

人用狂犬病疫苗pH值质量分析

石磊泰[#], 曹守春[#], 李加, 王云鹏, 吴小红* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 了解人用狂犬病疫苗pH值质控现状, 为做好人用狂犬病疫苗质量评价提供数据支持。方法: 采用《中华人民共和国药典》三部pH值测定法, 对国内15家企业人用狂犬病疫苗进行测定, 每批疫苗测3次; 对测得的结果进行趋势分析; 并对人用狂犬病疫苗pH值质量控制进行讨论。结果与结论: 测定结果显示, 有14家企业的42批疫苗pH值在7.41~7.63, 1家企业3批疫苗pH值在7.68~7.73; 15家企业45批疫苗pH平均值为7.51, 均在7.2~8.0的合格范围。不同病毒类疫苗的pH值标准各不相同, 但对狂犬病毒而言, pH值在7.2~8.0之间能保持较好的生物学活性, 因此适宜的pH值对维持狂犬病疫苗的安全、有效至关重要。

关键词: 人用狂犬病疫苗; 质量控制; pH值; 温度; 评价分析

中图分类号: R183.9; R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)12-1391-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.12.008

Quality Analysis of pH Value of Rabies Vaccine for Human Use

Shi Leitai[#], Cao Shouchun[#], Li Jia, Wang Yunpeng, Wu Xiaohong* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To understand the pH value quality control status of rabies vaccine for human use, and to provide data support for quality evaluation of rabies vaccine for human use. **Methods:** Rabies vaccines for human use from 15 domestic enterprises were determined with the pH measurement method in Part III of the Chinese Pharmacopoeia, and each batch of vaccine was determined three times. Trend analysis was conducted on the measured results and pH value of rabies vaccine for human use quality control was discussed. **Results and Conclusion:** Determination results show that the pH value of 42 batches of rabies vaccine from 14 enterprises was 7.41-7.63, and that of 3 batches of vaccines from one enterprise was 7.68-7.73. The averaged pH value of 45 batches of vaccines from 15 enterprises was 7.51, which was within the qualified range of 7.2-8.0. The pH value standard for different viral vaccines vary, but for rabies virus, the pH value between 7.2 and 8.0 can maintain good biological activity. Therefore, an appropriate pH value is very important for maintaining the safety and effectiveness of rabies vaccine.

Keywords: rabies vaccine for human use; quality control; pH value; temperature; evaluation and analysis

作者简介: 石磊泰 Tel: (010) 53852130; E-mail: taige@nifdc.org.cn

共同第一作者: 曹守春 Tel: (010) 53852130; E-mail: caosc@nifdc.org.cn

通信作者: 吴小红 Tel: (010) 53852130; E-mail: wuxiaohong@nifdc.org.cn

狂犬病作为一种嗜神经致死性人兽共患病,广泛存在于150多个国家和地区。据世界卫生组织2023年最新数据显示,每年死于狂犬病人数约为5.9万^[1],而每年约有2900多万人次需接受狂犬病暴露后的预防接种和处理,由此造成的经济损失估计为86亿美元/年^[2]。虽然近几年我国狂犬病上升趋势有所遏制,但形势仍不容乐观。人用狂犬病疫苗在我国市场需求很大,每年约1500万人份^[3]。根据中国食品药品检定研究院批签发公开数据,2019年到2021年,我国人用狂犬病疫苗签发量分别为1377、1755和2050万人份^[4],基本满足了我国市场需求。

我国对人用狂犬病疫苗的质量十分重视,并制定了一系列相关标准来保证疫苗的安全性和有效性。涉及人用狂犬病疫苗安全性和有效性指标的研究已有大量报道,而本研究关注的重点是能体现疫苗缓冲体系的指标——pH值。pH值的大小可以反映配制疫苗所用缓冲溶液的酸碱度,选择适宜的缓冲溶液酸碱度对病毒的生物学活性及疫苗成品安全、有效至关重要。pH值作为人用狂犬病疫苗的一项质量控制指标,最早被收载于1990年版《中国生物制品规程》,同时对其限值范围做出了明确规定,即7.2~8.0^[5]。后续的《中国生物制品规程》及2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)^[6]对人用狂犬病疫苗质量标准均保留pH值这一指标,沿用7.2~8.0限值范围。

本研究通过对国内多家人用狂犬病疫苗pH值检测数据进行汇总分析,并对比2020年版《中国药

典》收载的29种病毒类疫苗的pH值限值范围,以期了解人用狂犬病疫苗pH值实际检测值,为好人用狂犬病疫苗的质量控制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品

样品均为中国食品药品检定研究院受理的注册人用狂犬病疫苗,来源于15家企业,每家3批,共45批。

1.2 主要仪器及试剂

pH计(型号S220-K-CN,梅特勒-托利多公司);pH值为4.01、7.00和9.21的标准缓冲液(梅特勒-托利多公司);温湿度计(型号JWS-A1,北京亚光华阳电连接器有限公司)。

1.3 检测方法

采用2020年版《中国药典》三部通则和指导原则0631 pH值测定法进行。选择pH值为4.01、7.00和9.21的标准缓冲液对pH计进行校正;使校正后仪器的斜率在90%~105%,电位漂移值在 0 ± 30 mV;将待测疫苗溶解后混匀,取2 mL进行检测,每批疫苗测3次,每次测定前需将疫苗和标准缓冲液平衡至室温。

1.4 统计学分析

用SPSS 25.0统计学软件对实验数据进行统计学分析和处理。

2 结果

2.1 人用狂犬病疫苗pH值检测结果

pH检测结果见表1。

表1 人用狂犬病疫苗 pH 值检测结果

企业代码	批号	pH 值测定次数			均值 \pm SD
		1	2	3	
A	201810025	7.54	7.54	7.54	7.56 \pm 0.02
	201810026	7.55	7.55	7.55	
	201811027	7.58	7.58	7.58	
B	201811309	7.46	7.46	7.46	7.46 \pm 0.00
	201811310	7.46	7.46	7.46	
	201811311	7.46	7.46	7.46	

续表 1

企业代码	批号	pH 值测定次数			均值 \pm SD
		1	2	3	
C	20190508	7.68	7.69	7.68	7.71 \pm 0.02
	20190509	7.73	7.73	7.73	
	20190611	7.73	7.73	7.73	
D	20200401	7.44	7.45	7.45	7.48 \pm 0.03
	20200402	7.51	7.51	7.51	
	20200503	7.49	7.50	7.50	
E	20201106-1	7.63	7.64	7.64	7.63 \pm 0.01
	20201107-1	7.61	7.61	7.62	
	20201108-1	7.63	7.63	7.63	
F	VZ202011005	7.49	7.49	7.49	7.43 \pm 0.04
	VZ202011006	7.40	7.40	7.40	
	VZ202012007	7.41	7.41	7.41	
G	202101010	7.49	7.49	7.49	7.48 \pm 0.02
	202101012	7.50	7.50	7.50	
	202102014	7.46	7.46	7.46	
H	202101001	7.48	7.48	7.48	7.44 \pm 0.03
	202101002	7.42	7.42	7.42	
	202101003	7.42	7.42	7.42	
I	20210701	7.60	7.60	7.60	7.56 \pm 0.03
	20210702	7.54	7.54	7.54	
	20210703	7.54	7.54	7.54	
J	202112001	7.47	7.47	7.47	7.46 \pm 0.02
	202112002	7.43	7.43	7.43	
	202112003	7.48	7.48	7.48	
K	202101001	7.54	7.54	7.54	7.54 \pm 0.00
	202101002	7.55	7.55	7.55	
	202101003	7.54	7.54	7.54	

续表 1

企业代码	批号	pH 值测定次数			均值 \pm SD
		1	2	3	
L	S202101001	7.62	7.62	7.62	7.62 \pm 0.01
	S202101002	7.60	7.60	7.60	
	S202101003	7.63	7.63	7.63	
M	202106001	7.43	7.43	7.43	7.44 \pm 0.01
	202106002	7.45	7.45	7.45	
	202107003	7.43	7.43	7.43	
N	T202106006	7.42	7.42	7.42	7.41 \pm 0.00
	T202106007	7.41	7.41	7.41	
	T202106008	7.41	7.41	7.41	
O	202204006	7.46	7.46	7.46	7.45 \pm 0.03
	202204007	7.41	7.41	7.41	
	202204008	7.47	7.47	7.47	

2.2 pH值检测结果统计学分析

25.0软件中Shapiro-Wilk (S-W) 检验, 结果见表2。

2.2.1 正态性检验

本次测量样本为45个 (<50), 故采用SPSS

表 2 3次测量 pH 值 S-W 正态性检验分析结果

测量次数	统计量	自由度	P 值
1	0.913	45	0.002
2	0.913	45	0.003
3	0.914	45	0.003

从表2可知, 3次测量pH值正态性检验结果统计量分别为0.913、0.913和0.914, P值分别为0.002、0.003和0.003, 均小于0.05, 可认为3次测量pH值数据不服从正态分布。

经“2.2.1正态性检验”可知pH值测定数据不符合正态分布, 故需采用SPSS 25.0软件中非参数检验Kruskal-Wallis (K-W) 进行统计学分析, 结果见表3。

2.2.2 pH值检测结果非参数检验

表3 3次测量 pH 值非参数检验

非参数检验	三次测量值统计量
Kruskal-Wallis	0.002
自由度	2
渐近显著性 <i>P</i> 值	0.999

从表3可知, $P=0.999>0.05$, 可认为3次pH值测定结果差异无统计学意义, 即3次测定数据重现性好, 测量结果稳定可靠。

2.3 人用狂犬病疫苗pH值质控趋势分析

将每个企业3批人用狂犬病疫苗pH值测定结果

取均值后, 做趋势分析, 结果见图1。从图1可以看出, 有14家企业抽取的42批人用狂犬病疫苗pH值均值在7.41~7.63, C企业的3批疫苗均值为7.71。总体来看, 15家企业疫苗pH值均在7.2~8.0的合格范围。

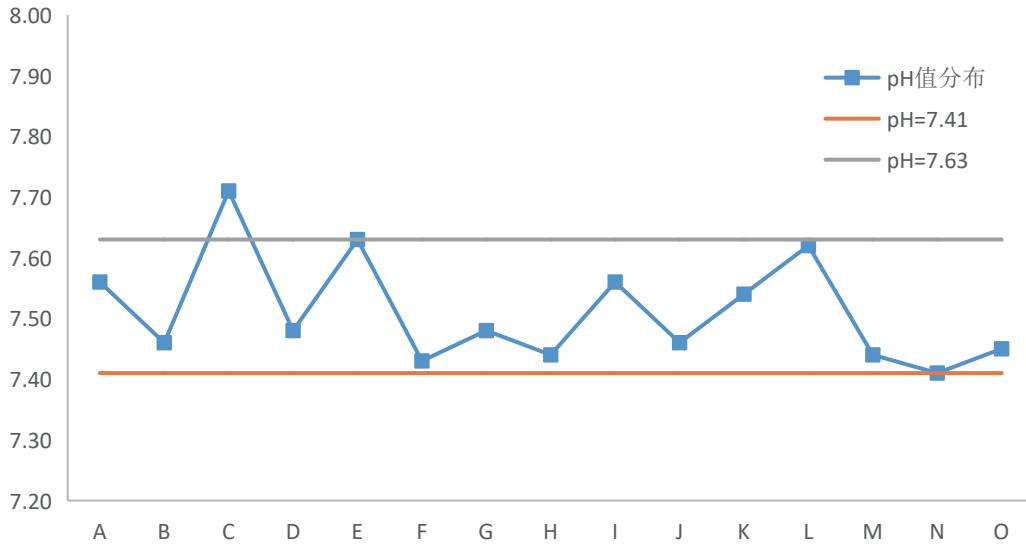


图1 人用狂犬病疫苗 pH 值质控趋势图

3 讨论

3.1 人用狂犬病疫苗的pH值测定易受温度影响

pH是由丹麦生物化学家Soren Peter Lauritz Sorensen在1909年提出的, 符号p来自德语Potenz, 意思是“浓度”; H代表氢离子(Hydrogen Ion)。pH意为氢离子浓度指数(Hydrogen Ion Concentration Index), 是表示氢离子浓度的一种方法, 它是水溶液中氢离子浓度(活度)常用对数的负值。pH值的测定受环境温度和待测样品的温度影响较大^[6-7], 因此, 每次测定前要把待测样品和标准缓冲液平衡至室温。

3.2 人用狂犬病疫苗pH值的质量控制

《中国药典》2020年版三部共收录了29种病毒类疫苗(见表4)。除口服减毒活疫苗和脊灰活疫苗糖丸外, 大部分产品检定项下均有pH项目。对于有具体限定标准的疫苗, 基本可分3类, 即偏酸性、偏中性和偏碱性。不同疫苗pH值标准各异, 最低为5.5, 最高为8.5。也有疫苗品种执行企业注册标准, 例如乙型脑炎减毒活疫苗, 虽然只有2个企业生产, pH值却也有2种不同限量标准, 成都生物制品研究所为7.5~8.7, 而武汉生物制品研究所为7.2~8.8。人用狂犬病疫苗限定标准为7.2~8.0, 为偏碱性。

表4 不同病毒类疫苗 pH 值质控标准

序号	pH 值标准	疫苗品种举例
1	5.5~6.8	重组乙肝疫苗 (CHO 细胞)
2	5.5~7.0	甲肝灭活疫苗 (人二倍体细胞), 重组乙肝疫苗 (汉逊酵母)
3	5.5~7.2	重组乙肝疫苗 (酿酒酵母), 甲乙肝联合疫苗
4	6.5~7.5	Sabin 株灭活脊灰疫苗 (Vero 细胞), 口服 I 型和 III 型脊灰减毒疫苗 (人二倍体细胞)
5	6.5~8.0	流感病毒裂解疫苗
6	6.8~8.0	流感全病毒灭活疫苗
7	7.2~8.0	冻干乙型脑炎疫苗 (灭活), 乙型脑炎灭活疫苗, 森林脑炎灭活疫苗, 双价肾综合征出血热灭活疫苗 (Vero 细胞, 地鼠肾细胞或沙鼠肾细胞), 冻干 / 人用狂犬病疫苗 (Vero 细胞或人二倍体细胞)
8	7.0~8.5	黄热减毒活疫苗
9	按批准要求执行*	乙型脑炎减毒活疫苗, 冻干甲型肝炎减毒活疫苗, 水痘减毒活疫苗, 麻疹减毒活疫苗, 腮腺炎减毒活疫苗, 风疹减毒活疫苗, 麻疹腮腺炎联合减毒活疫苗, 麻疹风疹联合减毒活疫苗, 麻腮风联合减毒活疫苗
10	无 pH 质控项目	口服脊灰减毒活疫苗 (猴肾细胞), 脊灰减毒活疫苗糖丸 (人二倍体细胞、猴肾细胞)

注: * 执行企业注册标准。

俞永新论著^[8]中提到: 狂犬病毒在 pH 值为 7.2~8.0 环境中较为稳定, 若 pH 值超过该范围, 则病毒容易失活。此外, 国外科研人员 Gaudin 等^[9-12] 研究表明: 低 pH 值环境可以诱导狂犬病毒构象发生改变, 天然构象和低 pH 值失活构象间存在着依赖 pH 值的平衡, 而且处于低 pH 值环境的狂犬病毒容易发生聚集失活。Fanli Yang 等^[13] 研究结果进一步确认了狂犬病毒在 pH 值为 8.0 环境中处于天然活性状态; 而 pH 值为 6.5 时, 狂犬病毒容易发生聚合而失去活性。我国疫苗生产人员如梁名践等^[14] 早在 2001 年也曾经报道过: 在人用狂犬病疫苗生产中, 条件一致情况下观察到 pH 值变化对狂犬病毒毒力影响较大, 结果显示, 把病毒维持液 pH 值调整至 7.6~7.8 时, 有利于病毒增殖, 病毒收获液滴度可以提高。以上研究结果表明, 狂犬病毒在 pH 值为 7.2~8.0 之间能保持较好的生物学活性, 利于病毒增殖和滴度提高, 可用于指导人用狂犬病疫苗生产。

人用狂犬病疫苗成品的 pH 值大小主要取决于原液洗脱时所用 PBS (磷酸缓冲盐溶液)、半成

品配制时 PBS 和人血白蛋白的 pH 值。经与生产企业沟通了解到, 大部分企业原液洗脱 PBS pH 值在 7.4~7.6, 用于半成品配制 PBS pH 值在 7.6 左右, 人血白蛋白 pH 值在 7.0 左右。虽然不同生产企业在半成品配制时原液、人血白蛋白和 PBS 三者使用比例不尽相同, 但从本次检测结果并结合企业自检结果 (本研究未展示) 来看, 最终完成半成品配制后人用狂犬病疫苗成品 pH 值大多维持在 7.41~7.63 之间。本次检测发现的 C 企业 pH 值稍高现象, 经调查了解到, 这家企业在半成品配制时加入了一定量 7.5% 碳酸氢钠溶液调节 pH 值; 另一个因素是这家企业在疫苗复溶时使用 pH 值为 7.6 PBS 溶液, 而其他企业疫苗复溶用 pH 值为 6.0 灭菌注射用水, 初步认为这两个因素是 C 企业疫苗复溶后 pH 值略高的原因。

人用狂犬病疫苗使用无禁忌, 因此其质量控制尤为重要。本研究选取 pH 值作监测指标, 对检测过 pH 值的人用狂犬病疫苗进行总结分析, 共涉及 15 个企业 45 批产品。就涉及到的产品而言, 所检测 pH 均值为 7.51, 均在 7.2~8.0 合格范围, 希望疫苗生产企业能继续保持人用狂犬病疫苗的安全有效。

参考文献：

- [1] WHO. Rabies[EB/OL]. (2023-03-28) [2023-03-28]. https://www.who.int/health-topics/rabies#tab=tab_1.
- [2] WHO. Rabies[EB/OL]. (2021-05-17) [2023-03-28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>.
- [3] Li J, Shi LT, Wang YP, et al. Analysis Strategies for Rabies Prevention and Control in China[J]. Journal of Applied Virology, 2019, 8 (4) : 71-85.
- [4] 中国食品药品检定研究院. 生物制品批签发数据 (2019-2021年) [EB/OL]. (2021-12-31) [2023-03-28]. <https://www.nifdc.org.cn/nifdc/zhtzh/szwppqf/shwzhppqf2019-2021/index.html>.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中国生物制品规程：一部[S]. 1990: 110-115.
- [6] 中华人民共和国药典：三部[S]. 2020: 151-155, 474-475.
- [7] 池玉梅, 范卓文. 分析化学[M]. 北京：人民卫生出版社, 2020: 49-82.
- [8] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 二版. 北京：中国医药科技出版社, 2009: 22.
- [9] Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, et al. Low-pH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and their Role in Membrane Fusion[J]. J Virol, 1993, 67 (3) : 1365-1372.
- [10] Gaudin Y, Tuffereau C, Durrer P, et al. Biological Function of the Low-pH, Fusion-inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein (G): G is Transported in a Fusion-inactive State-like Conformation[J]. J Virol, 1995, 69 (9) : 5528-5534.
- [11] Gaudin Y, Raux H, Flamand A, et al. Identification of Amino Acids Controlling the Low-pH-induced Conformational Change of Rabies Virus Glycoprotein[J]. J Virol, 1996, 70 (11) : 7371-7378.
- [12] Roche S, Gaudin Y. Evidence that Rabies Virus forms Different Kinds of Fusion Machines with Different pH Thresholds for Fusion[J]. J Virol, 2004, 78 (16) : 8746-8752.
- [13] Yang F, Lin S, Ye F, et al. Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27 (3) : 441-453.
- [14] 梁名践, 蒋茨蕾, 鲁宏, 等. pH值对精制地鼠肾细胞狂犬病疫苗毒力影响的分析[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35 (3) : 216.

(收稿日期 2023年1月31日 编辑 郑丽娥)