。有有效期的产品，可以在标签或分析报告单上提供失效期。有复验期的产品，可以在标签或分析报告单上提供复验期。
- 5.4.2.13 检验报告单应当列明按药典或客户要求所做的各项测试，包括可接受的限度和得到的结果。
- 5.4.2.14 检验报告单应当由指定的质量部门人员签名、签日期。如有要求，检验报告还应注明原制造商的名称、地址和电话。
- 5.4.2.15 如果由重新包装者/重新加工者、代理人、中间人或由其代表出具新的报告单，这些报告单上应当注明做分析的实验室的名称、地址和电话。还应当附注原制造商的名称和地址，以及原制造商的报告单的复印件。
- 5.4.2.16 有洁净厂房或（和）实验室的工厂应该有环境监控的规程，包括取样方式、取样频率、取样点、警戒限、行动限及异常结果的调查及处理等内容。环境监控记录至少包括取样点、取样日期、取样方式、取样人、结果等内容，并应定期做趋势分析。
- 5.4.2.17 工厂的生产用水应在制定规程的基础上定期监测，包括生产用水的种类、取样点、取样方法、取样频率、检验项目、接收标准及异常结果的调查及处理等内容。生产用水的检验记录至少包括取样日期、取样点、检验日期、检验项目等内容，每次检验都应有检验报告单。应定期对其关键项目进行趋势分析。
- 5.4.2.18 分析方法验证方案和报告应该包括验证目的、适用范围、职责、验证项目及标准、方法描述、验证结论等。
- 5.4.2.19 应该有实验室仪器的使用、校准及维护的规程及记录。使用规程应包括仪器的开关机、具体操作步骤、使用注意事项等；校准规程应包括校准周期、校准内容、校准项目及标准，还应规定校准失败后应采取的措施等等；仪器的维护规程应包括维护项目、维护周期等内容。仪器的使用、校准及维护都应如实记录。
- 5.4.2.20 实验室仪器的验证包括设计确认（DQ）、安装确认（IQ）、运行确认（OQ）、性能确认（PQ）等内容。具体要求参见第 10 章《实验室分析仪器的验证》。所有验证文件应长期保存。
- 5.4.2.21 实验室应有试剂的管理规程，包括试剂的领用、登记、储存、使用等规定。实验室配制的试剂应有配制记录。
- 5.4.2.22 实验室应有标准品的管理规程，包括法定标准品和工作标准品的管理。来源于 CP、EP 或 USP/NF 的标准品不需要进一步标定。非官方来源的标准品应当通过合理的工作获得最高的纯度，应当全面测定确保其鉴别、效

力、质量、纯度、和效价。标准品的管理应涵盖标准品的使用、内部标准品的标定，标准品的保存等内容。工作标准品应该用法定标准品进行标定，并做好记录。所有相关标准品都应建立使用记录。

5.4.2.23 实验室如果使用菌毒种，应该有相应的规程规定菌毒种的领用、登记、储存、使用及销毁等，并应有详细的记录。

5.4.2.24 实验室用到的剧毒物品如砷化物、可溶性钡盐等应有相应的管理规程，必须严格按照剧毒物品的管理规定执行，并建立试剂配制记录、使用记录和销毁记录等。

## 7. 取样

本章中您将找到以下问题的答案：

- 什么地方需要取什么样品？
- 对于取样人员、取样间和取样设备有什么需求？
- 取样的流程，以及在制定取样流程时需要考虑哪些方面？
- 取样文件有哪些要求？

### 【法规要求】

#### 第二百二十九条 取样

应有取样的操作规程，包括：经授权的取样人、取样方法、取样用设备、取样量、取样后剩余部分及样品的处置和标识，以及为避免因取样过程产生的各种风险的预防措施等。

1. 质量管理部门的人员有权进入生产区和仓储区进行取样及调查。
2. 应按照经批准的操作规程取样，操作规程应详细阐述：
  - (1) 取样方法；
  - (2) 所用器具；
  - (3) 样品量；
  - (4) 分样的方法；
  - (5) 存放样品容器的类型和状态；
  - (6) 样品容器的标识；
  - (7) 取样注意事项，尤其是无菌或有害物料的取样以及防止取样过程中污染和交叉污染的注意事项；
  - (8) 贮存条件；
  - (9) 取样器具的清洁方法和贮存要求。
3. 取样方法应科学、合理，以保证样品的代表性。
4. 留样应能代表被取样批次的产品或物料，也可抽取其它样品来监控生产过程中最重要的环节（如生产的开始和结束）。
5. 样品的容器应贴有唯一性的标签标明内容物，注明样品名称、批号、取样日期、取自哪一包装容器、取样人。
6. 样品应按规定的贮存条件保存，成品的样品应按照注册批准的成品贮存条件保存。

#### 第二百三十二条 留样

1. 企业按规定保存的、用于药品质量追溯或调查的物料、产品样品为留样。用于产品稳定性考察的样品不属于留样。
2. 应按照经批准的操作规程对留样进行管理。
3. 留样应能代表被取样批次的物料或产品。
4. 成品的留样
  - (1) 每批药品均应有留样；如果一批药品分成数次进行包装，则每次包装应至少保留一件最小市售包装的成品。
  - (2) 留样的包装形式应与药品市售包装形式相同，原料药的留样如不采用市售包装形式的，可采用模拟包装。
  - (3) 每批药品的留样数量一般应至少能确保按照注册批准的质量标准完成二次全检（无菌检查和热原检查等除外）。
  - (4) 如果不影响留样的包装完整性，保存期间内应至少每年对留样进行一次目检观察，如有异常，应进行彻底调并采取相应的处理措施。
  - (5) 留样观察应有记录。

(6) 留样应按注册批准的贮存条件至少保存到药品有效期后一年。

(7) 如企业终止药品生产或关闭的，应将留样转交授权单位保存，并告知当地药品监督管理部门，以便在必要时可随时取得留样。

5. 物料的留样

(1) 制剂生产用每批原辅料和与药品直接接触的包装材料均应有留样，与药品直接接触的包装材料（如输液瓶），如成品已有留样，可不必单独留样。

(2) 物料的留样量应至少满足鉴别要求。

(3) 除稳定性较差的原辅料外，用于制剂生产的原辅料（不包括生产过程中使用的溶剂、气体或制药用水）和与药品直接接触的包装材料的留样应至少保存至产品放行后二年。如果物料的有效期短，则留样时间可相应缩短。

物料的留样应按规定的条件贮存，必要时还应适当的包装密封。

## 【背景介绍】

### 7.1 定义

为确定药品或物料的质量是否符合预先制定的质量标准，需要根据制定的取样方案对药品或物料进行取样，取样方案中应明确取样的方法、所用的取样工具，确定取样点、取样频率以及样品的数量和每个样品的重量，盛装样品用的容器等。取样是整个质量控制过程非常重要的一环，对于从某批产品中取出的样品，虽然数量很小，但是对整批产品的质量来说却是具有代表性的。因此有必要非常仔细的制定取样计划、执行取样程序。

### 7.2 应用范围

药品生产的各个环节都有可能需要取样进行质量检查，但是制程验证、清洁验证和环境监测相关的取样不会在此论述，因为制程验证和清洁验证的取样都将根据相应的验证草案进行取样，对于环境监测的取样则将在微生物章节进行论述。取样操作主要服务于以下生产阶段的质量控制：

- 原材料（包括辅料、活性成分和包装材料）
- 中间产品
- 中间过程控制的取样
- 成品（包括留样的取样）

## 【技术要求】

### 7.3 要求

#### 7.3.1 人员

选择取样人员时应该具备以下几方面的品质：

- 良好的视力和对颜色分辨、识别的能力
- 能够根据观察到的现象做出可靠的质量判断和评估（例如检查要取样物料的包装状况）
- 有传染性疾病和在身体暴露部分有伤口的人员不应该被安排进行取样操作
- 取样人员还要对物料安全知识、职业卫生要求有一定了解

取样人员应该接受相应的培训使其熟悉取样方案和取样流程，他们必须掌握取样技术和取样工具的使用，必须意识到在取样过程中样品被污染的风险并采取相应的安全防范措施，同时应该在专业技术和个人领域得到持续的培训。

取样人员的培训应该涵盖以下方面：

- 取样方案的制定（取样指南）
- 取样程序，包括样品的采集方案
- 取样技能以及取样器具的使用（取样工具和样品容器）
- 取样时应采取的安全措施（包括预防物料污染和人员安全防护）
- 样品外观检验的重要性（样品观察的第一眼原则）
- 对异常现象的记录（例如包装被污染或破损）
- 取样器具和取样间的清洁

### 7.3.2 取样器具

应该根据要取的样品选择合适的取样器具。取样器具应该具有光滑表面，易于清洁和灭菌。取样器具使用后应该立即清洁，必须在清洁、干燥的状态下保存，再次使用前应进行消毒，用于微生物检验样品或无菌产品取样时必须先灭菌。破损的取样器具必须被明确标识并立即停止使用。一般用来取原辅料的取样器具有浸取式吸管、分层取样器、吸管、塑料勺、标签和密封条等，生产单位应该尽可能从有资质的供应商处购买此类取样器具。

### 7.3.3 样品容器

取样用样品容器一般需满足以下要求：

- 易于装入样品
- 易于倒出样品
- 容器表面不吸附样品
- 易于密封和存储
- 重量轻、便于携带
- 如需要应该能够避光

### 7.3.4 取样间

取样间不能使用易产生颗粒物的材质，应易于被有效清洁和消毒。取样间室内表面（天花板、墙面和地板）应尽可能的保持光滑无痕。取样间一般应在特殊房间或特别设计的房间（包括生产区间里的取样间），**取样间的洁净级别应等同生产区域**，如需要应该有防爆功能，取样间应装备有良好的灯光、满足取样时对温湿度的要求和充分的通风设施（例如装备抽气单元、高效滤膜和层流单元）。**只有经过授权的人才有限进入取样间，同时必须准备相应的规程以规定取样间的清洁程序和清洁频次，取样间环境的监测。**

## 【实施指导】

### 7.4 流程实施

#### 7.4.1 取样方案

取样方案是根据物料或药品中要取的样品数量（一个或多个样品）而预先制定的取样程序。其中包括取混合样品，例如从 $\sqrt{n}+1$ 个包装中取样混合进行微生物或理化分析；同时亦包括基于取样量和应取样包装数确定的各初始样品，例如从不同包装中取样的单一用于鉴别实验；还应该包括留样的存储。样品必须是从整批物料中取出的具有代表性部分（随机样品）。一般来说，取样方案应该清晰定义以下内容：

- 取样的方法
- 取样的工具
- 样品量（一般为 2-3 倍的全检量）以及需要取的样品数量
- 是否有特殊取样要求，例如分包样品
- 样品容器
- 取样完成后被取样包装上的标签
- 避免交叉污染应该采取的措施，特别是对无菌产品
- 对人体毒害的防护措施

样品的存储条件

- 清洁程序以及取样设备的储存方式

需要取的样品数量应该根据相关标准，例如国标 GB/T2828 和 ISO2858 等，基于统计学原理进行计算确定以确保样品有代表性。中间过程控制的样品应该至少从工艺流程的开始、中间和结束过程进行取样。

#### 7.4.2 取样

取样方法必须明确说明，其中信息应该包含样品数量（一个或多个）及每个样品的取样量、样品取样位置（例如底部、下面、里面、外面、上面、中间或者是周边）。如果要取多个样品，应该在取样方法里说明样品是否应该混合。一般用于物料的逐桶鉴别实验的样品不允许被混合。

中间过程控制样品的采集一般由中间控制实验室的人员执行，生产单位应制定相应工艺的关键控制点和取样检测频率。

#### 7.4.3 标识

取回的样品必须要明确标识，标签上至少应该包括以下信息：

- 样品名称
- 样品批号
- 取样日期
- 样品来源（应具体到包装容器号）
- 样品储存条件

如需要应标明样品测试允许时间

## 取样人

取完样之后，被取样的包装容器应该贴上取样标签，同时密封以使贮存阶段内容物产品质量受损的风险降至最小。

### 7.4.4 取样记录

取样过程应该被记录在取样报告或取样记录中。取样记录上应该包含取样计划中的所有内容，如样品名称、批号、取样日期、取样量及样品来源（即样品取自哪个包装）、取样工具以及取样人等信息应该清楚的记录在取样记录中，必要的时候还应在取样记录上注明取样时的温度、湿度以样品暴露时间等信息。

### 7.4.5 取样的异常处理

取样时，取样人员需要对产品（物料）外包装和物料外观进行现场检查，需要检查核对标签，如品名、生产日期和失效日期等信息。如果发现不符合，取样人员应立即停止取样，将观察到的不符合现象记录在取样记录中，并通知公司质量管理相关部门进行调查处理。

### 7.4.6 留样

#### 7.4.6.1 原则

用于留样的样品要能代表整批物料或产品的质量，也可以抽取其它样品来监控生产过程中最重要的环节（如生产的开始和结束环节）。用于药品生产的活性成份、辅料和包装材料均需要留样。

#### 7.4.6.2 数量

一般来说，成品留样量应至少为全检样品量的两倍。对于活性成份、辅料和包装材料的留样量，应至少足够进行鉴别检验。

#### 7.4.6.3 储存条件

成品留样应该以最终市售包装形式，根据批准的储存条件进行储存，至少储存至效期后 1 年。原始物料的储存，如果稳定性许可的话应储存到物料最后使用日期后 2 年，生产过程中用到的溶剂、气体和制药用水不需要留样。

#### 7.4.6.4 使用

留样的使用可以分为主动使用和被动利用两种类型，主动使用是指公司内部主动对留样进行质量追溯。被动使用是指有客户或政府监管机构投诉或其它非预期事件发生，用于质量调查时对物料或产品的质量确认。留样使用之前必须得到所在公司授权部门的批准。

#### 7.4.6.5 文件

留样应有相应的留样记录，记录留样的名称、批号、数量，取样日期，产品（物料）失效日期、储存条件、储存期限以及留样管理人员的签名等信息。

对于成品留样，应至少每年一次对留样外观进行检查并留下检查记录，一般应每年至少对同一产品的 3 批留样进行外观检查。外观检查不应损坏留样包装。在效期内出现外观异常时（例如外包装变形、褪色、字迹不清或掉字等），公司质量管理部门应对异常现象进行全面彻底调查并采取相应措施。

## 【实例分析】

### 7.5 某外资药厂的取样计划示例

该外资药厂将供应商根据其历史供货状况将供应商分成批准级 (Approval)、授权级(Qualified)和认证级(Certified)三个不同等级, 接收物料时, 对于来自不同等级供应商的物料需要进行不同程度的检验。以下是该外资药厂一份针对批准级供应商提供的原料药 A 的取样方案, 该原料要求储存于 2-8℃的环境中:

#### 取样量和取样数量的确定

基于统计原理对来货进行取样, 每一个包装都需要分别取样 2g 根据现行控制方法进行鉴别实验; 从  $\sqrt{n}+1$  个包装中取样混合进行微生物限度实验, 总取样量 20g, 每个取样包装取平均量; 从  $\sqrt{n}+1$  个包装中取样混合进行理化全检实验, 总取样量 40g, 每个取样包装取平均量; 从任意包装中取样 50g 作为留样。

#### 取样工具

不锈钢勺、不锈钢插入式取样枪, 其中用于微生物取样的不锈钢勺须先灭菌并且在灭菌后一周内使用。

#### 盛装样品用的容器

2#自封袋用于装鉴别样品, 5#自封袋用于装理化样品, 经过灭菌的玻璃瓶用于装微生物样品, 棕色玻璃瓶用于装留样。

#### 取样程序

取样之前, 根据现行 SOP 准备样品标签, 标签信息至少应包含样品名称、样品类别、数量、批号、取样日期、取样人等。根据现行 SOP 对取样工具进行消毒并做好消毒记录。

取样过程严格按照现行 SOP 执行, 佩戴口罩、手套、套袖等防护设施, 每一件取样工具只能用于从一个包装中取样。样品取回后应储存于 2-8℃冷藏冰箱。留样交由留样管理员登记接收并尽快转移至冷藏库中储存。

从上述示例可以得到整个取样操作所需要的全部信息, 任何一个合格的取样操作人员都可以根据描述取回样品。这正是一个完善的取样计划所应该达到的目的。

### 【要点分析】

#### 7.6 要点分析

任何时候都必须清楚对于以上提到的各个方面, 没有代表性的样品, 分析并不能得出整批产品质量的准确结论。取样错误会让质量控制程序的余下所有阶段处于令人怀疑的状态。确定分析结果不符合的根本原因是由于取样错误产生的是非常费时和费事的。所以, 有代表性的样品将是实验室能否提供准确可靠的实验结果的最重要前提。为了获得有代表性的样品, 实验室应该重点关注以下方面:

建立取样操作规程, 明确和完善取样计划;

建立取样员的培训制度, 既有新员工的取样技能培训, 还应有持续性的取样技能和相关法规的培训计划。

## 8. 试剂及试液的管理

本章中您将找到以下问题的答案：

试剂与标准品和对照品有什么区别？  
试剂应该怎么标识？  
试剂的用途和稳定性如何规定？  
针对试剂的文件有哪些要求？

### 【法规要求】

第二百三十三条 试剂、试液、培养基和检定菌

1. 试剂和培养基应从可靠的供应商处采购，必要时应对供应商进行评估。
2. 应有接收试剂、试液、培养基的记录，必要时，应在试剂、试液、培养基的容器上标注接收日期。
3. 应按照规定或使用说明配制、贮存和使用试剂、试液和培养基。特殊情况下，在接收和使用前，还应对试剂进行鉴别或其它检验。
4. 试液和已配制的培养基应标注配制批号、配制日期和配制人员姓名，并有配制（包括灭菌）记录。不稳定的试剂、试液和培养基应标注有效期及特殊贮存条件。标准液，滴定液还应标注最后一次标化的日期和校正因子，并有标化记录。

### 【背景介绍】

#### 8.1 定义和应用范围

试药或试剂是实验室对物料或产品进行质量控制的重要组成部分。正是考虑到试剂在质量控制程序中的重要性，要求在试剂准备、配制和文件记录方面应视同标准品或对照品进行管理。欧盟 GMP 实施指南明确要求应该确保试剂质量并按批准的方法配制试液，不管试剂将用于定量分析还是定性分析。化学试剂用于质量控制的各个分析阶段，根据使用领域不一样，可以选择不同级别的试剂。本章主要讨论的是的化学类试剂和试液，培养基的管理将在第 17 章中详细论述。

### 【技术要求】

#### 8.2 要求

##### 8.2.1 采购接收和标识

实验室在接收试剂、试药时，应在每个试剂瓶或包装箱上贴上标签，标签上应注明接收日期和试剂的失效日期。如果试剂生产厂家给出有效期的可以采用厂家的效期，厂家没有明确给出有效期，使用单位应规定使用效期。实验室配制的试剂标签还应标明试剂名称、贮存条件以及试剂配制人和配制日期，若是滴定液还需要标明浓度、校正因子以及标定条件。试剂的第一次开瓶使用者，应将试剂的开瓶日期同时标注于试剂标签上并签名。

试剂标签上的试剂名称可以使用规定的编码代替，但是必须确保编码是唯一的，防止引起试剂与试剂之间或者同种试剂不同批次的混淆。

对于剧毒或易制毒试剂的采购和管理应符合国家相关法规的要求，应该在申请采购之前向相关部门提出申请，接收时应有专门的可控区域进行储存。

##### 8.2.2 储存和使用

如果试剂瓶上有明确的储存条件要求，必须遵照执行。否则，试剂应储存在密闭容器中，避免阳光直射并置于干燥、温度可控的环境中，且试剂库温度应有记录。

原则上，试剂均用于特定的实验目的，如果不能采购到，试剂的配制过程应尽可能详细的描述作为试剂配制指南。

剧毒或易制毒试剂的储存应有专人进行管理，使用应有记录，进行物料数量平衡管理，确保剧毒或易制毒试剂被用于预定用途。

### 8.2.3 试剂使用效期的管理

实验室用到的所有试药和试剂，都应该有合理的有效期。试剂的有效期应该是基于历史数据的总结或者是稳定性研究的结果，并经过质量管理部门的批准。对于采购的试药和试剂，生产厂家的规定应该遵守，对于生产厂家没有规定有效期的试剂使用单位可以根据合理的科学依据规定试剂的有效期，一般来说试药自开瓶之日起最长推荐有效期不应超过 5 年。

### 8.2.4 报废

实验室应该制定相应的试剂报废处理流程，根据不同的试药、试剂特性和相应的法规要求制定相应的报废流程。

### 8.2.5 文件管理

试剂管理的文件一方面应涵盖试剂的接收与配制，另一方面也应涵盖试剂在实验室的使用。

试剂的配制程序必须精确描述，最好是使用同公司实验指南的格式。配制程序中应规定使用试剂的质量等级。试剂配制记录应包含配制日期以及所用试剂的生产厂家、批号等信息。对于实验室配制滴定液，使用单位应该有相应的程序规定其配制和标定，并明确标定与复标的接受标准。

## 9. 标准品/对照品

本章中您将找到以下问题的答案：

标准品/对照品的类型有哪些？  
标准品/对照品的定义？  
为什么要用标准品/对照品？  
标准品/对照品的处理？

### 【法规要求】

第二百三十四条 标准品或对照品

1. 标准品或对照品应按规定贮存和使用。
2. 标准品或对照品应有适当的标识，内容至少包括名称、批号、制备日期、有效期（如有）、首次开启日期、含量或效价、贮存条件。
3. 企业自制工作标准品或对照品的，应建立工作标准品或对照品的质量标准以及制备、鉴别、检验、批准和贮存的操作规程，每批工作标准品或对照品应用法定标准品或对照品进行标化，并确定有效期，还应通过定期标化证明工作标准品或对照品的效价或含量在有效期内保持稳定。标化应有相应的记录。

### 【背景介绍】

#### 9.1 定义

标准品是通过特殊合成工艺单独合成或者是用正常流程生产的通过额外的提纯工艺得到的物质。标准品在用作标准品/对照品之前须经检定确认其质量和最高可能达到的纯度。国家药品标准品、对照品是指国家药品标准中用于鉴别、检查、含量测定、杂质和有关物质检查等的标准物质。

企业可以选择相应的物质，对照国家标准品进行标定，标定后的物质可以在企业内部用作标准品，是企业自制工作标准品。

#### 9.2 分类

标准品按照纯度可以分为以下几类：（欧盟 GMP Manual）

- 基准标准品 纯度达到原子重量级标准的物质。
- 初级标准品 市售的纯度达到 99.98% 的标准品。
- 工作标准品 市售的纯度达到 99.95 的物质。
- 次级标准品 用初级标准品标定的纯度较初级标准品低的物质。

#### 9.3 应用范围

标准品、对照品应用于药品鉴别、检查、含量测定、杂质和有关物质等药品检验的各方面。

### 【技术要求】

#### 9.4 要求

##### 9.4.1 接收

质量控制部门应安排有专人负责接收和管理标准品并建立标准品接收记录。接收标准品时对于有储存温度要求的标准品应该立即放到符合温度要求的环境中。标准品负责人在接收时应该检查标准品名称、数量、有效期等信息并将其记录在标准品接收记录中。第一位开瓶者应该在标签上注明首次开瓶日期，并签名签日期。

#### 9.4.2 标识

标准品溶液应该有明确的标识，标签中应该包含标准品溶液名称、配制人、配制日期和溶液有效期，为了便于标准溶液使用的追踪，标准品溶液标签中还可以定义标准品液的编号，编号的形式可以根据情况由使用单位自行定义，实验记录中应能体现标准品溶液的编号。

对于企业自制的工作标准品，还应在标签中明确标定日期，标定人及标定浓度。

#### 9.4.3 标准溶液的稳定性研究

药典或者其它标准品、对照品的提供机构一般不会明确规定标准品的有效期，特别是对开封的标准品或配制的标准溶液使用期限，原则上讲，不推荐重复使用标准溶液，如果需要重复使用同一份标准溶液，使用单位应对其稳定性和使用效期进行研究。在进行标准品溶液的稳定性研究之前，应起草该标准品溶液稳定性研究草案，并获得公司质量管理部门的批准。稳定性研究草案里应明确标准品溶液的配制程序、储存条件、稳定性研究方案、稳定性结果的记录和判断程序。对于标准品的有效性的判断，可以根据不同时间点的标准品检查结果，比如 HPLC 的峰面积、UV 的吸收值或直 TLC 展开图中斑点大小和颜色深浅等。稳定性研究结束后，需要对实验结果进行总结、分析，根据评估给出溶液的内部推荐效期，同时征求质量管理部门的意见并获得其批准。批准后的标准品溶液效期可用于实验室内部对标准品溶液的使用。

#### 9.4.4 标准品、对照品的使用、处置和贮存

使用单位应该有 SOP 对标准品、对照品的储存、处置和分发等流程进行规定。SOP 中应该规定有正确的溶液处置方式、文件的处理，对于不在室温贮存的标准品还应规定从储存区域取出后怎样放至室温。

SOP 还需要规定标准品的使用注意事项，例如是否需要在称量使用前干燥、是否需要重新测定标准品、对照品的 LOD 或者有其它应规定的流程，最后还应规定用于计算的数值。

应根据标准品、对照品的特性决定其储存条件。有些可能需要冷冻储存，有些可以是冷藏储存，还有一些性质比较稳定，只需要储存于常温环境中即可。从标准品稳定性角度来说，对标准品、对照品最好的储存方法是将其分装成合适的小包装单独标识进行储存。

#### 9.4.5 文件管理

标准品、对照品的管理的文件应包括标准品的接收、标识，标准品和标准品溶液的储存和使用，以及过期标准品，包括标准品溶液的处置。



## 10. 实验室分析仪器的验证

本章中您将找到以下问题的答案：

- 哪些分析仪器需要验证
- 如何进行分析仪器的验证
- 分析仪器的验证文件如何编写

### 【法规要求】

- 新版中国 GMP 中第七章“确认与验证”

第七章 第 146 条：企业应确定需要进行的确认或验证，以证明有关操作的关键要素能得到有效控制。确认或验证的范围和程度应经过风险评估来确定。

第七章 第 147 条：企业的厂房、设施、设备和检验仪器应经过确认或验证，应采用经过验证的生产工艺、操作规程和检验方法进行生产、操作和检验，并保持持续的验证状态。

第七章 第 152 条：

确认和验证不应视为一次性的行为，首次确认和验证后应根据产品质量回顾分析情况进行再验证。关键的生产工艺和操作规程应定期进行再验证，确保其能够达到预期效果。

第七章 第 154 条：企业在验证主计划或其他相关文件中作出相应规定，确保厂房、设施设备、检验仪器、生产工艺、操作规程和检验方法等保持持续的验证状态。

第七章 第 155 条：应根据验证对象制定验证方案，经过审核、批准。并经过审核、批准。验证方案应明确实施验证的职责。

第七章 第 156 条：验证应按照预先确定和批准的方案实施；验证工作完成后，应写出验证报告，并经审核、批准。验证结果和结论（包括评价和建议）应有记录并存档。

- 与国外法规的比较

新版中国 GMP 中第七章“确认与验证”对企业确认和验证工作进行了较详细的描述，这些与欧美法规中的要求基本一致。

下表中列出了美国和欧盟针对实验室分析仪器和实验设备管理的相关指南

机构或组织	文件名称
-------	------

美国食品药品监督管理局 (FDA)	Guide to Inspection of Pharmaceutical Quality Control Labs 药物物质控实验室检查指南
	Guide to Inspection of Microbiological Pharmaceutical Quality Control Labs 微生物药物物质控实验室检查指南
世界卫生组织 (WHO)	WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations Report 40 WHO 药品生产专家委员会报告 40
欧洲药品管理局 (EMA)	EC GMP Annex 11 Computerized Systems 欧盟 GMP 附录 11 计算机化系统
	Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice, Qualification and Validation 欧盟 GMP 指南附录 15, 确认和验证
药品检查合作组织 (PIC/S)	PI 023-2 Aide Memoire on Inspection of Quality Control Laboratories QC 实验室检查备忘录
美国药典 (USP)	Chapter 1058 Analytical Instrument Qualification 分析仪器的验证

## 【背景介绍】

近年来, 自动化程度高, 构造复杂的分析仪器的应用日益增加, 分析仪器验证在实验室管理体系越来越重要。虽然过去也进行仪器、设备的测试和检定, 来确保仪器的准确, 但随着全面验证体系的发展建立, 国际上对于生产设备、设施的验证指南和要求也逐渐被应用于分析仪器的验证。

适用的分析仪器是获得准确可靠实验数据的基础。分析仪器的验证是证明仪器的安装, 运行和性能满足使用要求, 并建立相关校验和维护程序的过程, 通常包括设计确认, 安装确认, 运行确认和性能确认。

### 10.1 应用范围

分析仪器的验证适用于质量控制实验室 (QC) 和中间过程控制实验室 (IPC) 的实验设备和分析仪器。

很多种类的仪器设备被应用于现代制药工业的实验室, 包括从简单的熔点仪到程序化高的高效液相色谱仪, 近红外分析仪等。复杂程度不同的仪器所需要的验证级别

和范围也不一样。用户可以根据仪器的复杂程度和使用需要，将仪器分为不同的类别，确定不同的验证级别。目前国内还没有实验室仪器设备分类的标准，参考美国药典第 1058 章 <分析仪器的验证>，根据所需的验证级别，可以分为以下 3 类：

A 类：不具备测量功能，或者通常只需要校准，供应商的技术标准可以作为用户需求。例如：磁力搅拌器，离心机，摇床。

B 类：此类仪器具有测量功能，并且仪器控制的物理参数（如温度，压力或流速等）需要校准，用户需求一般与供应商的功能标准和操作限度相同。例如：熔点仪，分析天平，PH 计，折射仪，滴定仪，干燥箱等。此类仪器或设备通常需要进行安装确认和运行确认，并制定相关操作和校验 SOP。

C 类：此类仪器通常包括仪器硬件和其控制系统（固件或软件），用户需求需要对仪器的功能要求，操作参数要求，系统配置要求等详细描述。例如：溶出仪，紫外分光光度计，高效液相色谱仪，气相色谱仪，恒温恒湿箱，近红外分析仪，红外光谱仪。此类仪器和设备需要安装确认，运行确认和专门的性能确认，并制定相关操作、校验和维护 SOP。

需要指出的是仪器类别的划分及其适应的验证程度应由实验室根据仪器的使用需求确定，可以将分类的原则在仪器验证的 SOP 中描述。根据仪器的使用不同，不同实验室的仪器分类也可能不同。

## 10.2 实施指导

### 10.2.1 验证总计划

分析仪器验证和其他验证活动一样应按照公司验证总计划进行管理和实施。验证总计划全面介绍了公司验证的方针策略，组织实施，以及验证活动的范围包括厂房、设施、设备、检验仪器、生产工艺、操作规程，分析方法，计算机系统等；再验证、变更控制的要求，计划和时间安排也是验证总计划的重要内容。根据不同公司验证管理的要求，分析仪器验证可以作为公司验证总计划的一部分，也可以制定单独的验证总计划。验证总计划的制定参见 [公用系统指南第 xxx 章](#)。

### 10.2.2 验证方案

在验证实施前，应由验证负责人编写验证方案。验证方案要对验证各个阶段（设计确认，安装确认，运行确认和性能确认）的要求进行规定，对于比较复杂的仪器设备，每个阶段可以准备单独的验证方案；对于相对简单的仪器，所有阶段可以包含在同一个方案。

在验证方案中，应对仪器的使用目的，主要功能，关键构造进行描述，详细定义要验证的项目、测试程序和接受标准，通常验证方案要包括以下内容

- 验证目的
- 验证过程的职责

- 仪器介绍，包括仪器的生产商， 型号，序列号，操作系统，关键构造和主要功能的描述
- 设计确认的程序和接受标准
- 安装确认的程序和接受标准
- 运行确认的程序和接受标准
- 性能确认的程序和接受标准
- 仪器的校准要求
- 验证过程中的培训，包括使用，校准和维护的培训
- 相关 SOP 的制定，包括仪器操作，校准和维护标准操作规程
- 验证过程偏差的处理
- 验证报告的编写

如果验证方案是由仪器供应商提供，在验证实施前，验证方案应由验证负责人和质量部门审核批准，以确认符合公司验证的要求才能使用。如不符合，应和供应商进行沟通并修改或增加确认项目或要求。

### 10.2.3 验证实施

验证活动要依照已批准的验证方案实施，所有验证活动应进行实时记录。实施过程中如果出现偏差应对其进行及时调查和评估。

#### 10.2.3.1 设计确认 DQ (Design Qualification)

设计确认是根据用户需求标准（URS）的要求检查仪器的设计规格，包括仪器的功能，配置，操作参数的范围是否满足使用要求，以及对仪器供应商提供验证，维护，培训资质能力的确认。设计确认通常在仪器采购前进行。

设计确认主要有以下活动和文件：

- 检查仪器的设计，包括仪器的主要配置，功能原理，参数范围，操作系统，安装、使用环境以及与其他系统的连接等
- 如需要，检查仪器及其配件的材质证明，如溶出杯的材质

- 确认供应商的资质能力。如需要，可对供应商进行审计，形成审计文件
- 主要配件列表
- P&ID 图

实验室仪器大部分为市售的非订制仪器（commercial off-the-shelf），此类仪器已经由制造商在出厂前完成设计和生产，对于实验室用户不必再进行单独的设计确认，但仪器验证负责人和使用者应检查和评估供应商提供的设计确认文件或规格标准是否满足要求。并应确认供应商有能力提供仪器安装，验证，维护以及培训的要求。

#### 10.2.3.2 安装确认 IQ(Installation Qualification)

安装确认是提供文件性的证明，确认仪器按照规定的要求被安装，并且安装环境满足运行要求。并且检查仪器及其配件是否与订单一致，使用手册、出厂证明是否齐全。

安装确认主要包括以下内容和文件：

- 交付物检查，检查仪器的型号与订单一致，仪器配件，软件，操作手册齐备，没有遗漏和破损。
- 检查并记录仪器的相关信息，型号，序列号，操作系统的种类和版本号，以及安装房间号等。通常使用表格或安装图。
- 检查并记录安装环境及相关动力系统是否满足规定的要求，包括环境的温湿度，电力系统，压缩空气等。例如对于天平，溶出仪检查安装实验台的水平度是必须的。
- 仪器的安装，包括硬件和软件的安装。通常由供应商和实验室验证人员共同完成。按照验证方案的要求，安装并记录仪器安装过程。确保仪器主体，测量仪表，传感器，管路，电源电缆等被正确连接，需要时应对关键部件和管路进行标识。对于需要计算机软件控制的仪器，安装前要确认计算机的配置满足控制软件的要求。。
- 网络和数据存储：一些仪器需要连接网络或者数据存储器，比如 HPLC，应按要求连接，并检查其功能。

#### 10.2.3.3 运行确认 OQ (Operation Qualification)

在仪器安装确认完成后，测试仪器的功能能否满足设计要求和用户需求的过程。测试的种类和范围依赖于仪器的复杂性和功能性。如需要，仪器所采用的操作系统的功能也在此阶段进行测试。运行确认的草案应包含测试项目，详细地测试过程，使用的标准仪器或标准品等，以及接受标准。每个测试结果应被清晰的记录，并由专人复核。

主要测试内容和文件要求如下：

- 校验：关键仪表、传感器应在 OQ 前或在 OQ 中进行校验。校验范围应满足用户使用的范围。如 HPLC 的流速，若实际使用范围是 0.5-3.0ml/min，则校验范围应至少涵盖 0.5-3.0ml/min。
- 仪器功能测试：用户需求中所有规定的功能都应该被测试，特别是对于质量控制和安全有关键影响的功能是非常重要的。应根据用户需求的操作范围，对操作参数的范围进行测试确认，而不能仅仅对典型的情况进行测试。如果可以，应进行挑战性试验。
- 报警测试，如冰箱温度超出要求，恒温恒湿箱的温湿度超出规定范围。
- 如果操作系统有登录权限的设定功能，应进行测试。不同级别的权限如管理员、使用者应在使用 SOP 中进行规定。
- 数据的保存、备份和存档——基于对操作系统和数据处理系统的需要，数据的处理如安全性，存储，备份，恢复，审计追踪等应按照规定的程序进行测试。
- 培训，应由供应商对使用人员，维护人员进行培训。
- 此外，如果适合，仪器的操作标准规程，校验和维护程序也应该在 OQ 阶段制定。

#### 10.2.3.4 性能确认 PQ (Performance Qualification)

PQ 的目的是确认仪器能够按照用户需求持续运行。在安装确认

和运行确认完成后，通过性能确认证明仪器的在正常操作环境中的适用性，主要活动包括：

性能测试：根据用户的使用要求，设计一个或多个测试确认仪器满足预期的使用要求，如培养箱的性能确认，应根据用户要求的温度范围进行空载和最大负载实验。系统适用性实验，或其他测试检查也可用于性能测试，如 TOC 可以依照药典进行系统适用性试验。水分测定仪可以进行重现性测试证明仪器的稳定性。有些仪器的运行确认和性能确认可以在一个阶段进行并记录的，如 HPLC 的 OQ/PQ 测试, UV-Vis 的 OQ/PQ 测试

在 OQ/PQ 中进行的测试，可以规定在仪器的操作或校验 SOP 中，在日常使用过程中定期执行，以检查和确认仪器持续处于受控的状态，。建立日常使用中的测试项目和频率是 OQ/PQ 的一部分。测试项目和频率的设定应基于下列因素和必要的风险评估：

- 法规要求
- 测试功能的关键程度
- 仪器供应商的推荐
- 仪器的操作环境
- 仪器本身的稳定性，或基于此类仪器的历史数据分析

#### 10.2.4 验证报告

所有测试项目完成后，应由验证人员根据验证记录起草仪器验证报告，用来总结验证活动，并确认验证方案中的所有项目是否完成，评估测试结果以及对仪器状态明确的阐述和结论。验证报告主要包括以下内容：

- 对验证结果的总结概述
- 设计确认，安装确认，运行确认和性能确认的结果和记录
- 验证支持性文件，如标准仪器或标准品的证书，供应商工程师的证书等文件应被附于验证报告。
- 对验证过程中偏差的总结。
- 验证结论。清晰的阐述仪器是否满足使用要求。
- 仪器的操作、校验和维护的 SOP 的制定作为验证活动的一部分，应在验证报告中予以描述并确保在仪器使用之前得到批

准。仪器操作程序，校验频率、项目及接受标准，维护内容和频率，以及人员的职责应在 SOP 中详细规定。

- 性能测试项目，系统适用性试验的要求：如果在验证过程中，一些测试项目需要在日常使用中定期检查，应在报告中描述。通常可以统一在使用或校验 SOP 中规定。使用、维护的培训情况，应有相应的培训记录
- 仪器再验证的要求：可以根据法规和使用要求，供应商的推荐或历史数据规定再验证的周期。

#### 10.2.5 系统适用性试验

- 系统适用性试验通常在仪器使用过程中进行，是证明仪器或系统在使用时满足预期使用要求的测试，逻辑上可以认为是仪器验证的持续。
- 美国药典中定义系统适用性试验是用来确认仪器或系统的性能能够满足既定标准，这些测试与样品测试一起进行，以确保仪器或系统的性能在使用时是被接受的。系统适用性试验是液相和气相色谱法必须的组成部分。是用来证明色谱系统在使用时满足预期的实验要求，是对仪器性能，分析操作，色谱柱条件及被测试样品的综合评价。主要评价指标包括：分离度（R），系统精密度（RSD），托尾因子（T）等。评价指标的标准通常来自方法验证的规定，所以这种系统适用性试验认为是基于实验方法的系统适用性试验，是实验方法的必要组成。
- 有些系统适用性试验的测试项目来源于仪器验证。例如，水分测定仪，可以用酒石酸钠二水物测量器准确性和精密性，如果测量结果满足要求，说明仪器满足日常使用的要求；PH 计使用前需要进行标准液的校准。TOC 的系统适用性试验。该试验的项目和标准通常来自于仪器验证的性能测试项目，可以被规定在仪器使用或校验的 SOP 中。

#### 10.2.6 实验室仪器控制系统和数据处理系统的验证

美国药典第 1058 章 >分析仪器的验证<将实验室应用的软件分为 3 类：固件；仪器控制，数据获取、处理的软件；独立软件。

- 固件系统 (firmware)

固件系统内置于系统的集成芯片中，仪器的操作通过集成芯片完成。用户通常不能改变固件的设计和函数，只能进行简单的参数选择或设置，如果固件出现问题，仪器也不能正常操作。因而，固件和仪器硬件是一体的，而不是独立于仪器的软件。毫无疑问，当仪器进行验证时，其集成固件的功能已经被验证，所以不需要进行单独的固件验证。如果可能，应在 IQ 过程记录固件的版本号。当仪器固件的版本升级或改变时，应通过仪器的变更系统进行控制。

- 仪器控制， 数据获取、处理的软件

这类软件通常安装在与仪器连接的专用电脑上，比如 HPLC 的化学工作站，UV 的操作软件等。仪器的操作，数据的获取和处理都通过软件操作完成，只有很少的操作需要通过仪器硬件。软件和仪器的功能是紧密配合，难以分开的，对产生可靠的分析数据都是至关重要的。因而，对于系统整体的验证要比单独进行软件验证更有效。用户在系统测试时，如果仪器操作和数据处理都是满足要求的，则证明软件的功能也是适合的。但当有专门的要求，或软件重新安装或升级是，应进行软件的安装确认和运行确认。

在仪器初始验证时，仪器的供应商应提供软件设计和经过验证的证明。安装软件的电脑和操作系统应满足软件的配置要求，应按照供应商的要求进行软件安装，安装后确认安装是否完全。

- 无论是软件和固件，根据仪器的功能和使用的需要，权限控制，数据的保存，备份，存档或审计追踪应该按照批准的方案在 OQ 中进行验证。
- 独立软件

独立的软件系统，例如 LIMS，实验室色谱处理系统等的验证可参照质量系统指南 第 xxx 章 计算机系统验证的规定执行。

#### 10.2.7 再验证

再验证通常分为定期再验证和基于仪器变更等引起的再验证。

- 仪器变更等引起的再验证

当仪器有下列情况时，其验证状态受到影响应进行再验证，

- 经历重大维修，或更换关键部件
- 仪器的安装地点需要变化，
- 软件或硬件升级，
- 由偏差，数据超出标准或数据趋势分析引起

再验证的范围应建立在风险评估、变更控制和偏差文件的基础上，根据评估结果，重新进行安装确认，运行确认或性能确认。仪器变更应该被记录，再验证应按照规定要求准备验证方案和报告。

- 定期再验证

仪器定期再验证的目的是为了提供证明在仪器日常使用过程中，仪器本身或使用环境的变化(有意的或无意的)没有影响仪器的整体性能，确保分析数据的可靠性。定期再验证通常重复初始验证过程中 PQ 的全部测试或部分测试。再验证的时间间隔和测试内容应规定在验证报告或仪器的使用 SOP 中，制定时应考虑下列因素：

- 法规要求，
- 仪器类型，
- 供应商的建议，
- 使用环境，
- 日常的维护和校验的程度。

一个很好的方法是，定期对实验室仪器进行验证状态的回顾评估，根据评估的结果，决定再验证的执行和范围。回顾和评估应至少包括以下内容：

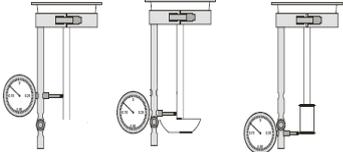
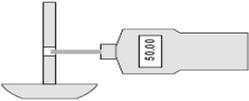
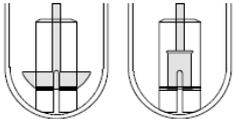
- 上次验证的方案和报告
- 是否有新的法规要求
- 仪器相关的技术文件是否齐备
- 校验和维护是否按规定执行，历史记录和趋势回顾
- 操作 SOP 是否被正确执行，使用日志的回顾
- 仪器相关的偏差情况

► 仪器变更控制，一系列微小变更的累积会产生关键性的影响

### 10.3 实例分析

某实验室购买一台新的溶出仪，需要进行仪器验证。下面介绍溶出仪的 IQ, OQ 和 PQ 的主要测试项目和要求：

测试项目	测试内容	接受标准	测试结果
DQ	此溶出仪为市售的非订制仪器，由厂家在出厂前完成设计并生产，不需要专门的设计确认。应检查其规格标准是否满足用户需求	不需要专门的设计确认	
IQ-1	仪器包装及开箱检查	<ul style="list-style-type: none"> <li>外包装无破损</li> <li>仪器主机及配件齐全(参照合同清单)</li> <li>记录仪器序列号</li> <li>仪器出厂合格证书及机器使用说明书齐全</li> </ul>	
IQ-2	安装条件是否满足要求： <ul style="list-style-type: none"> <li>试验台水平测试：用水平尺测试台面水平度</li> <li>压缩空气连接</li> <li>电源电缆连接</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>水平测试符合</li> <li>压缩空气压力 3-5 bar</li> <li>电源连接正常</li> </ul>	
IQ-3	开机显示	所有功能键显示正常	
IQ-4	加热水域循环检查	水域循环正常，循环过程没有气泡	
IQ-5	循环泵	循环泵管路连接正常，溶媒循环正常	
	样品收集器	连接正常，溶媒经各个通道被收集到对应的样品收集器中	
	溶媒补加器	连接正常，溶媒能经各个通道加到对应的溶出杯中	
OQ-1	显示功能确认		
	日期和时间显示	日期和时间显示正确	
	记录操作程序版本号		
OQ-2	操作测试：		
	搅拌开关：开/关按钮	桨转动/停止	
	加热开关	加热开始/停止	
	温度设定：按住 SET 键，同时键入所需温度 (20℃/45℃)，然后按 ENTER 键确认	开始加热	

	转速设定: 按 SET 键至转速反显为灰色, 设定速度范围 ● 25-250RPM	浆转动正常	
	手动/自动操作: 自动取样运行:	Ready / remote 模式显示正确运行正常, 溶媒经各通道收集到对应的样品收集器中	
0Q-3	校验		
	晃动度: 转轴, 桨, 转篮 用晃动度测试仪测量 	转轴: 不得大于 2mm 桨: 不得大于 0.5 mm 转篮: 不得大于 1.0 mm (标准参照中国药典)	
	转动速度: 用转速测试仪测定 	应在设定转速的±4%内, 如 50 RPM: ±2 RPM 100 RPM: ±4 RPM (标准参照中国药典)	
	桨/转篮到溶出缸底的距离 	转桨和转篮下沿应在测试装置标识线内, 即 $25 \pm 2$ mm (标准参照中国药典)	
	温度控制: ● 水域加水至刻度线, 溶出缸加脱气水 900 毫升, ● 温度设定 37 度, 运行至温度稳定, 一般至少少 1 小时 ● 查看显示温度 ● 用标准温度探头测试水域温度 ● 用标准温度探头测试溶出杯的实际温度	溶出杯温度实际温度应为 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (标准参照中国药典)	
	自动取样泵速度校准	各通道流速与平均流速间的允许偏差为± 2.0%	
PQ-1	根据美国药典要求, 用泼尼松标准校正片进行系统适用性测试	测试结果应符合要求(基于所使用 USP 校正片的批号)	
其他			
培训	仪器操作培训	由供应商进行仪器操作培训, 并有培训记录	
	仪器校验和维护培训	由供应商进行校准和维护的培训, 并有培训记录	
SOP 的制	仪器操作标准程序	在验证过程中准备, 并在仪器使用前被批准	

定	仪器校验和维护标准程序	在验证过程中准备,并在仪器使用前被批准	
支持性文件	标准仪器证书(晃动度仪,转速仪,标准温度测试仪) 标准物质证书(校验片及标准物质) 验证工程师资质证书	应有相关证书原件或复印件,并作为报告的附件	

#### 10.4 技术要点

- 用户需求 (URS)

用户需求标准：在购买仪器前，通常由仪器使用者起草用户需求标准，并由相关技术部门和质量部门审核批准。用户需求标准的内容主要包括仪器的功能性要求，系统配置要求，要求以及供应商的服务要求等。用户需求标准不但是选择仪器的标准，也将作为仪器验证的基础。所以对于仪器功能描述，参数的使用范围要根据实际需求规定明确，以便在验证过程中测试，例如：温度范围，流速范围等。

- 风险分析 (Risk analysis)

风险分析已经被很多公司应用于验证过程。作为验证活动的组成，风险评估可以被用来对仪器的功能或 GMP 风险进行分析，根据分析的结果，可以确定所需要的验证活动和相关文件。如采用失效模式和效果分析 (FMEA) 工具，详细介绍请参见 [质量体系指南第六章](#)。

- 验证 SOP

实验室应建立仪器验证的 S O P，对验证的流程，职责，文件的准备与批准，验证的实施，偏差处理，再验证作出规定。可以是验证总则，也可以针对不同的仪器设定专用的 S O P，如天平验证，溶出仪验证，高效色谱仪验证。

对于验证方案，验证报告，用户需求，风险分析制定相应模板，规范验证人员的编写。



## 12. 分析方法的验证和确认

本章中您将找到以下问题的答案：

1. 哪些检验项目需要方法验证？
2. 方法验证内容有哪些？如何进行验证？
3. 什么时候需要方法确认？
4. 什么时候需要再验证？
5. 验证文件怎样保存？

### 【法规要求】

第十二条 质量控制的基本要求：

（四）检验方法应经过验证或确认；

第二百二十三条 检验

应有物料和不同生产阶段产品的书面检验操作规程，阐述所用方法、仪器和设备。检验结果应有记录。

1. 企业应确保药品按照注册批准的方法进行全项检验。

2. 符合下列情形之一的，应对检验方法进行验证：

- (1) 采用新的检验方法；
- (2) 检验方法需变更的；
- (3) 采用《中华人民共和国药典》及其它法定标准未收载的检验方法；
- (4) 法规规定的其它需要验证的检验方法。

3. 对不需要进行验证的检验方法，企业应对检验方法进行确认，以确保检验数据准确、可靠。

### 【背景介绍】

除中国药品生产质量管理规范对分析方法验证和确认有明确的要求外，下表所列法规中均有“分析方法需验证”的要求。

国家，机构或组织	文件名称
美国食品药品监督管理局 (FDA)	Guide to Inspection of Pharmaceutical Quality Control Labs (section 15) 药物质量控制实验室检查指南中 15 章节
欧洲共同体药物评审委员会 (EMEA)	EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Part I: Basic Requirements for Medicinal Products, Quality Control 良好的医药和兽药生产质量管理规范，第一部分中的质量控制

药品检查合作组织 (PIC/S)	Aide Memoire on Inspection of Quality Control Laboratories 质量控制实验室检查检查备忘录 Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products PART I chapter 6 良好的药品生产质量管理规范，第一部分第六章
加拿大	Good Manufacturing Practice (GMP) Guideline -2009 edition 药品生产质量管理规范指南 2009 版

下表中列出了国内外针对分析方法验证的相关指南：

机构或组织	文件名称
美国药典 (USP)	<1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES 方法验证 <1226> VERIFICATION OF COMPENDIAL PROCEDURES 方法确认
人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH)	Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2 (R1) 分析方法验证：文本以及方法 Q2 (R1)
中国药典 (Ch. P2010)	附录 XIX A 药品质量标准分析方法验证指导原则

## 12.1 分析方法

分析方法是完成检验项目而设定和建立的测试方法，它详细描述了完成分析检验的每一步骤。一般包括分析方法原理、仪器及仪器参数、试剂、供试品溶液与对照品溶液的制备，测定，计算公式及检测限度等。

分析方法可采用化学分析方法和仪器分析方法。这些分析方法各有特点，同一分析方法可用于不同的检验项目，但验证内容会有不同。例如采用高效液相色谱法用于药品的鉴别和杂质定量检验应进行不同要求的方法验证。前者重点要求验证专属性，而后者则需要重点验证专属性、准确度和定量限。

## 12.2 方法验证

在建立药品质量标准时，分析方法需经验证。

**定义：**方法验证就是根据检验项目的要求，预先设置一定的验证内容，并通过设计合理的实验来验证所采用的分析方法是否符合检验项目的要求。

**目的：**证明采用的分析方法科学、合理，符合检验要求并能有效控制药品的内在质量。

**作用：**方法验证在分析方法建立过程中具有重要的作用。只有经过验证的分析方法才可以用于控制药品质量，因此方法验证是制订质量标准的基础。

## 12.3 方法确认

在应用已验证的药典方法和其他法定方法前,应在当前的实验室条件下进行方法确认来证明方法在该实验室的的适用性。

#### 12.4 适用范围

适用于:

- 化学药品的物料,中间产品和产品的理化分析方法的验证和确认.
- 清洁验证方法的验证

不适用于:

- 化学药品的微生物方法(微生物方法的验证参见第17章)。
- 生物制品分析方法验证

### 【技术要求与实施指导】

#### 12.5 方法验证的一般原则

- 通常,分析方法需进行方法验证,外观、崩解时限、密度、重量、pH 值、硫酸盐、灰分、装量不需进行方法验证。
- 方法验证的内容应根据检验项目的要求,结合所采用分析方法的特点确定。
- 同一分析方法用于不同的检验项目会有不同的验证要求。

#### 12.6 需要验证的检验项目

检验项目是为控制药品质量,保证药品安全有效而设定的测试项目。根据检验项目的设定目的和验证内容的不同要求,本指导原则将需验证的检验项目分为四类:

鉴别试验

杂质的限度检查

杂质的定量测定

含量测定,包括原料药或制剂中有效成分的含量,制剂中其他成分(如防腐剂等)的含量,溶出度与释放度等检查中的溶出量、和含量均匀度。。

除此之外还有一些物理项目的检测如粒径分布、旋光度、熔点和硬度,其要求与其它检验项目有所不同,通常在进行出因此分析方法验证应有不同的要求。

鉴别的目的在于判定被分析物是目标化合物,而非其它物质。用于鉴别的分析方法要求具有较强的专属性和耐用性。

杂质检查主要用于控制主成分以外的杂质,如无机杂质,有机杂质等。杂质检查分为限度检查和定量测定两部分。用于限度检查的分析方法验证侧重专属性、检测限和耐用性。用于定量测定的分析方法验证强调专属性、准确度、精密度、线性、范围、定量限和耐用性。

含量测定对准确度要求较高,因此所采用的分析方法要求具有一定的专属性、准确度和线性等要求。

中国药典 2010 版中规定了不同的检验项目需要验证不同的内容,详见表 1。

表 1 检验项目和验证内容

验证内容		检验项目			
		鉴别	杂质测定		含量/含量均匀度/溶出量
			定量	限度	
准确度		否	是	否	是
精密度的	重复性	否	是	否	是
	中间精密度的	否	是*	否	是*
专属性**		是	是	是	是
检测限		否	是***	是	否
定量限		否	是	否	否
线性		否	是	否	是
范围		否	是	否	是
耐用性		是	是	是	是

- 备注：1. \*：已有重现性验证，不需验证中间精密度的；  
 2. \*\*：如一种方法不够专属，可由其它分析方法予以补充。  
 3. \*\*\*：视具体情况予以验证。  
 4. ‘是’代表该项内容需要验证，‘否’代表该项内容不需要验证

有关欧盟，世界卫生组织，美国药典，ICH 和中国药典 2010 版对方法验证的要求详见下表。

证 目	鉴别试验					杂质										含量测定				
						定量测定					限度检查									
	C	H	S	CH	h. P	C	H	S	CH	h. P	C	H	S	CH	h. P	C	H	S	CH	h. P
密度							R	R	R	R						R	R	R	R	R
准确度							R	R	R	R						R	R	R	R	R
属性	R	R	R	R	R		R	R	R	R						R	R	R	R	R
测限		R					R		T	T						R	R	R	R	R
量限							R	R	R	R										
							R	R	R	R						R	R	R	R	R

性																				
围						R	R	R	R	R	R	T				R	R	R	R	R
用性		R			R		R	R	R	R	R	R	R	R			R	R	R	R

R=必须验证的参数，T=可视具体检测而定的参数  
 EC: 分析方法验证，参照指南，III，844/87，最终版，1989年8月（欧洲）  
 WH: 分析方法验证被用于药物原料的测定中，WHO技术报告系列，1992  
 US：美国药典 USP <1225>  
 ICH: 分析方法验证 Q2(R1)  
 Ch.P 中国药典 2010 版

### 12.7 方法验证内容

本章节内容除特殊标注外，主要依据中国药典 2010 附录 XIX A 药品质量标准分析方法验证指导原则。

#### 12.7.1 准确度

准确度系指用该方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度。一般用回收率表示。准确度应在规定的范围内测试。

##### 12.7.1.1 验证方法

准确度应在规定的范围内建立，至少用 9 个测定结果进行评价。例如，设计 3 个不同浓度，每个浓度各分别制备 3 份供试品溶液，进行测定。应报告已知加入量的回收率（%）或测定结果平均值与真实值之差及其相对标准偏差或可信限。

准确度是定量测定的必要条件，因此含量测定、杂质定量测定均需验证准确度。原料药与制剂所用的具体方法详见下表。

检验项目	原料药	制剂	备注
含量测定	<p><b>方法 1:</b> 用已知纯度的对照品或供试品进行测定。</p> <p><b>方法 2:</b> 用本法所得结果与已知准确度的另一方法测定的结果进行比较</p>	<p><b>方法 1:</b> 用含已知量被测物的各组分混合物进行测定。</p> <p><b>方法 2:</b> 如不能得到制剂的全部组分，可向制剂中加入已知量的被测物进行测定。</p> <p><b>方法 3:</b> 用本法所得结果与已知准确度的另一方法测定的结果进行比较。</p>	如该分析方法已经测试并求出精密性、线性和专属性，在准确度也可推算的情况下，准确度可不必再做。

杂质的定量测定	<p><b>方法1:</b> 可向原料药或制剂中加入已知量杂质进行测定。</p> <p><b>方法2:</b> 如果不能得到杂质或降解产物, 可用本法测定结果与另一成熟的方法进行比较, 如药典方法或经过验证的方法。</p>	在不能测得杂质或降解产物的响应因子或不能测得对原料药的相对响应因子的情况下, 可用原料药的响应因子。应明确单个杂质和杂质总量相当于主成分的重量比(%)或面积比(%)。
---------	---	---

例如: 测定含量的准确度, 按标示量的 80%, 100%和 120%配制三个浓度的溶液, 每个浓度各分别制备 3 份供试品溶液, 进行测定。根据测定结果与配制浓度计算出平均回收率以及相对标准偏差。

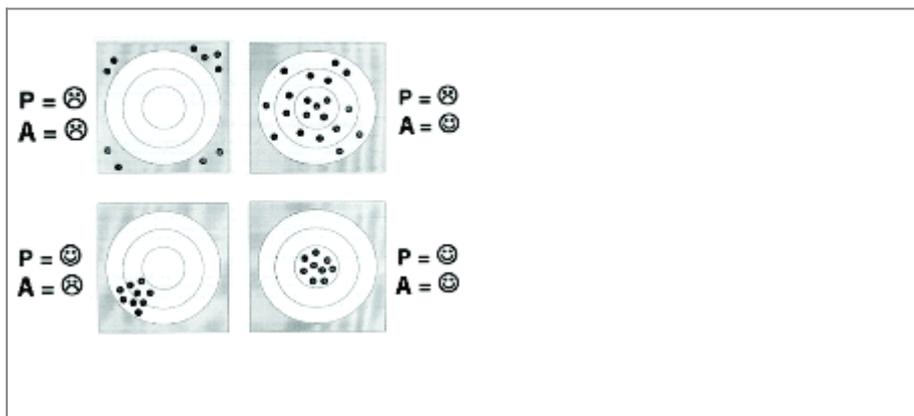
### 12.7.1.2 数据要求

需报告已知加入量的回收率(%), 或测定结果平均值与真实值之差及其相对标准偏差或可信限。

### 12.7.2 精密度

精密度系指在规定的测试条件下, 同一均匀供试品, 经多次取样测定所得结果之间的接近程度。精密度一般用偏差、标准偏差或相对标准偏差表示。

精密度与准确度不同, 下图形象地描绘了精密度和准确度之间的差别。精密度测定了一系列重复性的被分析物之间的接近程度, 但它不能表达与已建立的真值之间的符合程度, 后者由准确度来测定。通过一系列的测定值, 可以得到良好的精密度, 但是由于所用分析方法存在的偏差, 所得的平均值不一定与真实值(请看图中左下角的较低的打靶环数)相符, 在这种状况下, 需要修改方法以消除偏差。



#### 12.7.2.1 验证方法

精密度可从重复性、中间精密度、重现性三个层次考察。详见下表。

名 称	定 义	验证方法
重复性	在相同条件下, 由同一个分析人员测定所得结果的精密度称为重复性。	在规定范围内, 至少用 9 次测定结果进行评价。例如, 设计 3 个不同浓度, 每个浓度各分别制备 3 份供试品溶液, 进行测定 3 次, 或将相当于 100% 的浓度水平的供试品溶液, 用至少测定 6 次的结果进行评价。
中间精密度	在同一个实验室, 不同时间由不同分析人员用不同设备测定结果之间的精密度, 称为中间精密度。	为考察随机变动因素对精密度的影响, 应设计方案进行中间精密度试验。变动因素为不同日期、不同分析人员、不同设备。
重现性	在不同实验室之间由不同分析人员测定结果之间的精密度, 称为重现性。	法定标准采用的分析方法或在不同实验室之间进行方法转移时, 应进行重现性试验。例如建立药典分析方法时, 通过协同检验得出重现性结果。协同检验的目的、过程和重现性结果均应记载在起草说明中, 应注意重现性试验用的样品本身的质量均匀性和贮存运输中的环境影响因素, 以免影响重现性结果。

例如: 中间精密度的设计方案

实 验	1	2	3	4	5	6
日 期	1	2	3	4	5	6
分析人员	A	B	A	B	A	B
仪 器	M	N	N	M	M	N
色 谱 柱	T	U	U	T	U	T

### 12.7.2.2 数据要求

均应报告标准偏差、相对标准偏差和可信限。

### 12.7.3 专属性

专属性系指在其他成分(如: 杂质、降解产物、辅料等)可能存在下, 采用的方法能正确测定出被测物的特性。

通常, 鉴别反应、杂质检查、含量测定均应考察其专属性。如一种方法不够专属, 可由其它分析方法予以补充。例如检测具有旋光特性的活性物质, 除采用非手性薄层色谱法或高效液相色谱法外, 还应增加旋光度的检查。

### 12.7.3.1 验证方法

检验项目	概述	验证方法	备注
鉴别试验	鉴别试验用于确认被测成分符合其特征。	专属性要求证明其能与可能共存的物质或结构相似化合物区分。 含被测成分的供试品呈正反应， 而不含被测成分的供试品以及结构相似或组分中的有关化合物，应均呈负反应。	对于药品，辅料不得干扰其有效成分的鉴别。
杂质测定 (包括限度检查和定量测定)	作为纯度检查，所采用的分析方法应确保可检出被分析物中杂质的含量测定，如有关物质、重金属、有机溶剂等。因此杂质检查要求分析方法有一定的专属性。	<b>方法 1:</b> 在杂质可获得的情况下，可向试样中加入一定量的杂质，考察杂质与共存物质能得到分离和检出，并具有适当的准确度与精密度。 <b>方法 2:</b> 在杂质或降解产物不能获得的情况下，专属性可通过测定含有杂质或降解产物的试样，与另一个已验证的方法或药典方法比较结果。或对试样用强光照射，高温，高湿，酸（碱）水解或氧化的方法进行加速破坏，以研究可能的降解产物和降解途径，并比对破坏前后检出的杂质个数。必要时可采用二极管阵列检测和质谱检测，进行峰纯度检查。	色谱法和其他分离方法，应附代表性图谱，以说明方法的专属性，并应标明诸成分在图中的位置，色谱法的分离度应符合要求。
含量测定	含量测定的目的是得到试样中被分析物的含量测定或效价的准确结果。	<b>方法 1:</b> 在杂质可获得的情况下，可向试样中加入杂质或辅料，考察测定结果是否受干扰，并可与未加杂质和辅料的试样比较测定结果。 <b>方法 2:</b> 在杂质或降解产物不能获得的情况下，专属性可通过测定含有杂质或降解产物的试样，与另一个已验证的方法或药典方法比较结果。或对试样用强光照射，高温，高湿，酸（碱）水解或氧化的方法进行加速破坏，用两种方法进行含量测定，比较测定结果。必要时可采用二极管阵列检测和质谱检测进行峰纯度检查，证明含量测定成分的色谱峰中不包含其他成分。	

### 12.7.4 检测限 (LOD)

检测限系指试样中的被分析物能够被检测出的最低量。

药品的杂质测定，应通过测试确定方法的检测限。

#### 12.7.4.1 验证方法

检验项目	验证方法
杂质测定	<b>方法 1:</b> 非仪器分析目视法 用已知浓度的被测物，试验出能被可靠地检测出的最低浓度或量。

**方法 2：信噪比法**

用于能显示基线噪音的分析方法，即把已知低浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较，计算出能被可靠地检测出的最低浓度或量。一般以信噪比为 3: 1 或 2: 1 时相应浓度或注入仪器的量确定检测限。

除信噪比法外，ICHQ2 R1 中还介绍了根据响应因子的标准偏差和斜率计算出检测限的方法

$$LOQ = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

$\sigma$  = 响应因子的标准偏差

S = 校正曲线的斜率

斜率 S 根据分析物的校正曲线评估而来，响应因子  $\sigma$  可采用不同方法获得，如：

**(1) 根据空白溶液的标准偏差**

测定分析背景的响应就是通过分析适量空白溶液并计算其响应值的标准偏差

**(2) 根据校正曲线**

用样品建立校正曲线，其中含有检测限范围的分析物，其回归线的剩余标准偏差或回归线截距的标准偏差作为标准偏差。

**数据要求**

应附测试图谱，说明测试过程和检测限结果。

**12.7.5 定量限 (LOQ)**

定量限系指试样中的被分析物能够被定量测定的最低量，其测定结果应具有一定的准确度和精密度。

杂质和降解产物用定量测定方法研究时，应确定方法的定量限。

**12.7.5.1 验证方法**

检验项目	验证方法
杂质定量测定	信噪比法：一般以信噪比为 10: 1 时相应浓度或注入仪器的量确定检测限。

除信噪比法外，ICHQ2 R1 中还介绍了根据响应因子的标准偏差和斜率计算出定量限的方法：

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

$\sigma$  = 响应因子的标准偏差

S = 校正曲线的斜率

斜率 S 根据分析物的校正曲线评估而来，响应因子  $\sigma$  可采用不同方法获得，如：

**(1) 根据空白溶液的标准偏差**

测定分析背景的响应就是通过分析适量空白溶液并计算其响应值的标准偏差

## (2) 根据校正曲线

用样品建立校正曲线,其中含量范围的分析物,其回归线的剩余标准偏差或回归线截距的标准偏差作为标准偏差。

### 12.7.6 线性

线性系指在设计的测定范围内,检测结果与试样中被测物的浓度直接呈正比关系的程度。

线性是定量测定的基础,涉及定量测定的项目,如杂质定量测定和含量测定均需验证线性。

#### 12.7.6.1 验证方法

应在设计的测定范围内测定线性关系。可用一贮备液经精密稀释,或分别精密称样,制备一系列供试样品的方法进行测定,至少制备5个浓度的供试样品。每一个浓度的样品3份,以测得的响应信号作为被测物浓度的函数作图,观察是否呈线性,用最小二乘法进行线性回归。必要时,响应信号可经数学转换,再进行线性回归计算。

不同分析方法的线性验证和准确度验证需涵盖的最低浓度范围,见表2。

表2 线性验证和准确度验证需涵盖的最低浓度范围

检验项目	需涵盖的最低浓度范围
含量测定	至少标示量的80 - 120% (ICH), 推荐包含50%-150%的浓度
含量均匀度	至少标示量的70 - 130% (ICH), 推荐包含50%-150%的浓度, 根据剂型特点, 如气雾剂和喷雾剂, 范围可适当放宽。
溶出度或释放度的溶出量测定	限度的 $\pm 20\%$ 。 a. 对于具有不同剂量的同种药品, 但测试溶液浓度一样的前提下, 只需进行一个剂量的线性试验(应涵盖限度的 $\pm 20\%$ ), 该试验即可用于该种药品的所有剂量。 b. 如规定了限度范围, 则应为下限的-20%至上限的+20%。例如: 缓释制剂的标准是1小时20%, 24小时后增到90%, 那么验证范围应为标示量的0-110%。
杂质的定量测定	范围应根据初步实测, 拟订为规定限度的 $\pm 20\%$ 。 如果含量测定与杂质检查同时进行, 用百分归一化法, 则范围应为杂质规定限度的-20%至含量限度(或上限)的+20%。

#### 12.7.6.2 数据要求

应列出回归方程、相关系数和线性图。

### 12.7.7 范围

范围系指能够达到一定的精密度、准确度和线性, 测试方法适用的高低限浓度或量的区间。

范围应根据分析方法的具体应用和线性、准确度、精密度结果和要求确定。要求见线性章节12.7.6.2中表2。

### 12.7.8 耐用性

耐用性系指测定条件有小的变动时, 测定结果不受影响的承受程度, 为使方法可用于常规检验提供依据。

开始研究分析方法时, 就应考虑其耐用性。经试验, 应说明小的变动是否符合系统适用性试验要求, 以确保方法有效。如果测试条件要求苛刻, 则建议在方法中予以写明。

典型影响耐用性的变动因素	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 被测溶液的稳定性</li> <li>2. 样品的提取次数, 时间等.</li> </ol>
液相色谱法 (HPLC) 中的典型影响耐用性的变动因素	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 流动相的组成</li> <li>2. 流动相的 pH 值</li> <li>3. 不同品牌或不同批号的同类型色谱柱</li> <li>4. 柱温</li> <li>5. 流速</li> <li>6. 其他</li> </ol>
气相色谱法 (GC) 中的典型影响耐用性的变动因素	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 不同品牌或不同批号的同类型色谱柱</li> <li>2. 固定相</li> <li>3. 不同类型的担体</li> <li>4. 柱温</li> <li>5. 进样口和检测器温度</li> <li>6. 其他</li> </ol>

#### 实例分析:

例1 : 下表列出了在评估HPLC含量方法耐用性中部分需考虑的因素及变化范围, 仅供参考, 实际变化范围可依据使用条件设计

HPLC 中的变动因素	变化范围
流动相的组成	有机相的 $\pm 5\%$ , 例如方法规定流动相缓冲溶液与甲醇的比例为 45:55, 那么允许使用 40:60 至 50:50 范围的比例.
流动相的 pH 值	$\pm 0.5$ , 如果已知 pH 值为关键影响因素, 变化范围会更小.
色谱柱	如可能, 推荐使用同一品牌的填料可由不同供应商填充的色谱柱。可通过回顾实验分析次数或方法研究确定色谱柱的质量。
柱温	$\pm 5^{\circ}\text{C}$

#### 例2 溶液的稳定性研究

溶液的稳定性研究用来证明根据相应方法制备的样品溶液和标准品溶液在规定的储存条件下在一定时间内保持稳定。如果方法中没有规定有效期, 样品溶液和标准品溶液需进行稳定性研究。

样品溶液和标准品溶液依据方法进行配制和分析。在室温或其他条件下 (如冰箱  $2-8^{\circ}\text{C}$ ) 条件下储存适当的时间。每个间隔点, 用新鲜配制的标准品溶液做对照, 测定储存的样品溶液和标准品溶液。测定结果与初始结果进行比较, 符合接受标准 (参见表 3) 便可确认样品溶液和标准品溶液在规定的储存条件下在规定储存时间是稳定的。

例3: 表 3 为某制药公司分析方法验证的接受标准, 仅供参考

检验项目	验证内容	接受标准
鉴别试验 (HPLC, TLC, GC)	专属性	色谱峰/斑点分离

鉴别试验 (IR/UV)	专属性	与标准物质响应相同, 能清晰的与相似物质区分
溶出度 <sup>(6)</sup> (DR)	精密度/重复性, $n \geq 6$	$S_{rel} \leq 2.0\%$
	中间精密度	方案中具体规定
	专属性	色谱法: 色谱峰分离 UV: UV 特征光谱 空白片的影响 $\leq 3.0\%$
	线性	$n \geq 6$
	- 相关系数	$r \geq 0.990$
	- 截距 <sup>(1)</sup>	$\leq 5\%^{(2)}$
	- 剩余标准偏差	$\leq 2.5\%^{(2)}$
	范围(篮法/桨法)	- 低于标准的 20% 到标示量的 120%
含量 (HPLC, GC, UV) 原料或辅料	准确度 (平均值)	
	- 回收率	标示量的 95 - 105%
	- 回收率的 $S_{rel}$	$\leq 2.5\%$
	稳定性	在规定时间内变化 $\leq 2.0\%$
	- 样品溶液	
	- 对照溶液	
	精密度/重复性, $n \geq 6$	$S_{rel} \leq 2.0\%$ (原料 $\leq 1.0\%$ )
	中间精密度, $n \geq 4$	$S_{rel} \leq 2.0\%$ , $n \geq 4$
峰纯度(如认为需要)	专属性	色谱峰基线分离, 无干扰 UV: UV 特征光谱 空白片的影响 $\leq 3.0\%$ .
	证明含量测定成分的色谱峰中不包含其他成分。参见准确度	
	线性	
	- 相关系数	$r \geq 0.998$
	- 截距 <sup>(1)</sup>	$\leq 2.0\%^{(3)}$
	- 剩余标准偏差	$\leq 2.0\%^{(3)}$
	范围	至少标示量 (100% 溶液) 的 80 - 120%
	准确度 制剂: - 回收率 (平均值)	98.0 - 102.0%

	(n=9, 3 个浓度, 每个浓度三份样品) - 回收率的 Srel (n ≥ 9, 至少 3 个浓度, <sup>(5)</sup> )	Srel ≤ 2.0%
	稳定性 - 样品溶液 - 对照溶液	规定时间内变化 ≤ 2.0%
	耐用性	方法通过系统适用性实验
含量均匀度 (制剂)	精密度/重复性, n ≥ 6	Srel ≤ 2.0%
	中间精密度, n ≥ 4	Srel ≤ 3.0%
	专属性	色谱峰基线分离, 无干扰  UV: UV 特征光谱 空白片 的影响 ≤ 3.0%.
	线性 - 相关系数 - 截距 <sup>(1)</sup> - 剩余标准偏差	r ≥ 0.990 ≤ 5.0% <sup>(3)</sup> ≤ 2.0% <sup>(3)</sup>
	范围	至少标示量的 70 -130%
	准确度	参见含量
	滤芯的验证	≤ 2.0% 未过滤 (离心) 和过滤
	稳定性 - 样品溶液 - 对照溶液	规定时间内变化量 (change over) ≤ 2.0%
杂质的定量测定 (副产品/降解产物, 对映结构体, ...)	精密度/重复性, n ≥ 6	限度 < 0.1%, s <sub>rel</sub> ≤ 30% 0.1 ≤ 限度 < 0.2%, s <sub>rel</sub> ≤ 20% 0.2 ≤ 限度 < 0.5%, s <sub>rel</sub> ≤ 10% 0.5 ≤ 限度 < 5%, s <sub>rel</sub> ≤ 5.0% 限度 ≥ 5%, s <sub>rel</sub> ≤ 2.5%
	精密度/ 中间精密度	限度 < 0.1%, s <sub>rel</sub> ≤ 40% 0.1 ≤ 限度 < 0.2%, s <sub>rel</sub> ≤ 30% 0.2 ≤ 限度 < 0.5%, s <sub>rel</sub> ≤ 15% 0.5 ≤ 限度 < 5%, s <sub>rel</sub> ≤ 7.5% 限度 ≥ 5%, s <sub>rel</sub> ≤ 4.0%
	专属性 峰纯度 (如认为需要)	色谱峰基线分离, 无干扰 证明含量测定成分的色谱峰中不包含其他成分。

线性 - 相关系数 - 截距 <sup>(1)</sup> - 剩余标准偏差	制剂, $r \geq 0.990$ 原料, $r \geq 0.998$ $\leq 25\%$ <sup>(4)</sup> 限度 $< 0.5\%$ , $s_{rel} \leq 10\%$ <sup>(4)</sup> $0.5 \leq \text{限度} < 5\%$ , $s_{rel} \leq 5.0\%$ <sup>(4)</sup>  限度 $\geq 5\%$ : $\leq 2.5\%$ <sup>(4)</sup>
范围	报告限 / LOQ 到 标准的 120%
检测限	信噪比 $\geq 3:1$ $S_{rel} \leq 20\%$ , $n \geq 5$
定量限	信噪比 $\geq 10:1$ $S_{rel} \leq 10\%$ , $n \geq 5$
准确度 - 回收率 (平均值) ( $n=9$ , 3 个浓度, 每个浓度三份样品)	限度 $< 0.5\%$ : 80-120% $0.5\% \leq \text{限度} < 5\%$ : 90-110%  限度 $\geq 5\%$ : 95-105%
- 回收率的 $S_{rel}$ ( $n \geq 9$ , 至少 3 个浓度)	限度 $< 0.5\%$ : $\leq 10\%$ $0.5\% \leq \text{限度} < 5\%$ : $\leq 5.0\%$  限度 $\geq 5\%$ : $\leq 2.5\%$
稳定性 - 样品溶液   - 对照溶液	限度 $< 0.5\%$ : $\text{change} \leq 20\%$  $0.5\% \leq \text{限度} \leq 5\%$ : $\text{change} \leq 10\%$  限度 $\geq 5\%$ : $\text{change} \leq 5\%$ 没有新的色谱峰出现。 > 储存期变化 $\leq 5\%$

(1) 截距的绝对值

(2) 指回归线的 y 值对应于完全溶出( $x=100\%$ )时的浓度

(3) 指回归线的 y 值对应于标示量( $x=100\%$ )时的浓度

(4) 指回归线的 y 值对应于允许限度(杂质的标准)时的浓度

(5) 3 个浓度, 每个测 3 次。

例 4: 在 FDA 质量控制实验室检查指南“15.方法验证”中指出许多含量和杂质的方法采用高效液相色谱法,对于这些方法的精密度的要求希望小于或等于系统适应性试验的相对标准偏差。

在美国药典<621> 色谱法中对系统适应性试验的相对标准偏差有如下规定:

“对用于含量测定的标准溶液或其他标准溶液重复进样分析, 比较其结果来确认精密度的是否符合要求。连续进样 5 次, 除在方法中已明确规定外, 其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 2.0%。如果 5 针的相对标准偏差大于 2.0%, 可连续进样 6 次, 其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 2.0%。”

### 12.8 方法确认

适用于: 药典方法和其他已验证的法定标准。因为药典方法和其他法定标准被认为是验证过的分析方法, 不需要验证, 但需要通过方法确认来证明方法在该实验室条件下的适应性。

不适用于: 实验室日常测试操作步骤不需要进行方法确认, 例如(包括但不限于)干燥失重, 炽灼残渣, 各种湿法化学步骤如酸值和简单的仪器方法如 PH 计, 除非有特殊要求。

### 12.9 方法再验证

在某些情况下, 如原料药合成工艺改变、制剂处方改变、分析方法发生部分改变等, 均有必要对分析方法再次进行部分或完整的再验证, 以保证分析方法可靠。

➤ 当原料药合成工艺发生改变时, 可能引入新的杂质, 杂质检查方法和含量测定方法的专属性就需要再进行验证, 以证明有关物质检查方法能够检测新引入的杂质, 且新引入的杂质对主成份的含量测定应无干扰。

➤ 当制剂的处方组成改变、辅料变更时, 可能会影响鉴别的专属性、溶出度和含量测定的准确度, 因此需要对鉴别、含量测定方法再验证。当原料药产地来源发生变更时, 可能会影响杂质检查和含量测定的专属性 and 准确度, 因此需要对杂质检查方法和含量测定方法进行再验证。

➤ 当质量标准中某一项目分析方法发生部分改变时, 如采用高效液相色谱法测定含量时, 检测波长发生改变, 则需要重新进行检测限、专属性、准确度、精密度的验证, 证明修订后分析方法的合理性、可行性。

再验证原则: 根据改变的程度进行相应的再验证。当这种改变到达一定程度时, 则需要完整的验证。如方法完全改变时, 则需要完整的验证。法再验证是对分析方法的完善过程, 应根据实际改变情况进行再验证, 从而保证所采用的分析方法能够控制药品的内在质量。

## 12.10 分析方法验证和确认的文件管理

12.10.1 必须制订方法验证和确认的标准操作规程。

12.10.2 在开始验证分析方法之前, 必须依据操作规程起草一个验证方案。对于方案存在的需求, 有两个重要的原因: 其一是要被执行的程序在方案中能够详细地描述, 其二是每个被测参数的接受标准能被具体地规定。

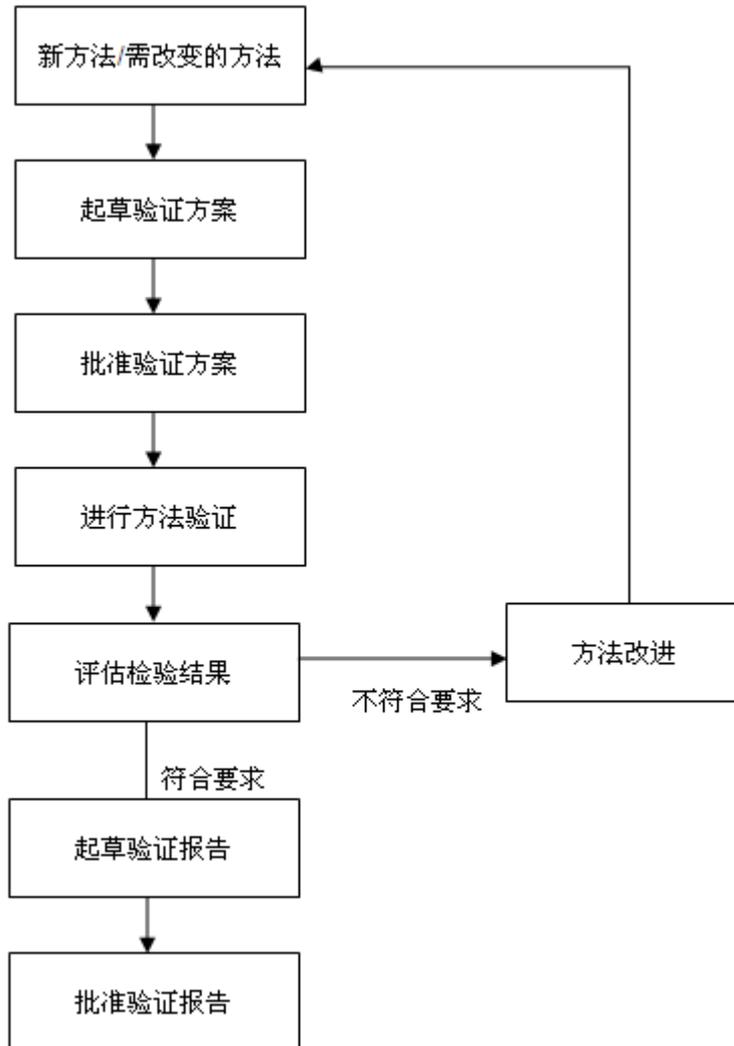
12.10.3 进行方法验证或确认前, 应确认如下条件已符合

- 从事分析方法验证或确认的分析师是合格的分析师。
- 所用分析仪器已通过验证和校验。
- 实验必须依据批准的方案进行。
- 实验过程中任何失败的测试, 过程中的偏差或异常均需复核和评估并查出原因。过程中的偏差或异常需通过正式的体系(如调查报告, 验证或确认报告中偏差的鉴定和批准)进行记录和批准。

12.10.4 验证的结果应以报告的方式给出，它包括了某一产品所有方法的验证，这与方法描述的要求一致。作为一种可供选择的方法，可以将测试规程与分析方法验证部分附在一起，这样做的优点是相关的文件总是和分析方法一起。

**实例分析：**

例 5：以下为某制药公司分析方法验证/确认的文件管理流程，仅供参考



➤ 分析方法验证或确认的方案

对于分析方法的验证或确认，应制订方案并由相关人员批准后方可进行。

验证或确认方案通常含有以下信息

- 唯一的方案号.
- 分析方法的版本号以及物料/产品的名称:
- 验证或确认的实验项目
- 验证或确认的原则和目的
- 验证或确认的参数以及接受标准
- 验证或确认实验中所用标准品，检验样品信息
- 分析仪器的相关信息
- 所用仪器的信息，如已确认的情况下
- 方案起草者，复核人和批准者需签字确认

➤ 方法验证或确认的执行

进行方法验证或确认前，应确认如下条件已符合

- 从事分析方法验证或确认的分析师是合格的分析师。
- 所用分析仪器已通过验证和校验。
- 实验必须依据批准的方案进行。
- 实验过程中任何失败的测试，过程中的偏差或异常均需复核和评估并查出原因。过程中的偏差或异常需通过正式的体系（如调查报告，验证或确认报告中偏差的鉴定和批准）进行记录和批准。

➤ 报告的起草与批准

分析方法验证或确认结束后，需起草报告相关人员批准。报告中通常含有如下信息：

- 唯一的报告号。
- 相关方案号
- 分析方法的版本号以及物料/产品的名称：
- 验证或确认的实验项目
- 验证或确认实验中所用标准品，检验样品以及分析仪器的相关信息
- 结果汇总，并与方案中规定的接收标准进行评估
- 偏离方案的偏差汇总
- 结论，需对方法验证或确认是否成功进行正式描述。
- 报告起草者，复核人和批准者需签字确认

➤ 分析方法验证或确认的方案与报告的存档

方案与报告均集中存档，并长期保存

例 6: 据统计，FDA 发给中国企业的警告信涉及分析方法验证和清洁验证。其中最多的是分析方法验证，其中以验证内容设置不合理和缺少最为常见。例如：2000 年 FDA 发给中国一企业的警告信：

.....

2. 用于稳定性检测的分析方法不指示稳定性。另外，没有确立 xx 的杂质框架。

我们的检查显示你们公司在使用的检测 xx 的 USP 滴定法不是一个稳定性指示的方法。另外，你们公司没有确立这个 API 的杂质框架。

在你们的答复中，你们制定和验证了一个指示稳定性的 xx 的分析方法，它将包括强制降解研究。请在这封警告信的答复中提交分析方法验证和你们降解研究的结果的拷贝件。

我们注意到你们的答复仍然没有解决 xx 杂质谱确立的问题。FDA 希望生产厂家确立每个 API 的杂质谱，说明用控制工艺生产的典型批次中出现的鉴定杂质和未鉴定杂质。杂质谱架包括鉴定或者定性分析界定（如保留时间）、可检测到杂质的范围和每个鉴定杂质的分类（如，无机、有机或溶剂）。杂质的框架应该在适当的间隔与历史数据进行对比，以发现因原料、设备运行参数或者生产工艺的改变引起的 API 的变化。请在这封警报信的答复中解决这个问题。

### 【要点分析】

- 在进行方法验证或确认前，应已建立分析方法。
- 分析方法应经验证或确认。
- 分析方法验证或确认的方案与报告应长期保存。
- 分析方法在实际使用过程中，应与验证或确认报告中确定的内容一致。



## 13 稳定性实验

在这里你会找到以下问题的答案：

- 为什么需要进行稳定性试验？
- 存在什么样的稳定性试验？
- 运输条件是如何确定的？
- 怎样的程序和特殊要求是需要特别加以考虑的（指南）？
- 文件的要求是什么？
- 如何降低成本，以及在哪些领域能降低成本？
- 数据应该如何评估（推测）？
- 如何处理稳定性试验的超标及超出趋势结果？
- 

### 10.5 定义

药品的稳定性是指原料药及其制剂保持其物理、化学、生物学和微生物学性质的能力。稳定型试验的目的是考察原料药、中间产品或制剂的性质在温度、湿度、光线等条件的影 响下随时间变化的规律，为药品的生产、包装、贮存、运输条件和有效期的确定提供科学依据，以保障临床用药的安全有效。。并且通过持续稳定性考察可以在有效期内监控药品质量，并确定药品可以或预期可以在标示的贮存条件下，符合质量标准的各项要求。

### 10.6 应用范围

稳定性研究是药品质量控制研究的主要内容之一，与药品质量研究和质量标准的建立紧密相关。其具有阶段性特点，贯穿原料药（API），制剂产品及中间产物的药品研究与开发的全过程，一般始于药品的临床前研究，在药品临床研究期间和上市后还应继续进行稳定性研究。

### 10.7 原则

研发阶段：应进行全面的稳定性实验，以得到注册所需所有数据。此数据用于证明环境因素对产品特性的影响，以确定包装、储存条件、复验周期（API 而言）和有效期。

已上市阶段：产品上市后，应进行适当的持续稳定性考察，监控已上市药品的稳定性，以发现市售包装药品与生产相关的任何稳定性问题（如杂质含量或溶出度特性的变化）；也用于考察产品上市后因变更对产品稳定性的影响。

### 10.8 稳定性分类

按照中国药典 2010 版及法规要求，我国的稳定性研究可以分为以下几类：

影响因素实验

加速稳定性实验

长期稳定性实验

## 持续稳定性实验

各公司根据需求及法规规定，还可以进行中间产品放置时间稳定性实验，批量放大及上市后变更（如生产设备变更，原辅料变更，工艺调整等）稳定性实验以及特殊目的稳定性实验，例如对偏差调查等的支持性实验。

### 10.9 要点

#### 10.9.1 基本要求（参考中国药典 2010）

稳定性试验应遵循具体问题具体分析的基本原则，其设计应根据不同的研究目的，结合原料药的理化性剂型的特点和具体的处方及工艺条件进行。一般性要求如下：

a. 影响因素实验用 1 批原料药或 1 批制剂进行。加速实验和长期稳定性试验用 3 批供试品进行。

b. 原料药供试品应是一定规模生产的。供试品量相当于制剂稳定性试验所要求的批量，原料药合成工艺路线、方法、步骤应与大生产一致。药物制剂供试品应是放大试验的产品，其处方与工艺应与大生产一致。药物制剂如片剂、胶囊剂，每批放大试验的规模，片剂至少应为 10000 片，胶囊剂至少应为 10000 粒。大体积包装的制剂如静脉输液等，每批放大规模的数量至少应为各项试验所需总量的 10 倍。特殊品种、特殊剂型所需数量，根据情况令定。

c. 供试品的质量标准应与临床前研究及临床试验和规模生产所使用的供试品质量标准一致。

d. 加速试验与长期试验所用的供试品的包装与上市产品一致

e. 研究药物稳定性，要采用专属性、准确、精密、灵敏的药物分析方法与有关物质（含降解产物及其他变化所生成的产物）的检查方法，并对方法进行验证，以保证药物稳定性结果的可靠性。在稳定性试验中，应重视降解产物的检查。

f. 由于放大试验比规模生产的数量要小，故申报者应承诺在获得批准后，从放大试验转入规模生产时，对最初通过生产验证的 3 批规模生产的产品仍需进行加速试验和长期稳定性试验。

#### 10.9.2 样品储存

##### 10.9.2.1 标准储存条件

（按照气候带不同区域有不同要求）

四个气候带的分类表				
气候带		温度	相对湿度	mbar*
I	温带	21 °C	45 %	11.2
II	亚热带	25 °C	60 %	19.0
III	热带（干热）	30 °C	35 %	15.0
IV A	热带	30 °C	65 %	30.0
IV B		30 °C	75 %	

\* mbar: 水饱和蒸汽压

各国家/地区被相应分配到以下气候带：

- 气候带 I 主要有英国，北欧，加拿大，俄罗斯

- 气候带 II 主要有美国，日本，南欧（地中海地区）
- 气候带 III 主要有伊朗，伊拉克，苏丹
- 气候带 IVB 主要有巴西，气候带 IVA 主要有加纳，印度尼西亚，尼加拉瓜，菲律宾

基于这种分类，表明大约90%的全球药品市场位于温带或亚热带气候带。在ICH指导原则Q1 A中的气候带I和II，已经作为标准贮藏条件。

我国总体属于亚热带（II），部分地区属湿热带（IV A），按照中国药典 2010 版规定，长期稳定性实验采用温度为  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $60\% \pm 10\%$ ，或温度为  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $65\% \pm 5\%$ ，与 ICH（美、日、欧国际协调委员会）采用条件基本一致。具体实验储存条件见下表：

标准贮藏条件（依据 ICH Q1A (R2) 和 ICH Q1F）		
对于气候带 I 和 II	温度	相对湿度
长期试验研究	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	$60\% \pm 5\%$
中间条件	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	$65\% \pm 5\%$
加速试验研究	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	$75\% \pm 5\%$
对于气候带 III 和 IV		
长期试验研究	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	$65\% \pm 5\%$ 或 $75\% \pm 5\%$
加速试验研究	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	$75\% \pm 5\%$

**长期稳定性实验或实时试验：**参考产品在指定期限内能保持质量稳定的实验条件，长期试验选择哪种实验条件—气候带 I&II ( $25^{\circ}\text{C}/60\text{RH}$ ) 或者 III & IV ( $30^{\circ}\text{C}/65\text{RH}$  或  $30^{\circ}\text{C}/75\text{RH}$ ) 进行，由厂家自行决定。

**加速稳定性试验：条件**至少高于长期稳定性试验条件 15C，用于加快降解反应的速度，使得相应的质量变更发生在早期阶段。

**中间条件：**是指在加速条件下因质量“显著变化”或供试品经检测不符合制定的质量标准而采用的替代条件，这也被称为**后备条件**。按照中国药典规定，应在  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $65\% \pm 5\%$  的情况下（可用  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  饱和溶液）进行，时间仍为 6 个月。

一般来说，原料药的“显著变化”应包括：

- 1、形状如颜色、熔点、溶解度、比旋度超出标准规定，及晶型、水分等超出标准规定
- 2、含量测定超出标准规定
- 3、有关物质如降解产物、异构体等超出标准规定
- 4、结晶水发生变化

药物制剂的“显著变化”应包括：

- 1、含量测定中发生 5% 的变化（特殊情况应加以说明）；或者不能达到生物学或者免疫学的效价指标
- 2、任何一个降解产物超出标准规定

3、形状、物理性质以及特殊制剂的功能性试验（如颜色、相分离、再混悬能力、结块、硬度、每撤给药剂量等）超出标准规定。

4、pH 值超出标准规定

5、制剂溶出度或释放度超出标准规定

如果选择气候带 III 和 IV 的条件作长期稳定性研究，中间条件可以排除。

除此之外，如下表描述的附加的标准条件应用于对温度较不稳定的产品：

温度选择性制剂的标准贮藏条件		
	温度	相对湿度
冷藏	5 °C ± 3 °C	监测
冷冻贮藏	-20 °C ± 5 °C	-
备注：FDA 草案中规定的冷冻温度为-15 °C ± 5 °C (FDA, 1998)。		

FDA 规定的吸入粉剂和气雾剂贮藏条件的描述见下表：

吸入粉剂和气雾剂的标准贮藏条件(依据 FDA)		
	温度	相对湿度
长期试验研究	25 °C ± 2 °C	75 % ± 5 %
加速实验研究	40 °C ± 2 °C	75 % ± 5 %

### 10.9.2.2 包装

稳定性试验样品的包装应与拟上市产品的包装一致，应紧密，避光(如需要)。原料药可采用模拟小包装，所用材料和封装条件应与大包装一致。通常，对于原料药，水蒸气渗透性试验用于包材的分级，例如通过硅胶吸收水分的重量测定所得，试验条件为 23C/75%RH 下储存 14 天。

原料药包装分类（依据水蒸气渗透性）		
严密性	分类	水蒸气渗透性/天/升
极密封	A	≤ 0.5 mg
密封	B	≤ 2.0 mg
渗透	C	≤ 14.0 mg
极易渗透	D	≤ 14.0 mg

### 10.9.2.3 样品的准备

取样：

稳定性样品取样应按照规定和需求进行，科学、合理、具有代表性。详见第七章“取样”

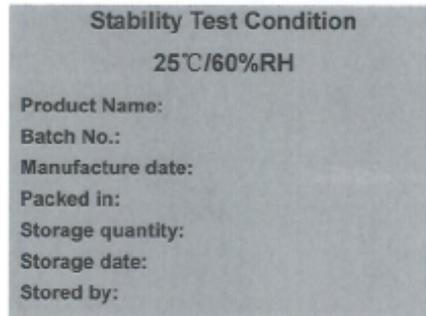
样品量：

通常，应储存足够量的样品用于稳定性研究，如需要，应确保所有试验都可以重复进行。许多公司选择储存双倍的全检样品量。即使选择简化试验方案设计（例如，括弧

法和矩阵)时,也必须按照全面设计的方案储存所有的样品。

样品标识:

储存于每个条件下的样品应作适当标示,反映出产品的名称,批号,储存条件和稳



定性研究的初始时间等信息。例如:

#### 10.9.2.4 设备要求

用于稳定性试验样品贮存的设备应按要求进行确认,校正及定期维护,保证处于稳定的状态。温度/湿度布点测定应建议与设备验证/再验证同步进行。具体参考“实验室设备的验证及校正/维护章节”。

样品储存设备(恒温恒湿箱)必须进行监控(计算机系统自动监控或者手工记录等),维持温度和湿度水平位于规定的范围内。此监控检查必须正确记录。计算机系统自动监控应实行访问控制,相关人员须接受进行培训。设备应有报警系统提示,如果发生控制系统故障失控,必须于紧急计划中规定后续行动,并对异常情况有及时的记录和调查。超出要求的情况及相应的处理措施,参见质量保证模块“偏差系统”。

样品应有足够的储存空间,同时应考虑备用设备或其它应急措施。如 1、委托有资质的第三方负责样品的贮存,委托应严格按照法规和委托合同执行,详见第十四章“产品的检验”中“委托检验”部分。2、降低储存条件,如:

40C/75%RH 条件下样品逐步地转移至 30C/75%RH, 30C/65%RH, 30C/环境自然湿度, 25C/60%RH, 25C/环境自然湿度。

30C/65%RH 条件下样品可逐步转移至 30C/环境自然湿度, 25C/60%RH, 25C/环境自然湿度。

25C/60%RH 条件下样品可转移至 25C/环境自然湿度

30C/75%RH 条件下样品可逐步转移至 30C/65%RH, 30C/环境自然湿度, 25C/60%RH, 25C/环境自然湿度

#### 10.9.2.5 挑战性试验储存条件

##### 10.9.2.5.1.1 影响因素试验

按照中国药典 2010 版规定,如下试验条件分别用于原料药及制剂的影响因素的测定

	原料药	制剂
目的	探讨药物的固有稳定性,了解其稳定性的影响因素和可能的降解途径与降解产物,为制剂生产工艺、包	考察制剂处方的合理性与生产工艺和包装条件

	装、贮存条件和建立降解产物的分析方法提供科学依据。	
试验批次	1 (如试验结果不明显, 应加试两批样品)	
样品形式	将供试品置适宜的开口容器中 (如称量瓶或培养皿), 摊成 $\leq 5\text{mm}$ 的薄层, 疏松原料药摊成 $\leq 10\text{mm}$ 的薄层	去除外包装, 置于开口容器中
高温试验	60℃ 放置 10 days, 于第 5 天, 第 10 天取样检测。40℃ 作为备份条件	
高湿试验	于 25℃, 90% $\pm 5\%$ RH 条件下放置 10 天, 于第 5 天, 第 10 天取样检测, 75% $\pm 5\%$ 作为备份条件。(备注: 除按照稳定性重点考察项目要求检测外, 同时应准确称量试验前后供试品的重量, 以考察供试品的吸湿潮解性能。若吸湿 5%以上, 则于备份条件下试验)。恒湿条件可在密闭容器如干燥器下部放置饱和盐溶液, 根据不同相对湿度的要求, 可以选择 NaCl 饱和溶液(相对湿度 75% $\pm 1\%$ , 15.6-60C), KNO <sub>3</sub> 饱和溶液(相对湿度 92.5%, 25C)	
强光照射试验	供试品开口放在装有日光灯的光照箱或其他适宜的光照装置内, 于照度为 4500lx $\pm 500\text{lx}$ 的条件下放置 10 天, 于第 5 天和第 10 天取样, 检测。设备: 采用定型设备“可调光照箱”, 也可用光橱, 在箱中安装日光灯数只使达到规定照度)	

当进行强度试验时, 如产生过多降解产物时, 试验条件可以适当调整。根据药品的性质必要时, 可以设计其他试验, 如考察 pH 值、氧、低温、冻融等因素对药品稳定性的影响。

#### 10.9.2.5.1.2 反复低温或冻融试验

对于易发生相分离、黏度减小、沉淀或聚集的药品须通过低温或冻融试验来验证其运输或使用过程中的稳定性, 作为影响因素试验的一部分。具体方法如下:

低温试验应包括三次循环, 每次循环应在 2-8C 条件下 2 天, 然后再 40C 加速条件下考察 2 天, 取样检测。

冻融试验应包括三次循环, 每次应在-10C 至-20C 条件下 2 天, 然后再 40C 加速条件下考察 2 天, 取样检测。

#### 10.9.2.6 特殊储存条件

除 ICH 标准储存条件以外, 对于特定的产品, 尚需测定进一步的储存条件下的质量稳定性。例如:

半渗透包装产品的储存条件 (包装于 PE 安瓿或 PE 瓶中的洗液, SVPs & LVPs, 鼻喷剂, 眼药等)

半渗透包装的标准贮藏条件		
对于气候带 I 和 II	温度	相对湿度
长期试验研究	25℃ $\pm 2^\circ\text{C}$	40% $\pm 5\%$
中间条件	30℃ $\pm 2^\circ\text{C}$	65% $\pm 5\%$
加速试验研究	40℃ $\pm 2^\circ\text{C}$	最大 25% $\pm 5\%$

对于气候带 III 和 IV		
长期试验研究	30°C ± 2 °C	35 % ± 5 %
加速试验研究	40°C ± 2 °C	最大 25 % ± 5 %

如果药物制剂使用密闭容器（玻璃瓶、西林瓶、密封的玻璃安瓿）包装，环境湿度对此影响极小，则水分测定并不是必需的。在这种情况下，建议贮藏条件可以参照下表：一般来说，在这些试验中提供单独的设施进行考察并没有任何优势，相反，样品往往是储存在正常气候箱中。

密闭包装的贮藏条件		
	温度	相对湿度
长期试验研究	25°C ± 2°C	环境
中间条件	30°C ± 2°C	环境
加速试验研究	40°C ± 2°C	环境

拟冷藏的药物制剂的贮藏条件参照下表

拟冷藏药物的贮藏条件		
	温度	相对湿度
长期试验研究	5°C ± 3°C	贮藏
加速试验研究	25°C ± 2°C	环境

若制剂拟深冷冻贮藏，参考以下建议表

在这种情况下，不推荐进行加速试验研究。但应对一批样品在略高的温度下（如：5°C ± 3°C 或 25°C ± 2°C）放置适当的时间进行测试，以了解允许的短期偏离标签贮藏条件的温度波动（短途运输）范围。

拟冷冻贮藏药物的标准贮藏条件		
	温度	相对湿度
长期试验研究	-20°C ± 5°C	-
备注：FDA 草案中规定的冷冻温度为 -15°C ± 5°C (FDA, 1998)。		

### 10.9.3 样品提取

#### 10.9.3.1.1.1 原则

样品必须按照稳定性试验计划从恒温恒湿箱和其他储存条件下按时取出

样品可以在一个允许的时间偏差范围内取出。例如对于试验点间隔至少为一年，则偏差为一个月是可以接受的。对于短期试验点，允许的时间偏差应适当减少，并应予以相应的 SOP 中予以规定。例如，在第三个月的试验点，早于或晚于 2 周的预设时间是可以接受的

对于加速试验条件，样品一般不推荐早于计划取样时间取出。另外，对于有效期月试验点的样品必须取出并进行检验。

任何附加于计划外的试验间隔点取样，必须经由责任授权人签字批准，并登记在册，必须保证有足够的样品用于余下的稳定性研究。

从恒温恒湿箱取出的稳定性试验样品应存放于适宜的位置等待试验，并有明显标示。

样品取出后，应作标记，并登记于相应的记录中，进行试验。

#### 10.9.3.1.1.2 文件

稳定性计划：按照要求，应准备每年的稳定性试验计划，并得到相应负责人的批准，以用于指导稳定性试验计划的实施。

稳定性试验样品记录：每次取出的样品数量必须记录。

#### 10.9.4 分析

##### 10.9.4.1 原则

所有的稳定性试验样品都需按照试验方法进行试验，稳定性特征试验项目应规定于稳定性试验草案中。

试验室对从贮存条件下取出的样品应在标准操作规程中明确规定完成分析的时间，并必须在指定实限内完成，以避免试验数据缺少取出时间点的代表性。例如，对于一个月的试验点样品，推荐于2周之内完成测试，对于其他试验点的样品，建议自实际取样日后4周之内完成测试，6周内完成报告。在完成分析之前，取出的样品应在推荐条件下贮存（如冷藏等）

##### 10.9.4.2 试验点的设计

由于稳定性研究的目的是考察质量随时间变化的规律，因此研究中一般需要设置多个时间点考察样品的质量变化。

考察时间点应基于对药品性质的认识

稳定性趋势评价的要求而设置。如长期试验中，总体考察时间应涵盖所预期的有效期，中间取样点的设置要考虑药品的稳定性特点和剂型特点。对某些环境因素敏感的药品，应适当增加考察时间。各法规对中间间隔点稍有不同，但都比需覆盖整个的产品生命周期。例如，

试验时间表		
长期试验研究	ICH	0, 3, 6, 9, <b>12</b> , 18, 24, 36, 48, 60月
	ChP. 2010	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36月. 如效期长于36个月, 则每年一次直至有效期止
加速试验研究	ICH	0, 3, <b>6</b> 月
	Ch. P. 2010	0, 1, 2, 3, 6月
	USA	0, 2, 4, <b>6</b> 月
	Japan	0, 1.5, 3, <b>6</b> 月

##### 10.9.4.3 考察项目的定义

稳定性研究的考察项目应选择在药品保存期内易于变化，并可能会影响到药品的质量、安全性和有效性的项目，以便客观、全面地反映药品的稳定性。根据药品特点和质量控制的要求，尽量选取能灵敏反映药品稳定性的指标。一般地，考察项目可分为物理、化学、生物学和微生物学等几个方面。具体品种的考察项目设置参考如下的中国药典规定：

附表 原料药及药物制剂稳定性重点考察项目参考表

剂型	稳定性重点考察项目	剂型	稳定性重点考察项目
原料药	性状、熔点、含量、有关物质、吸湿性以及吸湿品种性质选定的考察项目	口服乳剂	性状、含量、分层现象、有关物质
片剂	性状、含量、有关物质、崩解时限或溶出度或释放度	口服混悬剂	性状、含量、沉降体积比、有关物质、再分散性
胶囊剂	性状、含量、有关物质、崩解时限或溶出度或释放度、水分，软胶囊要检查内容物有无沉淀	散剂	性状、含量、粒度、有关物质、外观均匀度
注射剂	性状、含量、pH 值、可见异物、有关物质，应考察无菌	气雾剂	泄漏率、每瓶主药含量、有关物质、每瓶总吸次、每瓶主药含量、雾滴分布
栓剂	性状、含量、融变时限、有关物质	粉雾剂	排空率、每瓶总吸次、每吸主药含量、有关物质、雾粒分布
软膏剂	性状、均匀性、含量、粒度、有关物质	喷雾剂	每瓶总吸次、每吸吸量、每吸主药含量、有关物质、雾滴分布
乳膏剂	性状、均匀性、含量、粒度、有关物质、分层现象	颗粒剂	性状、含量、粒度、有关物质、溶化性或溶出度或释放度
糊剂	性状、均匀性、含量、粒度、有关物质	贴剂(透皮贴剂)	性状、含量、有关物质、释放度、黏附力
凝胶剂	性状、均匀性、含量、有关物质、粒度，凝胶剂应检查分层现象	冲洗剂、洗剂、灌肠剂	性状、含量、有关物质、分层现象(乳状型)、分散性(混悬型)，冲洗剂应考察无菌
眼用制剂	如为溶液，应考察性状、可见异物、含量、pH 值、有关物质；如为混悬液，还应考察粒度、再分散性；洗眼剂还应考察无菌；眼丸剂应考察粒度与无菌	搽剂、涂剂、涂膜剂	性状、含量、有关物质、分层现象(乳状型)、分散性(混悬型)，涂膜剂还应考察成膜性
丸剂	性状、含量、有关物质、溶散时限	耳用制剂	性状、含量、有关物质，耳用散剂、喷雾剂与半固体制剂分别按相关剂型要求检查
糖浆剂	性状、含量、澄明度、相对密度、有关物质、pH 值	鼻用制剂	性状、pH 值、含量、有关物质，鼻用散剂、喷雾剂与半固体制剂分别按相关剂型要求检查
口服溶液剂	性状、含量、澄明度、有关物质		

注：有关物质(含降解产物及其他变化所生成的产物)应说明其生成产物的数目及量的变化，如有可能应说明有关物质中何者为原料中的中间体，何者为降解产物，稳定性试验重点考察降解产物。

#### 10.9.4.4 消耗性试验

这种试验是为了模拟多剂量容器的应按规定禁止使用(如糖浆、口服溶液、软膏剂、滴眼液)。根据包装上的说明，当产品含量只剩余 10% 时即应该禁止使用。其次对化学和微生物性质(如无菌)分析和评价。这些调查结果将用于包装信息，例如滴眼液应在开瓶 10 天内使用，超过期限则必须妥善处置。

#### 10.9.4.5 静脉注射剂的兼容性试验

许多的 API 都具有在塑料表面聚集的趋势，从而引起次剂量的浸出。因此，所用的塑料容器和其他组分必须进行试验，同时另外一种材质的塑料必须被选定(例如：硬塑料代替软塑料)。如果需要，过滤性检查试验必须进行。

#### 10.9.4.6 橡胶塞和塑料组分的兼容性试验

这些兼容性试验专属用于液体制剂和无菌粉针制剂。FDA 推荐，除了使用药典中描述的标准萃取溶剂进行试验外，应附加更灵敏更专属的试验。例如口服溶剂，样品倒置存放，然后用 GC/MS 或其他适宜的方法分析内容物可能的污染。外观检测非常重要，例如口服溶剂盖子内的橡胶塞即为已知的污染源。

#### 10.9.4.7 光学稳定性 (ICH Q1 B)

##### 原则

按照 ICH Q1A (R2) 规定，新原料药和产品的光照试验的分析是必须的。ICHQ1B 中规定了一般实验条件。这个试验的目的是为了证明光照的影响不会引起质量上的不可接

受的变化。一般来说，一批制剂产品的试验即足够。API 的试验是强度挑战试验的一部分，应于研发早期进行。

#### 光源

光源必须符合 D65/ID65 的标准。ID65 相当于室内简介日光标准。如具有紫外-可见输出的人造日光荧光灯、氙灯或卤素灯也是适合的。若光源发射光低于 320nm，应滤光除去。另外，样品可暴露于冷白色荧光灯和光谱范围为 320~400 nm 的近紫外荧光灯。

#### 试验条件

试验进行时，温度必须加以考虑使得光线的影响可以独立评估。如必要，一个包裹与 OPAQUE 膜中的控制样品必须放置于样品室(黑暗控制)。曝光必须至少为 1200klux.h，并且由紫外成分产生的能量必须至少为 200w.h/m<sup>2</sup>。

#### API

API 的属性必须在试制阶段纳入考虑避免照射过程中升华，熔融或发生其他变化。API 必须在所需的适宜的容器和阴凉处进行试验。必须备注出：在早期的研发阶段的挑战性试验中，特意采用光降解方法进行杂质研究，而后来的调查重点是分析样品的保护措施。

#### 制剂产品

最初使用未包装的样品试验。如发生不能接受的变化，增加保护，首先以初级包装开始，然后次级包装（即市售包装）。基于试验结果，其包装必须改进，和/或配方更改。如同 API 一样，产品的特性 必须加以考虑，并且使用密闭容器排除外部影响。

#### 参数分析

照射后，样品的物理特性必须检测-主要为外观，含量和杂质。制剂产品还包括崩解时限和溶出度试验。然后，必须确定必要的防护方式。

#### 评估

一旦分析试验完成，必须评估结果。基于 API 或制剂产品在研发阶段的经验，对比质量标准做出判断。相应的有助于保护产品质量被负面影响的保护措施必须随后确定。

### 10.9.4.8 微生物分析

#### 防腐：

无菌以及非无菌药品均可能含有防腐剂以保护制剂不受细菌和真菌污染。在批准的货架效期结束时，在研发过程中必须确定最低含量。当低于处方中的防腐剂（如乙醇）需求量时，最低限度必须经过微生物挑战试验确认，以确定安全范围（USP<51>）。FDA 建议在货架效期内的初次、末次时间点及每一年，与防腐剂含量测定同时进行分析。

#### 微生物限度：

在非无菌药品的稳定性试验中，应进行定期核查的微生物限度的符合情况。美国药典或欧洲药典的规定同样适用。

#### 无菌试验：

在稳定性试验开始时，应对每一个批样品进行无菌检查。FDA 还建议应在货架效期

每年及结束时验证内包装的完整性。这个测试必须有足够的专属性和敏感度来检测不合格品的缺陷。美国药典中的无菌试验 (USP<71>) 是用来确定样本大小的。根据 FDA 的规定, 已通过完整性测试的样品, 可同时用于其他物理化学调查。但在任何情况下都不要将这些样品进行储存及在以后重复使用。FDA 还明确指出, 通过完整性测试被分析放行的样品不能用于无菌试验的替代品。

热原和内毒素:

热原和内毒素的检查必须在稳定性试验的开始和适当的时间间隔点进行。大多数的非肠道用药, 试验仅需在开始和效期结束即足够。对于干物质制造或溶液密封于琥珀瓶中, 只需在开始进行试验。塑料容器和可旋盖的玻璃容器, 至少在开始和结束时试验。

试验方法和标准参见第十七章“微生物”章相应章节。

#### 10.9.4.9 中间产品放置时间的研究

持续稳定性考察主要针对市售包装药品, 但也需兼顾待包装产品。例如, 当待包装产品在完成包装前, 或从生产厂运输到包装厂, 还需要长期储存时, 应在相应的环境条件下, 评估其对包装后产品稳定性的影响。此外, 还应考虑对储存时间较长的中间产品进行考察。此特殊稳定性试验用以建立原料药用于生产前的贮存时间以及需采取的防护措施。类似的调查也需进行去测定生产中间阶段产品, 如半成品包装前的最长贮存时间及包装容器。FDA 一般接受 30 天的放置时间, 更长的时限需要提供数据支持。至少一批产品被用于证明指定的适宜的包装条件下的放置时间选择。

通常, 以下几个方面需涵盖在研究中:

批次: 至少一批, 工艺验证中, 3 批验证批次可同时用于研究

样品量: 至少双倍量样品, 单独包装

包装: 模拟拟定的包装形式

贮存条件: 模拟最恶劣的贮存条件, (如可用恒温恒湿箱) 或真实的贮存条件 (如生产的储存间)

取样点: 预期的最长储存时间点及设计中间点

关键试验项目: 参考稳定性试验的重点考察项目, 并结合剂型与药品的特性, 设计专署试验。

例如一片剂产品的生产过程中, 如下阶段可以适用于进行中间产品放置时间的研究

产品 生产阶段	试验 项目	包装	贮存	时间 点
原料 分包装后	含量, 杂质	2 层 PE 袋/ 铁 桶, 内有 5 克干燥剂	生产储存 间 (18-25C)/ (30-65%RH)	0, 1, 2, 4 周
终混 颗粒	水分, 含量, 杂质	2 层 PE 袋/ 铁 桶, 内有 5 克干燥剂	生产储存 间 (18-25C)/ (30-65%RH)	0, 1, 2, 4 周

裸片 (片芯)	水分, 含量, 杂 质, 溶出度	2 层 PE 袋/ 铁 桶, 内有 5 克干燥剂	生产储存 间 (18-25C)/ (30-65%RH)	0, 1, 2, 4 周
包衣 液	微生 物限度, 干 物质	玻 璃 瓶 (密闭)	冰 箱 (2-8C)	0, 1, 2 周
半包 装品(包衣 后)	水分, 含量, 杂 质, 溶出度	2 层 PE 袋/ 铁 桶, 内有 5 克干燥剂	生产储存 间 (18-25C)/ (30-65%RH)	0 , 2, 4, 8 周

#### 10.9.4.10 运输条件的分析

##### 原则

除标示的储存条件外, 转运条件也必须关注。有时从制造商库房到药房的长途路线是必须监控的。必须保证药品到达最终客户是完整无损的。适当时, 须进行转运验证。验证或调查过程中, 药品必须与记录温湿度的记录仪同时发送, 药品的质量需随后通过试验调查, 从温湿度记录仪 logger 中得到的数据需评估。

##### 条件定义

转运条件一般如下规定:

运输条件		
类别	名称	描述
A	深冷冻运输	在-15 °C 以下不间断运输和临时存储
B	不间断冷藏运输	在+2~+8 °C 温度下不间断运输和临时存储
C	冷藏运输	在+2~+8 °C 温度下短暂间断运输和临时存储
D	受控	在 30°C 以下短暂运输和临时存储(最大周期 1 个月)
E	一般	运输和临时存储没有特殊要求

必要的运输验证按如下程序进行:

产品被列为处于研发阶段, 必须进行检查以确定在特定的条件下该产品是否会继续保持包装的完整。

新产品经过三次运输并在此期间进行数据记录和评估。

评估运营商, 以确定他们是否能符合入上表指定的条件, 并签订商业和质量协议定期检查运营商的对条件的承诺, 例如每隔两年。

#### 10.9.5 简化方案设计

10.9.5.1 目的: 为了将稳定性研究的人员和财务的付出保持在尽可能低的花费上, 基于 ICH Q1D, 可以如下进行简化试验, 目的为减少费用和试验室的消耗, 同时必须避免任何信息丢失。

10.9.5.2 原则: 保证法规及比需的基本要求。

#### 括号法

括号法是一种稳定性试验的设计方案, 它对某些设计因子(如规格、包装大小和/或填充量)处在极端状态的样品, 与完整设计方案一样, 在所有时间点进行试验。这种方案假设: 任何中间状态样品的稳定性可以用被试验的极端样品的稳定性所代表。括号法可以应用于处方相同或相近的多个规格的样品研究中。例如由相同粉末混合物、不同填充量制成的不同规格的胶囊。凡粉末混合物在质量上是一致而其数量上不同时, 必须提供理由。但是, 括号法不适合用于质量上不同(其他辅料)的粉末混合物。

#### 应用实例

括号法										
剂量		50mg			75mg			100mg		
批次		1	2	3	4	5	6	7	8	9
包装规格	15 ml	T	T	T				T	T	T
	100 ml									
	500 ml	T	T	T				T	T	T
T = 已测试样品										

备注: 所有的样品必须按照全面设计来存储, 括号法只能应用于最终的分析。如果无法确认被选择受试的规格或容器尺寸和/或填充量确实是处在极端状态, 那么应用括号法是不合适的。

#### 矩阵

定义: 用统计学设计作为基础, 仅在特定的试验点对选定的子因子进行试验。样品的子集变化从一个点到下一个点。一般来讲, 所有的因子必须在开始和效期点进行试验。一般以 1/2 或 1/3 比例减少, 但真实的节约应低于此值。设计方案假设受试的每个样品子集的稳定性代表着所给时间点上所有样品的稳定性(同一制剂、次级包装系统影响、设计因子、需考虑因素 etc)。

#### 应用实例

以 1/2 减少量的矩阵设计

矩阵法 1 (1/2 设计, 减少 1/2)							
剂量		50mg			100mg		
批次		1	2	3	1	2	3
试验次数(月)	0	T	T	T	T	T	T
	3	T	T		T		
	6			T	T		T
	9	T	T			T	
	12	T	T	T	T	T	T

### 13.1.1 上市产品的稳定性试验

药品在注册阶段进行的稳定性研究，一般并不是实际生产产品的稳定性，具有一定的局限性。采用实际条件下生产的产品进行的稳定性考察的结果，是确认上市药品稳定的最终依据

在药品获得批准上市后，应采用实际生产规模的药品继续进行长期实验。根据继续进行的稳定性研究的结果，对包装、贮存条件和有效期进行进一步的确认。

药品在获得上市批准后，可能会因各种原因而申请对制备工艺、处方组成、规格、包装材料等进行变更，一般应进行相应的稳定性研究，以考察变更后药品的稳定性趋势，并于变更前的稳定性研究资料进行对比，以评价变更的合理性。

#### 13.1.1.1 追踪（持续）稳定性实验

目的：保证按照固定验证过的生产参数制造的产品质量维持在稳定的趋势

要求：至少每年一批必须放置于稳定性试验，稳定性报告必须定期更新。

可以按如下设计方案实施：

仅在长期稳定性报告中标示的储存条件下储存

在所有 初级包装材料中储存

储存足够量的样品以推动以年度为基础的试验直至有效期

仅反析稳定性涉及的因子

推荐每年进行测定，至少 在有效期的开始，中间和结束点进行分析

矩阵是被接受的

出口美国的产品年度分析

#### 13.1.1.2 承诺稳定性实验（或理解为用于注册的稳定性实验？）

目的：特殊类型的稳定性，其报告与试验方案应提交给权威机构

要求：应用于下面的情况

原料药和药品制剂 转移到生产上的稳定性研究，即生产的前 3 批产品已获得批准，

从变更引发的稳定性研究，例如生产的改变、处方或包装的改变、厂房的变更。

权威机构申请补交数据

例如，如果新产品申请用的现有的稳定性数据不是来自于 3 批生产批次，则，则需承诺将最初三批生产批次放于长期稳定性实验和加速稳定性实验。

### 13.1.2 评估

稳定性数据评估的基本概念与单-多因素研究及全部-降低设计的研究相同。从正式的稳定性研究得到的数据，以及适宜的支持性数据都应进行评估，以确定关键质量属性是否可能影响产品质量和原料药或药品性能。每个属性应分开评估，并应全面评估判断所提议的复验期或有效期，储存、包装条件，一般如下确定：

- 贮存条件的确定

应综合影响因素实验、加速实验和长期实验的结果，同时结合药品流通过程中可能遇到的情况进行综合分析。选定的贮存条件应按规范术语描述

- 包装材料/容器的确定

一般先根据影响因素实验结果，初步确定包装材料和容器，结合加速试验和长期试验的稳定性研究的结果，进一步验证采用的包装材料和容器的合理性。

- 有效期的确定

药品的有效期应综合加速试验和长期试验的结果，进行适当的统计分析得到，最终有效期得确定一般以长期试验的结果来确定

由于试验数据的分散性，一般应按 95% 可信度进行统计分析，得出合理的有效期。如三批统计分析结果差别较小，则取其平均值为有效期，如差别较大则取其最短的为有效期。若数据表明测定结果变化很小，提示药品很稳定，则可以不作统计分析。

### 如下 ICH 具体原则可供参考

#### 13.1.2.1 欲贮存于室温的 API 复验周期和药品有效期 的数据评估

- 在加速储存条件下无明显变化

a. 长期和加速试验数据显示很小或无改变和很小或无可变性：无需统计学评估，但须提交证据说明。复验期和有效期限可以外推至最长支持数据实限的两倍但不超过 12 个月

b. 长期和加速试验数据显示随着时间推移有变化和/或变异：如果一个或几个因子的变化显著，长期数据的统计学分析是权宜于测定复验期和有效期。如果存在批间或其他因素变异，其复验期和有效期限不能超出所提交的合格数据的实限。如果变化源于特定因素，特定复验期或有效期可以指定到不同的计量产品。外推法允许调和，取决于有效的数据：

数据不能作统计评估或统计评估未作，复验期和有效期限可以延长到 1.5 倍的最长长期支持数据，最大允许延长期限为 6 个月。

数据可以做统计评估，如已做统计评估，复验期和有效期限可以延长到 2 倍的支持数据的最长实限，最多允许 12 个月，支持性数据要求来自注册研究。

- 加速储存条件下明显变化

中间存储条件的数据可以使用。

- a. 中间存储条件无明显变化：

数据不能统计分析或未评估：复验期和有效期限可以延长最多 3 个月于支持的长期数据的实限。支持数据要求与注册批次

数据可以进行统计分析：如完成统计分析，复验期和有效期限可以延长至 1.5 倍的支持数据，最多允许 6 个月

- b. 中间存储条件有明显变化：

如明显变化发生在一个或几个因素，复验期和有效期限不能长于支持数据的实限。另外，复验期和有效期限有可能被要求短于长期研究的支持数据实限。

#### 13.1.2.2 欲贮存于冰箱中（2-8 °C）的 API 复验周期和药品有效期 的数据评估

原则同室温储存产品。因其不稳定性，外推效期需谨慎，另外，无中间储存条件。

- 在加速储存条件下无明显变化

a. 长期和加速试验数据显示很小或无改变和很小或无可变性：无需统计学评估，但须提交证据说明。复验期和有效期限可以外推至最长支持数据实限的 1.5 倍但不超过 6 个月

b. 长期和加速试验数据显示随着时间推移有变化和/或变异：

数据不能作统计评估或 统计评估未作，复验期和有效期限可以延长到 1.5 倍的最长长期支持数据，最大允许延长期限为 3 个月。

数据可以进行统计分析：如完成统计分析，复验期和有效期限可以延长至 1.5 倍的支持数据，最多允许 6 个月

- 加速储存条件下明显变化

变化发生于 3 个月和 6 个月之间

a. 长期数据用于指定复验期和有效期限的基础，如外推法不可能，效期必须再取决于数据的有效性缩短。统计分析可以适用。

b. 变化发生在前 3 个月

与上相同。另外，对稳定性有影响的超出储存温度的行动需讨论。

#### 13.1.2.3 欲贮存于冷冻（-20 °C）的 API 复验周期和药品有效期 的数据评估

长期数据用于标定复验期和有效期。另外，一批可以储存于高温（5 度或 25 度）储存条件的 短实限的稳定性影响。作最长三个月试验，以得到数据证明超出

#### 13.1.3 数据汇总

所有的稳定性试验结果和相关调查均需记录，稳定性数据如下章“文件”方式报告，以保证从连续的样品点产生的信息可以易于比较。

#### 13.1.4 统计分析的程序

这一分析的目的是为了建立一个高可信度的复验期或货架期，以确保将来在相似条件下生产、包装和贮藏的所有批次的样品的定量特性在此期间内能符合认可标准的要求。一旦采用一种统计分析方法去分析注册批次的数据，则应采用相同的统计方法进行后续稳定性承诺批次的数据。

回归分析是评价定量特性的稳定性数据和建立复验期或货架期的一种合适的方法。定量特性与时间的关系决定了这些数据是否需要转换进行线性回归分析。平均值的 95% 单侧置信水平和定量特性交叉分析用于确定随时间减少的定量特性（如含量）的复验期或货架期。而平均值的 95% 单侧置信水平上限将应用于随时间增加的定量特性（如降

解产物)。该程序可用于评估单批或经适当的统计分析后合并的多批次产品的复验期或货架期。

备注：如果一种 统计分析用于注册批次，那么相同的统计程序应用于相应的承诺稳定性批次。

线性回归、合并检验和统计模型一般可应用于稳定性分析的定量结果评价

## 13.2 文件

### 13.2.1 标准操作规程

必须建立标准操作流程去描述稳定性试验的程序和要求，复检期/有效期声明和推荐储存条件和转运条件的测定

### 13.2.2 稳定性实验草案

稳定性草案是稳定性研究的基本部分，应涵盖药品有效期，应至少包括以下内容：

- 每种规格、每种生产批量药品的考察批次；
- 相关的物理、化学、微生物和生物学检验方法，可考虑采用稳定性考察专属的检验方法；
- 检验方法依据；
- 合格标准；
- 容器密封系统的描述；
- 试验间隔时间（测试时间点）；
- 贮存条件（应采用与药品标示贮存条件相对应的《中华人民共和国药典》长期稳定性试验的标准条件）；
- 检验项目，如检验项目少于成品质量标准所包含的项目，应说明理由。

所有的稳定性草案必须有责任授权人批准后执行，注册稳定性相关的试验草案须经由注册部相关责任人复核并批准。稳定性试验草案必须在稳定性研究启动之前得到相关责任人的批准。

如果在市产品的持续稳定性程序不同于初始的长期稳定性试验研究，则必须提交书面证明，作为上市批准档案的一部分。

### 13.2.3 计划

每年的年度必须准备下一年的“年度稳定性计划“ 一旦新的稳定性研究被启动，补充性的“ 年度稳定性计划“ 必须相应准备。如果需要，及时更新“年度稳定性计划”添加补充性的计划内容。必须按照“年度稳定性计划”进行稳定性试验管理。

### 13.2.4 记录

取样：样品必须按照 稳定性试验计划按时取出，并及时记录于相应的记录中，同时，样品必须转移至相关实验室登记及随后的分析试验，分析记录应及时出具。原则详见“原始数据管理”章节。

### 13.2.5 报告

稳定性报告应包含稳定性研究中收集的所有相关的数据，也包括对正在进行的或已

完成的稳定性 研究所得结果的科学的数据评估和结论。一般的，稳定性报告被要求按时撰写和更新。

稳定性报告须涵盖下列部分，包括但不限于以下所列条款：

- 所选的批次
- 产品性能的汇总介绍
- 产品有效期
- 批生产信息
- 分析试验和质量标准
- 试验结果
- 与稳定性试验草案的偏差
- 结论
- 数据表
- 适当的趋势分析和统计分析
- 适当的统计分析图表。

稳定性试验报告应由责任分析师撰写/更新，并经由责任授权人批准。

长期稳定性试验和持续稳定性试验应定期报告汇总，建议每年至少以中期报告或数据汇总表的形式报告一次。所有稳定性研究完成后，应出具最终的稳定性报告。

#### 13.2.6 年度趋势分析与评估

在年度产品回顾的报告中，在回顾期限内从事的所有稳定性研究均需加以描述和评估，对于复验期/有效期的支持结论必须明确定义。

### 13.3 超出质量标准 OOS/超出趋势或预期 OOE 数值的调查处理

#### 13.3.1 原则：

应对不符合质量标准的结果或重要的异常趋势进行调查。任何已确认的不符合质量标准的结果或重大不良趋势，都应向当地药品监督管理部门报告；企业还应考虑是否可能对已上市药品造成影响，必要时应实施召回。

调查程序参见“实验室调查”章节，如下描述。

#### 13.3.2 程序：

##### 13.3.2.1 在市产品的 OOS/OOE 的调查处理

###### A.持续稳定性试验 OOS/OOE 的调查处理

原则：任何超出标准和超出趋势的结果必须进行调查，并采取相应的措施

质量警报：一旦追踪稳定性试验 OOS 结果被确认，生产商的质量保证部必须被书面通知，最好在短期内完成报告

可能的召回：如果质量警报包含潜在的召回，召回的调查程序必须遵守

产品失败的调查：必须在制造方质量保证部的领导下，进行全面的失败调查（见 QS 模块），对于即将生产的批次必须采取相应的措施。

产品评估：在相关质量团队的领导下，包含所有涉及的操作的全面的的产品质量评估必须进行，并需决定紧急行动，包含采取的召回，以保证现有的和将来批次的产品质量。此评估应在 20 个工作日之内完成。

相关质量团队的组成：推荐为如下

领导：稳定性试验室负责人/委托方质量保证负责人（如果为第三方制造产品）

委员：制造方质量保证部，法规部，总部质量保证支持

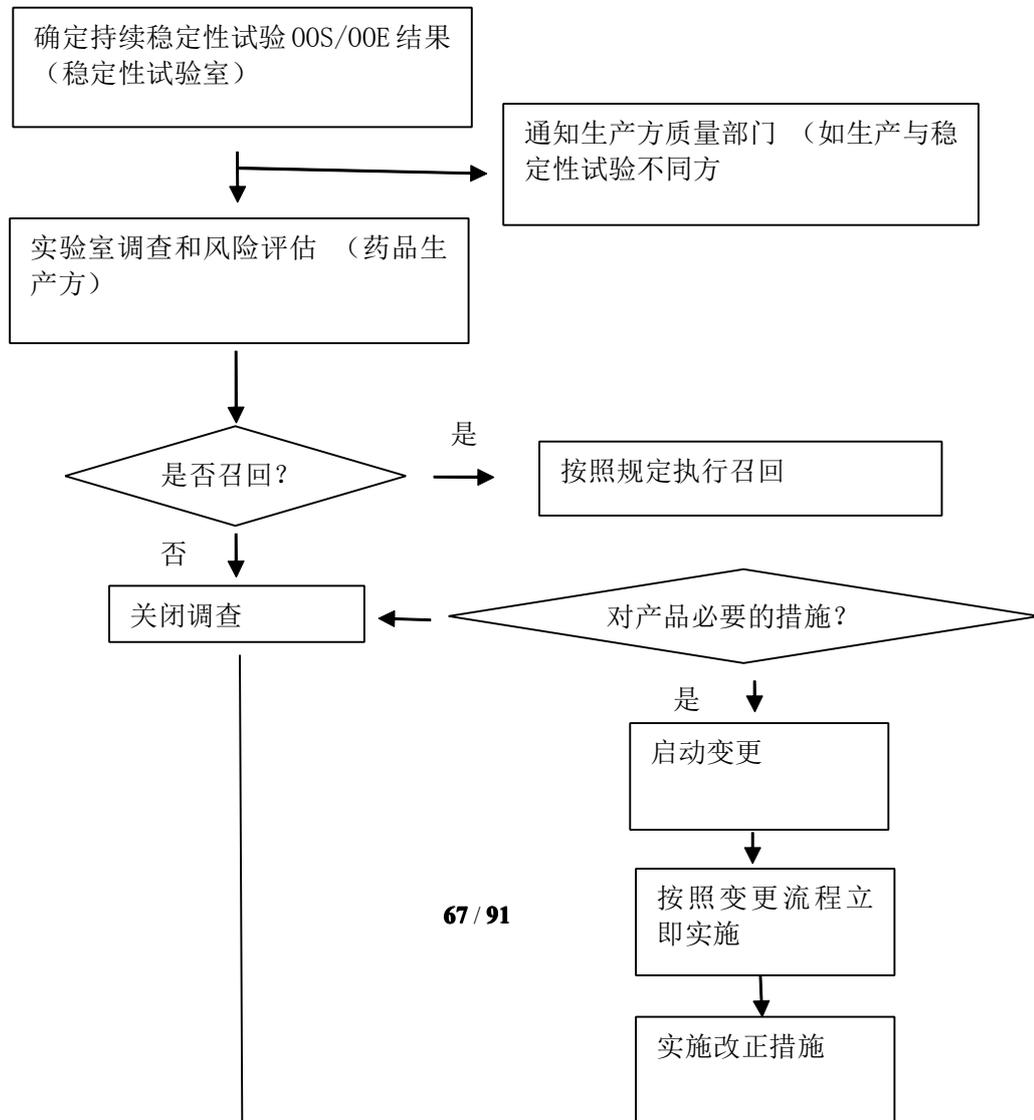
特别专家：供应链部门，医学专家，当地质量保证部，当地药品法规事务部

紧急变更：如紧急行动是必须的，此委员会有责任在正式批准的变更流程生效之前去实施变更。无论如何，所有的步骤均需记录，在变更系统中的追踪记录需随后采取。

通知质量授权人：质量授权人（负责产品放行至市场）需要被通知 OOS 的结果以及由质量警报组织所作的决定。有时，当地质量保证部门须将情况报告当地健康组织。

通知健康组织：超出标准或明显的非典型趋势应被调查。所有确认的 OOS 结果，或明显的负面趋势，均应报告给相应的主管当局。在市批次的可能的影响必须在与主管当局的商议中加以考虑。

调查流程详见下图：



年度产品报告追踪

#### B. 非追踪稳定性试验 OOS/OOE 的调查处理

在稳定性承诺项下相关的稳定性研究，按照与持续稳定性试验 OOS/OOE 的调查处理规定相同的程序执行，但不包括下列例外：

研发部，药事法规部和当地质量保证部须在早期纳入质量警报组织。

当地健康组织必须立即被通知。

### 【法规要求】

2010 版 GMP 要求

#### 第三节 持续稳定性考察

**第一条** 应进行适当的持续稳定性考察，监控已上市药品的稳定性，以发现市售包装药品与生产相关的任何稳定性问题（如杂质含量或溶出度特性的变化）。

**第二条** 持续稳定性考察的目的是在有效期内监控药品质量，并确定药品可以或预期可以在标示的贮存条件下，符合质量标准的各项要求。

**第三条** 持续稳定性考察主要针对市售包装药品，但也需兼顾待包装产品。例如，当待包装产品在完成包装前，或从生产厂运输到包装厂，还需要长期储存时，应在相应的环境条件下，评估其对包装后产品稳定性的影响。此外，还应考虑对储存时间较长的中间产品进行考察。

**第四条** 持续稳定性考察应有考察方案，结果应有报告。用于持续稳定性考察的设备（尤其是稳定性试验设备或设施）应按照第七章和第五章的要求进行确认和维护。

**第五条** 考察方案应涵盖药品有效期，应至少包括以下内容：

- (一) 每种规格、每种生产批量药品的考察批次；
- (二) 相关的物理、化学、微生物和生物学检验方法，可考虑采用稳定性考察专属的检验方法；
- (三) 检验方法依据；

(四) 合格标准;

(五) 容器密封系统的描述;

(六) 试验间隔时间(测试时间点);

(七) 贮存条件(应采用与药品标示贮存条件相对应的《中华人民共和国药典》长期稳定性试验的标准条件);

(八) 检验项目,如检验项目少于成品质量标准所包含的项目,应说明理由。

**第六条** 考察批次数和检验频率应能获得足够的数,以供趋势分析。通常情况下,每种规格、每种内包装形式的药品,至少每年应考察一个批次,除非当年没有生产。

**第七条** 某些情况下,持续稳定性考察中应额外增加批次,如重大变更或生产和包装有重大偏差的药品应列入稳定性考察。此外,任何采用非常规工艺重新加工、返工、或有回收操作的批次,也应考虑列入考察,除非已经过验证和稳定性考察。

**第八条** 关键人员,尤其是质量授权人,应了解持续稳定性考察的结果。当持续稳定性考察不在待包装产品和成品的生产企业进行时,则相关各方之间应有书面协议。生产企业应保存持续稳定性考察的结果以供药品监督管理部门审查。

**第九条** 应对不符合质量标准的结果或重要的异常趋势进行调查。任何已确认的不符合质量标准的结果或重大不良趋势,都应向当地药品监督管理部门报告;企业还应考虑是否可能对已上市药品造成影响,必要时应实施召回。

**第十条** 应根据所获得的全部数据资料,包括考察的阶段性结论,撰写总结报告并保存。应定期审核总结报告。

## 【要点分析】

### 13.11.1 稳定性研究的系统:

原则描述? 是否使用矩阵或 bracketing? 是否委托他人操作? 检验试验项目? 接受标准定义?

### 13.11.2 进程

流程如何?(时间间隔,试验批次定义?)适宜的分析方法? 如果 OOS 结果出现,将采取什么措施? 如果发生变更,如何执行试验?

### 13.11.3 前提/设备:

是否有适宜的储存条件? 专用? 是否验证? 正确标识?

温度计及湿度测量仪是否校正? 是否持续监控温度与湿度? 如何储存光敏感物质?

现有的报警系统(使用日志)?

## 17 微生物检验

本章中您将找到以下问题的答案:

进行微生物检验需要的设施及环境要求?

关于微生物检验人员的资质要求?

培养基、菌种管理及使用的具体要求?

微生物试验的种类及具体要求?

### 【法规要求】

第六十六条 质量控制实验室、中药标本室通常应与生产区分开，生物检定、微生物和放射性同位素的实验室还应彼此分开。

第六十九条 处理生物或放射性样品等特殊物品的实验室应符合国家的有关要求。

第二百二十六条 质量控制实验室的检验人员应至少具有相关专业中专或高中以上的学历，并至少经过一定时限与所从事的检验操作相关的实践培训且通过考核。

第二百三十三条 试剂、试液、培养基和检定菌

5. 每次配制的培养基均应进行无菌性和适应性检查，并有相关记录。应有培养基使用的记录。

6. 应有检验所需的各种检定菌，并建立检定菌保存、传代、使用、销毁的操作规程和相应记录。

7. 检定菌应有适当的标识，内容至少包括菌种名称、编号、代次、传代日期、传代操作人。

8. 检定菌应按规定的条件贮存，贮存的方式和时间不应对检定菌的生长特性有不利影响。

下表中列出了国内外针对微生物检验的相关指南：

机构或组织	文件名称
美国食品药品监督管理局(FDA)	Guidance for industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice  工业指导原则：无菌工艺生产的无菌产品 cGMP 指南
	Guide to Inspections of Microbiological Pharmaceutical Quality Control Laboratories  药品质量控制微生物实验室检查指南

美国药典 (USP)	Microbiological Test 微生物检查法
药品检查合作组织 (PIC/S)	Inspection of Quality Control Laboratories 质量控制实验室检查
欧洲药典 (EP)	Microbiological Test (14. K) 微生物检查法
中国药典 (CP2010)	Microbiological Laboratory guidance 微生物实验室规范指导原则

## 【背景介绍】

### 17.1 应用范围 (GMP manual)

药品生产所使用的所有原料及制剂都必须遵守法规要求,其生产及销售都必须符合法律要求。应对药品的微生物质量进行监控,微生物质量的标准可能会因地域及应用方式的不同而不同。各国药典中都有相应微生物试验的详细要求。

### 17.2 原则 (CP2010 附录: 微生物实验室规范指导原则)

药品微生物的检验结果受到很多因素的影响,如样品中微生物可能分布不均匀、微生物检验方法的误差较大等。因此在药品微生物检验中,为保证检验结果的可靠性,必须使用经验证的检验方法并严格按照药品微生物试验室规范要求进行试验。

## 【技术要求】

### 17.3 人员资质及培训要求 (CP2010 附录: 微生物实验室规范指导原则)

从事药品微生物试验工作的人员应具备微生物学或相近专业知识的教育背景。试验人员应依据所在岗位和职责接受相应的培训,在确认它们可以承担某一试验前,他们不能独立从事该项微生物试验。应保证所有人员在上岗前接受胜任工作所必须的设备操作、微生物检验技术和试验室生物安全等方面的培训,经考核合格后方可上岗,同时,实验室应制定所有级别试验人员的继续教育计划。

检验人员必须熟悉相关监测方法、程序、检验目的和结果评价。微生物实验室的管理者其专业技能和经验水平应与他们的职责范围相符,如:管理技能、实验室安全、试验安排、预算、试验研究、实验结果的评估和数据偏差的调查、技术报告书写等。

### 17.4 设施 (《中国药典 2010 附录: 微生物实验室规范指导原则》)

实验室应具有进行微生物检测所需的适宜、充分的设施条件。实验室的布局与设计应充分考虑到良好微生物实验室操作规范和实验室安全的要求。实验室布局设计的基本原则是既要最大可能防止微生物的污染,又要防止检验过程对环境和人员造成危害。合适的规划及活动区域的合理区分将提高微生物实验室操作的可靠性。

通常,实验室应划分成洁净或无菌区域和活菌操作区域,同时应根据试验目的,在时间或空间上有效分隔不相容的试验活动,将交叉污染的风险降低到最低。

一般情况下，药品微生物检验的实验室应有符合无菌检查法（附录XI H）和微生物限度检查法（附录XI J）要求的、用于具有开展无菌检查、微生物限度检查等检测活动的、独立设置的洁净室（区）或隔离系统，并为上述检验配备相应的细菌（真菌）等实验室、培养室、培养基及实验用具准备（包括灭菌）区、样品接收和储藏区、标准菌株储藏区、污染物处理区和文档处理区等辅助区域，同时，应对上述区域明确标识。

#### 17.4.1 无菌及微生物限度检验等实验区域

无菌操作室的环境洁净度条件不应低于无菌生产操作区，以降低无菌检查出现假阳性的风险。无菌检查应在环境洁净度 10000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内或隔离系统中进行。用于无菌检查和微生物限度检查的洁净操作室应配有属于“人流净化”的更衣室及属于“物流净化”的缓冲间或传递窗（柜），使进入洁净操作室的实验人员和试验物品分别经适当净化后进入实验操作间。

无菌室分无菌操作室和缓冲间。无菌操作室应具有空气除菌过滤的单向流空气装置。操作室或工作台应保持正压。应在压差十分重要的相邻级别区之间安装压差表。应采取适当的方法监控压差，如连锁系统或声光报警系统。

微生物限度检查的全过程，均应遵守无菌操作，严防再污染。因此，微生物限度检查宜在环境洁净度 10000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内进行；限度检查实验室应配有相应的人流和物流缓冲间，并定期作环境监测。

#### 17.4.2 菌种处理、微生物鉴别和阳性对照室

菌种的处理包括的内容比较多，如菌种的传代、保藏、制备以及培养基促生长实验、阳性对照、微生物方法验证、消毒剂和防腐剂的效力测定和对环境中分离菌的鉴别等，这些实验过程中都在处理活的微生物，处理不当会造成实验室环境污染，影响其他实验结果，因此，该室必须与其他实验室严格分开；必要时，应按实验室性质的需要保持对相邻实验室的相对压差；需采取必要的消毒方式确保实验室洁净条件合格（如臭氧，乳酸熏蒸等），以净化层流台作为局部 100 级的控制措施，最好是使用生物安全柜，所有的与活毒菌种相关的活动都应在层流台或生物安全柜中进行。每次实验结束后要对层流台或生物安全柜及整个实验室环境进行消毒。所有与菌种相关的试验废物均应经过灭菌处理后方可丢弃。

#### 17.4.3 抗生素微生物检定室（《抗生素微生物检定法及其标准操作》）

抗生素微生物检定（俗称效价检定）用实验室应注意防止抗生素及微生物的污染。实验室由两部分组成：用于样品处理的试验间和用于制备双碟的半无菌间。半无菌间要求有紫外灯、温控设备、稳固水平的试验台（如水泥台）、隔水式培养箱（ $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、恒温水浴箱。实验室温度应控制在  $30^{\circ}\text{C}$  以下。

#### 17.4.4 培养室及其他功能间

培养室用于放置培养细菌和真菌的培养箱。准备区即试液及培养基配制/灭菌区域、实验器皿洗涤、烘干室、灭菌室、实验用品及易耗品储藏室等没有特殊要求的功能间，可为一般清洁环境。

### 17.5 设备

#### 17.5.1 无菌隔离器（如使用）

此系统具备无菌操作室的全部功能。它既可以对检品外部进行消毒，又能保持操作环境的无菌条件，由于它和外界环境是隔离的，因此美国药典并不要求它安装在洁净区/室内，但应控制无关人员进入隔离操作系统所处的房间；欧盟则建议将它放置于 100000 级区的环境中。

隔离操作系统基本的操作程序如下：

样品放入转移舱（进样舱）中后→用过氧乙酸（或其他适宜的灭菌剂，如过氧化氢）对表面进行灭菌→排尽灭菌剂余气→连通无菌操作舱→将实验样品移入操作舱中→完成无菌检查→将样品从操作舱中移入转移舱→关闭两舱之间的转移门并断开连接→从转移舱中取出实验样品→阳性对照及培养。

利用隔离系统进行无菌操作的安全性及可靠性好，除非系统发生泄漏，一般不可能出现假阳性结果。但设备及耗材价格昂贵，目前国内使用尚不普遍。

#### 17.5.1.1 确认

无菌隔离器应包括设计确认（DQ），安装确认（IQ），操作确认（OQ），性能确认（PQ），定期再验证，当设备发生变化时，常通过变更控制的管理程序进行评估和重新验证及维护。如果在无菌隔离器的传输部位使用蒸汽灭菌则需要做该过程的验证和再验证。

#### 17.5.1.2 检漏实验

运行灭菌程序之前，需进行检漏实验，保证舱体无漏点，防止灭菌剂气体的泄露。检漏实验合格后才可以进行灭菌，否则要排查漏点，直到检漏实验通过。

检漏试验方案应至少规定：

- 测试频率：建议每次灭菌前必须做检漏试验
- 测试物品：如半身服、舱体、手套等
- 可接受的标准：例如压强变化率不大于 1.6Pa/min

#### 17.5.1.3 环境监测(PQS L6108)

无菌隔离器的环境监控应基于风险控制的分析。风险评估应包含以下方面的定义和文件：

- 环境监测的种类：可采用空气取样器法，沉降菌法等
- 环境监测的频率：参见无菌实验室的环境监测的频率（参照本章 17.9.4.11.2）
- 环境监测的位点：可以选择舱体内工作台的两侧也可以根据实际情况选择风险较高的其他位置
- 环境监测可接受的标准：无微生物检出

应持续监控压差，产生的压差报警都需要调查。

#### 17.5.2 实验室用层流台

应定期监测层流台内的空气质量（微生物和粒子数）及风速，微生物监测可以使用空气取样器法、沉降菌法、表面测试法等。

空气取样器法：本方法采用计数浓度法，通过收集悬浮在空气中的生物性粒子于专门的培养基，经若干时间，在适宜的生长条件下让其繁殖到可见的菌落进行计数，从而判定洁净环境内单位体积空气中的活微生物数。以此评定洁净区的洁净度。参见 GB/T16293-1996 医药工业洁净室浮游菌测试方法。

沉降菌法：本方法采用沉降法，通过自然沉降原理收集在空气中的生物性粒子于培养基平皿，经若干时间，在适宜的生长条件下让其繁殖到可见的菌落进行计数，以平板培养皿中的菌落数来判定洁净环境内的活微生物数。并以此评定洁净区的洁净度。参见 GB/T16294-1996 医药工业洁净室沉降菌的测试方法。

表面微生物测试（棉签取样/接触平皿法，表面菌监测）：用无菌棉签在相应位点的表面涂拭取样，取样面积约为  $5 \times 5 \text{cm}^2$ ，将棉签在整个平碟表面均匀涂抹以确保整个棉签头部与琼脂接触，然后合上碟盖。对于平整的表面可以使用接触平皿法代替棉签取样法，使用 55mm 接触平皿和待取样表面充分接触后培养。并以此评定洁净区的表面洁净度。

### 17.5.3 培养箱

新设备应在进行安装确认 (IQ)，操作确认 (OQ)，性能确认 (PQ) 合格之后方可使用。使用时应进行温度监控，建议进行性能确认 (PQ) 时进行多点温度分布的确认。并应定期进行校正，定期进行内表面的清洁。

### 17.5.4 蒸汽灭菌柜（中国药典 2010 灭菌法）

湿热灭菌条件通常采用 121 度 15 分钟、121 度 30 分钟、116 度 40 分钟的程序，也可采用其他温度和时间参数，但必须保证物品灭菌后无菌保证值  $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ 。当灭菌程序选定采用  $F_0$  概念时，应采取特别措施确保被灭菌物品能得到足够的无菌保证，此时，除对灭菌程序进行验证外，还必须在生产过程中对微生物进行监控，证明污染的微生物指标低于设定的限度。

灭菌程序经验证合格后方可使用。定期进行 BD 实验、真空泄漏测试、温度参数测试（空载热分布、定载热穿透、满载热穿透）、压力改变速率测试（GB8599-2008 大型蒸汽灭菌器技术要求），同时以生物指示剂验证灭菌效果，必须保证物品灭菌后无菌保证值 SAL 小于百万分之一。

### 17.5.5 空调高效过滤器

定期对过滤器的过滤效果进行检查，测定风速、粒子数，必要时进行送风量、换气次数的测量、检漏实验，对气流流向、压差进行检验，须符合设计标准。

## 17.6 灭菌消毒方式（中国药典 2010 灭菌法）

灭菌和消毒方式需经验证合格后，方可正式使用。

◆ 湿热灭菌：湿热灭菌法系指将物品置于灭菌柜内利用高压饱和蒸汽、过热水喷淋等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法。该法灭菌能力强，为热力灭菌中最有效、应用最广泛的灭菌方法。药品、容器、培养基、无菌服、胶塞以及其他遇高温潮湿不发生变化或损坏的物品都可采用湿热灭菌。

◆ 干热灭菌：本法系指将物品置于干热灭菌柜、隧道灭菌器等设备中，利用干热空气达到杀灭微生物或消除热源物质的方法。适用于耐高温但不宜用湿热灭菌法灭菌的物品，如玻璃器具，金属制容器、纤维制品、

固体试药、液状石蜡等均可采用本法灭菌，无论采用何种灭菌条件，均应保证灭菌后的物品的无菌保证值  $SAL \leq 10^{-6}$ 。如果程序用于除去热原，要对其去热原效果进行验证。

◆ 辐射灭菌：本法系指将灭菌物品置于适宜放射源辐射的  $\gamma$  射线或适宜的电子加速器发生的电子束中进行电离辐射而达到杀灭微生物的方法。本法最常用  $60\text{ Co-}\gamma$  射线辐射灭菌。医疗器械、容器、生产辅助用品不受辐射破坏的原料及成品等均可用本法灭菌。

◆ 气体灭菌：本法系指用化学消毒剂形成的气体杀灭微生物的方法，常用的化学消毒剂有环氧乙烷、气态过氧化氢、甲醛、臭氧等，本法适用于在气体中稳定的物品灭菌。采用气体灭菌法时，应注意灭菌气体的可燃可爆性、致畸性和残留毒性。本法中最长用的气体是环氧乙烷，一般与 80%–90% 的惰性气体混合使用，在充有灭菌气体的高压腔室内进行。该法可用于医疗器械、塑料制品等不能采用高温灭菌的物品灭菌。含氯的物品及能吸附环氧乙烷的物品则不宜使用本法灭菌。

◆ 消毒剂杀菌：适用于洁净室墙面、地面、设备表面等消毒。

◆ 紫外照射杀菌：对于进入洁净区域的物体表面进行照射消毒。

◆ 过滤除菌：本法系利用细菌不能通过致密具孔滤材的原理以除去气体或液体中的微生物的方法。常用于热不稳定的药品溶液或原料的除菌。除菌过滤器采用孔径分布均匀的微孔滤膜作为过滤材料，微孔滤膜分亲水性和疏水性两种，滤膜材质依过滤物品的性质及过滤目的而定。药品生产中采用的滤膜孔径一般不超过 0.22 微米，过滤器对滤液的吸附不得影响药品质量，不得有纤维脱落，禁用含石棉的过滤器，滤器和滤膜在使用前应进行洁净处理，并用蒸汽灭菌或作在线灭菌，更换品种和批次应先清洗过滤器，再更换滤膜。

#### 17.7 菌种的管理（CP2010 附录：微生物实验室规范指导原则）

试验过程中，生物样本可能是最敏感的，因为他们的活性和特性依赖于合适的实验操作和储存条件。实验室菌种的处理和保藏的程序应标准化，使尽可能减少菌种污染和生长特性的改变。按统一操作程序制备的菌株是微生物试验结果一致性的重要保证。

药品微生物检验用的试验菌应来自认可的国内或国外菌种保藏机构的标准菌株，或是用于标准菌株所有相关特性等效的商业派生菌株。

标准菌株的复活或培养物的制备应按照供应商提供的说明或按已验证的方法进行。从国内或国外菌种保藏机构获得的标准菌株经过复活并在适宜的培养基中生长后，即为标准储备菌株。标准储备菌株应进行纯度和特性确认。标准储备菌株可用于制备每月或每周 1 次转种的工作菌株。冷冻菌种一旦解冻转种制备工作菌株后，不得重新冷冻和再次使用。

工作菌株的传代次数应严格控制，不得超过 5 代（从菌种保藏机构获得的标准菌株为第 0 代），以防止过度的传代增加菌种变异的风险。必要时，实验室应对工作菌株的特性和纯度进行确认。

工作菌株不可替代标准菌株，标准菌株的商业衍生物均可用作工作菌株。

实验室必须建立和保存其所有菌种的进出、收集、储藏、确认试验以及销毁的记录，应有菌种管理的程序文件（从标准菌株到工作菌株），该程序包括：标准菌种的申购记录；从标准菌株到工作菌株操作及记录；菌种必须定期转种传代，并作纯度、特性等实验室所需关

键指标的确认，并记录；每支菌种都应注明其名称、标准号、接种日期、传代数；菌种生长的培养基和培养条件；菌种保藏的位置和条件；其他需要的程序。

### 【实施指导】

#### 17.8 培养基（CP2010 附录：微生物实验室规范指导原则）

培养基是微生物试验的基础，直接影响微生物试验结果。适宜的培养基制备方法、贮藏条件和质量控制试验是提供优质培养基的保证。

##### 17.8.1 培养基的制备

培养基可按处方配制，也可使用按处方生产的符合规定的脱水培养基。

在制备培养基时，应选择质量符合要求的脱水培养基或单独配方组分进行配制。脱水培养基应附有处方和使用说明，配制时应按使用说明上的要求操作以确保培养基的质量符合要求，不得使用结块或颜色发生改变的脱水培养基。脱水培养基或单独配方组分应在适当的条件下贮藏，如低温、干燥和避光，所有的容器应密封，尤其是盛放脱水培养基的容器。商品化的成品培养基除了应附有处方和使用说明外，还应注明有效期、贮藏条件、适用性检查试验的质控菌和用途。

为保证培养基质量的稳定可靠，各脱水培养基或各配方组分应准确称量，并要求有一定的精确度。配制培养基最常用的溶剂是纯化水，特殊情况下，可能需要用去离子水和蒸馏

水。应记录各称量物的重量和水的使用量。

配制培养基所用容器和配套器具应洁净，可用纯化水冲洗玻璃器皿以消除清洁剂和外来物质的残留。对热敏感的培养基如糖发酵培养基其分装容器一般应预先进行灭菌，以保证培养基的无菌性。

脱水培养基应完全溶解于水中，再行分装与灭菌。配制时若需要加热助溶，应注意不要过度加热，以避免培养基颜色变深。如需要添加其他组分时，加入后应充分混匀。

应按照生产商提供或使用者验证的参数进行培养基的灭菌。商品化的成品培养基必须附有所用灭菌方法的资料。培养基灭菌一般采用湿热灭菌技术，特殊培养基可采用薄膜过滤除菌。

培养基若采用不适当的加热和灭菌条件，有可能引起颜色变化、透明度降低、琼脂凝固力或 pH 的改变。因此，培养基应采用验证的灭菌程序灭菌，培养基灭菌方法和条件，应通过无菌性试验和促生长试验进行验证。此外，对高压灭菌器的蒸汽循环系统也要加以验证，以保证在一定装载方式下的正常热分布。温度缓慢上升的高压灭菌器可能导致培养基的过热，过度灭菌可能会破坏绝大多数的细菌和真菌培养基促生长的质量。灭菌器中培养基的容积和装载方式也将影响加热的速度。因此，应根据灭菌培养基的特性，进行全面的灭菌程序验证。

应确定每批培养基灭菌后的 pH 值（冷却至室温 25℃ 测定）。若培养基处方中未列出 pH 值的范围，除非经验证表明培养基的 pH 值允许的变化范围很宽，否则，pH 值的范围不能超过规定值 ± 0.2。

制成平板或分装于试管的培养基应进行下列检查：容器和盖子不得破裂，装量应相同，尽量避免形成气泡，固体培养基表面不得产生裂缝或涟漪，在冷藏温度下不得形成结晶，不

得污染微生物等。应检查和记录批数量、有效期及培养基的无菌检查。

### 17.8.2 培养基的贮藏

自配的培养基应标记名称、批号、配制日期等信息,并在已验证的条件下贮藏。商品化的成品培养基标签上应标有名称、批号、生产日期、失效期及培养基的有关特性,生产商和使用者应根据培养基使用说明书上的要求进行贮藏,所采用的贮藏和运输条件应使成品培养基最低限度的失去水分并提供机械保护。

培养基灭菌后若贮藏在高压灭菌器中,质量可能会受影响,一般不提倡这种存放法。琼脂培养基不得在 0℃ 或 0℃ 以下存放,因为冷冻可能破坏凝胶特性。培养基应避光保存,若

要长期保存,应置于密闭容器中以防止水分流失。琼脂平板最好现配现用,如置冰箱 2-8℃ 保存,一般不超过 1 周,且应密闭包装,若延长保存期限,保存期需经验证确定。

固体培养基灭菌后的再融化只允许 1 次,以避免因过度受热造成培养基质量下降或微生物污染。培养基的再融化一般采用水浴或流通蒸汽加热。若使用微波炉,应避免培养基过度受热及水分的蒸发,更要注意安全,融化的培养基应置于 45~50℃ 的水浴中,不得超过 8 小时。倾注培养基时,应擦干培养基容器外表面的水分,避免容器外壁的水滴进入培养中造成污染。

使用过的培养基(包括失效的培养基)应按国家污染废物处理相关规定进行。

### 17.8.3 培养基的质量控制实验

实验室应对试验用培养基建立质量控制程序,以确保所用的培养基质量符合相关的监测需要。

实验室配制或商品化的成品培养基的质量依赖于其制备过程,采用不适宜方法制备的培养基将影响微生物的生长或复苏,从而影响实验结果的可靠性。所有配制好的培养基均应进行质量控制实验,实验室配制的培养基的常规监控项目是 pH,适用性检查试验,定期的稳定性检查以确定有效期,培养基在有效期内应依据适用性检查试验确定培养基质量是否符合要求,有效期的长短将取决于在一定存放条件下(包括容器特性及密封性)的培养基其组成成分的稳定性。

除药典附录另有规定外,在实验室中,若采用已验证的配制和灭菌程序制备培养基且过程受控,那么同一批脱水培养基的适用性检查试验可只进行一次,如果培养基的制备过程未经过验证,那么每一批培养基均要进行适应性检查试验,试验的菌种可根据培养基的用途从药典相关附录中进行选择,也可增加从生产环境及产品常见的污染菌株。

培养基的质量控制实验若不符合规定,应寻找不合格的原因,以防止问题重复出现。任何不符合要求的培养基均不能使用。

用于环境监控的培养基需特别防护,最好用双层包装和终端灭菌,如果不能采用终端灭菌,那么在使用前应进行 100% 的预培养以防止外来的污染物带到环境中及避免出现假阳性结果。

◆ 欧洲药典的规定有所不同,要求对每批成品培养基和每批配制培养基(包括从干粉配制和按照成分配制)都必须检查其生长性。

针对不同用途的培养基,可根据其用途(总菌落数检查、控制菌检查、无菌检查),按照药典的不同要求进行不同的适应性检查。

## 17.9 实验分类

### 总菌落数检查(中国药典 2010 限度检查法)

17.9.1.1 限度要求: 各种产品不同的限度标准参见中国药典附录 XIJ 微生物限度检查法项下 微生物限度标准。

欧洲药典对限度检查标准在 EP 5.1.4 项下表内有详细规定。

不仅是最终产品一定要检查其微生物限度，其使用的原料也要检查。用于药物制剂生产的原料确实具有不可低估的重要性。药典没有微生物检验要求的原料可以通过定期抽检的方式进行监测。

17.9.1.2 检验条件：此检查应在环境洁净度 10000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内进行。

17.9.1.3 取样计划：检验量即一次试验所用的供试品量(g、ml 或 cm<sup>2</sup>)。除另有规定外，一般供试品的检验量为 10g 或 10ml，膜剂为 100cm<sup>2</sup>，贵重药品、微量包装药品的检验量可以酌减。要求检查沙门菌的供试品，其检验量应增加 20g 或 20ml (其中 10g 或 10ml 用于阳性对照试验)。检验时，应从 2 个以上最小包装单位中抽取供试品，膜剂还不得少于 4 片。一般应随机抽取不少于检验用量（两个以上最小包装单位）的 3 倍量供试品。

取样要求：样品应具代表性，应能反应整批产品的情况及工艺情况。应对取样器进行必要的质量控制，合格后方可使用。

取样量：除另有规定外，一般供试品的检验量为 10g 或 10ml，化学膜剂为 100cm<sup>2</sup>，贵重药品、微量包装药品的检验量可以酌减，要求检查沙门菌的供试品，其检验量应增加 10g 或 10ml。

#### 17.9.1.4 总菌落数检查用培养基（中国药典 2010 微生物限度检查法）

培养基种类：

中国药典： 细菌计数：营养琼脂培养基

霉菌和酵母菌计数：玫瑰红钠琼脂培养基

酵母菌计数：酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基

欧洲药典： 细菌计数：胰蛋白胨大豆琼脂培养基

霉菌和酵母菌计数：沙氏葡萄糖琼脂培养基

培养基适用性检查：取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌各 50~100cfu，分别注入无菌平皿中，立即倾注营养琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 30~35℃ 培养 48 小时，计数，取白色念珠菌、黑曲霉各 50~100cfu，分别注入无菌平皿中，立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 23~28℃ 培养 72 小时，计数；取白色念珠菌 50~100cfu，注入无菌平皿中，立即倾注酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基，平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 23~28℃ 培养 72 小时，计数。同时，用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

结果判定：若被检培养基上的菌落平均数不小于对照培养基上的菌落平均数的 70%，且菌落形态大小与对照培养基上的菌落一致，判该培养基的适用性检查符合规定。

17.9.1.5 样品制备：通常根据供试品的理化特性和生物学特性，采取适宜的方法制备供试液，参见 CP 微生物限度检查法/供试液制备。每个产品的样品制备是不同的。

#### 1. 液体供试品

取供试品 10ml，加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml，混匀，作为 1:10 的供试液。油剂可加入适量的无菌聚山梨酯 80 使供试品分散均匀。水溶性液体制剂也可用混合的供试品原液作为供试液。

#### 2. 固体、半固体或黏稠性供试品

取供试品 10g，加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml，用匀浆仪或其他适宜的方法，混匀，作为 1:10 的供试液。必要时加适量的无菌聚山梨酯 80，并置水浴中适当加温使供试品分散均匀。

#### 3. 需用特殊方法制备供试液的供试品

##### (1) 非水溶性供试品

方法 1 取供试品 5g (或 5ml)，加至含溶化的 (温度不超过 45℃) 5g 司盘 80、3g 单硬脂酸甘油酯、10g 聚山梨酯 80 无菌混合物的烧杯中，用无菌玻棒搅拌成团后，慢慢加入 45℃ 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml，边加边搅拌，使供试品充分乳化，作为 1:20 的供试液。

方法 2 取供试品 10g，加至含 20ml 无菌十四烷酸异丙酯 (制法见附录 XI 无菌检查法中供试品的无菌检查项下) 和无菌玻璃珠的适宜容器中，必要时可增加十四烷酸异丙酯的用量，充分振摇，使供试品溶解。然后加入 45℃ 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100ml，振摇 5~10 分钟，萃取，静置使油水明显分层，取其水层作为 1:10 的供试液。

##### (2) 膜剂供试品

取供试品 100cm<sup>2</sup>，剪碎，加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100ml (必要时可增加稀释液)，浸泡，振摇，作为 1:10 的供试液。

##### (3) 肠溶及结肠溶制剂供试品

取供试品 10g，加 pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液 (用于肠溶制剂) 或 pH7.6 无菌磷酸盐缓冲液 (用于结肠溶制剂) 至 100ml，置 45℃ 水浴中，振摇，使溶解，作为 1:10 的供试液。

##### (4) 气雾剂、喷雾剂供试品

取规定量供试品，置冰冻室冷冻约 1 小时，取出，迅速消毒供试品开启部位，用无菌钢锥在该部位钻一小孔，放至室温，并轻轻转动容器，使抛射剂缓缓全部释出。用无菌注射器吸出全部药液，加至适量的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (若含非水溶性成分，加适量的无菌聚山梨酯 80) 中，混匀，取相当于 10g 或 10ml 的供试品，再稀释成 1:10 的供试液。

##### (5) 贴剂供试品

取规定量供试品，去掉贴剂的保护层，放置在无菌玻璃或塑料片上，粘贴面朝上。用适宜的无菌多孔材料 (如无菌纱布) 覆盖贴剂的粘贴面以避免贴剂粘贴在一起。然后将其置于适宜体积并含有表面活性剂 (如聚山梨酯 80 或卵磷脂) 的稀释剂中，用力振荡至少 30 分钟，制成供试液。贴剂也可采用其他适宜的方法制备成供试液。

(6) 具抑菌活性的供试品

当供试品有抑菌活性时,采用下列方法进行处理,以消除供试液的抑菌活性,再依法检查。常用的方法如下。

①培养基稀释法 取规定量的供试液,至较大的培养基中,使单位体积内的供试品含量减少,至不含抑菌作用。测定细菌、霉菌及酵母菌的菌数时,取同稀释级的供试液 2ml,每 1ml 供试液可等量分注多个平皿,倾注琼脂培养基,混匀,凝固,培养,计数。每 1ml 供试液所注的平皿中生长的菌落数之和即为 1ml 的菌落数,计算每 1ml 供试液的平均菌落数,按平皿法计数规则报告菌数;控制菌检查时,可加大增菌培养基的用量。

②离心沉淀法 取一定量的供试液,500 转/分钟离心 3 分钟,取全部上清液混合。用于细菌检查。

③薄膜过滤法 同细菌、霉菌及酵母菌计数的薄膜过滤法。

④中和法 凡含汞、砷或防腐剂等具有抑菌作用的供试品,可用适宜的中和剂或灭活剂消除其抑菌成分。中和剂或灭活剂可加在所用的稀释液或培养基中。

17.9.1.6 检验方法:计数方法包括薄膜过滤法和平皿计数法。

◆ 检查时,按已验证的计数方法进行供试品的细菌、霉菌及酵母菌菌数的测定。按计数方法的验证试验确认的程序进行供试液制备。用稀释液稀释成 1:10、1:100、1:1000 等稀释级的供试液。

◆ 薄膜过滤法:采用薄膜过滤法,滤膜孔径应不大于 0.45 $\mu$ m,直径一般为 50mm,若采用其他直径的滤膜,冲洗量应进行相应的调整。选择滤膜材质时应保证供试品及其溶剂不影响微生物的充分被截留。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时,应保证滤膜在过滤前后的完整性。水溶性供试液过滤前先将少量的冲洗液过滤以润湿滤膜。油类供试品,其滤膜和滤器在使用前应充分干燥。为发挥滤膜的最大过滤效率,应注意保持供试品溶液及冲洗液覆盖整个滤膜表面。供试液经薄膜过滤后,若需要用冲洗液冲洗滤膜,每张滤膜每次冲洗量为 100ml。总冲洗量不得超过 1000ml,以避免滤膜上的微生物受损伤。

取相当于每张滤膜含 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 供试品的供试液,加至适量的稀释剂中,混匀,过滤。若供试品每 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 所含的菌数较多时,可取适宜稀释级的供试液 1ml 进行试验。用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液或其他适宜的冲洗液冲洗滤膜,冲洗方法和冲洗量同计数方法的验证。冲洗后取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基或酵母浸出粉胍葡萄糖琼脂培养基平板上培养,

阴性对照试验:取试验用的稀释液 1 ml,照上述膜过滤法操作,作为阴性对照,阴性对照不得有菌生长。

◆ 平皿计数法:

根据菌数报告规则取相应稀释级的供试液 1ml,置直径 90mm 的无菌平皿中,注入 15~20ml 温度不超过 45℃ 的溶化的营养琼脂培养基或玫瑰红钠琼脂培养基或酵母浸出粉胍葡萄糖琼脂培养基,混匀,凝固,倒置培养。每稀释级每种培养基至少制备 2 个平板。

阴性对照试验 取试验用的稀释液 1ml,置无菌平皿中,注入培养基,凝固,倒置培养。每种计数用的培养基各制备 2 个平板,均不得有菌生长。

17.9.1.7 培养: 除另有规定外,细菌培养 3 天,霉菌、酵母菌培养 5 天,逐日观察菌落生长情况,点计菌落数,必要时,可适当延长培养时间至 7 天进行菌落计数并报告。细菌培养温度为 30-35℃, 霉菌及酵母菌培养温度为 23-28℃。

◆ 欧洲药典 (Ph. Eur.) 规定的培养条件, 细菌培养 30-35℃5 天, 真菌培养 20-25℃5 天。

17.9.1.8 计数: 点计菌落数后,计算各稀释级供试液的平均菌落数,按菌数报告规则报告菌数。若同稀释级两个平板的菌落平均数不小于 15, 则两个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上。

一般营养琼脂培养基用于细菌计数, 玫瑰红钠琼脂培养基用于霉菌及酵母菌计数;酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基用于酵母菌计数。在特殊情况下,若营养琼脂培养基上长有霉菌和酵母菌、玫瑰红钠琼脂培养基上长有细菌,则应分别点计霉菌和酵母菌、细菌菌落数。然后将营养琼脂培养基上的霉菌和酵母菌数或玫瑰红钠琼脂培养基上的细菌数,与玫瑰红钠琼脂培养基中的霉菌和酵母菌数或营养琼脂培养基中的细菌数进行比较,以菌落数高的培养基中的菌数为计数结果。

含蜂蜜、王浆的液体制剂,用玫瑰红钠琼脂培养基测定霉菌数,用酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基测定酵母菌数,合并计数。

◆ 《欧洲药典》6.0 “2.6.12 微生物总计数”协调方法中描述: 以前的细菌数被定义为“细菌培养基”上菌落形成单位的平均数,真菌数是真菌培养基上菌落形成单位的平均数,如沙氏葡萄糖培养基,并且微生物总数是细菌数和真菌数的总和,而现在需氧菌总数 (TAMC) 是酪蛋白大豆消化琼脂上包括真菌的菌落形成单位的数量,酵母菌和霉菌总数 (TYMC) 是沙氏葡萄糖培养基上包括细菌的菌落形成单位的数量。

17.9.1.9 菌数报告规则:

◆ 平皿计数法: 细菌、酵母菌宜选取平均菌落数小于 300cfu、霉菌宜选取平均菌落数小于 100cfu 的稀释级,作为菌数报告 (取两位有效数字) 的依据。以最高的平均菌落数乘以稀释倍数的值报告 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 供试品中所含的菌数。

如各稀释级的平板均无菌落生长,或仅最低稀释级的平板有菌落生长,但平均菌落数小于 1 时,以 < 1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

◆ 膜过滤法：以相当于 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 供试品的菌落数报告菌数，若滤膜上无菌落生长，以 <1 报告菌数（每张滤膜过滤 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 供试品），或以 <1 乘以稀释倍数的值报告菌数。

#### 17.9.1.10 方法验证：

◆ 当建立产品的微生物限度检查法时，应进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证，以确认所采用的方法适合于该产品的细菌、霉菌及酵母菌数的测定。若产品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时，计数方法应重新验证。

验证时，按供试液的制备和细菌、霉菌及酵母菌计数所规定的方法及下列要求进行。对各试验菌的回收率应逐一进行验证。

◆ 验证方法：验证试验至少应进行 3 次独立的平行试验，并分别计算各试验菌每次试验的回收率。

(1) 试验组 平皿法计数时，取试验可能用的最低稀释级供试液 1ml 和 50~100cfu 试验菌，分别注入平皿中，立即倾注琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，按平皿法测定其菌数。薄膜过滤法计数时，取规定量试验可能用的最低稀释级供试液，过滤，冲洗，在最后一轮的冲洗液中加入 50~100cfu 试验菌，过滤，按薄膜过滤法测定其菌数。

(2) 菌液组：测定所加的试验菌数。

(3) 供试品对照组：取规定量供试液，按菌落计数方法测定供试品本底菌数。

(4) 稀释剂对照组：若供试液制备需要分散、乳化、中和、离心或薄膜过滤等特殊处理时，应增加稀释剂对照组，以考察供试液制备过程中微生物受影响的程度。试验时，可用相应的稀释液替代供试品，加入试验菌，使最终菌浓度为每 1ml 供试液含 50~100cfu，按试验组的供试液制备方法和菌落计数方法测定其菌数。

◆ 结果判断：在 3 次独立的平行试验中，稀释剂对照组的菌数回收率（稀释剂对照组的平均菌落数占菌液组的平均菌落数的百分率）应均不低于 70%。若试验组的菌数回收率（试验组的平均菌落数减去供试品对照组的平均菌落数的值占菌液组的平均菌落数的百分率）均不低于 70%，照该供试液制备方法和计数法测定供试品的细菌、霉菌及酵母菌数；若任一次试验中试验组的菌数回收率低于 70%，应采用培养基稀释法、离心沉淀法、薄膜过滤法、中和法等方法或联合使用这些方法消除供试品的抑菌活性，并重新进行方法验证。

若没有适宜的方法消除供试品的抑菌活性，那么验证试验中微生物回收的失败可看成是因供试品的抗菌活性引起的，同时表明该供试品不能被试验菌污染。但是，供试品也可能仅对试验菌株具有抑制作用，而对其他菌株没有抑制作用。因此，根据供试品须符合的微生物限度标准和菌数报告规则，在不影响检验结果判断的前提下，应采用能使微生物生长的更高稀释级的供试液进行方法验证试验。若验证试验符合要求，应以该稀释级供试液作为最低稀释级的供试液进行供试品检验。计数方法验证时，采用上述方法若还存在一株或多株试验菌的回收率达不到要求，那么选择回收率最接近要求的方法和试验条件进行供试品的检验。

验证试验也可与供试品的细菌、霉菌及酵母菌计数同时进行。

## 【实例分析】

### 实例：某口服产品总菌数测定方法验证

#### 1. 实验准备

##### 1.1 标准菌株和菌液制备

- 大肠埃希菌 (CMCC (B) 44102)
- 金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26003)
- 枯草芽孢杆菌 (CMCC (B) 63501)
- 白色念珠菌 (CMCC (F) 98001)
- 黑曲霉 (CMCC (F) 98003)

接种相应菌株至适宜培养基中并培养 24 小时，得到新鲜培养物，用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释成每 1ml 含菌数为  $50 \sim 100$  cfu 的菌悬液。

##### 1.2 供试液的制备

称取 10 克样品，加入 100 毫升 PH7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中溶解混匀，作为 1:10 的供试液。

#### 2. 细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证

2.1 实验组：取 1:10 的供试液 1 毫升和 50-100CFU 的实验菌，分别注入平皿中，根据菌株的不同立刻倾注营养琼脂或玫瑰红钠琼脂培养基，每株实验菌平行制备 2 个平皿。按照平皿计数法测定其菌数。

营养琼脂平皿于 30-35℃ 培养 48 小时，玫瑰红钠琼脂平皿于 23-28℃ 培养 72 小时观察结果。

2.2 菌液组：平皿中加入实验菌，测定所加的试验菌数

2.3 供试品对照组：取规定量的供试液加入平皿中，进行计数。

##### 2.4 结果判断

在 3 次独立的平行试验中，若试验组的菌数回收率 (试验组的平均菌落数减去供试品对照组的平均菌落数的值占菌液组的平均菌落数的百分率) 不低于 70%，照该供试液制备方法和计数法测定供试品的细菌、霉菌及酵母菌数，否则须重新进行方法验证。在表中记录试验结果。

#### 17.9.1 控制菌检查 (欧盟 GMP Manual)

##### 17.9.1.1 环境条件

应该与总菌落数检查的环境要求一致，并且相应的环境也应该进行监控。

##### 17.9.1.2 样品制备

与总菌落数检查的样品制备一致。

### 17.9.1.3 控制菌的测定及结果判断

供试品检出控制菌或其他致病菌时，按一次检出结果为准，不再复试。

如果特定微生物检验结果略有可疑，就应执行特定的确认反应，或者使用鉴别系统对结果进行确认。

如果说对总菌落数的结果尚有解释的余地，控制菌的结果则丝毫没有解释的余地。唯一的例外就是内毒素和某种特定的菌。如果发现了其他菌，必须要考虑使患者感染的风险，并以此作为产品放行与否的依据。

### 17.9.1.4 培养基和培养基实验（欧盟 GMP Manual）

每批培养基都必须进行以下试验，该试验可以在产品试验之前执行也可以同时进行。

#### ▲ 无菌性

药典中没有明确规定要做无菌性试验，但只有和总菌落数试验一样，测定培养基的无菌性才能保证结果可靠。

#### ▲ 促生长能力、抑制能力及指示能力检查（测试培养基的营养性、选择性和指示性）

生长性试验应该按以下频次检验：

每批已经制备好的培养基

每批由干粉培养基制备而来的培养基

每批按配方配制的培养基

因为培养基的灭菌在培养基的制备过程中是至关重要的步骤，所以培养基灭菌的时间不能够太长，灭菌温度不能够太高。因此只测试干粉批次是不够的。必须保证培养基已经在正确的温度下培养了足够长的时间，同时还要保证培养基没有被灭菌的时间过长或温度过高。

结果除了能观察到阳性结果即可，还要和以前测试过并且合格的批次进行比较。

在测试促生长性时，在液体培养基中应在最短时间内观察到明显的生长（和以前检验过并已接受的培养基比较），在固体培养基中的菌落数应当和以前检验过并已接受的培养基有可比性。

抑制能力检查至少应在培养的最长时间内不能观察到微生物的生长。

指示能力检查在规定的时间内必须和以前检验过并已接受的培养基在外观和指示反应都具备可比性。

### 17.9.1.5 方法验证

当建立药品的微生物限度检查法时，应进行控制菌检查的方法验证。以确认所采用的方法适合于该药品的控制菌检查。若药品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时，检查方法应重新验证。验证时，依各品种项下微生物限度标准中规定检查的控制菌选择相应验证菌株，验证大肠菌群检查法时，应采用大肠埃希菌作为验证菌株。验证试验按照供试液的制备和控制菌检查法的规定及中国药典要求进行。

验证频次的设定应参照以下情况

■ 每种新产品

■ 检验过程有变化

■ 产品生产过程发生可能影响检验结果的变化

验证时，依各品种项下微生物限度标准中规定检查的控制菌选择相应验证的菌株，验证大肠菌群检查法时，采用大肠埃希菌作为验证菌株。验证试验按供试液的制备和控制菌检查法的规定及下列要求进行。

菌种及菌液制备：同控制菌检查用培养基的适用性检查。

验证方法：取规定量供试液及 10-100cfu 试验菌加入增菌培养基中，依相应控制菌检查法进行检查。当采用薄膜过滤法时，取规定量供试液，过滤，冲洗，试验菌应加在最后一次冲洗液中，过滤后，注入增菌培养基或取出滤膜接入增菌培养基中。

结果判断：若上述试验检出试验菌，按此供试液制备法和控制菌检查法进行供试品的该控制菌检查；若未检出试验菌，应采用培养基稀释法、离心沉淀法、薄膜过滤法、中和法等方法或联合使用这些方法消除供试品的抑菌和活性，并重新进行方法验证。

验证试验也可与供试品的控制菌检查同时进行。

### 17.9.3 非无菌产品的实验频率

对于大多数非无菌制剂及原料来说，只能在极少数情况下对所有批次进行微生物检验。必须建立一个系统以保证随机取样也能保证足够的安全性。

#### 17.9.3.1 制剂产品（GMP manual）

仅仅确定是随机取样检查还是逐批检查是不够的。还应建立取样频次。产品首先应该按照受污染的程度进行以下分类：

A：检验数据不足以证明其风险水平的产品：新的产品及配方或生产过程发生重大变化的产品。生产过五批之后，再按照下面 B 类（高风险）或 C 类（低风险）来进行分类。

B：高风险产品：所有微生物结果超标的产品。

C：低风险产品：至少最近五批没有发生微生物结果超标。

产品类型	检验频次	放行的可行性
A	头五批	微生物检查结果必需为批发放依据。
B	每批或每一阶段	微生物检查结果必需为批发放依据。
C	每季度或每五批，取二者频次最高者	微生物检查结果不需为批发放依据。

#### 17.9.3.2 原料

不是所有的起始物料都需要进行每批均检的微生物试验。在 ICH Q6A 的规定中，可以找到制定原料微生物检验频次的指导。由此可以看出检验及检验频次的制定主要依赖于原料受污染的风险。

对于非无菌产品，已经把原料按照受污染的风险分为几个不同的类别：第一类是药典中要求强制检验微生物的原料以及起始原料是植物、动物的原料。这种物料必须要考虑到杂质。第二类（随机取样）是那些在生产过程中经过提取而可靠消毒的天然物质及合成的物质。

如果杂质可以被去除，以硝酸为例，该原料可以认为是低风险类的。其检验频次可以参照下表：

级别	标准	检验频次
1	原料非常关键，要求强检	每批均检
2	原料不关键	每五批检一次或每年检一批
3	因物料的种类及工艺过程决定其受污染的可能性很低	无需检验
4	新物料	初始每批均检，直至可以评估其风险水平并设定相应检验频次

#### 17.9.4 无菌检查法

##### 17.9.4.1 无菌检查法的局限性

无菌检验由于检验样品量小，所以无菌检验方法检测样品受到微生物污染的能力是有限的。例如，就如 USP 中描述的，假设一批产品的产量为 10000 个单位，如果染菌率为 0.1%，取样量位 20 个单位，则通过无菌检查的概率为 98%。

USP 和 EP 对无菌检查的描述就是“无菌检查得出的结果只能表示被检样品在检测条件下没有发现有微生物存在”。中国药典 2010 版对无菌检查的描述中也有这样的说明“若供试品符合无菌检查法的规定，仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染”。

##### 17.9.4.2 无菌产品的取样原则(FDA)

样品应具代表性，应能反应整批产品的情况及工艺情况。取样应按照以下原则进行：

1. 对无菌灌装产品而言，所取的样品必须包括最初、最终灌装的产品以及灌装过程中发生较大偏差后的产品；
2. 对最终灭菌产品而言，应考虑从可能的灭菌冷点处取样；
3. 同一批产品经多个灭菌设备或同一灭菌设备分次灭菌的，样品应从各个/次灭菌设备中抽取。

##### 17.9.4.3 检验数量及检验量

检验数量是指一次试验所用供试品最小包装容器的数量。检验量是指一次试验所用的供试品总量（g 或 ml）。具体规定见《中国药典 2010 附录 XI H 无菌检查法》

##### 17.9.4.4 阳性对照/阴性对照

中国药典要求做阳性对照，对照菌应根据供试品特性进行选择。阳性对照管培养 48-72 小时应生长良好。

阴性对照应取相应溶剂和稀释液、冲洗液同法操作。阴性对照不得有菌生长。

#### 17.9.4.5 培养基

培养基的适用性检查：无菌检查用的硫乙醇酸盐流体培养基改良马丁培养基等应符合培养基的无菌性检查及灵敏度检查的要求。本检查可在供试品的无菌检查前或与供试品的无菌检查同时进行。

- 无菌性检查：每批培养基随机取不少于 5 支（瓶），培养 14 天，应无菌生长。
- 灵敏度检查：

菌种：培养基灵敏度检查所用的菌株传代次数不得超过 5 代，并采用适宜的菌种保藏技术，以保证试验菌株的生物学特性。

菌液制备：接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中或营养琼脂培养基上，接种生孢杆菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中，30~35℃培养 18~24 小时；接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中或改良马丁琼脂培养基上，23~28℃培养 24~48 小时，上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数小于 100cfu（均落形成单位）的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基上，23~28℃培养 5~7 天，加入 3~5ml 含 0.05%(ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05%(ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含孢子数小于 100cfu 的孢子悬液。

菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在 24 小时内使用。黑曲霉孢子悬液可保存 2~8℃，在验证过的储存期内使用。

培养基接种：取每管装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 9 支。分别接种小于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌、生孢梭菌各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 3 天；取每管装量为 9ml 的改良马丁培养基 5 支，分别接种小于 100cfu 的白色念珠菌、黑曲霉各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 5 天。逐日观察结果。

结果判断：空白对照管应无菌生长，若加菌的培养基管应生长良好，判该培养基的灵敏度检查符合规定。

#### 17.9.4.6 测定方法

通常采用薄膜过滤法和直接接种法。

#### 17.9.4.7 培养及观察

按规定温度培养 14 天，培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。培养结束后，观察培养基，如果出现混浊、絮结、沉淀，表示有微生物生长，对于难以判断的情况，可以转移部分初次培养产物至新鲜培养基中继续培养，培养 14 天后如果未有微生物生长可以判定为阴性，否则为阳性。（CP2010/附录 XI H 无菌检查法）

#### 17.9.4.8 结果判断

阳性对照管应生长良好，阴性对照管不得有菌生长，否则，试验无效。

#### 17.9.4.9 阳性结果的调查 (FDA)

在进行无菌试验操作时应该谨慎操作避免一切可能带来污染的行为。当检验结果出现阳性时，需要进行实验室调查，只有当调查结果为以下几种原因中的一种或几种时，阳性结果才被认为无效。

- 实验时的环境监测结果超标
- 回顾规程时发现规程中存在能够引起培养基、冲洗液、设备被污染的漏洞
- 阴性对照出现阳性并且污染菌株和引起产品阳性的菌株是同一种
- 通过对引起阳性的菌株的鉴定分析证明，阳性结果确实是由实验中使用的材料或实验的技术原因引起的

当阳性结果被认为无效时，应重新进行试验。若阳性结果确定，则应通知 QA 启动调查程序。

#### 17.9.4.10 方法验证

##### 17.9.4.10.1 验证原则(CP2010/附录XI H 无菌检查法)

当建立产品的无菌检验法时，应进行方法的验证，以证明所采用的方法适用于该产品的无菌检验。

##### 17.9.4.10.2 验证方法(CP2010/附录XI H 无菌检查法)

中国药典规定可以采用薄膜过滤法和直接接种法。

若与对照管比较，生长良好则可以照此方法进行无菌检验。若含供试品的任一容器中的实验菌生长微弱、缓慢或不生长，则需重新进行方法验证试验。方法验证的最终目的是证明该方法不会产生假阴性结果。具体验证方法参见《中国药典 2010/附录XI H 无菌检查法》

#### 17.9.4.11 无菌实验室环境监测

##### 17.9.4.11.1 无菌室的消毒

应采用经验证合格的消毒方式，保证无菌室的洁净级别达到要求。

##### 17.9.4.11.2 监测方法及频次

层流工作台每次使用时都要进行沉降菌法环境监测，并贯穿整个实验过程，监测时层流台左右两侧各露置一平皿。无菌室的整体环境监测定期进行，在无菌室环境有较大变化或在有新的设备引进时，在进行变更管理或验证的同时加大环境监测频次。人员的微生物学监测在每次无菌实验结束后进行一次。

##### 17.9.4.11.2 监测中发现微生物的鉴定

于任何级别环境中发现超过行动值的菌落时，应鉴定至种。其他情况可进行革兰氏染色及细胞形态检查。

A 至 D 级发现的霉菌可通过观察菌落形态和镜下形态进行鉴定并记录（例如画图，参考出版物，照相）。

##### 17.9.4.11.3 警戒限、行动限和行动措施

无菌实验室的检验条件应与生产条件相同要求，行动限具体要求见 GMP 附录一。警戒限的设定应根据历史数据来制定。

如果层流工作台内的监测结果超过行动值,应调查原因,并需对层流工作台的有效性进行检查。如果其它区域超过行动值,则相应区域或无菌室应彻底清扫和重新熏蒸消毒(常用消毒剂可选择甲醛、过氧化氢、乳酸、臭氧等)。

如果无菌服和无菌手套的监测结果超过行动值,应采取如下措施:

增加监测频次

重新培训

重新进行资格确认或相关人员暂时不进入无菌室工作。

#### 17.9.5 内毒素检查

17.9.5.1 方法分类(EP6.0 2.6.14 BACTERIAL ENDOTOXINS): A.凝胶限度法、B.凝胶半定量法、C.动态浊度法、D.动态显色基质法、E.终点显色基质法、F.终点浊度法。供试品检测时可以使用其中任何一种方法进行试验。当测定结果有争议时,除另有规定外,以凝胶法结果为准。

17.9.5.2 实验室环境和人员:为保证实验结果的准确性,防止污染,内毒素检查实验应在密闭的洁净室中或密闭实验室的超净工作台下进行。检测人员应经过严格的培训,并应配备相应的防护设施(如穿防护服,戴口罩、头套等)。

17.9.5.3 鲎试剂(EP6.0 2.6.14 BACTERIAL ENDOTOXINS):分为美洲鲎试剂(LAL)和东方鲎试剂(TAL)

17.9.5.4 标准品(CP2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法):分为国家标准品和工作标准品。

细菌内毒素国家标准品系自大肠埃希菌提取精制而成,用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度及标定细菌内毒素工作标准品的效价。

细菌内毒素工作标准品系以细菌内毒素国家标准品为基准物质标定其效价,用于试验中灵敏度复核、干扰试验及各种阳性对照。

细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品应使用由中国药品生物制品检定所统一发放的标准品。如果用于出口产品的检验,细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品须经 USP 细菌内毒素参考标准品标定后,方可使用。

17.9.5.5 试验器具的准备(CP2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法):实验室所用器皿需经处理,以除去可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法(250℃,30分钟以上)除内毒素。也可用其他不干扰细菌内毒素检查的适宜的方法。若使用塑料器械,应选用标明对试验无干扰的器械。

17.9.5.6 供试品溶液的制备:某些供试品需进行复溶、稀释或在水溶性溶液中浸提制成供试品溶液。一般要求供试品溶液的 pH 值在 6.0-8.0 的范围内。对于过酸、过碱或本身有缓冲能力的供试品,可用酸、碱溶液或适宜的缓冲液调节 pH 值。对于自行配制的一些用于调节 pH 用的酸碱溶液可以用浓缩物或固体物质与内毒素检查用水在除内毒素处理的容器中配制,其存储条件和有效期应经过验证。缓冲液必须经过验证不含内毒素和干扰因子。供试品溶液的浓度应该和方法验证中的浓度一致,或者是低于验证的浓度而不得超过最大有效稀释倍数。

17.9.5.7 鲎试剂灵敏度复核(CP2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法)

具体方法参见《中国药典 2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法》，其操作应和药典要求完全一致。

内毒素标准品的准备：根据鲎试剂的灵敏度标示值 ( $\lambda$ )，将细菌内毒素国家标准品或工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解，在漩涡混合器上混匀 15 分钟，然后制成  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$  和  $0.25\lambda$  四个浓度的内毒素标准溶液，每稀释一步应在漩涡混合器上混匀 30 秒钟。

结果判断：当最大浓度  $2\lambda$  管均为阳性，最低浓度  $0.25\lambda$  管均为阴性，阴性对照管为阴性，试验方为有效。按下式计算反应终点浓度的几何平均值，即为鲎试剂灵敏度的测定值 ( $\lambda_c$ )： $\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/4)$ 。当复核灵敏度 ( $\lambda_c$ ) 在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$  时，方可用于内毒素检查，并以标示灵敏度 ( $\lambda$ ) 为该批鲎试剂的灵敏度。

试验频次：当使用新批号鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行灵敏度复核试验。

#### 17.9.5.8 方法验证（干扰试验）：

具体方法参见《中国药典 2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法》。

内毒素限值的确定：一般按以下公式： $L=K/M$ 。

式中 L 为供试品的的内毒素限值，一般以 EU/ml、EU/mg 或 EU/U（活性单位）表示。

K 为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素计量，以 EU/(kg.h) 表示，注射剂  $K=5\text{EU}/(\text{kg.h})$ ，放射性注射剂  $K=2.5\text{EU}/(\text{kg.h})$ ，鞘内注射剂  $K=0.2\text{EU}/(\text{kg.h})$ 。

M 为人用每千克体重每小时的最高供试品剂量，以 ml/(kg.h)、mg/(kg.h) 或 U/(kg.h) 表示，人均体重按 60kg 计算，人体表面积按  $1.62\text{m}^2$  计算。注射时间不足 1 小时，按 1 小时计算。供试品每平方米体表面积剂量乘以 0.027 即可转换为每千克体重剂量 (M)。

最大有效稀释倍数的确定：最大有效稀释倍数是指在试验中供试品溶液被允许达到稀释的最大倍数 ( $1 \rightarrow \text{MVD}$ )，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测。用以下公式来确定： $\text{MVD} = cL/\lambda$

L 为供试品的细菌内毒素限值。

c 为供试品溶液的浓度，当 L 以 EU/ml 表示时，则 c 等于 10ml/ml，当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时，c 的单位为 mg/ml 或 U/ml。如果供试品为注射用无菌粉末或原料药，则 MVD 取 1，可计算供试品的最小有效稀释浓度  $c = \lambda/L$ 。

方法验证要求至少检测三批样品（如为新产品需检测三批样品），同时使用两个鲎试剂厂家的鲎试剂进行干扰试验。如同一样品对两个厂家的鲎试剂测定结果差异较大，应使用第三个厂家的鲎试剂。在确认该品种在某一不超过最低有效浓度下不干扰细菌内毒素检查，或该品种在有效浓度下虽有干扰作用但采用适当方法能消除这种干扰作用时，该品种方可采用细菌内毒素检查方法。

干扰因素的排除：参见《中国药典 2010 附录 XI E 细菌内毒素检查法》

试验频次：当进行新药的内毒素检查试验前，或无内毒素检查项的品种增加内毒素检查项时，须建立该品种的内毒素检查法，并须进行方法验证。

当鲎试剂、供试品的处方、生产工艺改变或试验环境发生了可能影响试验结果的变化时，须重新进行方法验证。

术语表:

无菌检查法: 系用于检查药典要求无菌的产品、医疗器械、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法。

微生物限度检查法: 系检查非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的方法。

无菌隔离器: 是一个防止污染的单元, 应为之提供 100 级甚至更高级别质量的空气, 它能完全将内部、外部隔离。

检验数量: 是指一次试验所用供试品最小包装容器的数量。

检验量: 是指一次试验所用的供试品总量 (g 或 ml)。

洁净区: 需要对环境中尘粒及微生物污染进行控制的房间 (区域), 其建筑结构、装备及其使用均具有防止该区域内污染物的引入、产生和滞留的功能。

警戒限度: 当系统的关键参数超出正常工作范围、但未达到纠偏限度时, 有可能需要采取纠正措施的限度标准。

鲨试剂: 将鲨血液变形细胞裂解物冷冻干燥制备而成。

内毒素: 革兰氏阴性细菌细胞壁的构成成分, 具有多种生物活性, 其化学结构是脂多糖 (LPS)。热原与内毒素的关系在学术上仍有争论, 但目前认为, 在 GMP 的条件下, 内毒素是主要的热原物质, 可以说无内毒素就无热原, 控制细菌内毒素就控制热原物质。

内毒素标准品: 指经人工提取精制并经生物效价测定的细菌内毒素, 作为细菌内毒素检查的参考品。由于大肠杆菌内毒素在天然内毒素中的致热活性比较高, 在各种细菌内毒素对鲨试剂反应的灵敏性上处于中值的位置, 且其稳定、可溶, 因此一般都采用大肠杆菌的内毒素作为内毒素标准品。