

低温乙醇法中人血白蛋白生产过程中 组分 I + II + III 的分离工艺研究探讨

全修锐 刘跃妹

国药集团贵州生物制药有限公司 贵州凯里 556011

摘要：目的：在低温乙醇法的人血白蛋白生产过程中，组分 I + II + III 的选择性沉淀与高效分离是后续获得高纯度白蛋白和充分回收免疫球蛋白的关键环节。本文围绕组分 I + II + III 分离阶段的工艺控制逻辑、影响因素与质量控制要点展开研究性讨论，旨在为规模化、稳定化生产提供方法学支撑与风险控制思路。方法：基于经典低温乙醇分级原理，从蛋白质溶解度受乙醇浓度、温度、pH 与电导率共同影响的角度，对组分 II + III（以免疫球蛋白为主）的选择性沉淀机理予以阐释。结合实际生产场景，梳理从混合血浆前处理、pH 调整、低温乙醇引入、等温压滤、沉淀收集与贮存等一体化环节的质量属性与过程分析要点，明确关键质量属性（CQA）与关键工艺参数（CPP）之间的映射关系。对常见偏差风险进行归因性分析，提出过程分析技术（PAT）与统计过程控制（SPC）在该段工艺中的应用思路。结果：在遵循低温、控 pH 与乙醇体积分数协同调控的策略下，可实现组分 I + II + III 的稳定沉降与澄清分离，获得澄明滤液用于后续白蛋白阶段操作，同时沉淀可作为人免疫球蛋白的源料。通过建立在线温度、pH 与乙醇体积分数监控，并结合澄明度判定与压滤压差管控，可在放大条件下提升批内与批间一致性，降低蛋白损失与夹带风险。

关键词：低温乙醇法；人血白蛋白；组分 I + II + III；免疫球蛋白；分离工艺；质量控制

一、绪论

（一）研究背景

人血白蛋白是临床用血制品中用量最大、适应证最广的血液制品之一，广泛用于失血性休克、烧伤、肝硬化低蛋白血症、腹水与手术围术期容量管理等场景。作为血浆中含量最高的蛋白组分，白蛋白承担维持胶体渗透压与转运脂肪酸、胆红素、药物分子等重要生理功能。受患者需求增长、外科手术量攀升与突发公共卫生事件等因素影响，全球对白蛋白制品的需求长期保持增长态势，亦对制造端的产能、质量与成本提出更高要求。

自 Cohn 等在 20 世纪中期建立以低温乙醇为核心的血浆蛋白分级方法以来，冷乙醇分级因其可规模化、可复制与较为成熟的病毒去除/灭活配套流程，成为当下主流的技术路线之一。该法通过在低温环境中调控乙醇体积分数、pH 和离子强度，使血浆中不同等电点、构象与表面疏水性差异的蛋白分群析出，从而实现级分化切取。对于白蛋白生产流程而言，将含免疫球蛋白的组分 II、III 沉降分离，不仅为后续获得澄清上清液以进入白蛋白段提供前提，也为免疫球蛋白制品的生产创造原料基础。

（二）研究目的与意义

本文聚焦于白蛋白生产工艺中的“组分 I + II + III 分离”这一关键节点，从机理、工艺控制逻辑与质量风险三方面展开系统阐述。通过明确该段的关键质量属性与关键工艺参数，构建便于质量监测与偏差纠偏的工艺控制框架，为提升批次稳定性、增强联产能力与优化经济性提供参考。同时，强调与免疫球蛋白联产的物料核算思路，促进血浆资源的综合高值利用。

二、理论基础与方法学原理

（一）低温乙醇分级的物理化学基础

低温乙醇法实质上是改变溶剂体系的物理化学属性，调控蛋白质分子间与蛋白-溶剂之间的相互作用。核心机制包括：

-介电极性与介电常数变化：乙醇的引入降低溶剂整体介电常数，削弱带电基团之间通过溶剂介导的静电屏蔽，促使带电表面之间相互作用增强，降低总体溶解度。

-水活度与溶剂化层重构：乙醇与水形成氢键网络，竞争蛋白表面极性位点，改变蛋白周围溶剂化层的稳定性；同时降低有效水活度，有利于蛋白分子间疏水区的相互聚集。

-温度效应：低温可抑制蛋白分子热运动，降低构象波动，减少去溶剂化所需能量，进而使沉淀阈值向更温和的条件偏移；同时低温有助于抑制潜在的蛋白变性与自聚集副反应。

-pH与净电荷：蛋白的溶解度与其相对于等电点的净电荷相关。在远离等电点时，蛋白之间库仑斥力较强，溶解度较高；接近等电点时，斥力减弱，易发生聚集沉降。通过调控pH，使目标群体蛋白更接近等电点，同时辅以乙醇降低极性，即可获得选择性沉淀效果。

-离子强度与辅盐效应：一定离子强度可屏蔽电荷、改变双电层厚度，对沉淀边界有微调作用；但在低温乙醇体系中，介质变化往往起决定作用。

（二）组分 I、II、III 与白蛋白的分群关系

免疫球蛋白在特定的低温、pH与乙醇体积分数组合下优先沉降；白蛋白因其较强的构象稳定性、溶解性与表面电荷分布特性，倾向于在较高乙醇体积分数条件下才发生沉降。因此，在白蛋白生产阶段，通过促使组分 II + III 选择性沉降并以固液分离去除，可使上清相对富集白蛋白与后续相关组分，为进入后续的分级步骤创造条件；与此同时，所得沉淀作为免疫球蛋白生产的原料，实现血浆蛋白的生产与价值最大化。

（三）沉淀与固液分离

组分 I + II + III 的分离不仅依赖于溶液态下的相平衡控制，还高度依赖后续固液分离单元的效率与温度一致性。其耦合逻辑包括：

-相平衡到动力学的过渡：当溶解度边界被越过时，形成的微团簇需要在一定剪切与停留时间下长大、聚集并形成可滤的絮体。过强的剪切、过快的流体扰动可能破坏絮体结构，导致细微颗粒穿透滤层或造成滤饼致密化。

-等温性：温度波动会导致瞬时溶解度与乙醇挥发平衡的扰动，进而影响絮体形态与滤液澄明度。因此，分离单元的温控与物料等温衔接对获得稳定澄清至关重要。

-预涂助滤与孔道控制：在不改变溶液化学条件的前提下，通过构筑稳定、均一的物理滤层，有助于早期截留细小沉淀，提高澄明度与流速的平衡性。

-在线监测与反馈：澄明度、压差与流量的联动监测可作为过程健康度的直接表征，从而使操作参数得到及时、温和的调整。

（四）关键质量属性与关键工艺参数

围绕组分 I + II + III 分离，应重点关注以下质量属性与其对应的控制因子：

-澄清滤液的光学清晰度与微粒水平，对应的控制因子包括温度一致性、乙醇体积分数的稳定性、剪切与压差控制及滤层完整性。

-沉淀的完整性与含湿量，受停留时间、搅拌强度与固液分离策略影响，关系到下游免疫球蛋白回收效率。

-白蛋白在该段的保留率，依赖于分级边界的精确控制与固液分离中的夹带最小化。

-工艺卫生与交叉影响，涉及设备状态、清洁与吹扫的充分性以及过程连接的密闭性。

三、组分 I + II + III 的分离工艺研究探讨

（一）原料、试剂与耗材

-原料血浆：来自合规采供浆机构的合格血浆，满足相关药典与内控标准；

-有机溶剂与溶液：药用乙醇；酸碱溶液用于pH调整；

-过滤与助滤材料：深层滤材、预涂助滤剂、滤布与过滤单元密封件等。

-检测与监测：温度、pH、乙醇浓度监测；取样耗材；理化检测所需标准品与试剂。

（二）主要设备与仪器

-反应分离罐，具备在线温度、pH与加料口的密闭连接。

-防爆型低温储罐与缓冲罐，具备保温与等温转运能力。

-防爆计量泵与流量计，实现有机溶剂与溶液的可控加料。

-板框压滤机，具备等温保温、在线压力与流量监测。

-溶剂回收系统、惰性气体系统、防静电接地与可燃气体报警。

-温控冷库、超低温设备与低温转运设施。

-CIP/SIP系统与验证工具，支持设备清洁、灭菌与残留监测。

（三）工艺环境与安全

-生产环境：符合相应洁净级别与防爆分区要求；设定低温作业SOP，人员穿戴与操作培训到位。

-安全控制：惰性气体顶置、乙醇蒸气报警、局部通风与静电控制；所有连接采用密闭快接以减少溶剂挥发与交叉污染。

-质量体系：批记录、在线偏差记录与放行标准完整；关键在线数据实时采集与留存，满足数据完整性要求。

(四) 工艺流程总述

本研究围绕低温乙醇法的人血白蛋白生产前段，完成组分Ⅱ+Ⅲ（以免疫球蛋白为主）的选择性沉淀与固液分离，获得澄清上清为后续白蛋白段提供进料，同时沉淀作为免疫球蛋白生产原料。总体策略在低温条件下，通过分阶段调控pH与乙醇体积分数，使目标群体蛋白依次形成可滤絮体，并在等温条件下实施固液分离与物料转运。

(五) 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ的分离工艺解析与质量风险探讨

1. 原料血浆接收、解冻与混浆

-目的与原理：将合格血浆在可控条件下均质化，降低批内差异并去除可能影响后续分级的脂质与微粒。

-方法概要：血浆在低温条件下解冻，按设定比例混合，必要时实施预澄清/除脂操作。全程保持等温与低剪切，避免泡沫与局部升温。

-关键控制：温度控制；混合均一性；前处理澄明度。

-质量监测：外观、浊度、pH、总蛋白；留样用于基线对照。

-风险控制：防止局部升温导致蛋白变性。

2. 预冷与工艺起始参数设定

-目的与原理：将物料带入目标低温区，预设pH与离子强度的起点，为后续乙醇分级提供稳定基底。

-方法概要：在夹套罐中等温预冷；用经低温预冷的酸/碱溶液缓慢调节pH。

-关键控制：温度、pH值、搅拌均匀。

-监测：在线温度与pH稳定，取样确认。

-风险：快速加料导致局部偏pH；温控响应滞后引起过冲。

3. 乙醇引入与条件设定（形成组分Ⅱ+Ⅲ沉淀）

-目的与原理：调整乙醇体积分数与pH，使免疫球蛋白聚集沉降。

-方法概要：分段或连续方式引入预冷乙醇并微调pH；保持温和搅拌，避免局部过饱和。

-关键控制：乙醇体积分数上升速率、pH值、搅拌强度。

-监测：乙醇浓度与pH稳定；絮体形成。

-风险：边界控制不当导致白蛋白损失。

4. 固液分离（分离组分Ⅱ+Ⅲ）

-目的与原理：在等温条件下分离Ⅱ+Ⅲ沉淀，获得制作白蛋白的澄清上清。

-方法概要：采用深层过滤组合；控制压差爬升速

率与滤液澄明度。

-关键控制：助滤剂级配、压差上限、温度等温、首尾段滤液管理。

-监测：滤液澄明度合格；白蛋白保留率抽样评估。

-风险：穿透、滤饼裂隙通道化、温度扰动。

5. 上清暂存与白蛋白段移交

-目的与原理：保持澄清上清的低温、低剪切与密闭状态，确保后续白蛋白分级起点一致。

-方法概要：等温转入暂存罐；复核三参数与微生物学基线；按计划移交。

-关键控制：温度、pH与乙醇体积分数在设计空间内；生物负荷受控。

-监测：理化与微生物指标近线确认。

-风险：长时间暂存导致密闭性不足引入风险。

6. 沉淀洗涤与免疫球蛋白原料管理

-目的与原理：适度洗涤以提升原料纯度与去除残余上清成分，提高下游回收效率。

-方法概要：在等温与既定介质条件下实施温和洗涤与固液分离；控制洗涤比与次数。

-关键控制：洗涤介质条件一致性、固含与含湿控制。

-监测：洗脱液蛋白泄漏；沉淀水分范围。

-风险：过洗导致目标损失；含湿过高影响储存与后续溶解。

7. 溶剂回收、设备清洗与批间防交叉

-目的与原理：降低溶剂消耗与环境排放，确保设备清洁状态符合再用要求。

-方法概要：回收系统在低温与防爆条件下操作；执行CIP/SIP程序，验证清洁残留与内毒素/蛋白残留。

-关键控制：回收纯度与安全；清洁验证与放行标准。

-监测：回收溶剂纯度检测；清洁取样检测。

-风险：残留导致批间交叉；回收系统泄漏或安全事件。

(六) 关键质量属性（CQA）与检测方法

-滤液澄明度与微粒：采用浊度计与可见异物检查，必要时动态光散射或显微检查作为支撑性数据。

-蛋白含量与分布：总蛋白（如双缩脲/紫外法）、白蛋白定量（免疫比浊或色谱法）、免疫球蛋白定量（免疫学方法）。

-乙醇浓度：在线检测乙醇浓度，采用比重法检测。

-pH与电导率：在线/离线酸度计与电导仪检测。

-含湿与固含（沉淀）：重量法评估。

-微生物学指标：生物负荷、内毒素（鲎试验）按需监控。

-安全与杂质指标：必要时检测脂质残留、血红蛋白泄漏等。

（七）工艺验证

-工艺验证：通过工艺性能确认批验证关键步骤的可重复性；验证报告覆盖设计、临界条件与最不利条件。

-清洁验证与交叉污染评估：建立残留限度与取样方案，确保批次间可接受。

-变更与偏差管理：任何CPP设定或检测方法变更均按变更控制流程执行，并进行影响评估。

结论

组分 I + II + III 分离段是低温乙醇法白蛋白制备的路径分叉点，兼顾白蛋白后续纯化可行性与免疫球蛋白

回收潜力。构建“温度—pH—乙醇体积分数—时间—剪切”五维控制框架，并辅以适当的前处理与等温固液分离策略，是实现质量稳定、可放大的现实路径。本文的工艺分析探讨为生产验证、持续工艺确认与质量体系优化提供了可操作的参考框架。

参考文献

[1] 鲍锦库, 安伟通, 唐斌, 孙承远, 付松林, 兰序强. 两种滤板在低温乙醇提取人血白蛋白FV工艺中的比较[J]. 生物化工, 2019 (04)

[2] 王鸣宇, 王斐, 臧恒昌, 张惠. 人血白蛋白生产及其应用研究进展[J]. 药学研究, 2014 (10)

[3] 郭江红, 谢育媛, 柯兵兵, 王文晞, 曾浩, 但晓梦, 姜红. 人血白蛋白质量评价与研究[J]. 中国药学杂志, 2019 (09)