低 pH 病毒灭活容器的验证与讨论

孟学科[1#]，尹云云[2#]，麻银林[1]，郭雪松[2]，杨晓东[2*]

（1. 甘肃省药品监督管理局，甘肃兰州 730070；2. 国药集团兰州生物制药有限公司，甘肃兰州 730046）

摘要：该研究的目的是全面考察低 pH 病毒灭活容器的在线清洁效果、密封性、无菌性、热穿透性及热稳定性。通过检测在线清洁后淋洗水水样的各项指标，证明清洁效果；通过保压试验验证密封性；通过培养基模拟灌装以及过程温度控制试验证明无菌性、热穿透性和热稳定性。结果表明，清洁后检测淋洗水样，其可见异物、pH 值、电导率、细菌内毒素、微生物限度、蛋白吸光度的检测结果均符合要求；低 pH 病毒灭活容器的保压测试合格；模拟除菌培养基于（24±1）℃下放置 21 d，模拟病毒灭活，其间罐温稳定在（24.0±0.2）℃，无菌性、热穿透性及热稳定性良好。上述结果说明该低 pH 病毒灭活容器符合生产要求，可确保病毒灭活过程的可靠性。该研究为低 pH 病毒灭活容器的 GMP 和工艺要求验证提供了参考。

关键词：生物制品；低 pH 病毒灭活；容器；验证；风险管理

中图分类号：Q93-334；TQ464.56　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2025）01-0109-04

引用：孟学科 , 尹云云 , 麻银林 , 等. 低 pH 病毒灭活容器的验证与讨论［J］. 中国医药工业杂志 , 2025, 56（1）: 109-112.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.01.013

Verification and Discussion of Containers for Low pH Viral Inactivation

MENG Xueke[1#], YIN Yunyun[2#], MA Yinlin[1], GUO Xuesong[2], YANG Xiaodong[2*]

（*1. Gansu Medical Products Administration, Lanzhou 730070; 2. Sinopharm Lanzhou Biopharmaceuticals Co., Ltd., Lanzhou 730046*）

ABSTRACT: The aim of this study was to comprehensively investigate the online cleaning effectiveness, integrity, sterility, thermal penetration, and thermal stability of the containers for low pH viral inactivation. The cleaning effectiveness was demonstrated by investigating the indicators of the rinsing water samples after online cleaning; the sealing performance was verified by pressure holding experiments; the sterility, thermal penetration and thermal stability were proved through simulated filling of the culture medium and the process temperature control tests. The results showed that after cleaning, the visible particles, pH value, conductivity, bacterial endotoxin, microbial limit and protein absorbance all met the requirements. The pressure-holding test of the low pH virus inactivation container was qualified. And the simulated sterilization culture medium was placed at（24±1）℃ for 21 days for simulating the virus inactivation. During the examination period, the tank temperature was stable at（24.0±0.2）℃ , indicating good sterility, thermal penetration and thermal stability. These results indicated that the containers for low pH viral inactivation met the production requirements and could ensure the reliability during the viral inactivation process. This study provided a reference for the validation of GMP and process requirements of the containers for low pH viral inactivation.

Key Words: biological product; low pH viral inactivation; container; verification; risk management

《血液制品去除 / 灭活病毒技术方法及验证指导原则》（国药监注［2002］160 号）中指出，为了提高血液制品安全性，生产工艺要具有一定的去除 / 灭活部分病毒能力，生产过程中应有特定的去除 / 灭活病毒方法[1]。病毒灭活 / 去除是生物制品病毒安全性控制手段之一。多数药品监管部门均要求生物制药企业适当地隔离制造过程，以降低来自生产工艺

对文章贡献等同。

收稿日期：2024-06-27

基金项目：甘肃省省级科技计划项目（2022GSMPA0029）

作者简介：孟学科（1972—），男，硕士研究生，专业方向：药品、医疗器械、化妆品现场检查及技术审评。

尹云云（1996—），男，医学生物工程师（中级），从事血液制品生产工作。

通信作者：杨晓东（1969—），男，高级工程师，从事血液制品生产管理工作。

E-mail：yangxiaodong@sinopharm.com

步骤、产品批次的残留污染以及同一工厂生产的不同产品间交叉污染的风险[2]，因此衍生了不同的病毒灭活 / 去除工艺和隔离策略。在生产制造过程中，隔离容器作为关键基础设备，其性能确认和风险点评估是质量控制中不可忽视的重点。低 pH 病毒灭活罐是静注人免疫球蛋白（pH 4）生产的关键设备之一，通常要求罐内制品在（24±1）℃温度下恒温孵放不少于 21 d[3]。本研究对低 pH 病毒灭活容器（罐）的清洁效果、密封性、无菌性、热穿透性及热稳定性进行验证，以确认低 pH 病毒灭活容器符合 GMP 和工艺要求。

1　仪器与试药

200 型低 pH 病毒灭活罐（材质 S31603；有效容积 200 L）购自成都英德生物医药装备技术有限公司；UV-1800 型紫外 - 可见分光光度计（日本 Shimadzu 公司）；SevenExcellence S470-B 型多参数检测仪（美国梅特勒 - 托利多公司）；卫生型隔膜压力表（精度等级为 1.6 级，上海布雷迪仪器仪表有限公司）；ASMPS107SP 型除菌滤芯（杭州科百特过滤器材有限公司，0.45/0.2 μm）；DK-8B 型电热恒温水浴箱（上海精宏实验设备有限公司）。

胰酪胨大豆液体培养基（TSB，德国默克公司，批号 VM754559 644）；鲎试剂（湛江安度斯生物有限公司，规格为每支 0.25 EU/mL，批号 2011132）；pH 标准液（4.01、7.00、9.21）均购自美国梅特勒 - 托利多公司。

2　方法与结果

2.1　设备确认

设备确认包括安装确认（installation qualification，IQ），确认仪器文件、部件及安装过程；运行确认（operational qualification，OQ），确认仪器在空转状态下，在操作的极限范围内能作正常运转；性能确认（performance qualification，PQ），确认仪器在载样运行状态下是否符合标准规定。结果显示，关键的部件得到正确安装，符合设计文件要求。在实际操作条件下，按照工艺过程和质量控制要求进行试验，设备性能满足生产需求和质量管理部门的要求。

2.2　验证方法

2.2.1　低 pH 病毒灭活罐在线清洁的验证

配制质量浓度为 3% 的 TSB 10 L，均匀涂抹在低 pH 病毒灭活罐的内表面，模拟制品转出后低 pH 病毒灭活罐的未清洁状态，放置 12 h 后，进行低 pH 病毒灭活罐的在线清洁（clean in place，CIP），并手动冲淋清洁难点（包括罐顶、进液阀、出液阀、温度监测孔等），收集最后的淋洗水。按照 ChP 2020 年版要求，对可见异物（三部通则 0904）、pH 值（三部通则 0631）、细菌内毒素（三部通则 1143）、微生物限度（三部通则 1105）、蛋白吸光度（三部通则 0401）、电导率（四部通则 0681）进行检测。

低 pH 病毒灭活罐清洁后淋洗水的检测结果如表 1 所示。低 pH 病毒灭活罐经过 CIP 后，目检罐体内无可见的残留物，淋洗水中可见异物、pH 值、电导率、细菌内毒素、微生物限度、吸光度均符合要求。

2.2.2　低 pH 病毒灭活罐的密封性试验

通过保压测试进行密封性试验。将低 pH 病毒灭活罐进行组装并安装压力表，然后密闭低 pH 病毒灭活罐的进液口、清洗口、出液口、取样口。将洁净压缩空气注入罐内，当罐内压力达到设计压力（0.09 MPa）时，停止注入压缩空气，密闭进气阀门，记录罐内起始压力。之后，每 1 h 记录 1 次罐内压力，8 h 时记录罐内最终压力，并计算压力衰减情况，以证明低 pH 病毒灭活罐的密封性符合要求。

结果显示，低 pH 病毒灭活罐内的压力在 8 h 内均保持 0.09 MPa 不变，可见 8 h 内罐内压力衰减值

表 1　低 pH 病毒灭活罐清洁后淋洗水的检测结果

Tab.1　Test Results of Rinsing Water after Cleaning of the Container for Low pH Viral Inactivation

项目	罐体目检	可见异物	pH 值	电导率 /（μS·cm^{-1}）	细菌内毒素 /（EU·mL^{-1}）	每 100 mL 的微生物限度 /cfu	吸光度
罐顶	无可见的残留物	澄清，无明显可见异物	6.0	0.6	0	0	0
进液阀	无可见的残留物	澄清，无明显可见异物	6.1	0.7	0	0	0
无菌取样阀	无可见的残留物	澄清，无明显可见异物	6.2	0.6	0	0	0
出液阀	无可见的残留物	澄清，无明显可见异物	6.1	0.7	0	0	0
可接受标准	无可见的残留物	澄清，无明显可见异物	5.0 ～ 7.0	≤ 1.3	<0.25	<10	≤ 0.03

为 0，符合罐内压力衰减在 8 h 内≤ 20%的要求。

2.2.3 低 pH 病毒灭活罐的无菌性挑战、热穿透性及热稳定性试验

通过培养基模拟试验进行无菌性挑战。同时监测病毒灭活过程中的温度变化，进行热穿透性及热稳定性试验。

配制 3%的 TSB 培养基，经除菌滤芯过滤后，分别加至 2 个已灭菌的低 pH 病毒灭活罐中，模拟满载（装量 200 L，编号 1）和半载（装量 100 L，编号 2）状态，于（24±1）℃条件下放置 21 d。模拟试验结束后，每罐取样，确认培养基样品无污染后按照 ChP 2020 年版四部通则 1106 进行培养基促生长试验，以未加菌的培养基管做阴性对照。逐日观察，记录微生物生长情况。促生长试验中应可观察到明显的接种微生物生长现象，以证明低 pH 病毒灭活罐符合无菌性要求。

放置期间，监测罐内温度、房间温度，并记录最高温度及最低温度，以证明低 pH 病毒灭活罐的热穿透及热稳定性适用于低 pH 病毒灭活。

低 pH 病毒灭活罐的罐温变化趋势如图 1 所示。模拟试验期间，2 个罐的培养基最高温度为 24.2 ℃，最低温度为 23.3 ℃，均落在 23.0 ～ 25.0 ℃；经过升温平衡（D2）后直至结束，罐温均稳定在（24.0±0.2）℃，无明显温度异常，符合工艺要求。

低 pH 病毒灭活罐的无菌性试验结果如表 2 所示。取样后观察，培养基为淡黄色澄明液体，无浑浊、无絮状沉淀；取培养基样品，接种特定菌群（表 2），经培育后可见明显的微生物生长现象。

3 总结与讨论

由于生物制品生产工艺的特殊性，稀释罐、培养罐、病毒灭活罐等罐体都是生物制品生产中的重要装备[3]。应用于血液制品的病毒灭活 / 去除方法有低 pH 孵放法、S/D 法、干热法、巴氏消毒法、辛酸钠处理法和纳米膜过滤法等[4—5]。其中，低 pH 孵放法是国内企业常用的免疫球蛋白类产品的病毒灭活方法。该方法不仅能保持免疫球蛋白的活性，同时可在保证制品病毒安全性方面发挥重要作用[6—8]。低 pH 孵放法中，温度和制品的均一性是非常重要的控制参数。低 pH 病毒灭活过程通常在病毒灭活罐内进行，低 pH 环境下免疫球蛋白更稳定，可避免 IgG 的聚合或裂解，且低 pH 孵放法不需增加其他成分去除步骤，在一定温度范围内保持一段时间，即可实现有效的病毒灭活[9]。

低 pH 病毒灭活罐作为密切接触制品的无菌容器，需要对其清洁效果、无菌性、密封性、热稳定性以及残留物进行验证及检测。其中，容器残留物的来源包括：输液管道、相关设备、原液飞沫、气溶胶等容器的盲端死角等区域。残留物的去除是制药企业和容器设计制造单位关注的重点项目。ICH Q7[10] 中提出：“应采取必要的预防措施，防止病毒

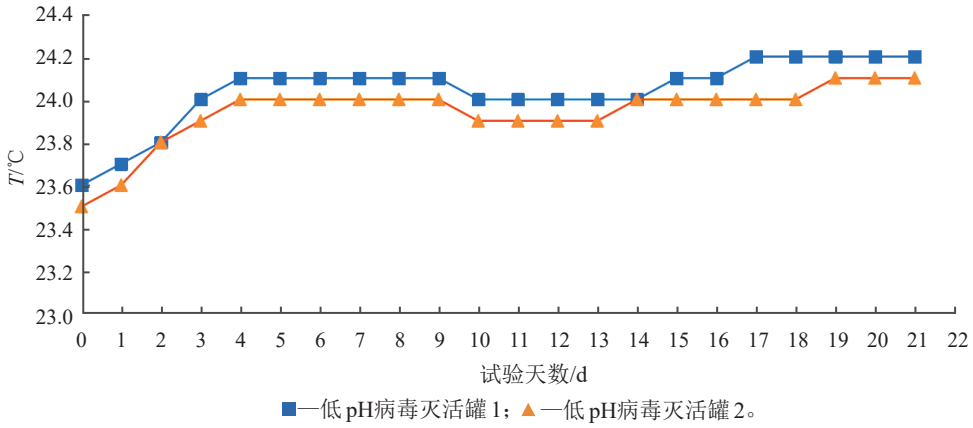


图 1 低 pH 病毒灭活罐内的温度变化趋势

Fig.1 Trend of Temperature Changes in the Containers for Low pH Viral Inactivation

表 2　培养基促生长试验结果

Tab.2　Results of Growth Promotion Tests on Culture Medium

菌株名称	培养温度 /℃	容器编号	生长情况				
			D1	D2	D3	D4	D5
金黄色葡萄球菌	30 ～ 35	1	+	+	+	/	/
		2	+	+	+	/	/
铜绿假单胞菌	30 ～ 35	1	+	+	+	/	/
		2	+	+	+	/	/
托尔豪特链球菌	30 ～ 35	1	—	+	+	/	/
		2	—	+	+	/	/
枯草芽孢杆菌	20 ～ 25	1	—	+	+	/	/
		2	—	+	+	/	/
白念珠菌	20 ～ 25	1	—	+	+	+	+
		2	—	+	+	+	+
黑曲霉	20 ～ 25	1	—	+	+	+	+
		2	—	+	+	+	+
阴性对照	30 ～ 35	1	—	—	—	/	/
		2	—	—	—	/	/
	20 ～ 25	1	—	—	—	—	—
		2	—	—	—	—	—

注：“+”表示有菌生长，“—”表示无菌生长，“/”表示不再培养。

去除 / 灭活前后步骤中可能的潜在病毒污染。”以低 pH 病毒灭活容器为例，在进出液接口、罐顶部以及温度探头快装接口（包括 O 形垫圈）处仍存在沾染原液或飞沫后灭活温度无法保证，以及因转移引起的灭活不完全等风险。因此，本研究以低 pH 病毒灭活容器（罐）为例，验证 CIP 程序的清洁效果，并对清洁难点（包括罐顶、进液阀、出液阀、温度监测孔等）进行手动淋洗。结果显示，淋洗水的可见异物、pH 值、电导率、细菌内毒素、微生物限度、蛋白吸光度检测结果均符合要求。同时，8 h 内罐内压力的衰减值为 0（小于 20%），符合密封性要求。模拟除菌培养基于 (24±1) ℃下放置 21 d，罐温均稳定在 (24.0±0.2) ℃，无明显温度异常；罐内培养基为淡黄色澄明液体，无浑浊、无絮状沉淀；取培养基样接种特定菌群，经培育后可见明显的微生物生长现象。

综上所述，现有低 pH 病毒灭活容器，在清洁难点、压力保持、无菌性、热穿透性及热稳定性方面都能得有效控制，符合 GMP 和工艺要求，可保证病毒灭活容器在低 pH 病毒灭活过程中的稳定性和可靠性，可用于实际生产。

参考文献：

[1] 国家药品监督管理局药品审评中心．血液制品去除 / 灭活病毒技术方法及验证指导原则 [EB/OL]．(2008-09-04) [2024-06-06]．https://www．cde．org．cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=1df43aa707869a9c8bc11afe1ed48ff1．

[2] WHO．Technical report, series No. 924, annex 4, guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products [EB/OL]．(2004-03-01) [2024-06-06]．https://www．who．int/publications/m/item/WHO-TRS924-Annex4．

[3] 刘　浩．新建原液生产车间不锈钢管罐系统清洁验证研究 [D]．南昌 : 南昌大学硕士学位论文 , 2022．

[4] 贾东晨 , 于鹏丽 , 吴舟一 , 等．血液制品病毒安全性药学审评考虑 [J]．中国新药杂志 , 2023, **32**(2): 168-173．

[5] 沈永才 , 陈　兴．常用血液制品病毒灭活的研究进展 [J]．中国生物制品学杂志 , 2008, **21**(8): 735-736．

[6] 王剑锋 , 英志芳 , 徐康维 , 等．两种低 pH 孵放法灭活静注人免疫球蛋白中脂包膜病毒效果比较 [J]．中国生物制品学杂志 , 2019, **32**(8): 919-922．

[7] ROBERTS P L, DUNKERLEY C, WALKER C．Virus reduction in an intravenous immunoglobulin by solvent/detergent treatment, ion-exchange chromatography and

（下转第 135 页）

scientific-guidelines.

[5] JORNITZ M W, AKERS J E, AGALLOCO J P, *et al*. Considerations in sterile filtration. Part Ⅱ: the sterilizing filter and its organism challenge: a critique of regulatory standards [J]. *PDA J Pharm Sci and Technol*, 2003, **57**(2): 88-96.

[6] 王杠杠, 王似锦, 马仕洪. 试验平皿数对低微生物负荷水平药品计数结果准确性的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(1): 96-100.

[7] 邓通洋, 程 琮, 冯维良, 等. 稀菌液细菌数服从泊松分布及其在菌落计数方面的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, **24**(9): 1255-1256.

[8] YANG H, LI N, CHANG S. A risk-based approach to setting sterile filtration bioburden limits [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, **67**(6): 601-609.

[9] BAIN D, HARDY D, BELL B L, *et al*. Microbial monitoring for biological drug substance manufacturing: an industry perspective [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2015, **69**(3): 451-460.

[10] SANDLE T. Improving microbiological assurance for bioburden tests [J]. *Eur Pharm Rev*, 2016, **21**(3): 41-44.

（上接第 112 页）

terminal low pH incubation [J]. *Biologicals*, 2012, **40**(5): 345-352.

[8] 梁 婧, 张潇文, 李策生, 等. 低 pH 孵放病毒灭活效果回顾性验证评价 [J]. 中国输血杂志, 2016, **29**(9): 915-917.

[9] 张 航, 容新宗, 黄 琰, 等. 狂犬病人免疫球蛋白低 pH 孵放工艺的病毒灭活验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, **33**(11): 1312-1316.

[10] ICH. ICH Q7, good manufacturing practice guidance for active pharmaceutical ingredients [EB/OL]. (2015-01-10) [2024-06-06]. https://database. ich. org/sites/default/files/Q7_Q%26As_Q%26As. pdf.