

气化过氧化氢空间灭菌在疫苗生产中的应用

成中山

杭州万泰生物技术有限公司

摘要: 基于对过氧化氢灭菌技术的探讨, 本文对目前主流技术进行了对比分析, 并将其应用于肺炎球菌多糖结合疫苗生产的洁净室空间灭菌。通过将 VHP 灭菌过程与空调系统整合, 实现了操作的便捷性与验证的可行性, 满足了用户对于高频率、短灭菌周期的需求。本文为制药行业洁净空间灭菌提供了具体的应用案例。

关键词: VHP ; 空间灭菌; 灭菌设计; 空调系统

过氧化氢 (Hydrogen Peroxide), 化学式为 H_2O_2 , 其水溶液通常被称为双氧水, 是一种强氧化剂。常用的使用浓度为 30% 或 35%, 它能够有效杀灭细菌、病毒、真菌以及芽孢, 因此被认为是一种广谱杀菌剂。由于过氧化氢分解后产生的副产品完全无害, 它在制药洁净室、食品、医疗和化工行业的灭菌应用中被广泛采纳。目前, 过氧化氢被认为是世界上最理想的杀菌剂之一。

1 过氧化氢的灭菌机理

目前, 过氧化氢灭菌技术主要分为 4 种: 包括水溶液过氧化氢 (AHP: Aqueous Hydrogen Peroxide)、气化过氧化氢 (VHP: Vaporized Hydrogen Peroxide)、过氧化氢等离子体 (HPP: Hydrogen Peroxide Plasma) 以及过氧化氢汽雾 (HPV: Hydrogen Peroxide

Vapor)。在这些方法中, 气化过氧化氢 (VHP) 以其常温、高浓度和干燥的特性, 成为一种快速且高效的灭菌方式。

过氧化氢的杀菌机理^[1-8]涉及两种自由基: 超氧自由基 $O_2\cdot$ 和羟基自由基 $OH\cdot$ 。这些自由基能够破坏蛋白质、多糖和 DNA。被氧化的碱基会被 DNA 修复机制识别并切割, 导致 DNA 分子单链断裂。随着暴露时间和过氧化氢水溶液浓度的增加, 断裂的数量也会相应增加。对于蛋白质而言, 过氧化氢具有显著的降解作用。在液相中, 蛋白质会发生交联反应; 而在气相中, 蛋白质会被分解为更小的肽, 从而达到更佳的灭菌效果。

综合来看, 过氧化氢的灭菌机理主要分为两大类:

- 过氧化氢能够破坏微生物的外层保护结构, 使保护层的渗透性发生变化, 进而引起渗透压的改变。这种破坏导致微生物细胞内外平衡系统受损, 最终导致微生物的死亡;
- 过氧化氢通过破坏微生物的酶、蛋白质和 DNA, 从而达到杀死微生物的目的。

2 气态过氧化氢灭菌技术的最新发展及现状

液态过氧化氢的杀菌效能已在一个多世纪前得到证实, 但它使用后产生的大量残留物需要额外处理。气态过氧化氢的杀菌原理大约在 1980 年代初期被提出。经过大量实验验证^[9], 相较于嗜热脂肪芽孢杆菌孢子, 气化过氧化氢对枯草芽孢杆菌亚种孢子的杀灭效果更为显著。

目前, 气态过氧化氢灭菌技术在欧美国家已成为生物净化的关键技术之一。美国 STERIS (思泰瑞) 所代表的干法 VHP 灭菌和英国 BIOQUELL (贝尔科) 公司所代表的湿法喷雾灭菌 HPV 是其中的两大主流方法。国内外针对这两种方法已经进行了广泛的研究和比较^[10], 结果汇总如表 1 所示。

BIOQUELL HPV 和 STERIS VHP 的技术步骤对比见表 2, 两者工艺步骤基本相同, 主要差异在与对环境条件的要求以及过氧化氢的形态。

表 3 展示了过氧化氢在液态与气态两种状态下的灭菌效果对比。

作者简介: 成中山, 杭州万泰生物技术有限公司工程项目部经理, 研究方向为药品生产管理、项目管理及工程设备管理。

表 1 HPV 与 VHP 技术及效果对比表

类别	HPV	VHP
技术名称	过氧化氢蒸汽技术 HPV (Hydrogen Peroxide Vapor)	气态过氧化氢技术 VHP (Vaporized Hydrogen Peroxide)
灭菌工艺	微冷凝蒸汽工艺在被灭菌物体表面形成一层细微的冷凝液体薄膜	采用闪蒸气化工艺, 确保操作温度控制在过氧化氢的冷凝点以下, 以维持过氧化氢的干燥气态状态
灭菌效果	可达到 6-log 级别的灭菌效果	可达到 6-log 级别的灭菌效果
材料兼容性	高浓度的过氧化氢冷凝液体在接触表面会使材料腐蚀或者损坏电子产品, 但对 PVDF、304 和 316 不锈钢的影响不明显	过氧化氢气态对材料温和, 对 PVDF、304 和 316 不锈钢的影响不明显, 而且对于 200 g/m ² 以上的镀锌板, 其腐蚀作用也相对较小
扩散能力	粒径 <10 μm, 喷雾雾化, 采用 5% ~ 6% 的过氧化氢 + 稳定剂, 扩散能力低	粒径 <5 nm, 闪蒸气化, 采用 30% ~ 35% 的过氧化氢, 扩散能力高
渗透性	粒径大, 渗透性低, 对 HEPA 过滤器的渗透性差	粒径小, 渗透性强, 对 HEPA 过滤器的渗透性好
表面残留	在被灭菌表面存在微量残留, 需要人工处理	由于过氧化氢为气态, 残留相对较小, 且可主导降解
排放时间	表面存在微量残留, 排放时间相对较长	过氧化氢维持在气态, 排放相对时间较短
过程控制	灭菌浓度与位置有关, 不同位置有差异, 无法实时监测	可以对空气流量和注射率等关键参数监测, 可精准控制
灭菌一致性	环境的温度、湿度以及雾化气体的分布差异会导致其效果各异	气体扩散率高, 分布好, 一致性高。
可验证	可验证	可验证

表 2 BIOQUELL HPV 和 STERIS VHP 的操作工艺对比

步骤	BIOQUELL HPV	STERIS VHP
1	Conditioning : 实现理想的环境条件, 维持大约 40% 的相对湿度	Dehumidification : 通过除湿降低腔体的湿度, 并提高温度, 使液态的过氧化氢通过“闪蒸”转为气态的过氧化氢
2	Gassing : 进气, 汽化 / 喷雾, 不断提升过氧化氢的浓度	Conditioning : 实现环境条件, 不断提升过氧化氢的浓度
3	Gassing Dwell: 持续进气, 保持浓度, 维持一定的时间灭菌	Decontamination : 保持浓度, 维持一定的时间灭菌
4	Aeration : 通风, 从被灭菌区排除过氧化氢	Aeration : 通风, 从被灭菌区排除过氧化氢

表 3 液相过氧化氢与气相过氧化氢灭菌效果对比

测试用微生物	杀死 90% 的芽孢所需要的时间 (H)	
	液态 400 mg/L(24 ~ 26℃)	气态 4 mg/L(24 ~ 26℃)
嗜热脂肪芽孢杆菌	1.3 ~ 1.6	1.2 ~ 2.5
枯草杆菌	3.1 ~ 6.2	1.3 ~ 2.2
芽孢杆菌	1.2 ~ 1.5	0.6 ~ 1.0

研究显示: 在确保达到相同灭菌效果的条件下, 气态过氧化氢的灭菌时间比液态的要短; 同时发现, 当气态过氧化氢的浓度在 750 ~ 2000 ppm 时, 其灭菌效果与 30000 ppm 过氧化氢液体相当, 因此, 气态过氧化氢的灭菌效果更高。

3 气态过氧化氢灭菌效果评估

3.1 灭菌目标

灭菌是指杀灭细菌及其细菌繁殖体、芽孢、病毒和真菌孢子等所有微生物形态的过程。在制药行业, 通常采用国际公认的无菌保证水平 (Sterility Assurance Level, SAL) 来

评估灭菌工艺的效果。SAL 定义为产品经过灭菌处理后, 微生物残存的概率。SAL 值越低, 产品中微生物存在的可能性就越小。因此, 国际标准通常规定, 采用湿热灭菌柜的 SAL 值不得超过 10^{-6} , 即灭菌后微生物存活概率不得超过 1%。

根据消毒规范技术要求, 灭菌目标设定为生物指示剂 (BIs) 达到 10^6 的杀菌率。常用的生物指示剂 (BIs) 包括黑色枯草芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌。

3.2 气态VHP设备布局

VHP 发生器的送风管道与被灭菌区域的洁净空调系统送风管道相连。通过被灭菌区域的洁净送风管道, 将气化的过氧化氢送入被灭菌的洁净室, 随后通过被灭菌区域的回风管道返回空调机组, 实现循环通风灭菌。这一过程确保气化的过氧化氢能够均匀地扩散至所有被灭菌区域。

3.3 测试试剂的准备

在进行实验之前, 确保所有必须的测试试剂和方案都已经准备就绪是非常重要的。测试试剂需要按照实验要求的纯度和浓度进行准备, 以确保实验结果的准确性和可靠性。

● 实验菌株: 选用枯草杆菌黑色变种和嗜热脂肪芽孢杆菌;

● 染菌载体: 包括不锈钢片和聚四氟乙烯垫片等, 染菌量控制在 $1 \sim 5 \times 10^6$ cfu/ 载体;

● 培养基: 采用胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 和胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB), 确保使用前经过湿热灭菌处理;

● 布点策略: 确保每个房间均布点采样, 选择远离 VHP 发生器的区域, 以及距离房间回风口较远的位置, 作为评估灭菌效果的关键点。

3.4 评价标准^[11]

灭菌合格标准: 实验对照组的回收菌量应为 $1 \sim 5 \times 10^6$ cfu/ 载体, 阳

性对照组应有菌生长；阴性对照组应无菌生长；实验组应无菌生长。

4 气化过氧化氢空间灭菌在疫苗生产中的应用

2023 年，笔者有幸参与国内某疫苗企业新建的肺炎球菌多糖结合疫苗车间项目，该项目的生产核心区域包括菌种制备间、Ps 发酵初纯间、Ps 纯化间、rPly 发酵初纯间、rPly 纯化间、缓冲液配制间、培养基配制间、CIP 站、冻干室以及制剂区等。在生产过程中，原料和中间体会频繁进出生产区域，因此，迫切需要一种高效且可靠的灭菌方法，以对物料表面、设备表面及空间进行彻底灭菌，同时，为了提高效率，还需要在最短时间内完成物料的转移。

针对本项目的工艺特点，项目面临三个主要挑战：

- 灭菌频率高，需尽可能缩短灭菌操作周期；
- 尽量减少灭菌过程对洁净室环境的影响；
- 确保人员安全，以及排气对环境无害。基于这些考量，项目最终决定采用固定式气化过氧化氢装置与洁净室空调系统相结合的灭菌方案。

4.1 气化过氧化氢装置的构成及工艺

4.1.1 气化过氧化氢设备系统的构成

气化过氧化氢设备由过氧化氢发生器、除湿装置、控制装置以及管道阀门系统组成。设备主体包括柜体、送风机、储液罐、注射泵、预加热器和蒸发器。控制系统由 Siemens PLC 控制系统、触摸屏和打印机构成，负责监测、控制和输出设备运行数据。该系统可独立运行，也可由洁净室空调系统控制运行，控制系统的启动、停止和通风循环，以及收集数据和监控 VHP 系统的状态。管道阀门系统由不锈钢自控阀门、硅胶管道、CPVC 和不锈钢风管等构成。

4.1.2 VHP 设备系统的工艺流程

VHP 设备系统与洁净空调系统的送风管道相连，将浓度为 35% 的过氧化氢液体通过 VHP 发生器闪蒸转化为 VHP 气体。该气体通过分配管道输送到待灭菌区域的空调送风管道中，通过洁净室房间顶部的 HEPA 过滤器均匀分布在各被灭菌区域，保持恒定浓度并维持一定时间，配合空调系统的循环运行，对洁净区的空间、设备、物料表面进行有效灭菌。

4.1.3 气化 VHP 装置的运行过程

第一步，除湿：降低空间的相对湿度，以满足气化过氧化氢灭菌所需的湿度条件。对于洁净区，将湿度控制在 60% 以下，符合洁净区日常管理的洁净等级湿度要求。在此阶段，VHP 发生器连接到洁净空调系统风管上的阀门保持关闭状态，确保洁净室系统正常运行。

第二步，调节：调整过氧化氢的注射速率，快速提升 VHP 的浓度。

首先关闭洁净空调系统的新风阀和排风阀，停止洁净空调系统的冷冻水和加热介质供应，将空调系统送风管至各房间的空气调节阀调至全开状态，同时将 VHP 发生器送风管道至空调系统连接之间的阀门也调至全开。启动 VHP 发生器，将气化的过氧化氢送入空调系统，并通过房间的 HEPA 高效过滤器送风口将 VHP 传输至被灭菌的洁净区域。此阶段应保持整个空调系统的相对湿度约为 55%。

第三步，灭菌：在维持一定 VHP 浓度的情况下，对整个空调系统的风管、房间、设备进行灭菌处理。经过一段时间的运行后，即可实现灭菌效果。

第四步，通风：灭菌完成后，关闭 VHP 设备及送风管道上的阀门。开启空调系统的新风，进行全面排风，快速降低被灭菌区域的 VHP 浓度，使残余的过氧化氢通过排放管道上的催化降解装置后排至室外。当洁净区空

间的过氧化氢浓度降至低于 1 ppm 时，通风过程结束，洁净空调系统恢复到正常运行模式。

4.1.4 灭菌参数的设置

灭菌参数的设置是确保灭菌过程有效性的关键步骤，需要根据 VHP 设备的特性及被灭菌物品的特性来精确设定。

- VHP 灭菌浓度设定为 650 mg/m³；
- 房间温度维持在 24~26 ℃；
- 房间湿度 ≤ 55%；
- 房间换气次数 > 15 次/h。

4.2 气化过氧化氢灭菌的洁净室维护结构设计^[12]

洁净室围护结构的密封性对 VHP 的灭菌效果具有显著影响。若空间的湿度控制（包括温度和湿度的控制）不当，可能会导致液态过氧化氢冷凝液的形成，进而对围护结构产生腐蚀作用。

4.2.1 彩钢板

该肺炎球菌多糖结合疫苗项目的洁净室围护结构采用了 50 mm 厚的夹芯金属系列彩钢板。

● 墙板彩钢板：采用手工双玻镁岩棉夹芯，外层为 0.5 mm 厚的灰白色 PVDF 彩涂钢板（双面），内层粘接 5 mm 厚的玻镁板，两层玻镁板之间填充岩棉，岩棉的容重为 120 kg/m³ 以上。所有承插面和密封面需涂满粘合剂，以确保基板与芯材之间的粘结牢固，无空鼓、脱层和断裂线现象。彩钢板的四周使用 0.8 mm 厚的镀锌钢边框，并采用厚墙体弹片结构进行固定；

● 吊顶用彩钢板：在洁净室一侧彩涂 PVDF，在技术夹层一侧彩涂 PE 聚酯。彩钢板成品覆膜上应明确标识涂层信息。吊顶用彩钢板的其他加工要求与墙板彩钢板相同。

所有彩钢板的安装缝隙应保持均匀（2~3 mm），清洁后用密封胶双面密封。用于洁净室内所有表面嵌缝的弹性密封材料为 798 食品级中性硅酮密封胶。

4.2.2 地面

采用抗腐蚀性能强，耐磨性好以及达到 A 级防火标准的聚氨酯彩砂材料，厚度为 4 ~ 5 mm。

4.2.3 面板门

选用密胺树脂面板门，其表面光滑细腻。门板厚度为 50 mm，采用铝蜂窝作为门板夹芯材料。门上配备双层透明玻璃观察窗，玻璃内充填惰性气体，采用 5 mm 厚的钢化玻璃，确保玻璃表面与彩钢板表面平齐。边框处使用密封胶进行密封处理；门的四周采用连续的中空硅胶密封条，无卷边、脱槽、缺口或断裂问题，且该密封条能承受 VHP 的侵蚀。

4.3 VHP灭菌的洁净室空调系统设计

在现代洁净室的设计中，VHP 灭菌技术已经成为一个重要的组成部分。洁净室围护结构及空调系统必须考虑到 VHP 灭菌技术的特殊要求，以确保其完整性及灭菌效果。

4.3.1 VHP设备系统与洁净室空调系统结合

将 VHP 设备系统与洁净室空调系统相结合，可以实现更为高效和精确的灭菌效果。这种结合方式的流程示意图如图 1 所示，它详细展示了如何将 VHP 灭菌技术融入到洁净室的空调系统中，以确保整个环境的无菌状态。

4.3.2 VHP气体注入风管的方式

VHP 送风管道垂直插入洁净室空调送风管，出口与气流方向一致，参见图 2。

4.3.3 空调系统的材料选型

在设计和构建空调系统的过程中，空调系统的材料选型不仅仅是一个简单的选择过程，而是一个需要综合考虑多种因素的复杂决策。它涉及到对各种不同材料的性能、成本、耐久性以及环境影响等多方面因素的综合考量。正确的选型可以确保系统的高效运行，延长使用寿命，同时减少对环

境的不良影响。

● 空调系统的送风、回风、排风管道均采用 304 不锈钢材质，通过折边压制工艺制成，确保了风管的强度和耐久性。不锈钢板的厚度控制在 0.5 mm ；

● 洁净室顶部的高效过滤器静压箱同样采用 304 不锈钢板制作，而 HEPA 过滤器则配置了铝合金边框。静压箱与过滤器箱体的所有连接处均采用满焊技术进行焊接，以确保密封性和结构的完整性。过滤介质选用的是玻璃纤维。HEPA 滤料与边框的密封采用聚氨酯材料，而液槽密封则使用了果冻胶（硅胶）；

● 对于暴露于 VHP 气流中的所有 AHU 空调机箱构件，均采用能够耐受 VHP 的特殊材料进行制造。

4.4 VHP设备系统的日常运行及维护

为了保障 VHP 设备系统的高效运作，需要对设备进行定期的检查和必

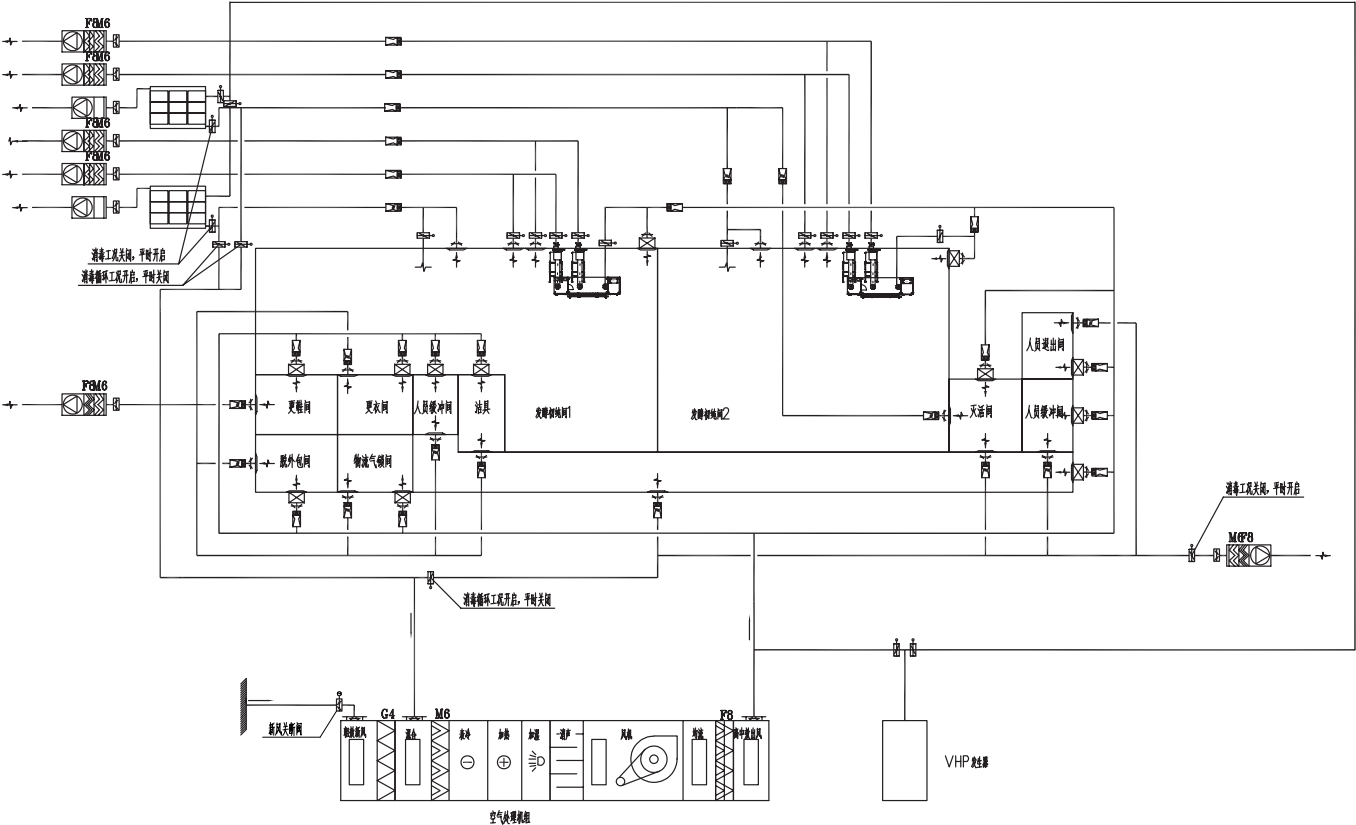


图 1 VHP 设备系统与空调系统的流程示意图

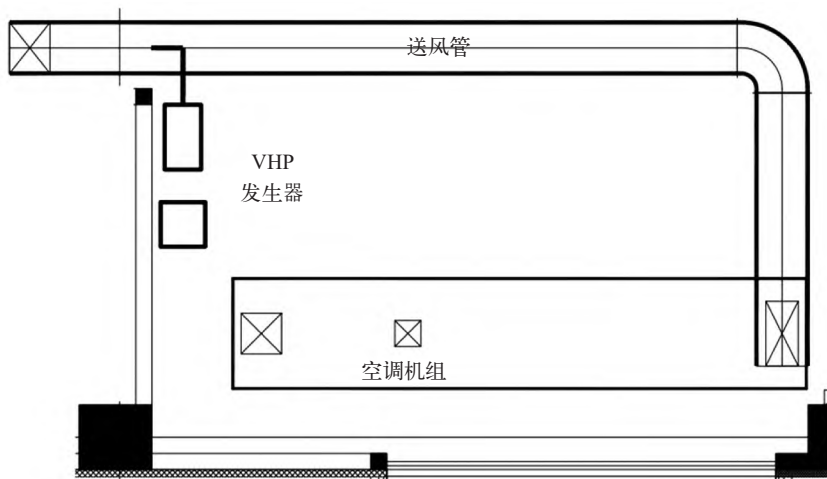


图2 VHP送风管道与洁净空调布置示意图

要的保养。

● 设备管理部门应根据制造商的指导和实际使用经验,制定日常运行的SOP,定期维护的SOP以及保养计划,并针对那些特别容易发生故障的部件,做好备件库存;

● 所有的仪表应纳入计量管理计划,以确保其计量的准确性;

● 制定操作和维护人员的岗位培训计划。

5 结论

在探讨过氧化氢灭菌技术的基础上,本文对目前主流技术进行了对比分析,并将其应用于肺炎球菌多糖结合疫苗生产的洁净室空间灭菌。将VHP灭菌的整个过程与空调系统相结合,展现了其操作性和可验证性,能够满足用户对高频率、短灭菌周期的需求。这为制药行业洁净空间灭菌提供了具体的应用案例。

参考文献:

[1] B.McEvoy¹ and N.J.Rowan
Terminal sterilization of
medical devices using vaporized
hydrogen peroxide: a review of
current methods and emerging
opportunities [J]. Journal of
Applied Microbiology, 2019,

127(10): 1403-1420.

[2] Philip M.Schneider New
technologies and trends in
sterilization and disinfection [J].
American Journal of Infection
Control, 2013, 41: S81-S86.

[3] Zhaojing Yu, Haiyang Cai,
Shanshan Xiao, Weimin Zeng,
Runlan Yu, Hong Cheng, Peiqi
Cheng. Behavior and linkage
mechanism of extracellular
polymers, cell membrane
peroxides and intracellular
peroxidases during high
concentration vaporized hydrogen
peroxide sterilization [J]. Journal
of Cleaner Production, 2023, 414:
137657

[4] POTTAGE T, RICHARDSON
C, PARKS S, et al. Evaluation
of Hydrogen Peroxide Gaseous
Disinfection Systems to
Decontaminate Viruses [J].
Journal of Hospital Infection,
2010, 74(1): 55-61.

[5] FU T, GENT P, KUMAR V.
Efficacy, Efficiency and Safety
Aspects of Hydrogen Peroxide
Vapor and Aerosolized Hydrogen
Peroxide Room Disinfection

Systems[J]. Journal of Hospital
Infection, 2012, 80(3): 199-205.

[6] FINNEGAN M, LINLEY E,
DENYER S, et al. Mode of Action
of Hydrogen Peroxide and Other
Oxidizing Agents: Differences
between Liquid and Gas Forms
[J]. Journal of Antimicrobial
Chemotherapy, 2010, 65(10):
8-15.

[7] 胡国庆. 我国过氧化氢低温等
离子灭菌技术应用现状与管理 [J].
中国消毒学杂志, 2011 (3) :
353-355.

[8] 楚莉沙. 气化过氧化氢灭菌研
究现状与展望 [J]. 包装工程,
2016, 37 (21) : 145-151.

[9] WANG J. Inactivation of
Microorganisms on Polyethylene
Exposed to Hydrogen Peroxide
Vapors in Air at Various
Temperatures [J]. Chemical
Abstracts, 1987, 10(12): 30-32.

[10] 郁朝阳. 气化过氧化氢灭菌技术
及其在动物设施消毒中的应用
[J]. 医药工程设计, 2012, 33
(2) : 49-53.

[11] 陈琦. 气化过氧化氢的灭菌技术
及其验证分析 [J]. 机电信息,
2016, 5 (467) : 41-48.

[12] 张少梅. VHP空间灭菌的工程实
施技术探讨 [J]. 化工与医药工
程, 2017, 38 (3) : 24-27.