

計畫編號： DOH102-DC-2603

衛生福利部疾病管制署 102 年度科技研究發展計畫

抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量檢測方法確效

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署血清疫苗研製中心

計畫主持人：李政道

研究人員：陳蓓諭、吳慧娟、曾雅鈴、溫振谷、陳雅惠

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

目 錄

封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
前言	(4)
材料與方法	(6)
結果	(8)
討論	(20)
參考文獻	(23)

中文摘要

近來衛生福利部為提昇國內藥廠品質，對 GMP 推展至 PIC/S GMP，而本署生產之抗蛇毒血清凍晶注射劑共有四種：1. 抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清凍晶注射劑；2. 抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑；3. 抗百步蛇毒血清凍晶注射劑；4. 抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑。WHO 規範建議應將抗蛇毒血清凍晶注射劑之水分含量納入品管檢驗規格，建議值為小於 3%。本研究目的為依據衛生福利部訂定之分析確效指導手冊，也就是依 ICH Q2A 和 Q2B 進行水分含量分析方法確效。方法為利用水分測定儀檢測抗蛇毒血清凍晶注射劑中水分含量，分析方法確效特性應包含方法之準確度、精密度、再現性、專一性、線性及範圍，以建立適合檢驗抗蛇毒血清凍晶注射劑之水分含量分析方法，而建立水分含量測定品管分析可有效監控產品穩定性、確保產品品質並符合 WHO 建議規格。

關鍵詞：抗蛇毒血清凍晶注射劑、水分含量測定、分析方法確效

前言

臺灣氣候溫暖潮濕適合蛇類繁殖，早期生態未破壞前處處可見蛇類出沒，其中毒蛇約23種，臨床上較常見的六大毒蛇分別是出血毒性的龜殼花、赤尾鮫及百步蛇；神經毒性的雨傘節及飯匙倩(眼鏡蛇)；混合毒性之鎖鏈蛇。除了鎖蛇分佈較偏重南部及東部山區之外，其它五種毒蛇在全台各地都可見，其中以被赤尾鮫咬傷比率最高，而百步蛇雖然在六大毒蛇中毒性較弱，但是每次釋放大量的毒液，所以致死率高居第一。咬傷之後臨床上的症狀，神經毒性蛇毒會造成肌肉麻痺、呼吸衰竭；出血性蛇毒則會使局部腫脹、瘀血、傷口流血，劇痛，全身性的症狀則是血小板降低與各器官出血。治療蛇毒咬傷使用正確種類的抗毒蛇血清是最決定性的治療[1, 2]。本署疫苗研製中心為目前國內唯一產製抗蛇毒血清的cGMP疫苗廠，目前供應4種抗蛇毒血清，其中2種為雙價型（抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清、抗飯匙倩及雨傘節蛇毒血清），另2種則為單價型（抗百步蛇毒血清、抗鎖鏈蛇毒血清），有效期皆為5年。

為提昇本署疫苗研製中心疫苗品質且符合PIC/S GMP規範，故執行抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量測定方法確效。本計畫擬以抗雨傘節及飯匙倩凍晶注射劑進行Karl Fischer水分含量分析方法確效。本研究參考WHO建議將抗蛇毒血清凍晶注射劑之水分含量規格定為3%進行確效[3]。

本研究依據衛生福利部訂定之分析確效指導手冊，即依ICH Q2A和Q2B進行水分含量分析方法確效[4, 5]，方法為利用Karl Fischer水分測定儀檢測抗蛇毒血清凍晶注射劑中水分含量[6]，分析方法確效特性應包含方法之準確度、精密度、再現性、專一性、線性及範圍，以建立適合檢驗抗蛇毒血清凍晶注射劑之水分含量分析方法，而凍晶製品之水分含量是影響產品品質長期安定的重要因子，建立適合之品管分析方法可有效監控產品穩定性並符合WHO建議規格。

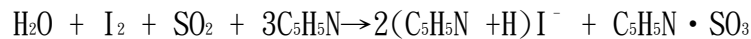
目前由本署疫苗中心所產製上市販售的抗蛇毒血清凍晶注射劑，上市前均依照中華藥典規範必須通過包括pH值、無菌、異常毒性、效價等品管檢驗相關測試項目，品質有一定保障。目前國際上抗蛇毒血清主要生產國已將抗蛇毒血清凍晶產品之水分含量納入成品放行檢驗規格，惟本中心尚未建立此一分析方法，藉由本次抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量

測定確效方法之建立，可以確保抗蛇毒血清成品品質的穩定性，也符合WHO法規對產品規格之建議，更能落實PIC/S GMP的品質管控精神。

材料與方法

(一) Karl Fischer 水分儀標準品分析

費氏法是應用費氏試劑以滴定法檢測檢品中所含之水分，費氏試劑以碘、二氧化硫、吡啶及甲醇所組成，其滴定之反應式如下：[7, 8]



此測定主要是利用水分與 Karl-Fisher 試劑作用，引起電化學電位的差異來進行水分含量分析，此方法已廣為各國藥典所採用，如 USP 及 EP，中華藥典第七版中亦載明此一測定法，本計畫所使用之水分測定儀分析儀器廠牌型號為 Metrohm 831 KF

Coulometer、728 Stirrer、832 Thermoprep

在進行分析方法確效前，必須對水分儀進行基本性能的驗證，以市售之 1% 之標準品(廠牌 Merk)進行水分含量測定，先確定儀器之適用範圍及可重複性之精密度，再進行蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效。

(二) 抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效

依據國際協調會議(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, ICH)及分析確效指導手冊之指引[4, 5, 9]，執行含量測定應包含準確度、精密度、線性及範圍等確效特性。

(1) 線性及範圍：評估分析方法之線性關係時，應涵蓋該分析方法的適用濃度範圍。分析方法之線性係指該方法用於測定一系列濃度不同之同成分檢品溶液時，如 60-140%，分析結果與檢品濃度呈線性關係，此線性關係之樣品濃度範圍即為線性範圍。本費氏水分含量測定，檢品水分含量規格為 3% 以下，檢品取樣量以 20mg 計量，取三批檢品，每批在 60-140% 範圍共取 5 點 (60%，80%，100%，120%，140%)，所得結果與理論含水量來進行線性度迴歸分析，線性關係之良否通常以線性迴歸斜率之相關係數 (r) 為度。確效指標為每批 r 值範圍應高於 0.99 以上。

(2) 精密度(可重複性)：本費氏水分含量測定之精密度測試，乃在於利用同一批號之檢品進行六次以上之水分含量測定，並分析測定結果能持續重現之程度。精密度通常以

分析結果之 %RSD ($SD/X \times 100\%$) 值為度。確效指標為其 %RSD 範圍：標準品應小於 2% 以下，凍晶注射劑應小於 10% 以下。

- (3) 準確度: 分析方法之準確性代表用該方法所得之分析結果與真值接近之程度。本費氏水分含量測定，須進行三批檢品之準確性測試，將已知濃度之標準品水溶液打入樣品內形成 spike，並分別測量未加入標準品前之檢品水分含量，標準品水分含量，及 spike 水分含量，並將所得結果代入以下公式，求得回收率。共量測三批以上檢品之回收率試驗，並計算其平均回收率。確效指標為每批回收率應介於 90% ~110% 之間，平均回收率 (% Recovery) 應介於 95% ~105% 之間，且回收率 %RSD ($SD/X \times 100\%$) 範圍應小於 2% 以下。

為避免空氣中水分濕度之干擾，所有檢品及標準品之量測，均應在低濕度環境下 (20% humidity) 進行。秤量時要注意秤藥匙洗淨後烘乾，再包鋁箔放在烘箱中，使用前放在真空乾燥箱中冷卻，使用時每次的秤重使用個別的秤藥匙，秤重時為避免檢品受潮，只秤取一次直接處理上機。

(三) 抗蛇毒血清凍晶注射劑洩漏測試

洩漏系統的目的主要是測試密封後的瓶灌是否有洩漏，承載模具腔體可以完整包覆待測玻璃瓶，確保腔體無縫隙。然後給予壓力利用壓力差來判別是否洩漏，假設瓶子洩漏而瓶內空氣跑到腔體就會造成真空度改變。標準洩漏測試是利用 5 μ m 洩漏節流孔接上測試接頭進行，測試值應大於 0.025psig 才可進行抗蛇毒血清凍晶注射劑洩漏測試，本計畫進行非破壞性完整性測試儀之性能驗證(PQ)。

(1) 密封完整性驗證：

取 5 個已封蓋之 30 mL 玻璃瓶進行測試。

(2) 洩漏測試驗證：

分別取 5 個封蓋完整之 30 mL 玻璃瓶，以 27G x3/4” 號針頭穿刺凍結乾燥橡皮塞，針留在橡皮塞上，依操作程序進行測試。

結果

一、 Karl Fischer 水分儀標準品分析：以水分標準品進行分析確認儀器的性能。

*水分含量計算公式： $\text{water content (\%)} = \text{H}_2\text{O (mg)} - \text{blank} / \text{sample size (mg)} * 100\%$

(一) 0.1%水分標準品：HYDRANAL-Water Standard 1.00

(Manufacture：Fluka；Cat no. 34828；Lot no. :SZE93350；Exp. Date: Nov. 2014)

COA 標示之水分含量為 1.003mg/g，即 0.1003%。

表一：以庫倫電量法水分儀進行 0.1%水分標準品精密度測試結果

No.	sample size (mg)	H ₂ O (mg)	water content (%)
1	994.9	1.0431	0.1048
2	920.54	0.9627	0.1046
3	723.02	0.7587	0.1049
4	763.1	0.7822	0.1025
5	748.63	0.7775	0.1039
6	1001.26	1.0397	0.1038
mean			0.1041
STDEV			0.0009
RSD%			0.8762

* 0.1%水分標準品以安瓿形式包裝，COA 上所列之效期為未開封前之效期，安全起見建議戴著手套打開安瓿，由於開封後，標準品易受潮，開封後須立即使用，不可久置。依 ISO9000 建議，庫倫電量法水分儀每批新購入之試劑，須以 0.1%水分標準品確認水分含量測定的可信度及儀器的性能，同一批試劑以此標準品測定 2~3 次即可。

(二) 5.55% oven 專用標準品：HYDRANAL-Water Standard KF-Oven 220°C~230°C，

(Manufacturer:Fluka；Reference no. 34748；Lot no. SZBB336AV；Exp. Date：Nov. 2016)

COA 標示此批號標準品之水分含量為 5.51%，可接受差異範圍為 5.31%~5.71%。

操作參數設定：(庫倫電量法水分儀)

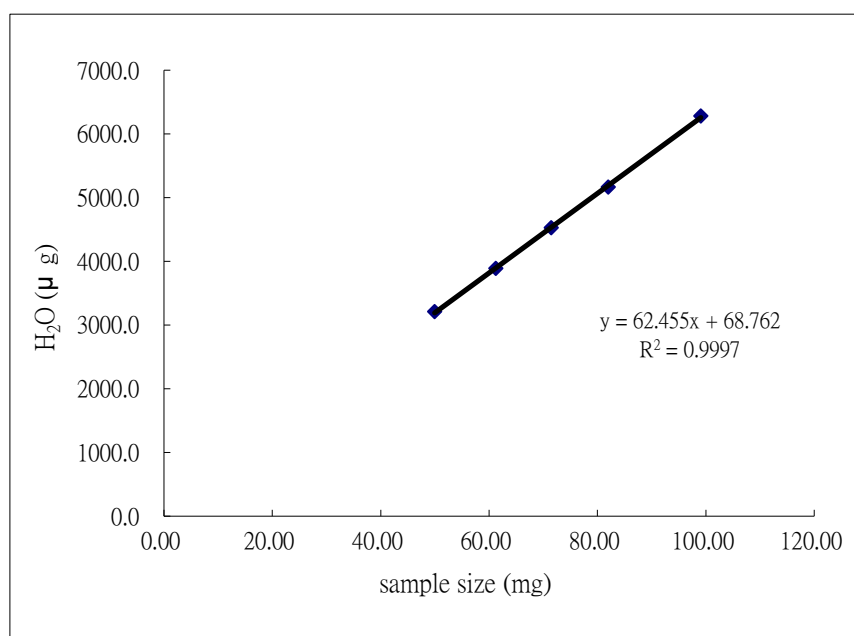
Oven 溫度：230°C

滴定時間：900sec

標準品用量：50~100mg

表二、以庫倫電量法水分儀進行 5.55%標準品線性測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (μg)	water content (%)
blank	-	-	67.0	-
1	49.98	908	3210.7	5.84894
2	61.26	908	3886.6	5.87529
3	71.49	908	4523.6	5.92558
4	82.02	908	5166.7	5.94891
5	99.09	908	6279.7	6.04733
			mean	5.9292
			STDEV	0.08
			RSD (%)	1.30



圖一、以庫倫電量法水分儀進行 5.55%標準品線性度測試結果之迴歸曲線圖

*線性R²計算結果為 0.9997，線性度非常好；但是，水分含量平均值 5.9292% 高於可接受差異範圍 5.31%~5.71%。可能原因為庫倫電量法水分儀較適用於 0.001%~1% 低水分含量測定，5.5%標準品之水分對此儀器而言，含量過高。

改以容量滴定法水分儀進行此 5.55%標準品精密度測試

操作參數設定：(容量滴定法水分儀)

Oven 溫度：230°C

滴定時間：800sec

標準品用量：200~300mg

表三、以容量滴定法水分儀進行 5.55% 標準品精密度測試結果

No.	sample size(g)	titr. Time (sec)	滴定量(mL)	water content (%)
blank	-	-	0.0670	-
1	0.26984	814.80	3.4300	5.3300
2	0.24280	824.30	3.1540	5.4300
3	0.22533	801.20	2.9470	5.4600
4	0.27631	857.80	3.5300	5.3600
5	0.26054	811.60	3.3960	5.4600
6	0.24170	804.3	3.1340	5.4200
			mean	5.4100
			STDEV	0.05
			RSD (%)	0.99

*以容量滴定法水分儀進行 5.55% 標準品精密度測試，水分含量平均值 5.4100%，各測定值介於 5.31%~5.71%，符合規格。

*5.55%oven 專用水分標準品不適合作為庫倫電量法之水分標準品。

(三) 1.0% oven 專用標準品：Water standard oven 1%, 1g = 10mg H₂O

(Manufacturer : Merck ; Cat no. 1888054 ; Batch no. : F1679654 ; Exp. Date : Sep. 2014)

COA 標示此標準品之水分含量為 0.97%。

操作參數設定：(庫倫電量法水分儀)

Oven 溫度：170°C

滴定時間：600sec

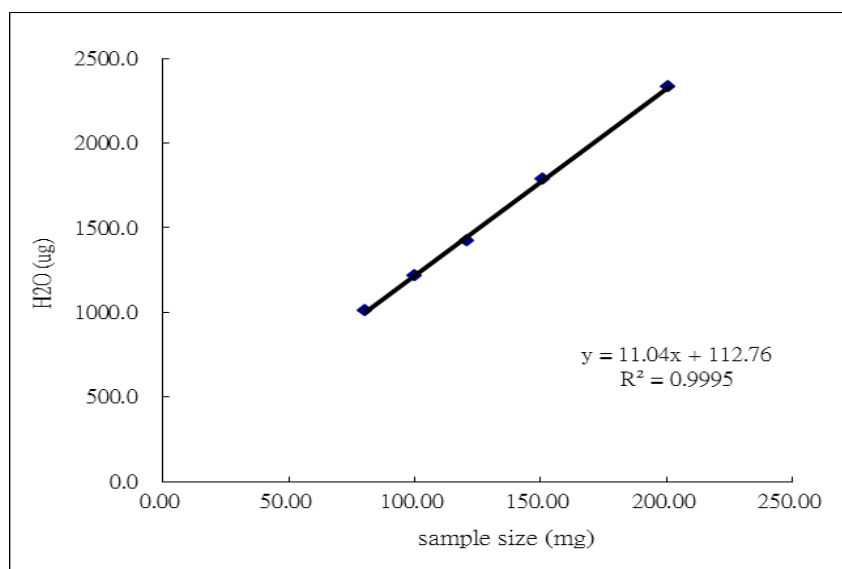
標準品用量：80~300mg

(1) 線性度：以 5 種不同濃度測試評估線性區間範圍，判定係數(R²)應至少 ≥ 0.99

表四、以庫倫電量法水分儀進行 1% 標準品線性度測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (μg)	water content (%)
blank	-	-	181.37	—
1	80.39	608	1010.9	1.0319
2	100.15	608	1219.6	1.0367
3	120.89	611	1426.4	1.0299
4	150.97	857	1784.7	1.0620
5	200.77	995	2332.9	1.0716

mean	1.0464
STDEV	0.02
RSD (%)	1.83



圖二、以庫倫電量法水分儀進行 1% 標準品線性度測試結果之迴歸曲線圖

*以庫倫電量法水分儀進行 1% 標準品線性度測試，判定係數(R^2)= 0.9995，大於判定標準 0.99，表示此儀器基本性能、試劑環境等各條件皆無問題。

(2)精密度：同一批號之標準品進行六次以上之水分含量測定，以檢測並分析測定結果能持續重現之程度。精密度通常以分析結果之%RSD ($SD/X \times 100\%$) 值為度。其 %RSD 範圍應小於 2% 以下。

表五、以庫倫電量法水分儀進行 1% 標準品精密度測試

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (µg)	water content (%)
blank	-	-	236.5	-
1	120.54	778.00	1535.1	1.0773
2	120.13	649.00	1519.4	1.0679
3	120.49	791.00	1571.1	1.1076
4	120.38	860.00	1585.1	1.1203
5	120.38	608.00	1528.9	1.0736
6	120.02	697	1548.3	1.0930
			mean	1.0900
			STDEV	0.02
			RSD (%)	1.90

*1%標準品測得之精密度%RSD=1.90%，範圍小於 2%，重複性佳，再次確認此儀器基本性能及試劑等各條件皆無問題。在進行抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效之前，會以 1%標準品，先行測試儀器、試劑及環境等狀況。

二、抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效

(一)依據衛生福利部訂定之分析確效指導手冊進行水分含量分析方法確效，以抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑(批號：FN10201)進行線性度分析。

操作參數設定：(庫倫電量法水分儀)

Oven 溫度：110°C

滴定時間：600 sec

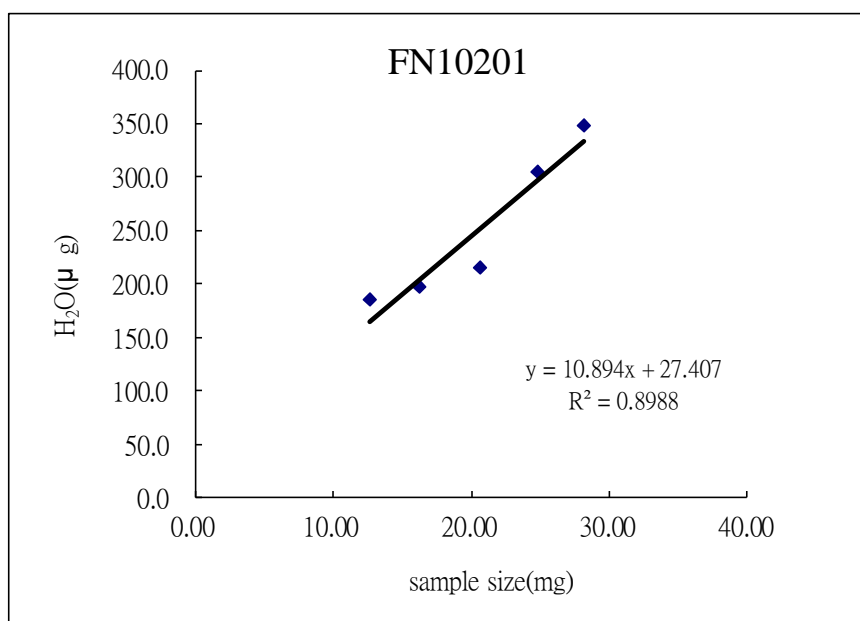
檢品用量：10~35mg

秤重環境溼度：13%RH

(1) 線性度：以 5 種不同濃度測試評估線性區間範圍，判定係數(R^2)至少 ≥ 0.99

表六、以庫倫電量法水分儀進行 FN10201 線性度測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (μg)	water content (%)
blank	-	-	317.1	-
1	12.63	908	503.1	1.4727
2	16.24	908	515.2	1.2198
3	20.59	908	532.1	1.0442
4	24.83	908	622.6	1.2304
5	28.10	908	665.0	1.2381
			mean	1.2410
			STDEV	0.1525
			RSD (%)	12.2851



圖三、以庫倫電量法水分儀進行 FN10201 線性度測試結果之迴歸曲線圖

* FN10201 線性度 $R^2=0.8988$ ，小於判定標準 0.99；RSD =12.2851% 亦超過 10%，二者皆未符合規格。

(二)依據衛生福利部訂定之分析確效指導手冊進行水分含量分析方法確效，以抗百步蛇毒血清凍晶注射劑(批號：FA10201)進行線性度及精密度分析。

操作參數設定：(庫倫電量法水分儀)

Oven 溫度：110°C

萃取時間：600sec

檢品用量：10~30mg

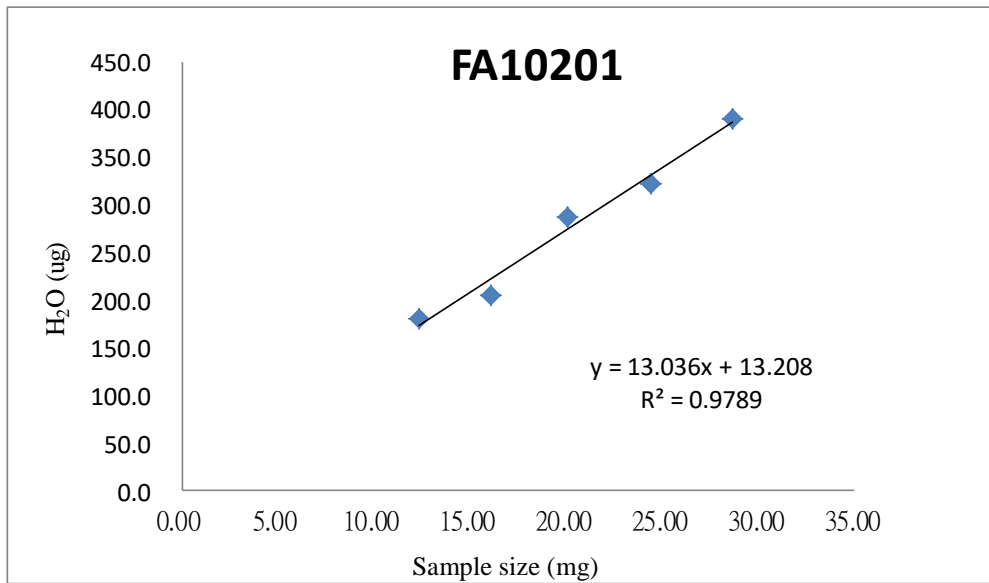
秤重環境溼度：13%RH

(1)線性度：以 5 種不同濃度測試評估線性區間範圍，判定係數(R^2)至少 ≥ 0.99

表七、以庫倫電量法水分儀進行 FA10201 線性度測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (μg)	water content (%)
blank	-	-	208.35	-
1	12.33	608	390	1.4736
2	16.08	608	414.6	1.2830
3	20.05	608	496.7	1.4384
4	24.47	608	531.5	1.3208
5	28.71	608	599.7	1.3633

mean	1.3758
STDEV	0.0795
RSD (%)	5.7797



圖四、以庫倫電量法水分儀進行 FA10201 線性度測試結果之迴歸曲線圖

* FA10201 線性度 $R^2=0.9789$ ，小於判定標準 0.99 以上，為符合規格；RSD (%)=5.7797%，小於判定標準 10% 以下，符合規格。

(2)精密度：同一批號之疫苗產品進行六次以上之水分含量測定，以檢測並分析測定結果能持續重現之程度。精密度通常以分析結果之 %RSD (SD/X x 100%) 值為度。確效指標為其 %RSD 範圍應小於 10% 以下。(可重複性評估標準通常建議 RSD $\leq 2\%$ ，對於濃度較低的分析物，RSD $\leq 10\%$ 的範圍是可以被接受的。)

表八、以庫倫電量法水分儀進行 FA10201 精密度測試

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (µg)	water content (%)
blank	-	-	255.9	-
1	20.71	608.00	508.2	1.2183
2	20.39	608.00	492.4	1.1599
3	20.01	608.00	466.4	1.0520
4	20.48	608	486.1	1.1240
5	20.48	607	498.9	1.1865
6	20.7	608	496.4	1.1618
			mean	1.1504
			STDEV	0.0575
			RSD (%)	4.9954

* FA10201 精密度測試之 RSD (%) = 4.9954%，符合判定標準 RSD 小於 10%。

(三) 依據衛生福利部訂定之分析確效指導手冊進行水分含量分析方法確效，以抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清凍晶注射劑(批號：FH10202)進行線性度及精密度分析。

操作參數設定：(庫倫電量法水分儀)

Oven 溫度：110°C

萃取時間：600 sec

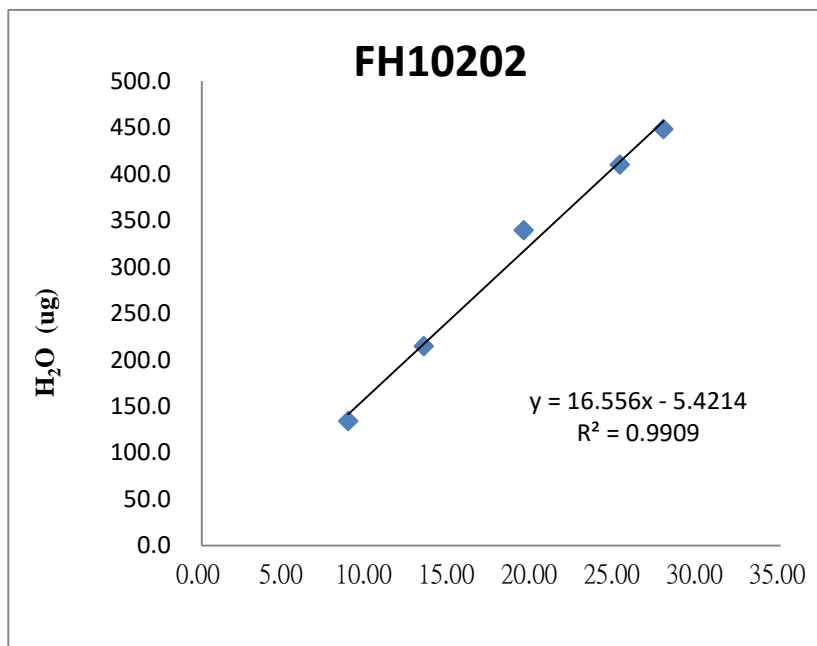
檢品用量：10~30mg

秤重環境溼度：13%RH

(1) 線性度：以 5 種不同濃度測試評估線性區間範圍，判定係數(R^2)至少 ≥ 0.99

表九、以庫倫電量法水分儀進行 FH10202 線性度測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (μg)	water content (%)
blank	-	-	181.4	-
1	8.86	608	333.0	1.5113
2	13.44	608	413.6	1.5960
3	19.48	608	538.3	1.7413
4	25.29	608	609.0	1.6208
5	27.93	608	647.3	1.6047
			mean	1.6292
			STDEV	0.0817
			RSD (%)	5.0156



圖五、以庫倫電量法水分儀進行 FH10202 線性度測試結果之迴歸曲線圖

* FH10202 線性度 $R^2=0.9909$ ，符合判定標準 $R^2 \geq 0.99$ ； $RSD (\%)=5.0156\%$ ，符合判定標準 $RSD \leq 10\%$ 。

(2)精密度：同一批號之疫苗產品進行六次以上之水分含量測定，以檢測並分析測定結果能持續重現之程度。精密度通常以分析結果之 %RSD (SD/X x 100%) 值為度。確效指標為其 %RSD 範圍應小於 10% 以下。(可重複性評估標準通常建議 $RSD \leq 2\%$ ，對於濃度較低的分析物， $RSD \leq 10\%$ 的範圍是可以被接受的。)

表十、以庫倫電量法水分儀進行 FH10202 精密度測試結果

No.	sample size (mg)	titr. Time (sec)	H ₂ O (µg)	water content (%)
blank	-	-	229	-
1	13.67	608	369.6	1.0271
2	17.65	608	430.3	1.1394
3	18.36	608	461.4	1.2647
4	19.74	608	465.5	1.1971
5	23.86	608	542.5	1.3131
6	33.56	608	642.9	1.2327
mean				1.1957
STDEV				0.1015
RSD (%)				8.4898

* FH10202 精密度測試之 $RSD (\%) = 8.4898\%$ ，符合判定標準 RSD 小於 10%。

(三)抗蛇毒血清凍晶注射劑洩漏測試

玻璃瓶的洩漏或密封完整性會直接影響內含物之水分含量，所以本計畫同時進行非破壞性完整性測試儀之性能驗證(PQ)，確效執行主要檢測抗蛇毒血清凍晶注射劑 30mL 玻璃瓶之密封完整性。

(1)密封完整性驗證:

方法:取 5 個已封蓋之 30 mL 玻璃瓶進行測試。

合格標準:” Accept” 綠色信號燈亮起，無洩漏現象。

表十一、密封完整性驗證結果

編號	檢測結果	
1	Accept (-0.0090psig)	合格
2	Accept (-0.0095psig)	
3	Accept (-0.0085psig)	
4	Accept (-0.0085psig)	
5	Accept (-0.0095psig)	

*5 個檢品之 Decay 壓力值皆小於-0.0115 Psig，表示無洩漏現象，密封完整，全數合格。

(2)洩漏測試驗證:

方法:分別取 5 個封蓋完整之 30 mL 玻璃瓶，以 27G x3/4”號針頭穿刺凍結乾燥橡皮塞，針留在橡皮塞上，依操作程序進行測試。

合格標準:”Reject”紅色信號燈亮起，有洩漏現象。

表十二、洩漏測試驗證結果

編號	檢測結果	
1	Reject	合格
2	Reject	
3	Reject	
4	Reject	
5	Reject	

*5 個檢品之 Decay 壓力值皆大於-0.0115 Psig，表示有洩漏現象，密封不完整，全數合格。

(3)取三批抗蛇毒血清凍晶注射劑各 20 瓶(批號：FH10102、FH10201 及 FN10201)進行密封完整性測試。

方法:

A.每次進行密封完整性驗證時，需先測試儀器管線的無洩漏狀況，及以標準件(5 μ m 洩漏節流孔)測試標準洩漏，標準洩漏測試之測試值應大於 0.025psig 才可進行抗蛇毒血清凍晶注射劑密封完整性測試。

B.參數設定

參數	設定值	參數	設定值
CHARGE Timer	10.0 Sec.	Pressr Specif.	-10.000 Psig
SETTLE Timer	10.0 Sec.	PRESSR % Toler	5.00%
TEST Timer	10.0 Sec.	CLAMP Timer	0.0 Sec.
DECAY Maximum	0.0115 Psig	BLEED Timer	2.0 Sec.
PRESSR MaxDrop	41.50%	PAUSE Timer	0.0 Sec.
PRESSR MaxDrop	-5.850 Psig	EXHAU Timer	0.0 Sec.

表十三、批號 FH10102 密封完整性測試結果

No.	Decay (Psig)	合格與否(Reject or PASS)
1	-0.0040	PASS
2	-0.0045	PASS
3	-0.0035	PASS
4	-0.0040	PASS
5	-0.0040	PASS
6	-0.0045	PASS
7	-0.0035	PASS
8	-0.0035	PASS
9	-0.0035	PASS
10	-0.0030	PASS
11	-0.0045	PASS
12	-0.0045	PASS
13	-0.0040	PASS
14	-0.0035	PASS
15	-0.0045	PASS
16	-0.0035	PASS
17	-0.0045	PASS
18	-0.0030	PASS
19	-0.0030	PASS
20	-0.0035	PASS

*Decay 壓力小於 0.0115Psig 判定為合格，批號 FH10102 測試結果皆為合格。

表十四、批號 FH10201 密封完整性測試結果

No.	Decay (Psig)	合格與否(Reject or PASS)
1	-0.0035	PASS
2	-0.0030	PASS
3	-0.0030	PASS
4	-0.0025	PASS
5	-0.0025	PASS
6	-0.0025	PASS
7	-0.0025	PASS
8	-0.0030	PASS
9	-0.0025	PASS
1 0	-0.0025	PASS
1 1	-0.0025	PASS
1 2	-0.0020	PASS
1 3	-0.0025	PASS
1 4	-0.0020	PASS
1 5	-0.0020	PASS
1 6	-0.0025	PASS
1 7	-0.0025	PASS
1 8	-0.0025	PASS
1 9	-0.0025	PASS
2 0	-0.0020	PASS

*Decay 壓力小於 0.0115Psig 判定為合格，批號 FH10201 測試結果皆為合格。

表十五、批號 FN10201 密封完整性測試結果

No.	Decay (Psig)	合格與否(Reject or PASS)
1	-0.0045	PASS
2	-0.0040	PASS
3	-0.0040	PASS
4	-0.0040	PASS
5	-0.0045	PASS
6	-0.0035	PASS
7	-0.0035	PASS
8	-0.0035	PASS
9	-0.0035	PASS
1 0	-0.0035	PASS
1 1	-0.0025	PASS
1 2	-0.0030	PASS
1 3	-0.0030	PASS
1 4	-0.0020	PASS
1 5	-0.0020	PASS
1 6	-0.0030	PASS
1 7	-0.0025	PASS
1 8	-0.0020	PASS
1 9	-0.0020	PASS
2 0	-0.0025	PASS

*Decay 壓力小於 0.0115Psig 判定為合格，批號 FN10201 測試結果皆為合格。

討論

冷凍乾燥目的是為了延長物質之保存及貯存期限，生物製劑製品是為了維持製品之完整性、效價、免疫性及安定性。殘留水分(residual moisture)用來描述低量的表面水分(surface water)，產品水分在凍乾過程被移除，仍殘留在凍乾疫苗或生物製劑產品上之微量水分，範圍一般指低於1%~5%。殘留水分應該夠低，才能維持產品的適用性、存活率、免疫效價及完整性，然而，殘留水分含量的多寡，並非愈低愈好，有些產品不可過度乾燥，否則會使活細胞喪失其存活率或改變蛋白質的四級結構，使其失去活性，因此每一種產品都應評估其合適的水分含量。目前WHO已將抗蛇毒血清凍晶注射劑之水分含量納入檢驗規範，規格為小於3%。

目前已被認可的水分含量測定法有以下幾種，包括乾燥減重法(Gravimetric Method；Loss of Drying; LOD)、費式水分測定法(Karl Fischer Methodology)、熱重量分析法/質譜分析法(Thermogravimetry/Mass Spectrometry)、氣相色譜法(Gas Chromatography)、蒸餾法(Distillation)及近紅外光光譜分析儀(Near-IR Spectrometry)，各方法有其優缺點及其偵測極限，目前生物製劑產品多以費式水分測定法測定產品的水分含量，且此方法已廣為各國藥典所採用，如USP及EP，另中華藥典第七版中亦載明此一測定法。本中心考量儀器操作性能及產品性質，亦選用費式水分測定法作為抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量之測定方法。

費式水分測定法，依分析水分的方式不同分成兩種方法：(1)KF容量滴定法；(2)KF庫倫定量法。KF容量滴定法是利用滴定呈色法來進行，每次測定的檢品量(Sample Size)須40mg以上，適用範圍為含水率100ppm到100%之物質；KF庫倫定量法是利用電解1mol的水分子需多少庫倫電量來反應，每次測定的檢品量(Sample Size)須10mg以上，適用範圍為含水率1ppm到1000ppm之物質。一般低水分含量製品建議選用KF庫倫定量法，高水分含量製品建議選用KF容量滴定法，考量本中心之抗蛇毒血清凍晶注射劑產品的特性，單瓶檢品量不多、製品含水率不高，故選用KF庫倫定量法來執行水分含量分析方法確效。

標準品分析部分，依ISO9000建議，庫倫電量法水分儀每批新購入之反應試劑，須以0.1%水分標準品確認水分含量測定的可信度及儀器的性能。本中心購買之儀器Metrohm 831 KF Coulometer，標準品測試結果其精密度之RSD(%)可達0.8762%，小於1%以下，符合規格，

判斷此儀器基本性能與試劑及環境等是沒有問題的。由於抗蛇毒血清凍晶注射劑無法溶於反應試劑(Karl Fischer reagent)中且無適合助溶劑，所以選用KF Oven 的方式，加熱樣品將樣品水分趕到滴定杯做水分測定。為了確認整個系統(水分儀主機及Oven)的適用性，選用5.55%Oven專用水分標準品進行測試。試驗結果，線性度之 R^2 為0.9997，線性度佳；然而，各水分含量測定值高於可接受差異範圍5.31%~5.71%。可能原因為庫倫電量法水分儀較適用於0.001%~1%低水分含量測定，5.5%標準品之水分對此儀器而言，含量過高。為了確認測定之標準品水分含量偏高，是否為標準品本身製造或保存的問題，改用容積滴定法測試，以容量滴定法水分儀進行5.55%標準品精密度測試，水分含量平均值5.4100%，各測定值介於5.31%~5.71%，符合規格。判定5.55%oven專用水分標準品不適合作為庫倫電量法之標準品，因此改用1%Oven標準品確認整個系統(水分儀主機及Oven)的適用性。以庫倫電量法水分儀進行1%標準品線性度測試，判定係數(R^2)=0.9995，大於判定標準0.99，線性度佳，精密度%RSD=1.90%，範圍小於2%，重複性佳，表示此系統基本性能、試劑環境等各條件皆無問題。在進行抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效之前，會以1%標準品，先行測試系統、試劑及環境等狀況。

抗蛇毒血清凍晶注射劑水分含量分析方法確效部分，抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑(FN10201)線性度 $R^2=0.8988$ ，小於判定標準0.99；RSD(%)=12.2851%亦超過10%，二者皆未符合規格。抗百步蛇毒血清凍晶注射劑 (FA10201)線性度測試 $R^2=0.9789$ ，小於判定標準需0.99以上，未符合規格；精密度測試之RSD (%)=4.9954%，RSD小於10%，符合判定標準。抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清凍晶注射劑 (FH10202)線性度 $R^2=0.9909$ ，符合判定標準 $R^2 \geq 0.99$ ；RSD (%)=5.0156%，RSD小於10%，符合判定標準。雖然，三批結果並未完全達成分析方法確效規格，但可知抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑、抗百步蛇毒血清凍晶注射劑及抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清凍晶注射劑其水分含量介於1.24%~1.62%，皆低於WHO的規範(應低於3%以下)，表示產品品質穩定。

由報告中可知，FN10201線性度未符合規格； FA10201線性度未符合規格，精密度符合規格；FH10202線性度及精密度皆符合規格。此結果並非代表抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清凍晶注射劑可適用此水分分析方法，其他兩種蛇種產品則否，只能代表當時測試條件的結

果。確效執行過程中，由於產品留樣量有限，無法完全以單一種血清凍晶注射劑測試實驗條件，故以存量多的優先進行測試，此次確效產品測試的先後順序為FN10201→FA10201→FH10202。由於FN10201最先用來測試，當時條件尚未找到，故測試結果最差，待以FH10202測試時，了解此分析方法的最適條件，故測試結果較佳。

本確效試驗執行時遇到的兩個重要問題是(1)產品如何均質化：由於血清凍乾後，會形成餅狀樣(cake-like)，取樣前，若無法將餅狀製品均質化，勢必無法正確量測產品中的水分含量，線性度及精密度皆無法符合規格；(2)產品如何不受潮：本產品凍乾製品水分含量低於3%，易受潮，秤重環境雖然在乾燥操作箱密閉環境下執行，由於除濕器效能問題，最大除溼效果只能達20%RH，經測試檢品在秤重過程中，隨著暴露時間愈長，所測得之水分含量愈高。針對這兩個問題，目前找到的解決方法為：(1)凍乾製品未開封前先以震盪器震盪均勻，並以烘乾之不銹鋼長針靠著玻璃壁研磨，務必確認餅狀物成均勻細粉；(2)在現有的乾燥操作箱中擺置乾燥劑，降低其秤重環境濕度；秤重時要將秤藥匙洗淨烘乾後乾燥冷卻，使用時每次的秤重使用個別的秤藥匙，減少檢品受潮機會。

雖然此試驗三批結果並未完全達成分析方法確效規格，然而這三批結果亦有其參考價值，抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑、抗百步蛇毒血清凍晶注射劑及抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血清凍晶注射劑其水分含量介於1.24%~1.62%，皆低於WHO的規範(應低於3%以下)。

本費氏水分含量測定在抗蛇毒血清凍晶注射劑之準確性代表用該方法所得之分析結果與真值接近之程度。原設計將已知濃度之標準品水溶液打入樣品內形成 spike，並分別測量未加入標準品前之檢品水分含量，標準品水分含量，及spike水分含量，求得回收率。目前尚未找到合適的方法完成此確效參數，未來將繼續實驗找出最適方法。

在分析方法開發階段，應考慮小幅度的變異是否會影響分析方法結果，也就是分析方法的耐變性(Robustness)，如環境濕度、溶劑使用效期或批號及乾燥劑等分析條件改變。在建立準確度確效指標後也將陸續執行耐變性分析，使整個分析方法更加完善。

凍晶製品之水分含量是影響產品品質長期安定的重要因子，凍結乾燥疫苗之安定性資料建議疫苗殘留水分含量應被規範，往後品管部門將持續建立水分測定分析方法，使可有效監控產品穩定性並符合WHO建議規格。

六、重要參考文獻：

依一般科學論文之參考文獻撰寫方式，列出所引用之參考文獻，並於計畫內容引用處標註之。

1. Gutierrez, J.M., G. Leon, and T. Burnouf, Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals*, 2011. **39**(3): p. 129-42.
2. Calvete, J.J., et al., Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett*, 2009. **583**(11): p. 1736-43.
3. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010, World Health Organization: Geneva.
4. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH Q2A.
5. Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Q2B.
6. May, J.C., et al., Measurement of final container residual moisture in freeze-dried biological products. *Dev Biol Stand*, 1992. **74**: p. 153-64.
7. USP33(921). Water Determination. 2010.
8. 中華藥典第七版.
9. 衛生福利部（前行政院衛生署）分析確效作業指導手冊.