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

王　妮，黄思嘉，王　静，张芳芳*
（上海市食品药品包装材料测试所，上海 201203）

摘要：考察了微生物挑战法和色水法对中性硼硅玻璃管制注射剂瓶容器密封完整性的关联并进行比较分析。微生物挑战法是将密封、灭菌后的空包装系统浸入高浓度铜绿假单胞菌的菌悬液中，施加特定压力驱动并保持 4 h，取出后于 33 ℃培养 7 d；色水法是将密封后的空包装系统浸没于 10%亚甲基蓝水溶液中，放入真空箱中抽至 75 kPa 并保持 30 min，恢复常压后继续浸没 30 min，取出，冲洗，目视检查。结果显示，微生物挑战法和色水法对 1、3、5、10 μm 孔径的打孔样品阳性检出率分别为 0、30%、40%、100%和 0、0、4.5%、15%；10%阳性检出率的灵敏度分别为 2.2、8.3 μm。说明对于注射剂瓶包装，微生物挑战法的灵敏度略优于色水法，为容器密封完整性的方法开发和比较分析提供了参考。

关键词：容器密封完整性；最大允许泄露限度；微生物挑战法；色水法；亚甲基蓝
中图分类号：R95　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)02-0246-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.02.012

Integrity of Sealed Injection Bottle Container: Correlation and Comparative Analysis of Microbiological Challenge Test and Dye Ingress Method

WANG Ni, HUANG Sijia, WANG Jing, ZHANG Fangfang*
(*Shanghai Food and Drug Packaging Material Control Center, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The correlation between the microbiological challenge test and dye ingress method on the sealing integrity of the neutral borosilicate glass controlled injection bottle container was investigated and compared. The microbiological challenge test included immersion of the sealed and sterilized empty packaging system in a suspension of high concentration of *Pseudomonas aeruginosa*, and driving a specific pressure for four hours. After taking it out, it was cultured at 33 ℃ for seven days. The dye ingress method was to immerse the sealed empty packaging system in a 10% methylene blue aqueous solution, then put it in a vacuum chamber with the pressure of 75 kPa for 30 min. After returning to normal pressure, it was immersed in the methylene blue solution again for 30 min, then after flushing, it was inspected visually. The results showed that the positive detection rates of microbiological challenge test and dye ingress method for punched samples with 1, 3, 5, and 10 μm pore size were 0, 30%, 40%, 100% and 0, 0, 4.5%, 15%, respectively. The sensitivities of the 10% positive detection rate were 2.2 and 8.3 μm, respectively, which indicated that the sensitivity of the former method was slightly better than that of the latter for injection bottle packaging. It was hoped to provide a reference for method development and comparative analysis of container seal integrity.

Key Words: container seal integrity; maximum allowable leakage limit; microbiological challenge test; dye ingress method; methylene blue

收稿日期：2021-04-06
基金项目：国家药典委员会药包材密封性完整性指导原则课题项目(2019Y04)
作者简介：王　妮(1993—)，女，工程师，从事药包材的理化研究。
通信作者：张芳芳(1981—)，女，高级工程师，从事药包材质量研究与开发。
E-mail：zhangfangfang@shpmcc.com

无菌产品容器密封完整性是无菌制剂研究和评价中的一项重点关注内容，是贯穿无菌产品整个生命周期的关键整合组件。美国药典 (USP 43)<1207>中将容器密封完整性定义为包装系统能够防止内容物损失、阻止微生物侵入，以及限制有害气体或其

他物质进入，从而确保产品符合所有必要的安全和质量标准。近年来，国内外对无菌药品的质量和安全性能的重视程度日益增加，为避免药品包装容器密封性缺失引发的相关药害事件，国内陆续出台了一系列监管要求和法规指南以规范无菌产品容器密封完整性的研究验证及生命周期管理。生产质量管理规范（GMP）2010 版中也明确规定，无菌药品包装容器的密封性应经过验证，以避免产品遭受污染 [1]。

化学药品注射剂瓶是一种无菌药物容器封闭系统，其理化及微生物屏障特性由容器密封完整性测试检测。容器密封完整性测试的核心目标是确定无菌产品的最大允许泄漏限度（maximum allowable leakage limit，MALL），即在该泄漏限度下，不会对产品安全和质量造成任何风险。GMP 2010 版中容器密封完整性验证方法包括微生物挑战法、饱和盐水法、色水法（又称亚甲基蓝溶液法）、高压电检漏和全自动灯检仪法 [1]，此外还有质量提取法、真空衰减法、激光顶空气体分析法和气体示踪法等 [2]，一般将微生物挑战法与另一方法进行比较分析，以同时保证产品的微生物属性和理化特性 [3]。

本研究主要考察了微生物挑战法和色水法检测中性硼硅玻璃管制注射剂瓶容器密封完整性的关联性，并进行比较分析，以期为容器密封完整性的方法开发和比较分析提供思路。

1 仪器与试药

UV-1800 型紫外 - 可见分光光度计［岛津仪器（苏州）有限公司］。

0.9％氯化钠注射液（华润双鹤药业股份有限公司，批号 S202011106）；亚甲基蓝（国药集团化学试剂有限公司，含量≥ 82.0％，批号 20130917）；胰酪大豆胨液体培养基（TSB，上海中科昆虫生物技术开发有限公司，批号 MZK002/180412）。

激光打孔样品（自制，在中硼硅玻璃注射剂瓶瓶身中部激光打孔，孔径通过流量计进行验证，制得孔径为 1、3、5、10 μm 的打孔样品各 10 支）。

铜绿假单胞菌［中国食品药品检定研究所，CMCC（B）10104］。

2 方法与结果

2.1 微生物挑战法

2.1.1 TSB 的配制

精密称量 TSB 30.0 g，加入纯化水 1 000 ml，加热煮沸、搅拌，直至完全溶解，调节 pH 使灭菌后在 25 ℃的 pH 值为 7.3±0.2，再于 121 ℃湿热灭菌 15 min 后，备用。

2.1.2 菌悬液的制备

接种铜绿假单胞菌的新鲜培养物至 TSB 10 ml 中，于 33 ℃培养 24 h，取菌悬液 1 ml 加至 TSB 100 ml 中，于 33 ℃培养 24 h，用 0.9％氯化钠溶液稀释 10 倍，计数后备用。计数得菌液浓度为 7×10^8 cfu/ml。

2.1.3 培养基验证

取 2 支已灭菌的 TSB 各 10 ml，分别接种小于 100 cfu 的铜绿假单胞菌，置 33 ℃培养 5 d，逐日观察结果。结果显示，在 5 d 的培养期内，接种铜绿假单胞菌的 TSB 全部生长良好，且空白对照无菌生长。

取 5 支已灭菌的 TSB 各 10 ml，置 33 ℃培养 14 d，逐日观察结果，结果显示 14 d 内均无菌生长。

2.1.4 样品制备

激光打孔阳性样品：将中性硼硅玻璃管制注射剂瓶不同孔径的激光打孔样品与配套铝塑组合盖、卤化丁基橡胶塞组合压盖，于 121 ℃湿热灭菌 30 min。灭菌处理后，将激光打孔样品空瓶浸入铜绿假单胞菌悬液（≥ 1×10^7 cfu/ml）中，菌悬液的液面应高于激光打孔样品的打孔位置，加压浸泡 4 h 后取出。用无菌棉球擦干注射剂瓶外残余的菌悬液，再用 75％乙醇棉球消毒外表面 3 次后，打开铝塑组合盖，用无菌注射器向激光打孔样品中注入 TSB，使液面高于样品上的打孔位置，用封口膜将瓶口进行密封处理后，于 33 ℃培养 7 d。

阴性对照样品：将中性硼硅玻璃管制注射剂瓶与配套铝塑组合盖、卤化丁基橡胶塞组合压盖，于 121 ℃湿热灭菌 30 min，加入 TSB，使液面高于瓶身中部，于 33 ℃培养 7 d。

阳性对照样品：将中性硼硅玻璃管制注射剂瓶与配套铝塑组合盖、卤化丁基橡胶塞组合压盖，于121 ℃湿热灭菌 30 min，加入 TSB，使液面高于瓶身中部，再接种小于 100 cfu 的铜绿假单胞菌，于33 ℃培养 7 d。

2.1.5 试验结果

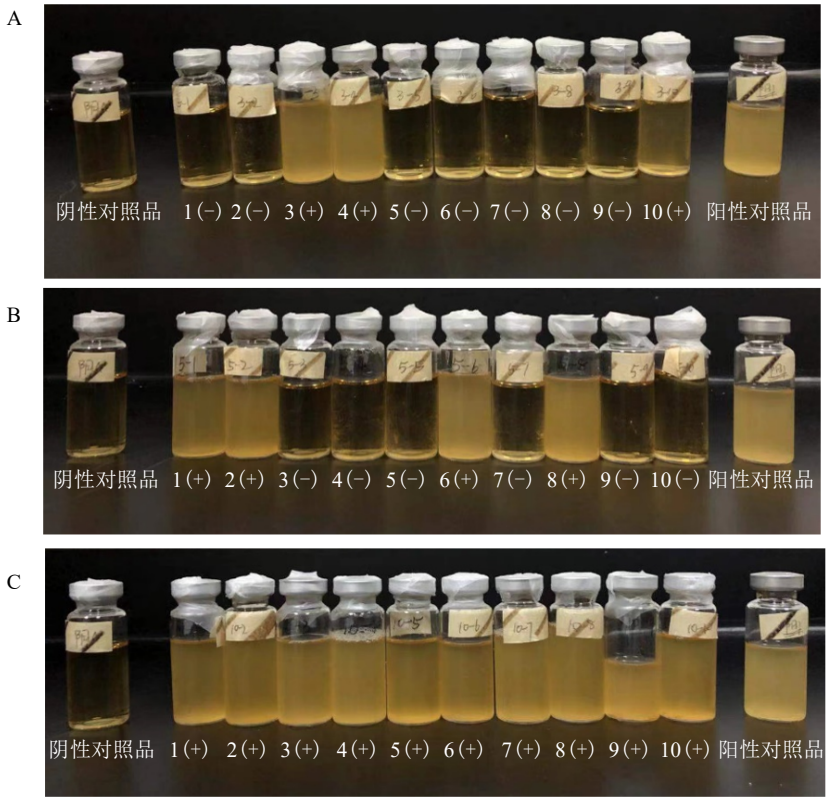
在 7 d 的培养期内对激光打孔阳性样品、阴性对照样品、阳性对照样品进行观察和记录，有菌生长的记为阳性，无菌生长的记为阴性。结果见图 1，微生物挑战法对 1、3、5、10 μm 孔径的激光打孔样品的阳性检出率分别为 0、30%、40%、100%。

2.1.6 微生物挑战法的阳性验证

参照《食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验方法》（GB 8538—2016）中铜绿假单胞菌项下检查方法[4]，利用铜绿假单胞菌悬液在紫外灯照射下呈蓝绿色荧光的特性[5—6]，对显阳性的激光打孔样品中生长的菌进行鉴定。结果显示，这些样品均在紫外灯下呈现蓝绿色荧光，表明其中生长的菌为铜绿假单胞菌，详见图 2。

2.1.7 微生物挑战法的统计分析

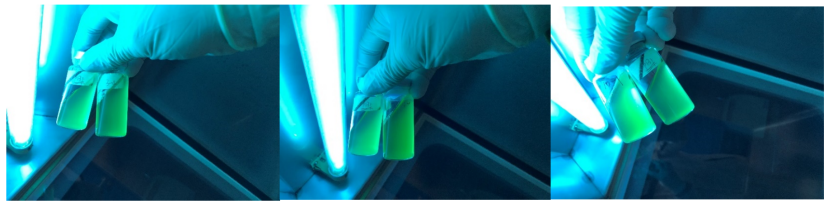
本试验检测了不同孔径的激光打孔样品在规定培养时间内是否有菌生长，定义阳性结果的因变量取值为 1，阴性结果取值为 0，阳性检出率记为 P。使用二项 Logistic 回归模型，以 Logit(P) 为纵坐标、孔径大小 x 为横坐标进行拟合，通过对数据结果的统计分析，得出函数 Logit(P) =0.788x − 3.915，即 $P=\frac{e^{(0.788x-3.915)}}{1+e^{(0.788x-3.915)}}$，并绘制其二分类逻辑回归线性图，具体见图 3。根据预测模型可知，样品孔径越小，样品呈现阳性的概率越小。USP 43<1207> 中规定微生物挑战试验的检测限（10%阳性检出率灵敏度）为阳性检出率为 10%时的孔径大小。根据统计分析，当阳性检出率为 10%时，P=0.1，得到 x=2.18，即孔径大小为 2.2 μm。



A：3 μm 激光打孔样品，B：5 μm 激光打孔样品，C：10 μm 激光打孔样品

图 1　激光打孔样品经 7 d 培养的结果图

Fig.1　Seven-day Incubation Results of Laser Drilled Samples



A B C

A：左瓶是阳性对照品、右瓶是 3 μm 激光打孔样品 4，B：左瓶是阳性对照品、右瓶是 5 μm 激光打孔样品 8，C：左瓶是 10 μm 激光打孔样品 1、右瓶是阳性对照品

图 2 激光打孔样品阳性验证图

Fig.2 Verification Test Results of Laser Drilled Samples

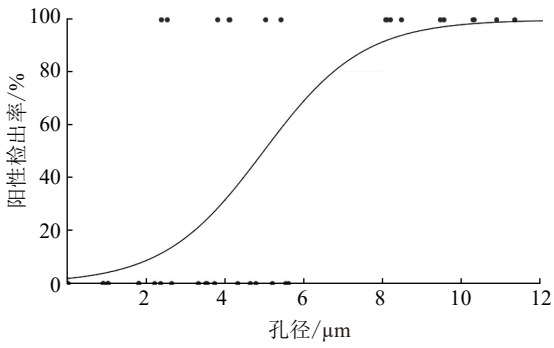


图 3 微生物挑战法中孔径大小与阳性检出率的二分类逻辑回归图

Fig.3 Binary Logistic Regression Analysis between Pore Diameter and Positive Detection Rate of Microbiological Challenge Method

2.2 色水法

2.2.1 试验方法及结果

2.2.1.1 样品制备

激光打孔阳性样品：取中性硼硅玻璃管制注射剂瓶不同孔径的激光打孔样品，注入高于打孔位置的纯化水后，与配套铝塑组合盖、卤化丁基橡胶塞组合压盖。

阴性对照品：取中性硼硅玻璃管制注射剂瓶空白样品，注入高于打孔位置的纯化水后，与配套铝塑组合盖、卤化丁基橡胶塞组合压盖。

2.2.1.2 试验步骤和结果

取中性硼硅玻璃管制注射剂瓶不同孔径（1、3、5、10 μm）的激光打孔样品和阴性对照品各 10 支，放入含有 10%亚甲基蓝水溶液的带抽气装置的容器中，亚甲基蓝溶液的液面高度应高于打孔位置，减压至真空度 75 kPa，维持 30 min，待真空装置恢复至常压，再放置 30 min，取出，用水冲洗瓶外壁，目视亚甲基蓝溶液的渗入情况[7]。每个样品重复测量 3 次，统计 3 次检出泄漏的数量和未检出泄漏的数量，并计算阳性检出率。结果显示，色水法对 1、3、5、10 μm 孔径的激光打孔样品的阳性检出率分别为 0、0、4.5%、15%。

2.2.2 色水法阳性结果验证

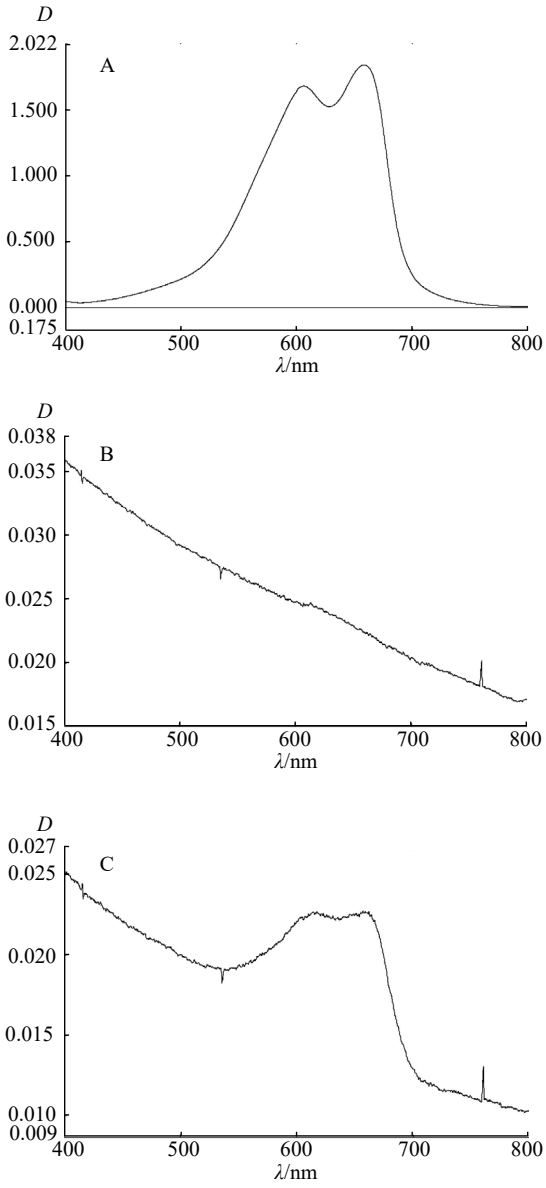
亚甲基蓝的可见光区特征吸收峰在 615 和 664 nm 处，其中 664 nm 为最大吸收峰[8]。本试验通过对比激光打孔样品溶液与阳性对照的紫外 - 可见吸收图谱来验证阳性结果，具体结果见图 4。

2.2.3 色水法统计分析

按“**2.1.7**”项下方法使用二项 Logistic 回归模型，得出函数 Logit(P) =0.454x - 5.961。将其变换成以阳性检出率 P 为纵坐标，孔径大小 x 为横坐标的函数，即 $P=\frac{e^{(0.454x-5.961)}}{1+e^{(0.454x-5.961)}}$，并绘制其二分类逻辑回归线性图，见图 5。当阳性检出率为 10%时，P=0.1，得到 x=8.29，即孔径大小为 8.3 μm。

2.3 微生物挑战法与色水法的比较

本研究的注射剂瓶包装系统采用微生物挑战法和色水法进行容器密封完整性方法验证。结果显示，微生物挑战法和色水法试验中，随着孔径的增加，阳性检出率均增加，注射剂瓶包装采用色水法时 10%阳性检出率的灵敏度为 8.3 μm，微生物挑战法的 10%阳性检出率的灵敏度为 2.2 μm。因此，对于注射剂瓶包装，微生物挑战法的灵敏度略优于



A：亚甲基蓝阳性对照，B：阴性结果，C：阳性结果

图 4　色水法的紫外 - 可见吸收图谱

Fig.4　UV-Vis Absorption Spectra of Dye Ingress Method

色水法。

2.4　微生物挑战法和色水法的关联分析

经二项 Logistic 回归模型统计分析得到微生物挑战法的孔径大小和阳性检出率的关系为 Logit(*P*) =0.788*x* – 3.915，色水法为 Logit(*P*) = 0.454*x* – 5.961。将微生物挑战法的阳性检出率作为 *y* 轴，将色水法的阳性检出率作为 *x* 轴，绘制微生物挑战法和色水法的阳性检出率的相关性图形，详见图 6，得相关系数为 0.791 0，说明微生物挑战法和色水法具有一定的相关性。

3　讨论

3.1　微生物挑战法菌株选用铜绿假单胞菌的原因

USP 43<1207.2> 对微生物挑战法菌株的选择依据表述为：小型且具有运动性的微生物比较适合该挑战试验，例如缺陷短波单胞菌和黏质沙雷菌。GMP 2010 年版“微生物侵入试验法验证密封完整性”项下，推荐菌株包括大肠埃希菌、铜绿假单胞菌或黏质沙雷菌 [1]。《中华人民共和国药典》2020 年版 1421 灭菌法过滤除菌法验证中，常用的挑战微生物为缺陷短波单胞菌。铜绿假单胞菌，是一种

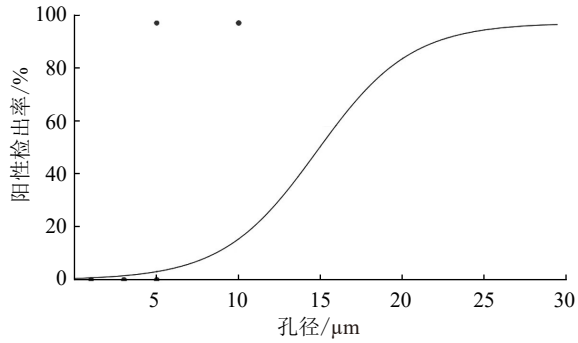


图 5　色水法中孔径大小与阳性检出率的二分类逻辑回归图

Fig.5　Binary Logistic Regression Analysis between Pore Diameter and Positive Detection Rate of Dye Ingress Method

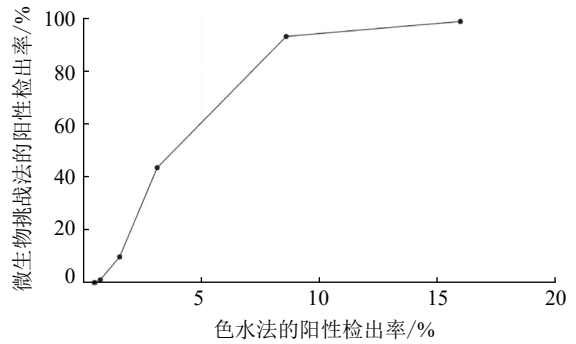


图 6　微生物挑战法和色水法的相关图

Fig.6　Correlation between Microbiological Challenge Method and Dye Ingress Method

非发酵革兰阴性菌，菌体大小为 (1.5 ～ 5.0) μm×(0.5 ～ 1) μm，菌体细长且长短不一，呈球杆状或线状，有单鞭毛和荚膜，无芽孢，在暗视野显微镜下观察可见细菌运动活泼 [9—10]，符合上述 3 种标准中对微生物挑战法菌株的表述，因此本次试验选择该菌株作为考察注射剂瓶微生物侵入能力的挑战菌株。

3.2 色水法测试结果原因分析

在本次关联试验中发现，对于本次研究的注射剂瓶包装，微生物挑战法的灵敏度和阳性检出率略高于色水法，且色水法检测结果的重复性较差、差异性较大，其原因可能是因为色水法检测环节较多，具有不可预期性和不可控性 [2]。色水法包括示踪液体与漏孔的接触、示踪液体的侵入和示踪剂的扩散等环节 [2]，及抽真空、平衡、测试周期 3 个泄漏测试阶段 [11]。USP 43<1207.1> 中将激光打孔样品的孔径假设为泄漏路径长度可以忽略不计的小孔，但实际试验中小孔从侧面看仍具有一定长度。在试验过程中，发现注射剂瓶内溶液在未减压条件下便有液体从泄漏通道渗出，详见图 7（采用反向示踪法），但试验结果并未呈现阳性，可能与减压条件、亚甲基蓝水溶液浓度及泄漏路径情况有关。

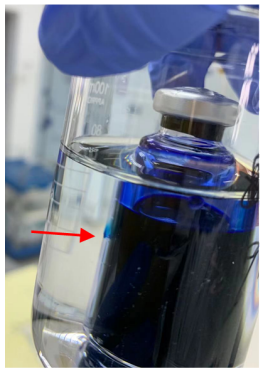
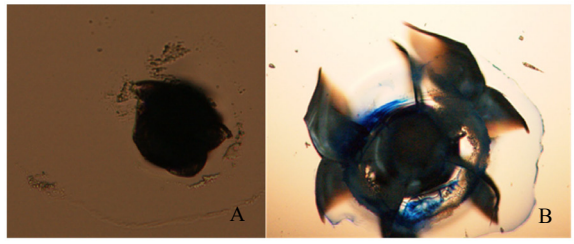


图 7 激光打孔样品泄漏通道示意图

Fig.7 Schematic Leak Pathway of Laser Drilled Sample

3.3 不同打孔工艺对色水法结果的影响

在本次注射剂瓶容器密封完整性测试中，微生物挑战法和色水法的对比分析试验采用同一批次、同种打孔方式、同一厂家的激光打孔样品。同时，本研究也对不同打孔方式、不同厂家的激光打孔样品进行对比研究。通过观察打孔形态发现，激光打孔样品 1，内外瓶壁目视正面观均为近似圆形的小孔；激光打孔样品 2，内外瓶壁则均为带有微裂纹的孔，目视观测其直径比激光打孔样品 1 直孔大，但相同孔径的激光打孔样品 1 和 2 的流量计量是一致的。光学显微镜下观察发现，激光打孔样品 1 的孔洞为近似圆形、边缘较连续的微孔，激光打孔样品 2 则类似蛛网形，详见图 8。色水法试验中发现，孔径 5 μm 的激光打孔样品 2 的阳性检出率为 33.3%，孔径 10 μm 的阳性检出率为 100%；激光打孔样品 1 则分别为 4.5%和 15%。其原因可能为由于边缘光滑连续的微孔液体表面张力较大，即使在常压或减压状态下瓶内液体有流出，在恢复常压后，亚甲基蓝溶液仍无法通过孔径进入瓶内。未来进一步试验可能采用微管形式阳性样品进行对比研究。



A：激光打孔样品 1，B：激光打孔样品 2

图 8 激光打孔样品显微照片

Fig.8 Micrographs of Laser Drilled Samples

3.4 容器密封完整性评价方法的选择

目前，国内包装系统密封完整性的研究尚处于起步阶段。USP 43<1207.2> 列举了 10 种密封完整性检测方法，本次试验所选用的微生物挑战法和色水法均为破坏性方法和概率性方法，结果发现对于注射剂瓶包装，色水法试验结果无法与微生物挑战法一一对应，重复性和耐用性也较差。其他包装系统密封完整性测试，例如质量提取法、真空衰减法、高压放电法、真空氦检法（真空示踪气体）和顶部空间气体分析方法也广受业内认可和推崇 [12—15]。USP 43<1207.2> 认为每种方法都各有其检测范围、

灵敏度和特异性，在实际应用中要根据注射剂内容物、包装材料和密封机制选用合适的检测方法，且方法参数会在试验进程和验证中不停地被优化，因此需要针对不同的包装系统选择最适宜的研究及质量控制方法。但当其他关键方法选择标准允许时，确定性方法将优于概率性方法。注射剂瓶密封完整性的最终目的是防止生物侵入、内容物损失及其他物质有害物质进入，因此为保证理化属性和微生物特性，建议所选用的方法应当与微生物挑战法进行关联，同时采用定量的方法进行质量控制。

参考文献：

[1] 国家食品药品监督管理总局药品认证管理中心．药品生产质量管理规范(2010年修订)[S]．北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[2] 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): 5-11.

[3] 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)[2021-04-01]．https://www．cde．org．cn/main/news/viewInfoCommon/8a4f9f16844fbed617f8e8ed59485c1d.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会．食品国家安全标准饮用天然矿泉水检验方法: GB 8538—2016[S]．北京: 中国标准出版社, 2016.

[5] 田　浩, 李光耀, 张　凡, 等．饮用水中铜绿假单胞菌检测结果的不确定度评定[J]．现代食品, 2021, (3): 206-209.

[6] 韦　云, 陈佩虹, 周　露．矿泉水中铜绿假单胞菌的测定能力验证结果分析[J]．食品安全质量检测学报, 2020, **11**(16): 5398-5402.

[7] 注射用无菌粉末用卤化丁基橡胶塞: YBB00052005-2015[S]．2015.

[8] 张　珏, 王建塔, 汤　磊．亚甲基蓝的结构解析[J]．临床医药实践, 2010, **19**(7): 941-943.

[9] 徐　涵, 潘　超, 黄　竞, 等．铜绿假单胞菌*waaL*突变体构建及糖基化系统的建立[J]．生物技术通讯, 2020, **31**(6): 634-640.

[10] 赵　妮, 柯　俊, 汪宏良, 等．铜绿假单胞菌感染的药物治疗进展[J]．国际检验医学杂志, 2016, **37**(14): 1982-1984.

[11] WARNE N W, MAHLER H C. Challenges in protein product development [M]. Basel: Springer International Publishing AG, 2018: 270-272.

[12] 王冬伟, 张　磊, 张祥龙, 等．真空衰减法测试西林瓶药品包装的密封完整性[J]．中国药事, 2020, **34**(5): 589-595.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.