

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.02.002

注射剂包装密封完整性检测技术研究进展*

陈江^{1,2}, 王俊苏^{1,2}, 关天横¹, 聂福平¹, 李贵³, 张国波², 王国民^{1△}

(1. 重庆海关技术中心, 重庆 400020; 2. 重庆玉成产品质量检测有限公司, 重庆 401120;
3. 重庆奥凯科技有限公司, 重庆 401121)

摘要:目的 为注射剂一致性评价中密封完整性的检测提供参考。方法 以文献研究为基础, 结合工作实践经验, 对现有注射剂包装密封完整性检测技术的相关研究进行系统总结。结果与结论 目前, 我国还处于药品包装密封完整性研究的初级阶段。为了顺应我国注射剂仿制药一致性评价工作的趋势, 应进一步加强密封完整性检测的研究工作, 同时要根据注射剂和包装选择适宜的密封完整性检测方法。比较发现, 质量提取法具有较强的综合性能, 是注射剂一致性评价中密封完整性检测较理想的方法之一。

关键词:一致性评价; 注射剂; 仿制药; 包装; 密封完整性; 检测技术

中图分类号: R95

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)02-0005-07

Research Progress of Container Closure Integrity Test of Injections

CHEN Jiang^{1,2}, WANG Junsu^{1,2}, GUAN Tianheng¹, NIE Fuping¹, LI Gui³, ZHANG Guobo², WANG Guomin¹

(1. Chongqing Customs Technology Center, Chongqing, China 400020; 2. Chongqing Yucheng Product Quality Testing Co., Ltd., Chongqing, China 401120;

3. Chongqing Aokai Technology Co., Ltd., Chongqing, China 401121)

Abstract: Objective To provide reference for the container closure integrity (CCI) test in the consistency evaluation of injections.

Methods Based on consulting the literature and combining it with practical experience in the work, a systematic review was conducted on the related research about CCI test of injections. **Results and Conclusion** At present, China is still in the primary stage of CCI test. The research on CCI test should be further strengthened, in order to comply with the trend of consistency evaluation of injection for generic drugs in our country. At the same time, the appropriate method of CCI test should be selected according to the injection and package. Compared with other methods, the quality extraction method is one of the most ideal methods for CCI test in the consistency evaluation of injections, which has a strong comprehensive performance.

Key words: consistency evaluation; injections; generic drugs; package; container closure integrity; test technology

注射剂的无菌性直接关系患者的生命安全。注射剂在其整个生命周期内必须符合无菌的要求并能通过无菌检查^[1-2]。但无菌检查存在局限性, 美国食品和药物管理局(FDA)建议在稳定性研究中, 使用密封完整性检测来替代无菌检查。密封完整性检测不但能确保注射剂的无菌, 还能保障注射剂在有效期内符合质量标准的要求。美国、欧盟、日本、澳大利亚、巴西、加拿大等国家和地区均颁布法律法规, 要求注射剂包装具有密封完整性^[3]。2020年5月14日, 国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)发布了《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》, 规定在注射剂稳定性考察初期和末期以外的其他时间节点, 可以经过方法学验证的密封完整性检测代替无菌检查。密封完整性检测已成为注射剂稳定性研究的重要组成部分, 且成为注射剂一致性评价关注的热点。本研究中以“注射剂”“包装”“密封性”“密封完整性”“sterile product”“parenteral”“package”

“container closure integrity”“leakage”“leak”等为关键词, 对 PubMed、Elsevier、Springer、中国知网、维普、万方等国内外数据库中收录的 1960 年 1 月至 2020 年 2 月期间发表的文献进行单一或组合搜索, 共检索到相关文献 752 篇, 其中有效文献 48 篇。现结合文献对注射剂包装密封完整性检测技术的相关研究进行总结归纳, 以期对注射剂一致性评价中密封完整性的检测提供参考。

1 密封完整性检测方法分类

1.1 确定性检测方法和概率性检测方法

根据检测时泄漏现象是否可预测和可控, 可将密封完整性检测分为确定性检测和概率性检测。确定性检测方法是基于系列可预见的泄漏现象, 采用可控制和可监测的理化测试技术对泄漏进行检测, 并可得到客观的定量检测结果的检测方法, 常用方法有质量提取法、真空衰减法、激光顶空气体分析法、高压放电法、氦质谱法(真空模式)等。概率性检测方法是基于系列具有不确定

*基金项目: 国家质检总局科技计划项目[2014IK247]。

第一作者: 陈江, 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为药品相容性、密封完整性、基因毒素杂质、元素杂质, (电话)023-67753013 (电子信箱)chenjiang@customs.gov.cn。

△通信作者: 王国民, 男, 博士研究生, 研究员, 研究方向为注射剂仿制药一致性评价, (电话)023-67756396 (电子信箱)chqwg@163.com。

性、会产生随机结果的测试环节的检测方法,其检测结果具有随机性,常需较大样本量和严格的测试条件,以降低结果的随机性,保障结果的有效性,常用方法有氮质谱法(嗅探模式)、微生物挑战法和液体示踪法。两种方法各有优劣,应根据注射剂和包装的特性来选择合适的检测方法。确定性检测方法具有灵敏、准确、稳定、成本低等优点,应优先考虑。

1.2 无损检测方法和破坏性检测方法

根据检测方法是否对注射剂和包装有影响,可将密封完整性检测分为无损检测和破坏性检测。无损检测方法包括质量提取法、真空衰减法和激光顶空气体法。高压放电法因对注射剂和包装无影响^[4],一般情况下被视为无损检测方法。但高电压会将包装内的氧气转化成臭氧,可能影响产品质量^[3]。因此,《美国药典》(USP39-1207)建议,采用高压放电法检测密封完整性时需评估其在整个生命周期里对药品质量的影响^[5]。气体示踪法既可能是无损的,也可能是破坏性的,当需要破坏包装壁而引入示踪气体或示踪气体对注射剂或包装有影响时即为破坏性检测方法。微生物挑战法和液体示踪法对药品或包装有影响,属破坏性检测方法。

无损检测方法相对于破坏性检测方法更具优势。无损检测时,在方法建立和验证过程中可重复使用样品。同时,《美国药典》(USP39-1207)指出,采用无损检测方法时通过密封完整性检测某个时间节点的稳定性样品,还可用于该时间节点下其他稳定性项目的检测,如可用于包材相容性的检测。因此,采用无损检测方法可以节省样品和降低检测成本,这对样本量较少或价格昂贵的药品来说尤为重要。

1.3 流体流转型检测方法和非流体流转型检测方法

根据检测过程中的泄漏是否由于流体流转产生,可将密封完整性检测分为流体流转型检测和非流体流转型检测。质量提取法、真空衰减法、激光顶空气体分析法、气体示踪法、微生物挑战法和液体示踪法均属流体流转型检测方法,前 4 种是基于气体的流转,后 2 种是基于液体的流转。基于流体流转的检测方法,漏孔被堵塞后,流体无法顺利流转通过漏孔,可造成假阴性结果。采用基于流体流转的检测方法时,固体物质均会堵塞漏孔而影响检测结果。采用基于气体流转的检测方法时,液态的蛋白质类药物由于溶剂挥发易在漏孔附近集聚并堵塞漏孔。因此,前 4 种均不适用于液态蛋白质类药物包装的检测。采用气体示踪法检测时,液体也可能堵塞漏孔。采用基于液体流转的方法,漏孔中的气泡可能会“堵塞”漏孔。高压放电法属非流体流转型检测方法,当漏孔被蛋白质类药物集聚体堵塞时,由于蛋白质集聚体导电,故漏孔的堵塞不会影响泄漏的检测。因此,高压

放电法能用于液态蛋白质类药物包装的检测^[3],且能与其他检测方法形成互补,完善液态蛋白质类大分子药物包装密封完整性的解决方案。

1.4 驱动型检测方法和非驱动型检测方法

根据检测时是否施加外力来驱动形成泄漏,可分为驱动型检测和非驱动型检测。驱动型检测方法包括质量提取法、真空衰减法、氮质谱法(真空模式)、微生物挑战法(浸没模式)、液体示踪法等,均需通过加压或抽真空的方式,使包装内外形成压力差来驱动泄漏发生,以便检测泄漏。同时,对于一些具有活动部件的包装(如注射器),以及易发生形变的柔性包装,测试时需采用特殊工具,以限制活动部件的位移和柔性包装的形变,从而降低检测时的背景噪音,提高检测灵敏度,避免检测结果出现错误。激光顶空气体法和高压放电法在测试时不需依靠外力来驱动泄漏,属非驱动型检测方法,不需特殊工具来限制部件的移动和包装的形变。

2 注射剂密封完整性检测方法

2.1 质量提取法

质量提取法是采用智能分子流质量传感器,检测在真空环境中从包装泄漏出的气体质量流率的方法。将包装放入测试仓,对测试仓进行抽真空,包装内的气体或由液体挥发生成的气体会通过漏孔泄漏出包装,被能在分子流状态下工作的智能分子流质量传感器所检测,最后以检测的质量流率来判定包装是否泄漏。

该法综合性能强,竞争优势大。检出限可达玻璃微量滴管名义孔径 1 μm 和钨丝直径 15 μm ^[6],检测灵敏度高;具有总泄漏、大泄漏、小泄漏检测机制,检测范围宽;基于质量流率检测机制,检测结果受外部环境如温度、湿度的影响较小,稳定性好;检测的包装类型包括弹性体密封件或螺纹盖密封的玻璃瓶和塑料瓶、玻璃或塑料安瓿瓶、注射器、柔性包装袋等,包装的容积涵盖几毫升到几升,药品的状态包括固态和液态,几乎覆盖注射剂的所有包装类型和剂型,方法适用范围广。鉴于其众多优势和行业内对其的广泛认可,质量提取法已经成为注射剂一致性评价中密封完整性检测的理想方法之一。

美国材料实验协会(ASTM)也已为该方法设立国际标准(ASTM F3287)。该标准在气体泄漏和液体泄漏两种模式下,建立和验证了玻璃瓶、低密度聚乙烯瓶、玻璃注射器的密封完整性检测方法,方法验证的指标包括检出限、准确度和精密度。在顶空气体泄漏模式下,在置信概率为 95% 的检出限为玻璃微量滴管名义孔径 1 μm ;在液体泄漏模式下,玻璃瓶和低密度聚乙烯瓶在 95% 置信概率下的检出限为玻璃微量滴管名义孔径 1 μm ,玻璃注射器为 2 μm 。在检出限及以上的漏孔检测中,方法的准确度均为 100%,精密度试验结果满足重复性限

和重现性限的要求。

注射剂的不同形态和组成对质量提取法检测结果的影响不同。YOON 等^[7]研究发现,注射剂为固体粉末(甘露醇粉)时,不会堵塞漏孔;注射剂为液态时,黏度对检测结果影响较小。当注射剂为液态的蛋白质类药物且浓度较低时,漏孔不会堵塞;当药物浓度增大时,漏孔会被堵塞,原因是大分子蛋白质类药物在漏孔附近聚集阻塞漏孔,产生假阴性结果。

2.2 真空衰减法

真空衰减法采用压力传感器检测包装泄漏引起测试仓真空度的衰减值,工作原理与质量提取法相似,具体如下,将测试包装置入测试仓并抽真空,包装内的气体或液体挥发生产的气体通过漏孔进入测试仓,引起仓内真空度变小,可使用压力传感器检测真空度的衰减值,最后以衰减值来判定包装是否泄漏。一般配合使用绝压传感器和差压传感器。绝压传感器用于监测测试仓的绝对压力,以便控制仓内的真空度,使包装内的气体能通过漏孔顺利流转至测试仓,对于液体泄漏的检测更为重要,因为必须将测试仓的真空度提高到一定程度,才能使液体气化而溢出包装。在预定时间内,如果测试仓内的真空度不能提高到一定程度,则表明包装有大漏存在。差压传感器的灵敏度更高,用于检测从包装流出的气体引起的真空度的变化值,故用于检测小漏。

真空衰减法由于在泄漏检测行业被广泛使用,已为其设立国际标准(ASTM F2338),适用的包装有无盖的托盘和杯碟、多孔阻隔材料密封的托盘、无孔硬质包装、无孔软包装,其中无盖的托盘和杯碟气体泄漏的检出限均为 50 μm ,多孔阻隔材料密封的托盘气体泄漏的检出限为 100 μm ,无孔硬质包装气体和液体泄漏的检出限均为 5 μm 。该方法适用于检测气体泄漏和液体泄漏。WOLF 等^[8]研究发现,采用液体泄漏检测方法对空气和水分别填充的包装进行对比检测,发现水填充的包装在相同尺寸的漏孔下产生的泄漏率更大,原因是水在较高真空度下会挥发产生大量水气。

真空衰减法不适合顶空气体或液体较少、且泄漏过大包装的检测。当包装内顶空气体或液体较少时,在真空测试仓被抽真空时,包装内有限的气体会通过大漏孔迅速溢出,随测试仓内的气体被抽走,在测试时包装内无气体流转至测试仓而引起真空度变化,从而产生假阴性结果。另外,其稳定性不及质量提取法。原因是前者基于压力变化而后者基于质量变化,压力会随环境温度的波动而变化,而质量则不然。

2.3 激光顶空气体分析法

激光顶空气体分析法通过检测包装内顶空气体对低能量激光的吸光度来检测气体的含量。根据检测气体

的种类,可调整激光的频率,使激光的波长与目标分析气体的吸收光谱特性相匹配^[9]。当激光通过包装内的顶空气体,顶空气体对激光有吸收,根据吸光度采用校准曲线推导出目标检测气体的含量,以此来判定包装是否泄漏。目前,能检测的气体种类主要有氧气、水蒸气和二氧化碳,另外还可用于检测包装内顶空部分的压强。该法的检测灵敏度很高,检出限能达到玻璃微量滴管名义孔径 0.2 μm ^[10],常能满足包装系统最大允许泄漏限度值的要求,在方法的开发和验证中,可免除与微生物挑战法或液体示踪法的比较研究。

该法的显著特点是检测结果能反映产品经历的生产、运输、储存等整个过程的泄漏情况,而其他检测方法仅能表征包装在测试时的密封状态。这一特性对于评估在极端条件下保存药品的密封完整性尤为重要,如在超低温条件下保存的包装内具有特殊顶空气体组成或压强的药品^[11]。胶塞在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下会丧失黏弹性,密封能力会降低,包装会产生泄漏,导致顶空气体的组成或压强发生变化。当把产品取出置于常温后,胶塞会恢复密封性能,此时若采用其他方法则无法检出泄漏,而采用激光顶空气体分析法则可以有效检测出在低温下产生的泄漏。

包装内的顶空气体通过漏孔特别是较小的漏孔与环境的气体交换非常慢,要想气体交换量达到方法的检测限,需要很长的时间。为了加快检测方法的开发和验证,可采用“Bombing”程序来加速气体交换。该程序是将样品置于具有一定真空度的环境中放置一定时间,然后取出在大气环境中平衡一定时间,通过增加包装内外的压差来加快包装内外气体的交换^[12-13]。但该程序中产品处理的压力和时间等参数对检测结果的影响很大。

激光顶空气体分析法适用范围有一定要求。首先是对包装的透光性有要求,只有低能量激光能通过的透明或半透明的包装才能检测,该法已用于西林瓶^[10,12,14-15]和安瓿瓶^[13]等透明包装的检测,也可用于柔性包装袋的检测。其次是对包装内顶空气体有要求,仅顶空气体组成或压强与所处环境不同且顶空气体体积足够大的药品包装才能检测。对于包装内填充氮气的药品和冻干制品,可检测包装内顶空气体中氧气的含量^[10,13,16-17];水蒸气的检测主要应用在包装内呈负压的药品和冻干类制剂的检测^[9,15,18];对于储存在干冰中的药品,可检测包装顶空气体中的二氧化碳含量^[3]。对于预灌注注射器,顶空气体体积较小,一般只有几毫升,测试时激光可能会通过液体部分而被水吸收,导致检测结果出现错误,因此该法不适用于检测预灌注注射器密封的完整性。

2.4 高压放电法

高压放电法检测通过药品和包装的电流来判断泄

漏情况,适用于液态或半液态的药品,且药品的导电性要比包装好的情形。完整的包装导电性能差,通过包装的电流较低;当包装中有漏孔,且药品处于漏孔附近或填充在漏孔中时,包装的电阻会变小,通过的电流会大幅增加。当电流增加到一定程度,超过泄漏阈值时,表明包装泄漏。药品与包装导电性差异越大,施加的电压越大,药品与漏孔的距离越近,方法的灵敏度就越高。高压放电法对柔性包装袋的检出限为激光打孔名义孔径 $2.5\ \mu\text{m}$,检测范围为 $2.5 \sim 11.2\ \mu\text{m}$ ^[19],同时还能检测出热封时产生的型式缺陷^[20];对于预灌注注射器,检出限可达到激光打孔 $5\ \mu\text{m}$ ^[21]。高压放电法检测速度非常快,往往只需要几秒钟,因此在生产线的在线检测中使用广泛^[3]。

在确定性检测方法中,高压放电法仅能检测漏孔位置,其通过各种机制确保电极探针能够探测包装表面的每个部位,探测电流最强部位以判断漏孔位置。在测试柔性包装时,采用碳刷刷毛制备的电极探针,沿不同方向扫过样品表面,以寻找具体的漏孔位置^[19]。在测试注射器时,使注射器绕其中心轴不停旋转,而电极探针垂直于旋转方向在注射器表面不停移动^[21],或采用多渠道电极覆盖整个样品^[3],以此来确定漏孔的具体位置。

该法的应用有一定局限性。首先是对注射剂状态和包装有选择性,注射剂必须是液体或半液体状态且不易燃烧,包装应该是绝缘性能比较好的材料,如玻璃、弹性和塑料等^[22];其次是检测结果受包装表面的水分影响较大,包装表面若存在水分,会降低包装的电阻,导致通过包装的电流值增大,从而出现假阳性结果^[5]。因此,采用该法检测时要避免包装表面出现水分,特别是放置温度较低的稳定性样品,取出后要在室温下进行充分平衡,避免测试时包装表面出现冷凝水,从而影响检测结果^[20]。

2.5 气体示踪法

气体示踪法的检测对象为通过包装漏孔泄漏出的示踪气体,适用范围较广,可用于无孔的硬质包装^[23-25]和柔性包装^[26-27]的检测,包装的容积覆盖小包装到几升的大包装。示踪气体有氦气和氢气。氦气具有无毒、惰性、价格便宜、在大气中含量较小、检测时背景值较低等优点,在实际检测中使用更多。氦气示踪法又称为氦质谱法,有真空检测和嗅探检测 2 种模式。

氦质谱真空检测模式是将充氦气的测试包装放入真空测试仓内,对测试仓进行抽真空,氦气通过漏孔泄漏出包装,被氦质谱检测器所检测,最后以氦气的泄漏率来判定包装是否泄漏(参见标准 ASTM F2391)。氦质谱检测器的灵敏度高和大气中氦气背景含量值很低^[9],因此氦质谱法真空检测模式的灵敏度非常高,且是目前检测灵敏度最高的方法。对于硬质包装,检出限可以达

到 $10^{-7} \sim 10^{-5}\ \text{scc/s}$,相当于玻璃微量滴管名义孔径 $0.1 \sim 0.3\ \mu\text{m}$ ^[23,28],柔性包装袋中的检出限可达到针孔型漏孔 $10\ \mu\text{m}$ ^[26]。氦质谱真空检测模式的灵敏度能够满足硬质包装最大允许泄漏限度值的要求,采用该法可以免除与微生物挑战法或示踪液体法的比较研究。鉴于真空模式的高灵敏度,该法常用于研究泄漏率或漏孔大小与微生物侵入概率的关系^[28],也用于研究泄漏率与漏孔尺寸的关系,研究发现泄漏率与玻璃微量滴管和激光打孔的名义孔径的平方成正比^[24,29]。真空检测模式能够检测整个包装,也能够检测包装的某一部分,如包装部分表面和封口处。

氦质谱嗅探检测模式是采用与氦质谱检测器相连的嗅探探针扫描包装表面,以捕捉和检测泄漏的示踪氦气的检测方法,可以检测包装漏孔的位置。实际应用中,需要确定漏孔具体位置时才选用该方法。从包装内泄漏出的示踪氦气在包装表面的集聚是不可预测的,且嗅探扫描程序由于操作者的技能差异而对检测结果影响较大,因此该方法是一种概率性检测方法。

气体示踪法也有一些缺陷。首先是检测结果易受示踪气体的渗透影响。示踪气体可能会渗透通过包装壁(特别是塑料和橡胶类的包装壁),从而掩盖泄漏的示踪气体,造成假阳性结果。采用氦质谱法真空检测模式时,泄漏阈值应该根据检测的温度来确定,因为氦气在不同温度下渗透性能不一样,温度越高,氦气的渗透性能越强。如果以低温时的泄漏阈值来判定较高温度时的泄漏率,较高温度下氦气的渗透量有可能超过低温时的泄漏阈值,产生假阳性结果^[3]。因此,要充分评估示踪气体渗透对泄漏检测结果的影响。其次是不适宜检测小包装的大漏。灌注示踪气体和泄漏检测有一定的时间间隔,在这段时间内,对于一些具有大漏孔的小包装,填充在包装内的示踪气体可能会通过大漏孔全部逃逸,在检测时没有示踪气体逸出包装,出现假阴性结果^[9]。另外,在检测注射液包装时,特别是在真空模式下,应避免注射液或其挥发生成的水蒸气进入测试系统损坏检测设备^[5]。

2.6 微生物挑战法

微生物挑战法检测在高浓度微生物环境下是否有微生物侵入包装,通过向空包装中注入无菌培养基,密封,灭菌,培养,检查包装内是否有菌落生长。若包装内无菌落生长,将包装放入具有高浓度微生物的介质中,施加一定驱动力并保持一定时间,促进介质中的微生物通过漏孔向包装内转移;然后撤销驱动力,使样品在大气压环境下平衡一定时间;再将样品从介质中取出并进行微生物培养,采用视觉观察法,检查包装内是否有菌落生长。微生物挑战法的检出限一般为玻璃微量滴管名义孔径 $5\ \mu\text{m}$ ^[5]。

根据含有高浓度微生物的介质不同,微生物挑战法分为浸没模式和气溶胶模式。浸没模式是以含有高浓度微生物的培养基为介质。微生物挑战法需选择尺寸较小、运动能力较强的微生物。浸没模式常用的微生物有缺陷短波单胞菌 *Brevundimonas diminuta*、沙雷氏菌 *Serratia marcescens*^[5,30]、大肠杆菌 *Escherichia coli*^[31],以及缺陷短波单胞菌和大肠杆菌的混合菌^[28,32]。培养基介质中微生物浓度一般不低于 10^5 cfu/mL。常用的培养基有乳糖生理盐水^[28,31-32]和大豆酪蛋白消化培养基^[5]。乳糖生理盐水为非蛋白培养基,不会产生细胞聚集,可避免漏孔堵塞^[31]。浸没模式主要用于硬质包装的检测^[28,31-32]。气溶胶模式是以含有高浓度微生物的气溶胶为介质。气溶胶中使用的微生物主要为金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli*。金黄色葡萄球菌为革兰阳性菌,易获取,菌落形态易鉴别,更重要的是在雾化过程中能完好地存活^[33]。大肠杆菌为革兰阴性菌,常用于生物气溶胶样品的测试^[34-35],因此也是气溶胶检测模式下较理想的菌种。采用特殊的喷雾器将菌液雾化形成的气溶胶粒径为 $1 \sim 5 \mu\text{m}$,有利于生成溶胶化的细菌^[36]。气溶胶中微生物的浓度一般不低于 2.0×10^7 cfu/m³。气溶胶模式对包装施加的外力较小,主要适用于易产生形变的柔性包装袋的检测^[6,36]。

微生物挑战法的检测结果受众多不确定因素影响。首先,微生物能否找到漏孔不可预测和控制;其次,即使微生物能找到漏孔,微生物能否顺利通过漏孔进入包装也受诸多因素,如漏孔的几何尺寸和形状、包装的材料和结构、漏孔内是否存在液体、菌液的表面强度、漏孔是否被堵塞等影响。微生物侵入的检测结果是不可预测和不可控的,特别是漏孔较小时,检测结果的差异极大。故属概率性检测方法。另外,微生物挑战法只适用于空包装的检测,不适用于含药品包装的检测,检测周期比较长(每次需数周)。一般在没有合适的方法,或其他检测方法的结果需要微生物侵入的直接证据时才选用。

2.7 液体示踪法

液体示踪法是检测通过包装漏孔的示踪液体中示踪剂的方法。通过将测试包装置于装有示踪液体的容器中,把容器放入真空仓中,对真空仓进行抽真空或加压,并在相应的真空度或压力下保持一定的时间,释放真空或压力,在大气压条件下平衡一定时间,然后检测包装内是否含有示踪剂。示踪液体主要有染料溶液、金属离子溶液和放射性核素溶液。当采用染料溶液作为示踪液体时,又称为色水侵入法,常用的染料有亚甲基蓝、赤藓红^[31]和罗丹明 B^[31]等。试验前需将配制的染料溶液用 $0.2 \mu\text{m}$ 的膜过滤,以免染料溶液中的不溶性物质造成

漏孔堵塞^[31]。金属离子溶液常用的是含 Mg^{2+} 溶液^[32]。对于示踪剂的检测,主要有化学分析法和目测法。化学分析法是采用化学分析手段对包装内示踪剂的浓度进行检测,如采用紫外-可见分光光度法检测染料浓度,采用原子吸收光谱法分析 Mg^{2+} 浓度^[31-32],但需对方法进行方法学验证。目测法主要用于色水侵入法,是对包装内是否有染料溶液侵入进行视觉判断,不但与检测者的技能和经验有关,还受检测环境如光照度、光源种类、观察背景等的影响。

液体示踪法是基于示踪液体与漏孔的接触、示踪液体的侵入、示踪剂的扩散等多个环节的检测方法,均具有不可预期性和不可控性,特别是在漏孔较小的情况下,即使漏孔孔径相同,检测结果的差异也较大^[3]。因此,液体示踪法也是典型的概率性检测方法。

液体示踪法中使用得最多的是色水侵入法,色水侵入法的原理与微生物挑战法相似,但不需微生物培养,检测周期比微生物法短,且能够用于含有药品的包装的检测^[9]。由于色水侵入法具有简单、成本低、检测周期短等优点,在药品行业应用的时间较长、范围较广,已形成众多检测方法标准。但 WOLF 等^[37]的研究表明,采用这些标准方法均不能可靠地检测激光打孔 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ 的阳性样品,方法的灵敏度和准确度欠佳,仅适合检测大漏。通过对这些标准方法进行优化,如增加包装内外的压强差,采用正压和负压组合^[3,38],延长作用时间,加大检测的样本量,增加染料溶液中染料和表面活性剂浓度^[21,31,37]等,可提高方法的灵敏度,检出限可达 $5 \mu\text{m}$ ^[3]。但优化的条件相对苛刻,会导致阴性样品也有色水侵入,从而出现假阳性结果^[37]。因此,色水侵入法的开发和验证的难度较大,也不适用于西林瓶包装的检测,因为很难清除胶塞和玻璃瓶间的染料^[13]。

3 展望

值得注意的是,上述所有检测方法的开发和验证均需针对待测药品和包装定制相关样品或器具。所有的检测方法均需定制与待测药品和包装相同的、包括多个泄漏级别的阳性样品。质量提取法需针对待测样品定制实体、测试腔体或填充块,真空衰减法需要定制实体和腔体,激光顶空气体分析法需定制校准用的标准样品,高压放电法需定制电极。

目前,我国药品包装密封完整性研究还处于初级阶段。为适应我国注射剂仿制药一致性评价工作的趋势,应进一步加强密封完整性检测的研究工作。密封完整性检测方法各有优劣势,在注射剂一致性评价中应根据注射剂和包装的情况选用合适的检测方法。实际上,当漏孔直径达到 $1 \mu\text{m}$ 时,微生物才开始侵入^[9]。目前,只有

质量提取法、激光顶空气体分析法和氦质谱法(真空模式)能满足 1 μm 检出限的要求。同时,质量提取法不但能检测小漏,还能检测大漏,检测范围宽;基于质量流率的检测机制,质量提取法检测结果受环境影响较小,稳定性好;检测对象覆盖注射剂的所有包装类型和剂型,适用范围广;属无损检测方法,在方法开发和验证过程中,阳性样品可重复使用,需要的阳性样品数量较少,检测成本低;稳定性样品检测中,通过质量提取法检测的样品可继续用于相容性检测,需要的样本量小;实现了审计追踪功能,能够确保检测数据完整性。可见,质量提取法具有较强的综合性能,是注射剂一致性评价中密封完整性检测较理想的方法之一。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 生物制品稳定性研究技术指导原则(试行)[Z]. 2015-04-15.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则[Z]. 2015-02-05.
- [3] WARNE NW, MAHLER HC. Challenges in Protein Product Development[M]. Basel: Springer International Publishing AG, 2018: 257-290.
- [4] RASMUSSEN M, DAMGAARD R, BUUS P, et al. High - Voltage Leak Detection of a Parenteral Proteinaceous Solution Product Packaged in Form - Fill - Seal Plastic Laminate Bags. Part 3. Chemical Stability and Visual Appearance of a Protein - Based Aqueous Solution for Injection as a Function of HVLD Exposure[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2013, 67(6): 664-669.
- [5] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia 39<1207. 2> Package Integrity Leak Test Technologies[Z]. 2016.
- [6] MOGHIMI N, SAGI H, PARK SI. Leakage analysis of flexible packaging: Establishment of a correlation between mass extraction leakage test and microbial ingress[J]. Food Packaging Shelf, 2018, 16: 225-231.
- [7] YOON SY, SAGI H, GOLDHAMMER C, et al. Mass Extraction Container Closure Integrity Physical Testing Method Development for Parenteral Container Closure Systems[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2012, 66(5): 403-419.
- [8] WOLF H, STAUFFER T, CHEN SC, et al. Vacuum decay container/closure integrity testing technology. Part 1. ASTM F2338-09 precision and bias studies[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2009, 63(5): 472-488.
- [9] KOLHEP, SHAH M, RATHORE N. Sterile Product Development[M]. New York: Springer, 2013: 315-329.
- [10] HEDE JO, FOSBØL PL, BERG SW, et al. Container Closure Integrity Testing - Method Development for Freeze Dried Products Using laser based Headspace Oxygen Analysis[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2019, 73(2): 170-180.
- [11] ZULEGER B, WERNER U, KORT A, et al. Container/Closure Integrity Testing and the Identification of a Suitable Vial/Stopper Combination for Low - Temperature Storage at - 80 °C [J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2012, 66(5): 453-465.
- [12] PELÁEZ SS, MAHLER HC, HERDLITSCHKA C, et al. Comparing Physical Container Closure Integrity Test Methods and Artificial Leak Methodologies[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2019, 73(3): 220-234.
- [13] SUDO H, O'DRISCOLL M, NISHIWAKI K, et al. Development of a nondestructive leak testing method utilizing the head space analyzer for ampoule products containing ethanol - based solutions[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2012, 66(5): 434-444.
- [14] VICTOR KG, LEVAC L, TIMMINS M, et al. Method Development for Container Closure Integrity Evaluation via Headspace Gas Ingress by Using Frequency Modulation Spectroscopy[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2017, 71(6): 429-453.
- [15] LIN TP, HSU CC, KABAKOFF BD, et al. Application of Frequency - Modulated Spectroscopy in Vacuum Seal Integrity Testing of Lyophilized Biological Products[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2004, 58(2): 106-115.
- [16] 李莉娜. 西林瓶真空包装的密封完整性检查[J]. 化工设计通讯, 2018, 44(8): 193.
- [17] 蒋井明, 彭晓蓉. 西林瓶真空包装的密封完整性检查[J]. 机电信息, 2012(32): 36-37.
- [18] COOK IA, WARD KR. Applications of Headspace Moisture Analysis for Investigating the Water Dynamics within a Sealed Vial Containing Freeze - dried Material[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2011, 65(1): 2-11.
- [19] DAMGAARD R, RASMUSSEN M, BUUS P, et al. High - Voltage Leak Detection of a Parenteral Proteinaceous Solution Product Packaged in Form - Fill - Seal Plastic Laminate Bags. Part 1. Method Development and Validation[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2013, 67(6): 634-651.
- [20] RASMUSSEN M, DAMGAARD R, BUUS P, et al. High - Voltage Leak Detection of a Parenteral Proteinaceous Solution Product Packaged in Form - Fill - Seal Plastic Laminate Bags. Part 2. Method Performance as a Function of Heat Seal Defects, Product - Package Refrigeration, and Package Plastic Laminate Lot[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2013, 67(6): 652-663.
- [21] SIMONETTI A, AMARI F. Non - destructive vacuum decay method for pre - filled syringe closure integrity testing compared with dye ingress testing and high - voltage leak detection[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2015, 69(1): 108-122.
- [22] MÖLL F, DOYLE DL, HAERER M, et al. Validation of a High Voltage Leak Detector for Use With Pharmaceutical Blow - Fill - Seal Containers—A Practical Approach[J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 1998, 52(5): 215-227.
- [23] KIRSCH LE, NGUYEN L, GERTH R. Pharmaceutical Container/Closure Integrity III : Validation of the Helium Leak Rate Method for Rigid Pharmaceutical Containers[J]. PDA J Pharm