

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.14.014

# 无菌药品容器密封完整性检测方法对比研究\*

封二飞,张筱宜,赵明<sup>△</sup>

(首都医科大学药学院,北京 100069)

**摘要:**目的 为制药企业和研发机构选择容器密封完整性检测方法和仪器提供参考。方法 根据第41版《美国药典》第1207章,分别选择3种“确定性泄漏检测方法”(真空衰减法、高压放电法、顶空气体激光法)和2种“概率性泄漏检测方法”(微生物浸入法、色水法)检测同一组无菌阴性样品,对比不同容器密封完整性检测方法的差异。结果 2种概率性检测方法中,色水法检测灵敏度较低,稳定性较差,但操作简单,仪器成本低;微生物浸入法检测结果可信度较高,无须单独采购特殊仪器,普通微生物实验室即可完成,但结果的重复性较差;2种方法均为破坏性试验,对于小批量产品或高价值产品不太适用。3种确定性检测方法结果的重复性较好,检测灵敏度较高,检测过程对产品无损伤,既适合离线抽样检测,也适合整合到生产线进行100%在线检测,但检测仪器的成本及后期计量维护的要求均较高。结论 5种不同检测方法各有特点,选择时要综合考虑产品的实际情况和不同国际市场的监管要求。

**关键词:**无菌药品;容器密封完整性检测;确定性泄漏检测方法;概率性泄漏检测方法

中图分类号:R95

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)14-0051-04

## Comparative Study on the Methods of the Sterile Drug Container - Closure Integrity Test

FENG Erfei, ZHANG Xiaoyi, ZHAO Ming

(School of Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing, China 100069)

**Abstract: Objective** To provide a reference for pharmaceutical enterprises and research and development institutions to select methods

\*基金项目:国家科技重大专项[2018ZX09721003-002-005]。

第一作者:封二飞,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品生产与质量管理,(电子信箱)erfei118@126.com。

<sup>△</sup>通信作者:赵明,女,博士研究生,教授,研究方向为小分子纳米药物,(电子信箱)maozhao@126.com。

梅等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。治疗后,观察组患者的TNF- $\alpha$ , hs-CRP, IL-6, IL-8水平均明显低于对照1组及对照2组,与秦芳芳等<sup>[11]</sup>的研究结果相似。美沙拉嗪可抑制前列腺素的合成和白三烯的形成,具有较好的抗炎效果;丹参酮II<sub>A</sub>作用于炎性细胞RAW264.7细胞,可降低IL-6表达水平,起到抗炎作用,二者联用可提升抗炎效果,降低机体内炎性因子水平。本研究结果显示,观察组患者的COX-2和NF- $\kappa$ B表达水平均明显低于对照1组及对照2组,表明美沙拉嗪联合丹参酮II<sub>A</sub>可下调机体COX-2和NF- $\kappa$ B的表达,其机制可能与降低机体炎性因子水平有关<sup>[12]</sup>。治疗后,3组患者的不良反应发生率无明显差异,表明联合用药并不增加不良反应的发生风险。

综上所述,美沙拉嗪联合丹参酮II<sub>A</sub>治疗溃疡性结肠炎有一定疗效,可下调患者肠黏膜COX-2和NF- $\kappa$ B表达水平,减轻肠黏膜炎性反应,较单用美沙拉嗪或丹参酮II<sub>A</sub>更具优势。

### 参考文献

- [1] 何琼,李建栋.炎症性肠病流行病学研究进展[J].实用医学杂志,2019,35(18):2962-2966.
- [2] 胡莲,廉华,周涛,等.双歧杆菌三联活菌胶囊联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者血清中炎症因子及环氧化酶-2含量的影响[J].实用医院临床杂志,2018,15(1):76-79.
- [3] 张媛,毛浩萍,樊官伟.丹参酮II<sub>A</sub>药理作用研究进展[J].天津中医药大学学报,2019,38(1):15-19.

- [4] 潘国宗.中华医学百科全书:消化病学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2015:1081-1091.
- [5] 高闯,张目涵,王斌斌,等.炎症性肠病中MT、NF- $\kappa$ B及HIF-1 $\alpha$ 表达的相关性[J].山西医科大学学报,2019,50(1):59-62.
- [6] 孙健,高文艳,林一帆.溃疡性结肠炎病因和发病机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(4):94-97.
- [7] 厉启芳,刘善军,景德怀,等.基于临床疗效及Th1/Th2、Th17/Treg炎性平衡变化探讨痛泻要方治疗溃疡性结肠炎的机制[J].辽宁中医杂志,2018,45(8):1569-1572.
- [8] 徐永跃,黄清春,何羿婷,等.COX-2/TxA2通路在炎症相关疾病中的分子机制研究进展[J].中国中西医结合杂志,2017,37(6):763-767.
- [9] MAHMOOD AK, MOHD JK. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF- $\kappa$ B pathways by suppressing COX-2 activity[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(sup1): 1149-1158.
- [10] 李秋梅,田志颖.丹参酮II<sub>A</sub>注射液联合美沙拉嗪肠溶片治疗溃疡性结肠炎患者的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1425-1427.
- [11] 秦芳芳,郑长清,张喆.美沙拉嗪联合固本益肠片对溃疡性结肠炎患者炎症因子及肠黏膜屏障功能的影响[J].临床消化病杂志,2020,32(3):168-171.
- [12] 何小兵.丹参酮II<sub>A</sub>对高血压脑出血患者血清IL-6和MMP-9的影响[J].现代中西医结合杂志,2018,27(13):1460-1462.

(收稿日期:2020-10-29;修回日期:2020-12-05)

and instruments for container – closure integrity test(CCIT). **Methods** According to the Chapter 1207 of *United States Pharmacopeia* (41st Edition), three deterministic leak test technologies(vacuum decay, high voltage leak detection, and laser – based headspace analysis) and two probabilistic leak test technologies(microbial challenging, liquid immersion and liquid tracer) were selected to test the sterile negative samples in the same group. **Results** Among the two probabilistic leak test technologies, the liquid tracer method had low sensitivity and poor stability, but the operation was simple and the instrument cost was low; the results of microbial challenging method had high reliability, and ordinary microbial laboratory could complete the test without purchasing special instruments, but the reproducibility of the results was poor. And the two methods were destructive tests, which were not suitable for small – batch products or high – value products. The results of the three deterministic leak test technologies were reproducible and sensitive, and the test process had no damage to the product. They were suitable for offline sampling test and 100% online test integrated into the production line, but the cost of test instruments and the requirements of later measurement maintenance were high. **Conclusion** The five different test methods have their own characteristics, when choosing the test methods should be based on the properties of products as well as the regulatory requirements of different international markets.

**Key words:** sterile drug; container – closure integrity test; deterministic leak test technologies; probabilistic leak test technologies

无菌药品的无菌性是至关重要的质量属性,但当前仅以概率性抽检作为无菌检测方式。要全面保障药品的无菌性,不能仅依靠无菌检测,还要基于质量源于设计的原则,对产品包装进行良好的设计和对生产制造过程进行控制。因此,容器密封完整性检测越来越受到国内外监管机构的重视。中国、欧盟和美国对无菌药品容器密封完整性检测的监管法规要求及各种检测方法的技术特性和进展在《美国药典》和国内文献中均有描述和报道<sup>[1]</sup>。本研究中参照《美国药典》(第41版,第1207章,无菌产品包装——完整性评估),选择当前制药企业常用的5种检测方法,通过阴性样品检测呈现不同检测仪器和方法的特点,根据阳性样品检测结果呈现不同检测方法的检测灵敏度,经过综合对比,为国内药品研发和生产企业更好地选择容器密封完整性检测方法提供参考。

## 1 检测方法

### 1.1 真空衰减法

美国材料试验学会(ASTM)于2009年推出了真空衰减法作为包装无损检漏的测试标准(标准号 ASTM F2338 – 09),后来得到了美国食品和药物管理局(FDA)的批准和认可。真空衰减法是将包装容器置于专门的测试腔体内,测试腔体抽真空,使容器内外产生压力差,如有泄露,容器内部的气体会通过漏孔进入测试腔体,仪器压力传感器监测到压力变化,将压力变化值和标准值进行比较,从而判定是否泄漏。该检测方法能将压力变化数值成比例换算成泄露孔径大小<sup>[2]</sup>,可作为确定性检漏方法使用。

### 1.2 高压放电法

高压放电法是通过在待检样品上外加高压电,根据无缺陷和有缺陷时的电学参数及表征差异确认待检样品的密封性<sup>[3]</sup>。

### 1.3 顶空气体激光法

顶空气体激光法是通过监测容器顶空氧含量变化

来判定容器的密封性,其测定原理是发射的近红外激光穿透容器顶空,容器顶空的氧对激光有吸收,激光吸收量和对应的氧含量成正比<sup>[4]</sup>。为保证测试结果的准确性,避免外界空气的干扰,通常测试样品腔体周围须用高纯氮气(99.99%)充盈保护。

### 1.4 微生物浸入法

微生物浸入法又称微生物挑战法,常通过微生物浸入试验完成,为传统检测方法。先往产品容器内灌入培养基,并按常规方式压塞轧盖(密封),灭菌后冷却备用。无菌检查(确认培养基微生物挑战前的无菌性)时,将冷却后的合格样品容器倒置,并将瓶口(密封处)完全浸没于高浓度(如  $> 10^5$  cfu/mL)的运动性菌液(如大肠埃希菌 *Escherichia coli*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 或黏质沙雷菌 *Serratia marcescens*) 4 h后,将容器外表面消毒并培养,看是否有挑战性细菌在容器内生长。此时,需做阳性对照试验,以确认培养基的促菌生长能力<sup>[3]</sup>。微生物浸入试验也可同无菌工艺模拟试验(培养基模拟灌装)同步进行,将培养基模拟灌装样品无菌培养14 d,确认无菌生长后,样品再进行微生物浸入试验。于硬质容器包装(如西林瓶和安瓿瓶等),泄漏孔径为  $0.1\ \mu\text{m}$  时会有液体渗出,  $0.3\ \mu\text{m}$  时会有微生物浸入。结果显示,当泄漏率  $< 6 \times 10^{-6}$  std · cm<sup>3</sup>/s 时(真空模式下的氦质谱分析测量),等同于泄漏孔径为  $0.1 \sim 0.3\ \mu\text{m}$ ,此时以微生物浸入法检测成功率的  $P < 0.10^{[5-6]}$ 。

### 1.5 液体示踪法(色水法)

通常选用的示踪液体为亚甲基蓝溶液,故又称色水法,为传统的检测方法。操作时,取适量玻璃瓶,往玻璃瓶中灌入注射用水,按常规方法压塞、轧盖(胶塞、铝盖及样品的处理最好模拟实际生产工艺)。样品倒置,完全浸没于装有一定浓度亚甲基蓝溶液的容器中。将容器放入真空箱中抽真空,维持一段时间,真空箱恢复至常压;

再给真空箱中施加一定压力,维持一段时间,真空箱恢复至常压。取出,用水冲洗瓶外壁,目检。亚甲基蓝溶液不得渗入瓶内<sup>[3]</sup>。样品内溶液颜色不发生变化为合格。

## 2 试验方法与结果

### 2.1 样品制备

在无菌制剂车间通过培养基模拟灌装试验,灌装出需要的6 mL西林瓶样无菌阴性样品,随机选取6瓶作为供试品,在20~25℃和30~35℃条件下分别培养7 d,观察是否存在微生物污染风险。

### 2.2 检测方法顺序

为了避免检测方法对培养基灵敏度的干扰,设定检测方法顺序为微生物浸入法、色水法、真空衰减法、高压放电法、顶空气体激光法。前2种方法均为传统破坏性检测,评判结果为合格和不合格,且均只试验1次;后3种方法需重复检测3次,以考察检测方法的稳定性和重复性。

### 2.3 试验操作

#### 2.3.1 微生物浸入法

仪器与试药:ZXJR-1430型霉菌培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);1316型生物安全柜(美国Thermo公司);E200型显微镜(日本Nikon公司)。胰酪大豆胨液体培养基干粉(德国Merck公司,批号为VM813650);阴性无菌样品(北京神州细胞工程有限公司,批号为M20200301,西林瓶包装,规格为每支6 mL;下同)。

方法与结果:配制质量浓度为30 g/L的胰酪大豆胨液体培养基溶液。除菌过滤,无菌灌装,充氮至6 mL西林瓶内,每瓶的灌装体积不少于4 mL。灌装合格产品转入霉菌培养箱内,在20~25℃(倒立培养)和30~35℃(正立培养)条件下分别培养至少168 h(24 h×7 d),培养期间连续监控培养温度。在培养期间和培养结束后,对所有供试品在规定照度下逐支目视检查。之后,对无菌性检查合格的供试品取样6瓶待用。取制备好的新鲜铜绿假单胞菌菌液(浓度不低于 $1 \times 10^6$  cfu/mL)倒入烧杯内,让供试品倒置在菌悬液中,使菌液浸没瓶口铝盖至少4 h。之后,取出供试品,擦干容器外残留的菌悬液,用无菌纯化水冲洗干净供试品外表面。取容器中的菌悬液在紫外光灯下观察,能观察到蓝绿色荧光,染色后结果为革兰阴性。取2瓶西林瓶,不经菌液浸泡,其外表面用无菌纯化水冲洗后,分别接入0.1 mL铜绿假单胞菌菌液(含菌量10~100 cfu),作为阳性对照。将表面冲洗后的供试品和阳性对照品放入包装袋内,置30~35℃条件下培养7 d,结果,供试品均不长菌,且通过促菌生长能力检测试验;阳性对照品长菌,检测为铜绿假单胞菌。

分析:微生物浸入法试验通常耗时较长(14~21 d),操作要求严格,被认为是结果可信度高但不能重现的方法。

#### 2.3.2 色水法

仪器与试药:MFY-05S型密封性测试仪(济南三

泉中心实验仪器有限公司);阴性无菌样品。

方法与结果:配制10%(W/V)的亚甲基蓝溶液,将供试品倒置于烧杯内,浸没于亚甲基蓝溶液中。抽真空至真空度为25 kPa,给供试品施加压力0.2 MPa,均维持1 800 s,恢复至常压状态再维持1 800 s。用无菌纯化水冲洗干净瓶外壁,逐支进行人工灯检,灯检照度 $\geq 1\,000$  lx。结果显示,供试品溶液颜色正常,未见蓝色。

分析:色水法常被认为检测灵敏度较低,稳定性较差<sup>[7]</sup>,且对检测人员的灯检水平依赖度高,结果重复性也较差。

#### 2.3.3 真空衰减法

仪器与试药:BE LF-S型真空检漏仪(意大利Bonfiglioli Engineering公司);阴性无菌样品。

方法与结果:测试前仪器自检确认正常,将供试品逐支放入测试腔体内,重复测试3次。结果显示,未泄露。

#### 2.3.4 高压放电法

仪器与试药:E-Scan 655型微电流高压放电检测仪(上海众寻检测技术有限公司);阴性无菌样品。

方法与结果:测试前仪器用标准电阻自检确认正常,将供试品逐支放入测试腔体内,重复测试3次。结果显示,未泄露,电压值均低于5 V。

#### 2.3.5 顶空气体激光法

仪器与试药:FMS-760型顶空气体激光分析仪(美国Lighthouse公司);阴性无菌样品。

方法与结果:测试前仪器用0.1%,2%,4%,8%,25%的标准氧含量瓶自检确认一切正常,将供试品逐支放入测试腔体内,重复测试3次。结果显示,未泄露,氧含量均低于1%。

## 2.4 试验结果

稳定性、重复性与检测效率:结果见表1。检测时长的RSD、检测结果的RSD分别与检测仪器的稳定性及检测结果的重复性呈正相关。可见,3种确定性检测方法结果的重复性均较好,且无明显差异。对生产线预期配置在线检测仪器进行100%产品密封性检测时,仪器方法的选择要重点考虑检测的稳定性和检测效率。

表1 确定性检测方法数据统计( $n=3$ )

Tab. 1 Data statistics of deterministic leak test technologies( $n=3$ )

| 指标            | 真空衰减法 | 高压放电法 | 顶空气体激光法 |
|---------------|-------|-------|---------|
| 检测时长的RSD(%)   | 15.41 | 44.76 | 96.05   |
| 泄漏检测结果的RSD(%) | 17.10 | 22.56 | 24.42   |
| 检测时长(s)       | 26.18 | 46.35 | 13.82   |

灵敏度:离线抽样进行生产线样品检测时,要重点考虑检测仪器的稳定性和检测灵敏度,这2项均为评价的关键指标。本试验未制作阳性样品,可参考文献[8]对除高压放电法外的4种检测方法进行对比分析。国外文献报道选用瑞士Wilco AG公司的Wilcoma® HAS-Lab

顶空激光仪, Wilco AG 公司的 Wilcoma® 07 真空检漏仪和德国 Asslar 公司的 ASM340 氦质谱检测仪, 用标准泄露孔径阳性样品进行检测, 结果见表 2。可见, 色水法灵敏度最低, 其次是真空衰减法; 微生物浸入法灵敏度最高, 其次是顶空气体激光法。

表 2 不同检测方法的检测灵敏度(%)

Tab. 2 Detection sensitivity of different test methods(%)

| 人工泄露孔         | 孔径(μm) | 微生物浸入法           | 真空衰减法            | 顶空气体激光法          | 色水法 |
|---------------|--------|------------------|------------------|------------------|-----|
| 阴性对照品         |        | 0                | 0                | 0                | 0   |
| 激光打孔(ID)      | 60     | 100              | 100              | 100              | 100 |
|               | 20     | 100              | 100              | 100              | 100 |
|               | 10     | 100              | 100              | 100              | 100 |
|               | 5      | 100              | 100              | 100              | 60  |
|               | 2      | 100              | 0                | 0                | 0   |
| 毛细管<br>(机孔内径) | 15     | 100              | 100              | 100              | 90  |
|               | 10     | 100              | 100              | 100              | 100 |
|               | 5      | 100 <sup>*</sup> | 100 <sup>*</sup> | 100 <sup>*</sup> | 50  |
| 毛细管<br>(实际内径) | 2      | 100 <sup>#</sup> | 10               | 100 <sup>#</sup> | 0   |
|               | 15     | 100              | 20               | 100              | 0   |
|               | 10     | 100              | 0                | 0                | 0   |
|               | 5      | 100              | 0                | 0                | 0   |
| 铜丝<br>(外径)    | 2      | 100 <sup>△</sup> | 0                | 0 <sup>△</sup>   | 0   |
|               | 60     | 100              | 100              | 100              | 100 |
|               | 20     | 100              | 20               | 0                | 0   |
|               | 10     | 100              | 40               | 0                | 0   |

注: \*  $n=9$ , #  $n=7$ ,  $\Delta n=3$ , 其余项  $n=10$ 。

Note: \*  $n=9$ , #  $n=7$ ,  $\Delta n=3$ , other terms  $n=10$ 。

### 3 讨论

结合试验结果和文献报道可知, 2 种概率性检测方法中, 色水法检测灵敏度较低, 稳定性较差, 但操作要求简单, 仪器成本低; 微生物浸入法所得结果可信度较高, 无须单独采购特殊仪器, 普通的微生物实验室即可完成检测, 但结果不能重现。且 2 种方法均为破坏性试验, 对于小批量产品或高价值产品不太适用。

3 种确定性检测方法检测结果的重现性均较好, 灵敏度均较高, 检测过程对产品无损伤, 既适合离线抽样检测, 也适合整合到生产线进行 100% 在线检测。但检测仪器的成本较高, 后期计量维护的要求也较高。

由于本试验样品数较少, 试验结果不能反映各检测方法之间绝对的优劣差异, 仅呈现各自仪器和方法的特点。后续可制作更多的阴性样品和阳性样品进行对比研究。

密封性检查方法为能检测出产品最大允许泄漏限度的确定性方法, 如方法灵敏度无法达到产品最大允许泄漏限度水平或产品最大允许泄漏限度不明确, 建议至少采用 2 种方法(推荐包括微生物挑战法)进行研究<sup>[9]</sup>。

选择检测方法时要基于产品的具体情况, 特别应注意产品是否影响检测方法的灵敏度, 如高糖、高盐或高黏度溶液。在产品的开发设计阶段和包材选择阶段应尽可能选择灵敏度、稳定性均较高的仪器和方法进行离线检测确认, 在后续日常生产和质量控制过程中可选择相对低灵敏度、高稳定性、高检测效率的仪器和方法进行在线检测。

当前, 概率性泄漏检测方法由于仪器成本低、操作维护简单而被国内企业普遍使用; 欧洲和美国企业则更多选择确定性泄漏检测方法, 对于药品出口企业需要考虑不同市场的监管要求。

志谢: 感谢北京神州细胞工程有限公司、北京市多肽及小分子药物重点实验室内源式预防药物教育部工程研究中心对本试验的支持和帮助。

### 参考文献

- [1] 封二飞. 无菌药品包装完整性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(11): 1352-1357.
- [2] WOLF H, STAUFFER T, CHEN SCY, et al. Vacuum decay container/closure integrity testing technology. Part 1. ASTM F2338-09 precision and bias studies[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2009, 63(5): 472-488.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 药品 GMP 指南: 无菌药品[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 256.
- [4] 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 Technol, 2012, 66(5): 434-444.
- [5] BAGEL S, WIEDEMANN B. Extension of in-use stability of preservative-free nasal sprays[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 57(2): 353-358.
- [6] KIRSCH LE. Pharmaceutical container/closure integrity VI: a report on the utility of liquid tracer methods for evaluating the microbial barrier properties of pharmaceutical packaging[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2000, 54(4): 305-314.
- [7] BURRELL LS, CARVER MW, DEMUTH GE, et al. Development of a Dye Ingress Method to Assess Container-Closure Integrity: Correlation to Microbial Ingress[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2000, 54(6): 449-455.
- [8] PELAEZ SS, MAHLER HC, HERDLITSCHKA C, et al. Comparing Physical Container Closure Integrity Test Methods and Artificial Leak Methodologies[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2019, 73(3): 220-234.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南(征求意见稿)[EB/OL]. (2020-06-02) [2020-08-18]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=viewInfoCommon&id=3abe5aa74ad586ec>.

(收稿日期: 2020-08-18; 修回日期: 2020-12-06)