色水法检测小容量注射剂包装系统密封性的方法对比及优化

邓雯卿，张　珅，王青青，吴英姿 *
（深圳康泰生物制品股份有限公司，广东深圳 518106）

摘要：建立了色水法测定预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统的密封性。在合理设置参数及制备阴性、阳性样品的基础上，优化了真空度、负压保持时间、预灌封注射器包装系统处理方式，并进行方法验证。结果表明，采用本方法测定预灌封注射器包装系统、西林瓶包装系统密封性的灵敏度为 10 ～ 15 μm，且其灵敏度在同等条件下优于 USP、EP 和国际标准化组织中的方法。该法能有效测试预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统的密封性，为建立色水法检测预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统密封性的标准提供了参考。

关键词：色水法；预灌封注射器；西林瓶；包装系统密封性
中图分类号：R917；TQ460.6^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)08-1121-08
引用：邓雯卿 , 张　珅，王青青，等．色水法检测小容量注射剂包装系统密封性的方法对比及优化 [J]．中国医药工业杂志，2024, 55(8): 1121-1128．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.013

Comparison and Optimization of Dye Ingress Method for Package Integrity Assessment of Small Volume Injection Packaging System

DENG Wenqing, ZHANG Shen, WANG Qingqing, WU Yingzi*
(*Shenzhen Kangtai Biological Products Co., Ltd., Shenzhen 518106*)

ABSTRACT: A dye ingress method was established to assess the package integrity of prefilled syringes and vials. On the basis of setting rational parameters as well as preparing negative and positive samples, the vacuum, negative pressure holding time and the processing method of the prefilled syringe packaging system were optimized, and the method was verified. The results showed that the sensitivity of this method for assessment the integrity of the prefilled syringe packaging system and the vial packaging system was 10 − 15 μm, and was better than those in the USP, EP and International Organization for Standardization under the same conditions. This method could effectively assess the integrity of the prefilled syringe packaging system and the vial packaging system, which provided a reference for establishing the test standard for the prefilled syringe packaging system and the vial packaging system by dye ingress method.

Key Words: dye ingress method; prefilled syringe; vial; package integrity

包装系统密封性 (package integrity) 又称容器密封完整性 (container-closure integrity)，是指包装系统防止内容物损失、微生物侵入以及气体（氧气、空气、水蒸气等）或其他物质进入，保证药品持续符合安全与质量要求的能力。包装系统密封性检查 (package integrity test)，或称为容器密封完整性检查 (container-closure integrity test，CCIT)，是指检测任何破裂或缝隙的包装泄漏检测（包括理化或微生物检测方法），一些检测可以确定泄漏的尺寸和（或）位置 [1—3]。常用的包装系统密封性检查方法 [1] 有微生物挑战法、色水法、气泡释放法、高压放电法、激光顶空分析法、质量提取法、压力衰减法、真空衰减法。

收稿日期：2023-11-24
作者简介：邓雯卿 (1992—)，女，中级工程师，从事生物制品质量控制工作。
通信作者：吴英姿 (1989—)，女，中级工程师，从事生物制品质量控制工作。
E-mail：wuyingzi@biokangtai.com

色水法主要适用于液体制剂，样品必须能承受浸没，可能需要工具限制软包膨胀或移动[1]。因其检验方法的特殊性，准确度、精密度、专属性、线性范围以及耐用性均无法有效获得。《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南（试行）》[1]中明确提出应“重点关注方法灵敏度的考察”，因此有必要评估该方法的灵敏度验证，证明方法能可靠、有效地适用于预灌封注射器包装和西林瓶包装疫苗成品的密封性检查。

容器密封完整性是确保无菌药品在生产、贮存、运输和使用过程中不受污染的关键因素之一。近年来，国内外的药品监管机构均要求药品包装系统必须通过密封完整性测试，以符合药品生产质量管理规范和其他相关法规。目前，ChP 2020 年版中已明确规定，注射剂容器的密封性要用适宜的方法确证，但尚无相关指导方法。

本研究参照《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南（试行）》[1]、USP 42、EP 11、国际标准化组织 ISO 8871-5[4] Annex C 及 Annex D 等，建立了试验方案，在合理设置参数及制备阴性、阳性样品的基础上，优化了真空度、负压保持时间、预灌封注射器包装系统处理方式，并进行了方法学验证，以期为色水法检测预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统密封性的研究提供参考。

1　仪器与试药

DZF-6030A 型真空干燥箱（上海一恒科技有限公司）；BSA4202S-CW 型电子天平［赛多利斯科学仪器（北京）有限公司］。

预灌封注射器包装系统（包括 1 mL 预灌封注射器组合件、氯化丁基橡胶胶塞和推杆，山东威高普瑞医药包装有限公司）；西林瓶包装系统（包括 1 mL 中硼硅玻璃管制注射剂瓶，成都市金鼓药用包装有限公司）；溴化丁基橡胶胶塞（江苏华兰药用新材料股份有限公司）；铝塑组合盖（河北金环包装有限公司）；注射器和西林瓶缺陷品，委托上海费米激光科技有限公司进行激光打孔，并进行校准检测，孔径为 5.0 ～ 10.0 μm、10.0 ～ 15.0 μm，其中，注射器打孔位置为针筒下部；硅胶管（济南晨生医疗科技有限公司）；压盖器（温州双木包装机械有限公司）；预灌封注射器专用托盘（康泰生物制品股份有限公司）；亚甲基蓝（广东光华科技股份有限公司，含量≥ 80.0%，批号 20200812）；氯化钠（广东光华科技股份有限公司，含量≥ 99.5%，批号 20201020）。

2　方法与结果

2.1　样品制备

阴性对照：以灌装生理盐水的预灌封注射器包装系统 / 西林瓶包装系统作为阴性对照，规格为每支 0.5 mL。

阳性对照：以灌装生理盐水的激光打孔缺陷品作为阳性对照①，即瓶身缺陷品，规格为每支 0.5 mL；以在灌装生理盐水的预灌封注射器包装系统 / 西林瓶包装系统中插入铜丝的样品作为阳性对照②，即瓶口缺陷品，规格为每支 0.5 mL。

预灌封注射器瓶口缺陷品：取预灌封注射器组合件，向针筒中加入生理盐水 0.5 mL，在针筒中放入 1 根直径约 0.2 mm 的铜线，使铜线竖直放置，长度需超出针筒的高度，随后将推杆和活塞组合后轻轻推入针筒中，针头向上，移除护帽，保留少量空气后盖上护帽。

西林瓶瓶口缺陷品：在 1 mL 西林瓶中加入生理盐水 0.5 mL，瓶中靠壁放入 1 根直径约 0.2 mm 的铜线，使铜线竖直放置，长度需超出瓶口的高度，使用胶塞压住铜线后盖上铝塑组合盖，用压盖器压紧铝塑组合盖。

2.2　试验方法

将样品置于装有一定浓度亚甲基蓝溶液的玻璃烧杯中，使其完全浸没。再将其放入真空干燥箱内减压到达一定真空度，保持一段时间后恢复至常压，放置一段时间。取出样品，用水冲洗容器外部，目检。

取阴性对照、阳性对照②各 2 支，阳性对照①各 10 支，按照上述方法，由不同实验员共重复测试 3 次，每次检测完成后由实验员和另 2 位观察人员进行结果判断，分别统计 3 次阳性对照①检出泄漏的数量，其与阳性对照①总数量的比值即阳性检出率。

2.3　方法对比

2.3.1　方法对比参数

参考 USP 42、EP11、ISO 8871-5，本研究增大了真空度、延长了负压保持时间，但降低了染料浓

度（方法①）。考虑到方法①有可能存在假阴性风险，故将染料浓度设置为与 USP <381>、EP 3.2.9 章节、ISO 8871-5 一致，作为拟优化的方法②。将上述方法进行比对测试，以确定密封性检查最优参数设置。各法的具体参数设置如表 1 所示。

表 1 不同方法的参数设置

Tab.1 Parameter Settings of Different Methods

方法参数	USP 42、EP11、ISO 8871-5 方法	方法①	方法②
真空度 /kPa	27	86	86
负压保持时间 /min	10	60	60
常压放置时间 /min	30	30	30
染料（亚甲基蓝溶液）浓度 /%	0.1	0.01	0.1
检查方法	目视检查	目视检查	目视检查



A B C

A—优化前（蓝色部分为硅胶管，其余同）；B—优化后（旋出推杆）；C—优化后（向上运动会使针筒内部气压降低）。

图 1 预灌封注射器包装系统处理方式优化前后

Fig.1 Prefilled Syringe Packaging System before and after Optimization

依据色水法的检测限级别，4 级时可检测出的泄漏孔径尺寸为 5.0 ～ 10.0 μm[1]，将阳性对照①的泄漏孔径设计为 5.0 ～ 10.0 μm。预灌封注射器包装系统的处理方式为旋出推杆，在针管内塞入粗细合适的硅胶，管顶紧胶塞，如图 1 所示。当针筒内部气压大于外部气压时，此措施能防止胶塞向上运动（向上运动会使针筒内部气压降低）。

2.3.2 方法对比结果

2.3.2.1 预灌封注射器包装系统

不同方法检测预灌封注射器包装系统的结果如图 2 所示，可见阴性对照容器内均无蓝色液体渗入，阳性对照②容器内均有蓝色液体渗入。不同方法对阳性对照①的检出结果如表 2 所示。

在上述试验条件下，色水法检测预灌封注射器包装系统密封性时方法②的灵敏度最优，阳性检出率为 83.3%～ 100.0%；方法①的灵敏度次之，阳性检出率为 83.3%～ 86.7%；USP 42 等方法的灵敏度最差，阳性检出率为 43.3%～ 60.0%。

方法比对测试中，预灌封注射器包装系统密封性检查的“灵敏度”项目中，阳性对照①的泄漏孔径设计为 5.0 ～ 10.0 μm，在该泄漏孔径下，阳性对照①不能完全检出，需重新设计泄漏孔径。

2.3.2.2 西林瓶包装系统

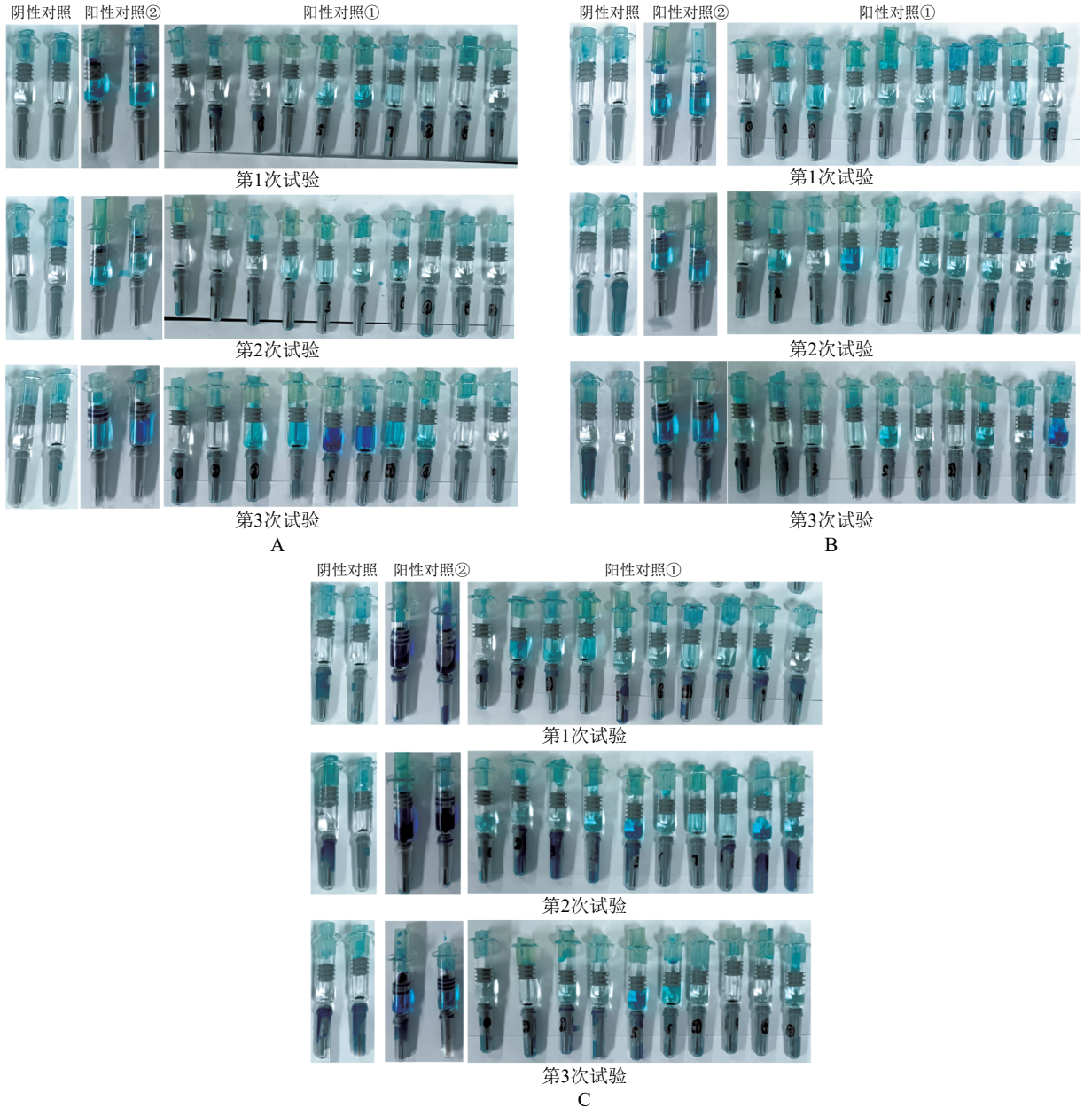
不同方法检测西林瓶包装系统的结果如图 3 所示，可见阴性对照容器内均无蓝色液体渗入，阳性对照②容器内均有蓝色液体渗入。不同方法阳性对照①的检出结果如表 3 所示。

在上述试验条件下，色水法检测西林瓶包装系统密封性中的方法②灵敏度最优，阳性检出率为

表 2 不同方法的阳性检出结果（预灌封注射器）

Tab.2 Positive Detection Results of Different Methods (Prefilled Syringes)

方法	试验次数	阳性对照①数量 / 支	蓝色液体渗入的容器数量 / 支			平均检出率 /%
			实验人员甲	观察人员乙	观察人员丙	
USP 42 等方法	1	10	6	5	5	53.3
	2	10	5	4	4	43.3
	3	10	6	6	6	60.0
方法①	1	10	9	9	8	86.7
	2	10	10	8	8	86.7
	3	10	9	8	8	83.3
方法②	1	10	9	8	8	83.3
	2	10	10	10	10	100.0
	3	10	9	8	8	83.3



A—USP 42 等方法；B—方法①；C—方法②

图 2　药典方法、方法①、方法②的结果图（预灌封注射器）

Fig.2　Results of Pharmacopoeial Method, Method ① and Method ②（Prefilled Syringes）

80.0%～93.3%；方法①灵敏度次之，阳性检出率为 70.0%～90.0%；USP 42 等收载方法的灵敏度最差，阳性检出率为 40.0%～50.0%。

方法比对测试中，西林瓶包装系统密封性检查的“灵敏度”项目中，阳性对照①的泄漏孔径设计为 5.0～10.0 μm，在该泄漏孔径下，阳性对照①不能完全检出，需重新设计泄漏孔径。

2.4　灵敏度验证

2.4.1　灵敏度验证参数

在方法②参数（真空度 0.086 MPa、负压保持时间 60 min、染料为 0.1%亚甲基蓝溶液、常压放置时间 30 min）的基础上，重新设计了阳性对照①的泄漏孔径，且通过改善预灌封注射器包装系统的处理方式，使阳性对照能够被完全检出，从而确定色水

表 3 不同方法的阳性检出结果（西林瓶）

Tab.3 Positive Detection Results of Different Methods (Vials)

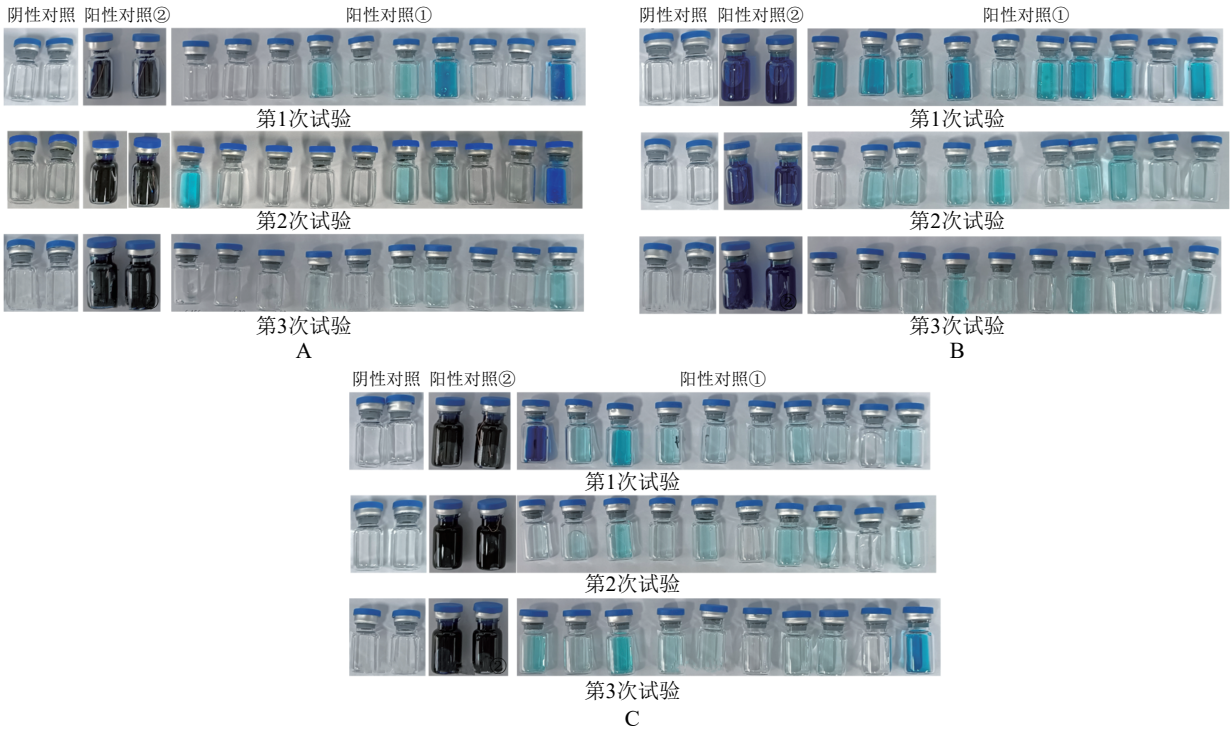
方法	试验次数	阳性对照①数量 / 支	蓝色液体渗入的容器数量 / 支			平均检出率 /%
			实验人员甲	观察人员乙	观察人员丙	
USP 42 等方法	1	10	5	5	5	50.0
	2	10	4	4	4	40.0
	3	10	4	4	4	40.0
方法①	1	10	9	9	9	90.0
	2	10	8	8	8	80.0
	3	10	7	7	7	70.0
方法②	1	10	10	9	9	93.3
	2	10	9	8	8	83.3
	3	10	8	8	8	80.0

法检测预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统密封性的灵敏度。

将阳性对照①的泄漏孔径设计为 5.0 ～ 10.0 和 10.0 ～ 15.0 μm。

预灌封注射器包装系统处理方式优化为：将预灌封注射器放入注射器专用托盘中，使用硅胶管固定推杆与针筒上端的部位、推杆与托盘上部，或将推杆靠近托盘上部，用硅胶管固定针筒及推杆与针筒上端的部位，如图 1B 和 1C 所示。

方法对比测试时观察到，预灌封注射器包装系统的处理方式仅能防止胶塞上移，但当恢复至常压时，针筒内部气压会小于外部气压，存在针筒外部的液体从硅胶管处挤压胶塞向下运动的情况，造成染料从泄漏处进入针筒内部的量减少，导致灵敏度降低。而优化后处理措施可防止推杆上下移动，达到固定胶塞的目的。



A—USP 42 等方法；B—方法①；C—方法②。

图 3 药典方法、方法①、方法②的结果图（西林瓶）

Fig.3 Results of Pharmacopoeial Method, Method ① and Method ② (Vials)

2.4.2　灵敏度验证结果

2.4.2.1　预灌封注射器包装系统

不同泄漏孔径的预灌封注射器包装系统的灵敏度验证结果如图 4 所示，可见阴性对照容器内均无蓝色液体渗入，阳性对照②容器内均有蓝色液体渗入。不同泄漏孔径的样品阳性对照①的检出结果如表 4 所示。

孔径 5.0 ～ 10.0 μm 的样品阳性检出率为 96.7 % ～ 100.0 %，孔径 10.0 ～ 15.0 μm 的样品阳性检出率为 100.0 %。由此可见，色水法检测预灌封注射器包装系统密封性的灵敏度为 10.0 ～ 15.0 μm。



图 4　不同泄漏孔径的预灌封注射器包装系统的检测结果

Fig.4　Detection Results of the Prefilled Syringe Packaging Systems with Different Leak Sizes

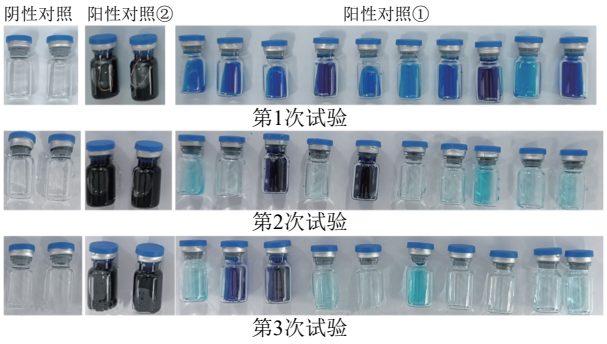


图 5 西林瓶包装系统检测结果

Fig.5 Test Results of Vial Packaging System

2.4.2.2 西林瓶包装系统

西林瓶包装系统（阳性对照①样品的泄漏孔径：10.0 ～ 15.0 μm）灵敏度的验证结果如图 5 所示，阴性对照容器内均无蓝色液体渗入，阳性对照②容器内均有蓝色液体渗入。阳性对照①的检出结果如表 5 所示。（泄漏孔径为 5.0 ～ 10.0 μm 的西林瓶包装系统的灵敏度验证结果与“**2.3.2.2**”项下方法②的结果相同。）

泄漏孔径 5.0 ～ 10.0 μm 样品的阳性检出率为 80.0%～ 93.3%，孔径 10.0 ～ 15.0 μm 的样品阳性检出率为 100.0%。可见，色水法检测西林瓶包装系统密封性的灵敏度为 10.0 ～ 15.0 μm。

3 讨论

本研究采用色水法测试了预灌封注射器包装系统和西林瓶包装系统的密封性，参数设置为：真空度 0.086 MPa、负压保持时间 60 min、染料为 0.1% 亚甲基蓝溶液；常压放置时间 30 min。测试结果表明，对于由 1 mL 预灌封注射器组合件、氯化丁基橡胶塞和 1 mL 推杆组合成的预灌封注射器包装系统和由 1 mL 中硼硅玻璃管制注射剂瓶、溴化丁基橡胶塞和铝塑组合盖组成的西林瓶包装系统，该方法能够可靠、有效地检测密封性能，灵敏度为 10.0 ～ 15.0 μm。

周浩等[5]在研究色水法包装系统密封性的策略时提出，以胶塞、螺旋软帽、螺旋硬帽等弹性体作为包装组件时，需关注测试压力是否会使弹性体发生形变或移动。为防止预灌封注射器包装系统的胶塞移动，本研究改进了处理方式，发现阳性检出率增大。

增大压差条件可使痕量液体侵入，延长染液浸没时间可以使通过泄漏路径的染液体积增大[5]。USP、EP 和国际标准化组织对于色水法中的真空度、负压保持时间、常压保持时间等参数都有明确规定。本研究在上述方法的参数基础上，通过增大真空度、延长负压保持时间，提高了方法的灵敏度。

色水法作为一种概率性方法，试验过程中的诸多因素都会影响其灵敏度，主要影响因素有：①色水法试验条件（染色剂种类、浓度、真空度 /

表 4 不同泄漏孔径样品的阳性检出结果（预灌封注射器）

Tab.4 Positive Detection Results for the Samples with Different Leak Sizes (Prefilled Syringes)

泄漏孔径 /μm	试验次数	阳性对照①数量 / 支	蓝色液体渗入的容器数量 / 支			平均检出率 /%
			实验人员甲	观察人员乙	观察人员丙	
5.0 ～ 10.0	1	10	10	10	10	100.0
	2	10	10	10	10	100.0
	3	10	10	9	10	96.7
10.0 ～ 15.0	1	10	10	10	10	100.0
	2	10	10	10	10	100.0
	3	10	10	10	10	100.0

表 5 样品阳性检出结果（西林瓶）

Tab.5 Positive Detection Results of the Samples (Vials)

泄漏孔径 /μm	试验次数	阳性对照①数量 / 支	蓝色液体渗入的容器数量 / 支			平均检出率 /%
			实验人员甲	观察人员乙	观察人员丙	
10.0 ～ 15.0	1	10	10	10	10	100.0
	2	10	10	10	10	100.0
	3	10	10	10	10	100.0

保持时间、压力 / 保持时间）；②目视法检测人员对颜色的敏感度等主观因素；③制剂的特点（包材的颜色，制剂的颜色、规格、成分、黏稠度等）[6]。为排除因人员对颜色敏感度不同造成的结果判断差异，本研究设计了由不同人员、重复测试 3 次的方式。

色水法作为一种测试成本低、操作维护简单的传统泄漏检测方法，已被国内企业普遍使用 [7]。但该法存在一定的局限性，如制剂的颜色、规格、成分、黏稠度等均会影响其灵敏度，在进行色水法的验证时应充分考察制剂的特点。

常晓强等 [6] 考察色水法、真空衰减法及微生物挑战法在密封性测试中的应用时，将色水法参数设置为：真空度 0.025 MPa、负压保持时间 30 min、染料为 10% 亚甲基蓝溶液、常压放置时间 30 min。该法对孔径为 3、5、10 μm 的 2 mL 西林瓶样品的阳性检出率分别为 22%、47%、93%。可见，该法在 USP、EP 国际标准化组织推荐方法的参数基础上，提高了染色液的浓度，所得的检测灵敏度优于本研究方法的灵敏度。本研究中染色液浓度采用了法规方法的推荐浓度，后续可继续考察染色液浓度对色水法灵敏度的影响。

参考文献：

[1] 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]．[2023-07-01]．https://amr．hainan．gov．cn/himpa/HICDME/zdyz/yp/202302/t20230209_3357656．htmL,2020．10．21/2022．10．09．

[2] 郭涤亮，董武军，马骏威，等．《美国药典》<1207> 无菌药品包装系统密封性评估的介绍与解读 [J]．中国新药杂志，2021, **30**(10)：880-885．

[3] 姚　琳，咸富荣，张芳芳．质量提取法测试西林瓶包装系统密封性 [J]．中国医药工业杂志，2022, **53**(7)：1013-1017．

[4] ISO．Elastomeric parts for parenterals and for devices for pharmaceutical use．Part 5: functional requirements and testing <8871-5> [S]．2016．

[5] 周　浩，王　欢，张士博，等．色水法包装系统密封性研究策略 [J]．中国药学杂志，2022, **57**(15)：1293-1296．

[6] 常晓强，刘海鹏，智晓日．色水法、真空衰减法及微生物挑战法在密封性测试中的研究分析 [J]．计量与测试技术，2022, **49**(11)：23-25．

[7] 封二飞，张筱宜，赵　明．无菌药品容器密封完整性检测方法对比研究 [J]．中国药业，2021, **30**(14)：51-54．

（上接第 1120 页）

Trimethoprim crystal forms [J]．*J Pharm Pharmacol*, 1976, **28**(1)：87-88．

[21] BETTINETTI G P, GIORDANO F, MANNA A L．Polymorphism of trimethoprim Ⅰ．Preparation of polymorph modifications（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ）and of a hydrate（TMP·H_2O）[J]．*Boll Chim Farm*, 1978, **117**(9)：522-529．

[22] MADDILETI D, SWAPNA B, NANGIA A．Tetramorphs of the antibiotic drug trimethoprim: characterization and stability [J]．*Cryst Growth Des*, 2015, **15**(4)：1745-1756．

[23] SUI J J, LUO Y, ZHAI J H, *et al*．Solubility measurement, model evaluation and molecular simulations of aprepitant（form Ⅰ）in eight pure solvents [J]．*J Mol Liq*, 2020, **304**: 112723．

[24] LOU B, XU Y, QIN X L, *et al*．Solubility measurement and molecular simulation of unsolvated and solvated estrogen receptor agonist（*R*）-equol in binary solvents（alcohols+*n*-heptane）from 273.15 K to 333.15 K [J]．*J Mol Liq*, 2023, **376**: 121460．