浅谈非最终灭菌产品制剂车间无菌工艺模拟试验中的要点与设计

Brief Discussion on Key Points and Design of Aseptic Process Simulation Test in Preparation Workshop of Non-final Sterilized Product

郭 巧，徐 彬，李望华，乔 建，明平刚*

（武汉生物制品研究所有限责任公司，湖北武汉 430200）

GUO Qiao, XU Bin, LI Wanghua, QIAO Jian, MING Pinggang*

(*Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430200*)

摘要：文章以非最终灭菌产品生产的无菌工艺模拟试验为主线，根据国内外法规及指南中关于无菌工艺模拟试验的相关规定，从无菌工艺模拟试验的起点、批量、最差条件选择、实施及培养、结果评价及运用等方面，分析无菌工艺模拟试验的设计要点及 GMP 检查时的关注点，并分享设计案例，以保证无菌工艺模拟试验的有效性，科学评价非最终灭菌产品的无菌保障水平。

关键词：无菌工艺模拟试验；无菌保障；干预项；最差条件；非最终灭菌产品

中图分类号：R95；TQ460 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255(2025)08-1103-06

引用：郭 巧，徐 彬，李望华，等．浅谈非最终灭菌产品制剂车间无菌工艺模拟试验中的要点与设计［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(8)：1103-1108．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.08.019

无菌制剂根据生产工艺，分为最终灭菌产品和非最终灭菌产品。对于最终灭菌产品，法规未强制要求模拟试验。但对于非最终灭菌产品，必须进行无菌工艺模拟（aseptic process simulation，APS）试验[1]。无菌工艺模拟试验，又称培养基模拟灌装试验，是评估非最终灭菌产品无菌生产工艺的有效方法之一[2—3]，一直是 GMP 符合性检查的重点。《无菌工艺模拟试验指南（无菌制剂）》[3] 定义无菌工艺模拟试验如下：采用适当的培养基或其他介质，模拟制剂生产中无菌操作的全过程，以评价该工艺无菌保证水平的一系列活动。

无菌工艺模拟试验应尽量采用和实际生产工艺相同的条件、操作方法、生产环境，模拟无菌界限内所有影响产品无菌性的关键操作[4]，从而真实、可靠地反映工艺。本文分析无菌工艺模拟试验设计流程，结合 GMP 检查中的关注点，通过要点分析和案例研究，以期对无菌工艺模拟试验的设计和实施提供一定的参考。

1 无菌工艺模拟试验设计

无菌工艺模拟试验的流程如下。识别无菌工艺模拟试验的起点→确定模拟频次和批量→最差条件选择→实施→培养与观察→促生长试验→结果评价及运用。

1.1 无菌工艺模拟试验的起点

《无菌工艺模拟试验指南（无菌制剂）》[3] 明确规定，无菌工艺模拟试验应从无菌操作（无菌工艺）的第一步开始，直至无菌产品完全密封结束。若产品制备阶段采用了无菌工艺，也应作为模拟试验的一部分。全程无菌生产（如配制后不能除菌过滤）的产品，无菌工艺模拟试验应涵盖原液配制、半成品配制等所有无菌操作过程，在某些情况下，还包括容器密封后对生产容器完整性产生不利影响的检测或处理等步骤，如泄漏检测、自动检测等。因此，设计非最终灭菌产品无菌工艺模拟试验的起点时，应从产品特性和生产工艺出发。

收稿日期：2025-01-12

作者简介：郭 巧，医学生物助理工程师，从事病毒性疫苗规模化生产的研究。

通信作者：明平刚，博士，副研究员，从事病毒性疫苗研发和规模化生产的研究。

无菌工艺的模拟试验一般要避免对单元操作分别模拟，应尽量进行连续工艺模拟。任何单独的模拟均需有文件记录，并确保所有单独模拟的总和能持续且全面地覆盖整个工艺[4]。单元操作模拟的合格标准判定需来自各单元操作的累积，并应考虑整个过程中发生的微生物总数。

1.2 无菌工艺模拟试验的频次、批量

新的无菌生产线，在正式生产之前，至少应完成连续 3 次成功的无菌工艺模拟试验；而正常生产期间，每半年进行 1 次试验，每次至少 1 批[5]。如因其他原因停产一定周期的生产线，在恢复正式生产前应进行无菌工艺模拟试验。例如：发生空气净化系统、生产用设备、厂房改造、无菌生产工艺及人员的重大变更，或设备的重大维修后，应进行无菌工艺模拟试验。模拟批次应基于对无菌风险影响的重要程度来决定，对无菌风险造成中、高等级影响的变更或维修，建议应进行连续 3 批无菌工艺模拟试验。

无菌工艺模拟试验的批量在《药品生产质量管理规范》（Good Manufacturing Practice for Drugs，GMP）附录[5]和美国注射剂协会（Parenteral Drug Association，PDA）发布的技术报告[6]中均有相应描述，并且要求基本一致：生产批量小于 5 000 支，模拟支数至少应等于生产批量；生产批量在 5 000 ～ 10 000 支，则模拟支数应与生产批量相当；生产批量大于 10 000 支，模拟支数应大于 10 000 支。在遵循上述原则的前提下，还应考虑分装足够的支数以覆盖所有干预操作。

1.3 最差条件选择

无菌工艺模拟试验应选择合理的“最差条件”。通过最差工艺条件对工艺流程、设备和整个体系进行挑战，在最差条件下的合格结果能证明无菌操作的可靠性，从而保证产品的无菌可信限度达到合格标准。

但最差条件并不意味着人为创造超出允许操作、强制系统失败的条件，最差条件应取决于影响产品无菌性的操作或正在考虑的风险，包括但不限于以下 4 个方面。

1.3.1 人员方面

人是无菌工艺中最大的污染源，最差条件可以从最大准入人数、更衣、班次轮换、夜班疲劳状态等因素进行设计。例如：通过设计灌装间保持最大准入人数，以确认在洁净区最大人数的情况下，人员活动对产品无菌性的影响。又如，无菌室操作人员的最长疲劳时间应不少于实际生产时间[7]，建议在人员最长疲劳时间的末期进行干预操作，以考察人员疲劳状态下对产品无菌性造成的影响[8]。

此外，迎检过程应特别关注无菌室操作人员进入无菌生产核心区域的细节，包括人员更衣进出洁净区的单向流移动或分时移动[9]，人员在洁净区的站姿、坐姿、手消频次、行走速度，以及物品进入 B 级背景下 A 级区域的转运、脱包和消毒[8]。

1.3.2 时限挑战模拟的最差条件

应从准备阶段和无菌操作过程 2 个方面去设计时限挑战的最差条件。无菌生产过程中有关时限的规定，包括物品灭菌后最长存放时间、敞口暴露操作最长时间、除菌过滤最长时间、分装最长时间、维修最长时间等。

准备阶段与可能影响产品的微生物负载相关，可挑战房间清场清洁的最长时间、器具灭菌后存放的最长时间，不刻意在无菌工艺模拟试验前进行洁净室空间消毒，以及用限制进入屏障系统（Restricted Access Barrier System，RABS）手套灭菌来提高无菌保障水平。在超过存放时限的情况下，若无菌工艺的验证结果合格，则实际生产时产品的可靠性更有保证。

无菌操作过程中的时限挑战可考虑以下方面，如灌装系统组装的最长时间、灌装最长时间、冻干产品轧盖最长时限、故障维修最长时间、开安全门最长时间、操作人员最长疲劳时间。

1.3.3 灌装速度

灌装速度越慢，制品敞口暴露时间越长；灌装速度越快，设备越易发生故障，干预操作强度 / 难度越大。培养基模拟灌装时应涵盖日常生产时的灌装速度范围，可考虑分别模拟快速和慢速 2 种情况。

1.3.4 干预操作

干预是指操作人员按照相关规定参与无菌工艺生产的所有操作活动，可分为固有干预和纠正性干预[8]。固有干预是指日常生产中常规、有计划的无菌操作，如灌装系统组装、添加胶塞、装量检测等；纠正性干预是指对无菌生产过程的调整，如处理倒瓶、清除被卡胶塞、设备故障维修等。干预频次的设计应考虑生产过程，按比例覆盖模拟试验的全过程，不能在短时间内集中完成。

无菌工艺模拟试验中的干预设计应基于日常生产时的干预项目和次数的统计。通常情况下，常发生的干预应每次模拟，不常发生的干预可定期模拟。干预模拟的次数应不低于实际生产中干预发生的次数，但也不应过度模拟。

1.4 无菌工艺模拟试验的实施

所有参与无菌工艺模拟的实施人员，包括维修人员均应经过相关培训和考核，并能按规定程序实施无菌操作，操作条件不应优于日常生产的操作条件。同时，应进行环境监测，监测频次或数量可比日常生产更高，以评估干预操作对无菌环境的影响。另外，环境监测本身也是一个干预，可通过模拟灌装来判断环境监测的有效性和科学性，后期也可通过环境监测判断模拟灌装失败的原因。例如，培养基模拟灌装时发生粒子报警，应按照日常生产时的报警处理方式进行调查和说明，并进行记录。因模拟各种干预操作，可接受悬浮粒子报警的频次高于日常生产。对于人员进入 A 级区进行干预操作的情况，除对人员五指进行取样外，还应对其他部位进行表面微生物取样。

1.5 无菌工艺模拟试验的培养与观察

无菌工艺模拟试验结果的可靠性依赖于灌装后培养基的培养与观察，应重点关注试验样品、剔废样品和剩余培养基的培养[7]。所有灌装完整的培养基均应进行培养，实际工艺中如明确规定受干预影响的产品（容器）应从生产线上剔除，在模拟试验时也可剔除，但不培养的容器应予以记录，并评估合理性。培养基模拟灌装时的废弃数量不应高于实际生产时的废弃数量，应尽可能保证培养基的保留与培养。

无菌工艺模拟试验结束后，应对所有与培养基接触的设备、容器、部件及环境进行有效清洁，防止培养基残留造成的微生物滋生，并对设备进行清洁效果确认。灌有培养基的容器可用于微生物侵入试验，以证明容器密闭完整性。

培养基灌装后容器具清洗效果的确认频次以及容器密封性的确认频次，仅需在非最终灭菌产品的首次无菌工艺模拟试验中进行，后续无需每次都进行周期性验证。若清洗程序或包材组合发生变更，则需再次确认。例如：清洗条件、流程、方法发生变化时，应进行清洗效果确认；内包材规格、厂家、组合形式发生变化，应进行微生物侵入试验。

灌装的培养基在培养前应进行倒置或相关操作，以确保培养基接触到密闭容器系统的所有内表面，培养时间至少为 14 d，温度应保证微生物能够繁殖，一般在 20 ～ 25 和 30 ～ 35 ℃环境中分别培养不少于 7 d，期间对温度进行控制和连续监测。

由经过培训且具有资质的人员对所有无菌工艺模拟试验中灌装的培养基逐支进行无菌性检查[4]，若在培养期间发现异常情况（如瓶身破裂、长菌等），应记录并做进一步调查。

每次无菌工艺模拟试验均应录制视频并妥善保存，视频监控录像属于文件记录的一部分，需包含所有高风险操作和关键信息[4]。作为历次检查的重点，检查员异常关注高风险操作人员无菌操作的规范性、模拟试验与产品实际生产工艺的一致性、视频和记录的一致性等。另外，若无菌工艺模拟试验失败，监控视频是调查失败原因的重要途径。

1.6 无菌工艺模拟试验中的促生长试验

培养结束后应进行培养基促生长试验[4]。促生长试验应包括药典规定的污染菌以及环境监控和无菌检查中的分离菌，以代表实际生产中可能遇到的污染菌；接种量应不超过 100 CFU。若促生长试验失败，应调查并重复培养基模拟灌装试验。

1.7 结果评价、运用

1.7.1 结果评价

欧盟 GMP 附录 1《无菌药品生产》[10] 中规定，

无菌工艺模拟试验的合格标准为无微生物生长，任何被污染的单元应判定无菌工艺模拟失败，需调查后再验证。

建议无菌工艺模拟试验方案中明确规定无菌工艺模拟试验出现污染时的调查和处理措施。若出现任何污染，均应进行彻底、规范的调查，并评估自上次成功的无菌工艺模拟试验以来的生产批次的潜在风险，所有未上市的批次均应纳入调查范围，任何有关其放行状态的决定均应考虑调查结果。

虽然通过培养基模拟灌装试验可评估无菌生产工艺的可靠性，但当产品无菌检查时发现阳性结果，不能以模拟灌装试验结果排除生产过程带来污染的可能性。

1.7.2 结果运用

结果运用主要体现在无菌工艺模拟试验后，输出日常干预清单和无菌生产人员资质。

无菌工艺模拟试验合格后，可根据模拟的干预项目制定下一阶段生产的干预清单，将无菌工艺模拟试验中模拟的最大干预次数作为日常生产时允许的干预最大限度值，并考虑对纠正性干预制定警戒限。在日常生产中，发生超出干预最大限度或发生新的纠正性干预等情况，应进行分析、评估；若新发生的干预与先前的模拟干预类似，且可采用适当的无菌技术执行，则可接受。这类干预的评估包括无菌工艺模拟灌装产生干预的继发结果，应有风险评估予以支持。在下一次无菌工艺模拟试验时，可考虑对新发生的干预进行模拟。

对于无菌生产人员，企业应建立资质获取和取消流程，获取资质需满足洁净室更衣标准要求，完成相关的培训，参与一次成功的无菌工艺模拟试验。通过无菌工艺模拟试验结果确认每位参与者可进入的区域及其允许的无菌操作项目[11]。对于不符合无菌室工艺操作流程或职能相关要求的，或者因自身行为导致其参与的无菌工艺模拟试验失败，应取消无菌操作资质，相关人员在克服问题、重新培训直至表明具备无菌生产能力后方可重新获取资质。

2 无菌工艺模拟试验的设计示例

以某一冻干产品为例，对无菌工艺模拟试验的关键设计要点进行说明。产品生产工艺流程如图 1 所示。

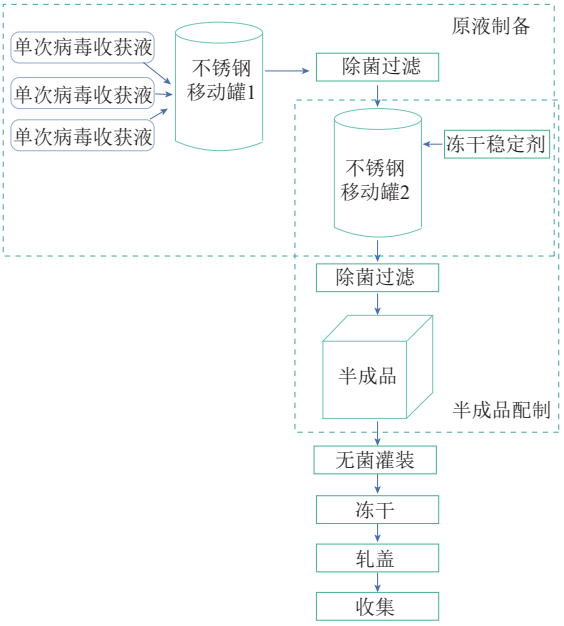


图 1　冻干产品的无菌生产工艺流程图

Fig.1　Process Flow of Aseptic Production of Lyophilized Products

该产品在原液制备阶段也有除菌过滤操作，且有取样进行无菌检查的步骤。根据现有检查的趋势，将产品原液制备阶段也纳入无菌工艺模拟试验的范围。因此，该产品的无菌工艺模拟试验是从单次病毒收获液合并这一步开始模拟。

原液制备和半成品配制的无菌工艺模拟试验操作流程按照产品生产工艺流程进行，包括过滤和取样的操作步骤。以下以制剂分装阶段为例，从模拟条件和干预项进行方案设计。

2.1 模拟条件

表 1 为该非最终灭菌产品分装车间无菌工艺模拟试验方案的模拟条件。根据前文描述的“最差条件”进行设计。其中，灭菌后存放最长时限、组装最长时限和维修最长时间的模拟是检查时的关注重点；尤其是日常生产过程中发生设备故障维修的情况，可通过偏差中记录的维修过程，对照查看无菌工艺模拟试验中是否模拟了维修操作，模拟的时长是否大于实际生产时的维修时长，是否进行了开安

表 1 冻干产品的无菌工艺模拟试验条件分析表

Tab.1 Analysis of Aseptic Process Simulation Test Conditions for Lyophilized Products

项目	产品实际分装条件	无菌工艺模拟试验条件	原因说明
灭菌后存放时间	灭菌效期≤ 72 h	＞ 72 h	灭菌物品放置 72 h 后使用，冻干机在线灭菌（sterilization in place，SIP）72 h 后使用，从而增加培养基污染风险
人数	灌装区最大准入人数 8 人，轧盖区最大准入人数 6 人	灌装区：8 人 轧盖区：6 人	人员活动增多的情况下，产品污染风险增加，设计最高人数以证明人数限定范围内实际生产的无菌风险
速度	每 1 min 530 瓶	快速： 每 1 min 530 瓶 慢速： 每 1 min 300 瓶	灌装速度越快，设备出现的故障率越高，操作越频繁，造成污染的风险越高 灌装速度越慢，培养基暴露时间越长，造成污染的风险越高
灌装体积	0.6 mL	1.0 mL	培养基灌装体积应考虑适宜微生物生长的情况，并能够覆盖容器内表面。因使用的是 2 mL 西林瓶，故装量设计为 1.0 mL
灌装瓶数	24 万支	约 6 万瓶	模拟灌装批量应足够大，以模拟正常生产的条件并评估可能的污染风险。本次无菌工艺模拟试验灌装约 6 万瓶，足够的灌装量能模拟生产时的各项干预操作
组装时限	≤ 4 h	＞ 4 h	模拟比实际生产更长的装配时间，以考察灌装系统组装时器具、管道暴露的污染风险
分装时限	≤ 16 h	＞ 16 h	培养基灌装的时间应足够长，以模拟最差的动态环境，并模拟所有可能出现的干预，从而更好地反映人员所致污染的风险
轧盖时限	每亚批≤ 6 h	每亚批＞ 6 h	模拟实际生产时的最长轧盖时限，以考察轧盖过程无菌风险
冻干柜内位置	共 2 个冻干柜，每柜 13 个板层，每层 1 万瓶	共 2 个冻干柜，每柜选择 3 个板层，每层 1 万瓶	为考察冻干柜内不同位置的污染风险，培养基分别放置在柜内最上层（第 1 层）、中间层（第 7 层）、最下层（第 13 层）
冻干持续时间	48 h	约 12 h	为避免培养基在冻干柜内时间过长，损失过多水分而影响微生物生长，培养基在柜内时间不能过长。前期该车间培养基灌装后冻干柜内放置时间均模拟为 12 h，既能保证培养基的生物活性，也能模拟冻干过程。因此，本次验证设计培养基在柜内的放置时间约为 12 h
冻干过程模拟	冷冻、抽真空	不模拟冷冻过程，模拟抽真空操作	为避免冷冻影响培养基的微生物生长，不模拟冷冻过程。冻干机保持常温，分别在入柜后和出柜前模拟 2 次抽真空操作
人员疲劳时间	≤ 4 h	＞ 4 h	主要操作人员至少挑战 1 次大于 4 h 的工作时长，并在 4 h 后挑战进行干预操作
最长维修时间	≤ 2 h	＞ 2 h	为挑战故障设备维修对产品无菌性的影响，模拟大于 2 h 的设备故障维修时间

全门等维修操作，开安全门的最长时间是否经过了模拟挑战等。

2.2 干预项目

分装开始前的准备工作，如灭菌物品转运、灌装器具组装、管道连接等操作过程，按照日常产品生产时的操作流程进行，分装过程中的干预次数设计基于日常生产时的干预统计，具体如表 2 所示。

以添加胶塞的缺陷为例。若模拟次数少于日常生产，则存在未模拟实际生产时最差条件的风险；若模拟次数远大于实际生产，则存在过度模拟的风险，导致放大输出到下一阶段生产允许的最大干预次数，不利于日常生产时干预次数的约束。

针对此类问题，本研究制定干预操作管理文件，对干预项目的设计原则进行规定。要求每次无菌工艺模拟试验前，统计自上一次成功的无菌工艺模拟试验以来，生产过程中发生的所有干预。对于

表 2 冻干产品无菌工艺模拟试验分装阶段的干预操作表

Tab.2 Intervention Operation Table for Aseptic Process Simulation Test of Lyophilized Products in the Packaging Stage

干预项目	日常发生最大次数 / 次	模拟次数 / 次
添加胶塞	22	24
处理灌装机倒瓶、卡瓶	18	20
调整灌装针	1	2
处理卡胶塞状况	9	10
更换灌装泵	1	1
开 RABS 门处理破瓶	2	3
设备故障、维修	1	1
处理灌装 - 冻干轨道倒瓶	5	6
处理出料倒瓶、掉塞	16	18
处理冻干 - 轧盖轨道倒瓶	4	5
添加铝盖	26	28
处理轧盖机倒瓶	16	18
处理卡铝盖	7	8

生产时发生超出上一次模拟次数的情况，进行原因说明和风险分析。若是因包材质量问题或人为操作

问题造成的干预次数超标的情况，制定预防纠正措施，但不纳入新一次模拟的次数增加，以避免过度模拟；若在正常、合理的情况下，干预次数超出上一次模拟次数，则在上一次干预模拟次数的基础上增加 10%左右，作为新一次的无菌工艺模拟试验干预次数模拟值。本研究按照该原则进行干预项目和次数设计，在外部审计时也得到认可，期望为相关企业提供一定的参考。

目前，我国已正式申请加入国际药品检查合作计划（Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme，PIC/S）[12]，对我国的药品检查制度和标准提出了更高要求。为更好地适应未来新形势下无菌药品 GMP 检查工作，有效提升非最终灭菌产品的生产质量管理水平，一方面，企业在实际生产过程中应深入学习和理解相关法规，持续更新管理理念，以缩小在无菌保障方面存在的差距；另一方面，应更全面、科学地设计无菌工艺模拟试验，提升产品的无菌保障水平。建议企业对日常生产过程中发生的干预情况进行统计和分析，通过最差条件模拟，更客观地评价工艺的无菌保障水平，从而完善无菌工艺控制策略，提高无菌保障水平，保证产品的安全性、有效性和稳定性 [13]。

参考文献：

[1] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 药品 GMP 指南:无菌制剂（第 2 版）[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2023.

[2] 杨惠毛, 田治文, 范利华. 某制药车间无菌工艺模拟试验研究 [J]. 中国药业, 2022, **31**(21): 77-81.

[3] 国家药品监督管理局. 无菌工艺模拟试验指南（无菌制剂）[EB/OL]. (2018-09-11)[2025-04-17]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=933746f656d1d50d11d63e4d4141cb75.

[4] 颜若曦. 无菌工艺模拟试验中常见问题和检查要点分析研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, **37**(9): 2135-2141.

[5] 国家市场监督管理总局. 药品生产质量管理规范（2010 年修订）附录 1：无菌药品 [EB/OL].(2011-02-24)[2025-04-24]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20110224164501312.html.

[6] Parenteral Drug Association. PDA Technical report No.22 revised process simulation for aseptically filled products [EB/OL]. (2011-12)[2025-04-24]. https://www.pda.org/search-results?Keywords=PDA%EF%BC%8EProcess%20Simulation%20for%20Aseptically%20Filled%20Products.

[7] 张　帆, 孙　洋, 刘福利. 化学药品注射剂的灭菌或无菌工艺现行要求及考虑 [J]. 药物评价研究, 2023, **46**(12): 2551-2557.

[8] 魏京焘, 苏　龙, 吕京津, 等. 基于风险评估的培养基模拟灌装试验设计的探讨 [J]. 化工与医药工程, 2020, **41**(6): 41-45.

[9] 王　丹, 杨敬鹏. 结合 PIC/S GMP 无菌药品附录修订探讨国内无菌药品生产现场检查策略 [J]. 中国生物制品学杂志, 2023, **36**(11): 1403-1408.

[10] EMA. EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Annex 1: manufacture of sterile medicinal products [EB/OL]. (2022-08-22)[2025-04-25]. https://health.ec.europa.eu/document/download/e05af55b-38e9-42bf-8495-194bbf0b9262_en?filename=20220825_gmp-an1_en_0.pdf.

[11] 周凡婷, 邓　凯. 冻干产品无菌工艺模拟试验方案改进及实施研究 [J]. 大众科技, 2023, **25**(6): 36-39.

[12] 颜若曦. PIC/S 技术标准指南体系分析 [J]. 中国药物评价, 2024, **41**(2): 172-176.

[13] 田盛举, 张　磊, 张颖聪, 等. 疫苗的无菌工艺模拟试验 [J]. 甘肃科技, 2022, **38**(11): 51-55.