注射剂包装系统的 2 种密封性检测方法的对比研究

施建国，蒋宇丹*
（上海禾丰制药有限公司，上海 201206）

摘要：注射剂生产中常用的包装系统密封性检测方法包括高压放电法和微生物挑战法等。该研究以方法灵敏度为指标，对高压放电法和微生物挑战法的适用性进行了对比研究。结果显示，高压放电法可检出 0.1 μm 孔径，微生物挑战法可检出 10 μm 孔径，前者灵敏度更高。高压放电法可更好地满足注射剂包装系统密封完整性检测的要求，且可实现在线检测，保证药品的质量。

关键词：呋塞米注射剂；包装系统密封完整性；高压放电法；微生物挑战法；在线检测
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)10-1493-03
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.10.013

Comparative Study on Two Test Methods of Container Closure Integrity of Injections

SHI Jianguo, JIANG Yudan*
(*Shanghai Harvest Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201206*)

ABSTRACT: At present, the commonly used methods for testing the container close integrity in the production of injections include high-voltage leak detection method and microbial challenge method. In this study, the method sensitivity was taken as the index to compare the applicability of high-voltage leak detection method and microbial challenge method. The results showed that the sensitivity of the high-voltage leak detection was 0.1 μm (pore size), and that of the microbial challenge method was 10 μm (pore size), indicating that the sensitivity of the high-voltage leak detection was better than the microbial challenge method for injection ampoule packaging. The high-voltage leak detection could better meet the requirements of container close integrity test of injection, and could realize on-line inspection to ensure the quality of injection.

Key Words: furosemide injection; container closare integrity; high-voltage leak detection; microbial challenge method; on-line inspection

我国 GMP 指南（2010 年版）无菌药品附录第七十七条指出无菌药品包装容器的密封性应当经过验证，其中熔封的产品（如玻璃安瓿或塑料安瓿）应当做 100%的检漏试验[1]，即对包装系统进行完整性测试。2020 年 7 月，国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）发布的《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南（试行）》[2] 中阐述了注射剂包装系统密封性检查方法的选择和验证要求，其中高压放电法为确定性检测方法，而微生物挑战法为概率性检测方法，此 2 种方法常用于包装系统密封完整性的检测。本研究分别采用高压放电法和微生物挑战法检测呋塞米注射剂的包装系统密封性，并进行了对比研究，确证了高压放电法的适用性。

1 仪器与试药

IMMD 型密封性检漏仪（日本 IDK 株式会社）；FM-UVD5 型激光打孔仪（上海费米激光科技有限公司）；LRH-250F 型培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

呋塞米注射液（上海禾丰制药有限公司，批号 Y09191101，规格 2 mL ∶ 20 mg）；胰酪大豆胨液体培养基（批

收稿日期：2023-03-27
作者简介：施建国(1982—)，男，高级工程师，从事药品工艺、药品注册的研究。
通信作者：蒋宇丹(1978—)，女，高级工程师，从事药物质量、药品注册的研究。
E-mail：jjjyyyddd@sina.com

号 20180826)、胰酪大豆胨琼脂培养基（批号 20201130)、溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基（批号 20190524)、蛋白胨 - 氯化钠（pH 7.0，批号 20200525）均购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；中硼硅玻璃安瓿瓶（山东力诺特种玻璃股份有限公司，批号 1950210061)。

铜绿假单胞菌（中国普通微生物菌种保藏管理中心，CGMC1.2421)。

2　方法与结果

2.1　高压放电法

2.1.1　样品制备

激光打孔阳性样品：取装有呋塞米注射液、熔封好的中硼硅玻璃安瓿，分别在瓶颈、瓶底、瓶头、瓶身激光打孔，孔径为 3 μm，每个位置各 4 支，共 16 支。

微管阳性样品：分别在装有呋塞米注射液、熔封好的中硼硅玻璃安瓿的瓶颈、瓶底、瓶头、瓶身打孔，并埋入 0.1 μm 的微管，共 4 支。

阴性对照样品：装有呋塞米注射液、熔封好的中硼硅玻璃安瓿（已用真空衰减法进行检验，均无泄漏孔径），共 200 支。

2.1.2　检测方法

将 16 支激光打孔（3 μm）阳性样品，4 支微管（0.1 μm）阳性样品、200 支阴性对照样品混合，采用密封性检漏仪，按表 1 中所示的电压和灵敏度，由同一个人进行包装系统密封完整性测试，重复 6 次，记录检测结果。结果（表 1）显示，阳性样品均被 100%检出，说明高压放电法可检测出孔径 0.1 μm 的微孔，灵敏度较高。

表 1　密封性检漏仪参数

Tab.1　Parameters of Leak Detector

参数	瓶颈	瓶底	瓶头	瓶身
电压/kV	18	18.5	18	18.5
灵敏度	3	3	3	3

2.2　微生物挑战法

2.2.1　菌液和样品制备

胰酪大豆胨液体培养基：称取胰酪大豆胨液体培养基 30 g，加热、搅拌条件下溶于蒸馏水 1 000 mL 中，冷却后即得。

胰酪大豆胨琼脂培养基：称取胰酪大豆胨琼脂培养基 30 g，加热、搅拌条件下溶于蒸馏水 1 000 mL 中，冷却后即得。

蛋白胨 - 氯化钠缓冲液：称取蛋白胨 - 氯化钠 14.63 g，加热条件下溶于纯化水 1 000 mL 中，冷却后即得。

溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基：称取溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基 45.3 g，加热条件下溶于蒸馏水 1 000 mL 中，加入甘油 10 mL，煮沸，冷却后即得。

上述培养基使用前均于 121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

取新鲜铜绿假单胞菌斜面菌种接种至胰酪大豆胨液体培养基中，30 ～ 35 ℃培养 18 h，用蛋白胨 - 氯化钠缓冲液稀释 2 次，得 1×10^5 ～ 9×10^5 CFU/mL 菌悬液。

阳性对照用菌悬液（100 ～ 1 000 CFU/mL 菌液）：取上述菌悬液 0.5 mL，加至蛋白胨 - 氯化钠缓冲液 4.5 mL 中，10 倍系列稀释，稀释 2 次后，得 100 ～ 1 000 CFU/mL 的阳性对照用菌悬液。

激光打孔阳性样品：对中硼硅玻璃安瓿进行激光打孔，孔径为 3、5、10 μm，每个孔径样品 15 支，共 45 支，分别注入胰酪大豆胨液体培养基 2 mL，熔封，高压蒸汽灭菌（121 ℃，15 min)。

阴性对照样品：取中硼硅玻璃安瓿共 12 支，分别注入胰酪大豆胨液体培养基 2 mL，熔封，高压蒸汽灭菌。

生长阳性对照样品：向灭菌后的试管注入胰酪大豆胨液体培养基，加入阳性对照用菌悬液 0.1 mL，密封。

2.2.2　试验方法和结果

阳性样品：将各试验用阳性样品固定在灭菌器下部，将制备好的挑战菌悬液加入灭菌器中，加入量应能浸没样品瓶。将样品打孔处浸没于菌液并与菌液充分接触。抽真空至 －30 kPa，保持 30 min，恢复至常压后加压至 10 kPa，保持 30 min，再恢复至常压，保持 30 min。浸没阶段结束后，取出样品，

用 75%乙醇消毒外表面，于 32 ℃培养箱中培养 7 d。打开样品瓶，取瓶内培养基划线于溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基平皿上，于 32 ℃培养箱中培养 48 h，观察菌落形态特征。

阴性对照样品：取 6 支于 32 ℃培养箱中直立培养 7 d，另取 6 支随阳性样品进行微生物挑战试验。

生长阳性对照样品：于 32 ℃培养箱中直立培养 7 d，观察培养基是否浑浊；然后取瓶内培养基，在溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基平皿上分区划线，于 32 ℃培养 48 h，对平皿内的菌落进行形态学鉴定。

结果显示，阳性对照样品均观察到试验菌生长，经过溴化十六烷基三甲基铵琼脂培养基培养生成的菌群均符合铜绿假单胞菌的菌落形态；而阴性对照样品均无菌生长。阳性样品瓶中微生物挑战法侵入结果为：3 μm 孔径样瓶和 5 μm 孔径样瓶的侵入率均为 73%，10 μm 孔径样瓶侵入率为 100%。因此，本试验中的微生物挑战法可 100%检出的孔径为 10 μm，灵敏度较低。

3 讨论

CDE 发布的《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南（试行）》[2] 中微生物挑战法的检测限（即灵敏度）级别为 5.0 ～ 10.0 μm，高压放电法为 1.0 ～ 5.0 μm。因此，本研究采用微生物挑战法对 3 μm 进行挑战，同时进行 5 和 10 μm 的阳性试验；高压放电法对 0.1 μm 进行挑战，同时对 3 μm 进行阳性试验。试验结果显示，在同等 3 μm 阳性对照的情况下，高压放电法可 100%检出，而微生物挑战法仅可检出 73%，且高压放电法对 0.1 μm 也能 100%检出。因此，高压放电法的灵敏度远高于微生物挑战法。

目前，国内注射剂生产企业多采用色水法（亚甲基蓝染色法）检测包装系统密封法，其灵敏度[2] 为 5.0 ～ 10.0 μm，且为破坏性、概率性的检测方法[3]，易产生假阳性或假阴性结果，数据可追溯性差。有研究[4] 对色水法与微生物挑战法进行了比较研究，结果显示色水法的重复性和耐用性较差，灵敏度远低于微生物挑战法。

微生物挑战法是公认的验证方法。因此通过微生物挑战法与其他物理方法的比较，可确定合适的包装系统密封完整性检测方法[5—11]。但该法测试周期较长，又是概率性检测方法，具有破坏性，仅适用于实验室中方法的建立或检测，不适用于工业化生产时的在线检测。

高压放电法是美国药典（USP）<1207> 章节中推荐的确定性泄漏检测技术，为非破坏性方法[3]。该法的基本原理[12] 是在容器上加载高压电，有漏孔时，电流会发生改变，此时通过设置阈值可判断容器的密封性。药品[13] 与漏孔的距离越近，方法的灵敏度越高。高压放电法检测速度非常快，往往只需几秒，是业内认可的注射剂包装系统密封性在线检测方法。

随着我国注射剂仿制药一致性评价工作的开展，色水法检漏已不能满足包装系统密封完整性检测的要求，而微生物挑战法不利于工业化生产中的在线检测。因此，灵敏度高、检测速度快的高压放电法将更适合于注射剂工业化生产中的过程检测。

参考文献：

[1] 国家食品药品监督管理局. 药品GMP指南: 无菌药品[EB/OL]. (2011-02-24)[2023-07-06]. https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20110224164501312.html.

[2] 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(试行)[EB/OL]. (2020-10-21)[2023-07-06]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/8a4f9f16844fbed617f8e8ed59485c1d.

[3] 杨梦雨, 赵 霞, 孙会敏. 无菌制剂容器密封完整性检测技术和相关法规研究进展[J]. 中国新药杂志, 2022, **31**(3): 245-250.

[4] 王 妮, 黄思嘉, 王 静, 等. 注射剂瓶容器密封完整性: 微生物挑战法与色水法的关联比较分析[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(2): 246-252.

[5] 王冬伟, 张 博, 张 翔, 等. 无菌药品包装系统密封完整性研究焦点问题的分析[J]. 中国药事, 2022, **36**(2): 133-138.

（下转第1503页）

[7] 国家知识产权局. 勃林格殷格翰制药两合公司诉广东东阳光药业有限公司重大专利侵权行政裁决请求, 国家知识产权局重大专利侵权纠纷行政裁决书, 国知保裁字[2021]1号[EB/OL]. (2022-07-27)[2023-09-10]. https://www.cnipa.gov.cn/module/download/downfile.jsp?classid=0&showname=重大专利侵权纠纷行政裁决书(国知保裁字%E3%80%942021%E3%80%951号). PDF&filename=5026a84858644074af90826f0ea95ab2.pdf.

[8] 国家知识产权局.勃林格殷格翰制药两合公司诉宜昌东阳光长江药业有限公司重大专利侵权行政裁决请求, 国家知识产权局重大专利侵权纠纷行政裁决书, 国知保裁字[2021]2号[EB/OL].(2022-07-27)[2023-09-10]. https://www.cnipa.gov.cn/module/download/downfile.jsp?classid=0&showname=重大专利侵权纠纷行政裁决书(国知保裁字%E3%80%942021%E3%80%952号). PDF&filename=f7131277786a4a4bb39620a4270c223d.pdf.

[9] 聂琳峰, 刘少军. 药品专利链接制度的解构与重构——兼论《药品专利纠纷早期解决机制实施办法(试行)》[J]. 情报杂志, 2022, **41**(9): 199-207.

[10] CDER. ANDA submissions—amendments and requests for final approval to tentatively approved ANDAs guidance for industry [EB/OL]. [2023-09-10]. https://www.fda.gov/media/119718/download.

[11] Code of Federal Regulations, 21 CFR§314.105(d)[EB/OL]. (1985-02-22)[2023-09-10]. https://www.govregs.com/regulations/title21_chapterI-i4_part314_subpartD_section314.105.

[12] 邱福恩. 韩国药品专利链接制度介绍及对我国制度的启示[J]. 电子知识产权, 2019, (3): 22-28.

[13] 曹红英, 宋蓓蓓, 王志超. 药品专利纠纷早期解决机制国际比较研究[J]. 电子知识产权, 2021, (9): 4-14.

(上接第1495页)

[6] 陆维怡, 蔡 荣. 国内外药品包装系统密封完整性研究与保障药品质量安全的思考[J]. 中国药事, 2021, **35**(7): 828-834.

[7] 王 焕. 氯化钙注射液包材变更质量研究[J]. 上海医药, 2022, **43**(9): 77-81.

[8] KIRSCH L E, NGUYEN L, MOECKLY C S, *et al*. Pharmaceutical container closure integrity Ⅱ: the relationship between microbial ingress and helium leak rates in rubber-stoppered glass vials [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 1997, **51**(5): 195-202.

[9] BURRELL L S, CARVER M W, DEMUTH G E, *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.

[10] ALIASKARISOHI S, HOGREVE M, LANGLOIS C, *et al*. Single-use system integrity Ⅰ: using a microbial ingress test method to determine the maximum allowable leakage limit(MALL) [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2019, **73**(5): 459-469.

[11] MORRICAL B D, GOVERDE M, GRAUSSE J, *et al*. Leak testing in parenteral packaging: establishment of direct correlation between helium leak rate measurements and microbial ingress for two different leak types [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2007, **61**(4): 226-236.

[12] 曾凡云, 李姝洁, 李 伟, 等. 注射剂一致性评价与无菌药品包装系统密封性创新验证[J]. 流程工业, 2020, (8): 46-48.

[13] 陈 江, 王俊苏, 关天横, 等. 注射剂包装密封完整性检测技术研究进展[J]. 中国药业, 2021, **30**(2): 5-10.