

# 岛津疫苗质量评价新技术方案（二）

## ——蛋白疫苗篇





# 序言

2018年7月，岛津分析中心推出了《岛津疫苗质量评价新技术方案（一）》——多糖疫苗篇，该文集从数据管理开始，并以多糖疫苗为重点品种，介绍了液相色谱质谱、ICP-MS、激光粒度仪、MALDI-TOF等理化技术在疫苗质量评价中的应用。

从2018年7月至今已一年有余，继多糖疫苗系列解决方案之后，岛津分析中心继续疫苗行业的拓展，并为以百白破为代表的蛋白类疫苗的质量评价提供了系列解决方案。本文集将这一年多的合作成果编写成册——《岛津疫苗质量评价新技术方案（二）》——蛋白疫苗篇。

本文集采用液相色谱质谱技术实现从百日咳菌的培养（发酵）、一次盐析、二次盐析、浸提、粗制、精制、脱毒到成品全过程的监控，检测项目涉及培养基营养成分、代谢产物、抗原蛋白（PT、FHA、PRN和FIM）、毒性残留小分子TCT和争议蛋白ACT。为了探索疫苗佐剂和疫苗的颗粒分布与疫苗的有效性和安全性的关系，我们以激光粒度仪为监测手段，研究了不同佐剂、温度变化、搅拌等因素对疫苗颗粒一致性和稳定性的影响，并在此基础上分析了不同厂家来源的疫苗颗粒分布情况。此外，我们还以电子探针为监测手段，实现了疫苗成品（含佐剂）的形貌和组成分析，从这两方面比较和分析了导致不同厂家疫苗差异的原因。甲醛是很多疫苗的灭活剂（脱毒剂），甲醛残留量的多少在一定程度上反应了该疫苗工艺的稳定性。我们以岛津气相色谱仪（GC）为



基础，开发了疫苗中残留甲醛的含量测定方法，该方法灵敏度高、重复性好，可实现不同厂家百白破疫苗中甲醛的含量测定，有利于疫苗厂家监测和优化生产流程。

本文集与百白破疫苗相关的所有内容均源于岛津疫苗行业组与中国食品药品检定研究院（以下简称中检院）百白破疫苗与毒素室的合作。本文作者在此代表岛津企业管理（中国）有限公司深深地感谢中检院百白破疫苗与毒素室对先进理化技术的接纳、理解与支持，并让这些技术弥补传统检测技术的不足（检测盲区），为提升中国疫苗质量发挥作用。

本版文集是第一版的延续，第三版的基石。更多精彩，敬请期待……

岛津企业管理（中国）有限公司  
分析中心



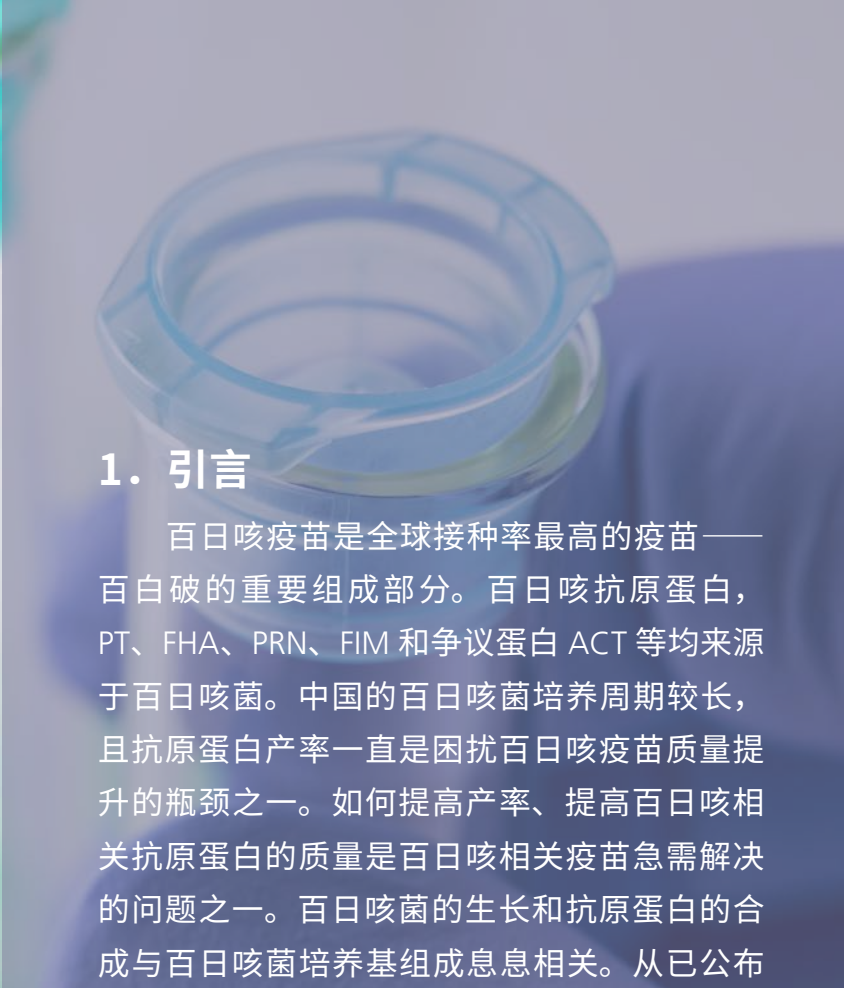
# 目录

---

序言	2
1 培养基上清液方法包用于发酵液监测	6
2 百日咳疫苗发酵过程抗原蛋白累计曲线	15
3 百日咳疫苗生产各环节抗原蛋白含量测定	19
4 百日咳和百白破疫苗中 TCT 含量测定	24
5 百白破疫苗中抗原蛋白含量测定	29
6 百白破疫苗颗粒粒度分析	32
6.1 SALD-7500nano 测定百白破疫苗颗粒的大小和分布	34
6.2 SALD-7500nano 在疫苗颗粒批次一致性评价中的应用	40
6.3 SALD-7500nano 在疫苗颗粒稳定性评价中的应用	46
7 百白破疫苗形貌分析	51
8 疫苗中甲醛残留检测	58
9 Hib 疫苗和脑膜炎四价疫苗中 CTAB 的含量测定方法	65
小结及展望	72



## 培养基上清液方法包用于发酵液监测



**摘要：**本文利用岛津细胞培养基上清液方法包，首次实现了快速监测国内两个主流百白破疫苗厂家用两种培养方法所得的百日咳菌发酵液。虽然各厂家培养基配方中均含有维生素 C，但 LC-MS/MS 测试中并未检测到明显的维生素 C 信号，若维生素 C 是百日咳疫苗必需营养成分，建议实时添加。培养基配方中的脯氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和烟酸均有明显检出，且随发酵时间的增加而降低，推测这些成分在发酵过程中被百日咳菌消耗。通过对比是否添加酪蛋白水解液的发酵液成分变化，发现酪蛋白水解液的添加会改变部分氨基酸的代谢。此外，在添加了酪蛋白水解液的培养基中检测到特有代谢产物胆碱、瓜氨酸和蛋氨酸亚砷。

**关键词：**LC-MS/MS 百日咳 发酵液 氨基酸 腺苷 维生素 酪蛋白水解液

## 1. 引言

百日咳疫苗是全球接种率最高的疫苗——百白破的重要组成部分。百日咳抗原蛋白，PT、FHA、PRN、FIM 和争议蛋白 ACT 等均来源于百日咳菌。中国的百日咳菌培养周期较长，且抗原蛋白产率一直是困扰百日咳疫苗质量提升的瓶颈之一。如何提高产率、提高百日咳相关抗原蛋白的质量是百日咳相关疫苗急需解决的问题之一。百日咳菌的生长和抗原蛋白的合成与百日咳菌培养基组成息息相关。从已公布的百日咳培养基组成来看，百日咳菌的氮源和碳源主要来自氨基酸（脯氨酸、谷氨酸钠、半胱氨酸）、多肽（还原型谷胱甘肽）和维生素（烟酸和维生素 C）。百日咳抗原蛋白中除以上氨基酸以外还存在其它种类的氨基酸，若培养基中并未添加其它氨基酸，百日咳菌一定存在将脯氨酸、谷氨酸和 \ 或半胱氨酸转化为其它氨基酸的酶。除已知添加成分会影响百日咳菌的生长，百日咳菌发酵液中存在的代谢物对百日咳抗原蛋白的合成也具有一定的影响。

本文采用岛津专利技术细胞培养基上清液方法包，稳定性好、灵敏度高的岛津液相色谱串联质谱仪上运行，探索百日咳菌发酵液变化，为优化百日咳菌发酵工艺提供数据参考。

## 2. 实验部分

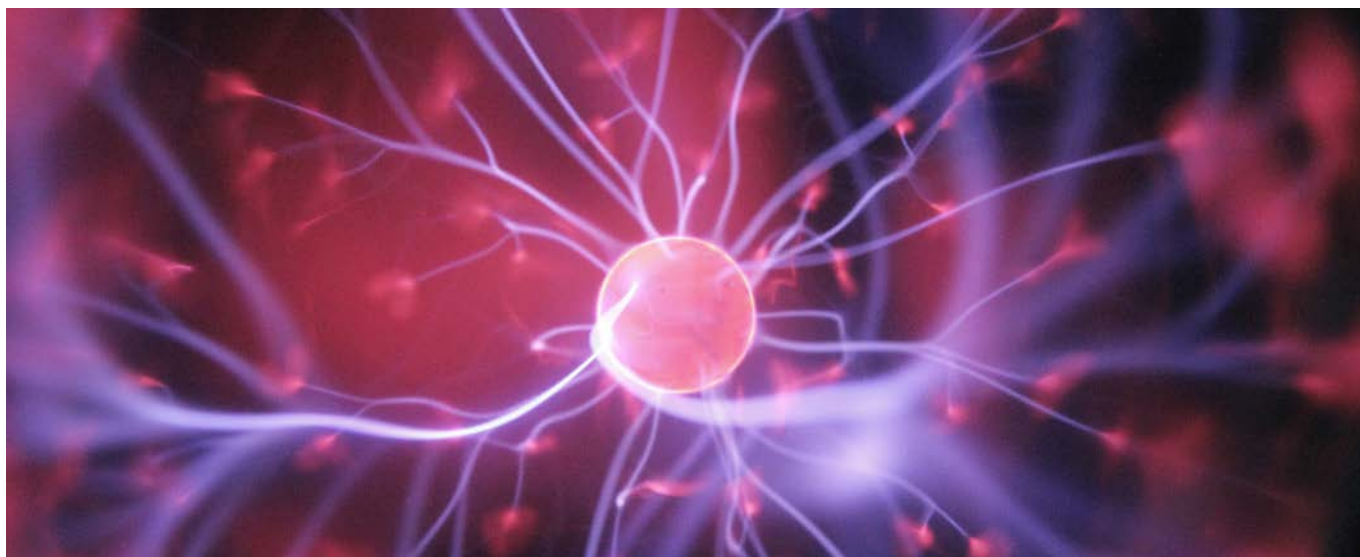
### 2.1 仪器、分析条件

用“岛津细胞培养上清液分析方法包 - 岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析”。

监控的化合物信息：见表 1-1

表 1-1. 细胞培养上清液分析方法包中 96 种化合物列表

编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别
1	2-Isopropylmalic acid	内标	33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	65	Cytidine	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	34	N-Acetylcysteine	氨基酸	66	Cytidine monophosphate	核苷酸
3	Glucosamine Carbohydrate	糖类	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose (Glucose) Carbohydrate	糖类	36	Oxidized glutathione	氨基酸	68	Guanine	核苷酸
5	Sucrose Carbohydrate	糖类	37	Phenylalanine	氨基酸	69	Guanosine	核苷酸
6	Threonic acid Carbohydrate	糖类	38	Pipecolic acid	氨基酸	70	Guanosine monophosphate	核苷酸
7	2-Aminoadipic acid	氨基酸	39	Proline	氨基酸	71	Hypoxanthine	核苷酸
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	40	Serine	氨基酸	72	Inosine	核苷酸
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	73	Thymidine	核苷酸
10	5-Glutamylcysteine	氨基酸	42	Tryptophan	氨基酸	74	Thymine	核苷酸
11	5-Oxoproline	氨基酸	43	Tyrosine	氨基酸	75	Uracil	核苷酸
12	Alanine	氨基酸	44	Valine	氨基酸	76	Uric acid	核苷酸
13	Alanyl-glutamine	氨基酸	45	4-Aminobenzoic acid	维生素	77	Uridine	核苷酸
14	Arginine	氨基酸	46	Ascorbic acid	维生素	78	Xanthine	核苷酸
15	Asparagine	氨基酸	47	Ascorbic acid 2-phosphate	维生素	79	Xanthosine	核苷酸
16	Aspartic acid	氨基酸	48	Biotin	维生素	80	Penicillin G	抗生素
17	Citrulline	氨基酸	49	Choline	维生素	81	2-Aminoethanol	其他
18	Cystathionine	氨基酸	50	Cyanocobalamin	维生素	82	2-Ketoisovaleric acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	51	Ergocalciferol	维生素	83	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
20	Cystine	氨基酸	52	Folic acid	维生素	84	4-Hydroxyphenyllactic acid	其他
21	Glutamic acid	氨基酸	53	Folinic acid	维生素	85	Citric acid	其他
22	Glutamine	氨基酸	54	Lipoic acid	维生素	86	Ethylenediamine	其他
23	Glutathione	氨基酸	55	Niacinamide	维生素	87	Fumaric acid	其他
24	Glycine	氨基酸	56	Nicotinic acid	维生素	88	Glyceric acid	其他
25	Glycyl-glutamine	氨基酸	57	Pantothenic acid	维生素	89	Histamine	其他
26	Histidine	氨基酸	58	Pyridoxal	维生素	90	Isocitric acid	其他
27	Isoleucine	氨基酸	59	Pyridoxine	维生素	91	Lactic acid	其他
28	Kynurenine	氨基酸	60	Riboflavin	维生素	92	Malic acid	其他
29	Leucine	氨基酸	61	Tocopherol acetate	维生素	93	O-Phosphoethanolamine	其他
30	Lysine	氨基酸	62	Adenine	核苷酸	94	Putrescine	其他
31	Methionine	氨基酸	63	Adenosine	核苷酸	95	Pyruvic acid	其他
32	Methionine sulfoxide	氨基酸	64	Adenosine monophosphate	核苷酸	96	Succinic acid	其他



### 3. 样品信息

表 1-2. 样品信息

厂家	培养基名称	培养基组成
厂家 1	A	基础培养基
	D	基础培养基
厂家 2	B	基础培养基 + 酪蛋白水解液
	C	基础培养基

## 4. 结果与讨论

### 4.1 添加氨基酸

A-D 培养基配方中共同的组分有还原型谷胱甘肽（可水解或酶解为甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸）、脯氨酸、谷氨酸钠、烟酸和维生素 C。

培养基 A-D 均未检测到明显的维生素 C 信号。可能的原因有：1) 维生素 C 在百日咳菌发酵的 0-8 h 被消耗（样品取点从 8 h 以后开始）；2) 维生素 C 在培养基使用前即已氧化。取样 -80 度保存的未使用的 A-D 培养基，按培养基上清液方法包处理后测试。结果显示，A-D 培养基中均无明显维生素 C 检出，推测维生素 C 在培养基使用前即已发生变化，并未在百日咳菌的培养中发挥实际作用。

以培养时间为横坐标，目标化合物与内标物质的峰面积比为纵坐标做图。如图 1-1 所示，烟酸、脯氨酸和甘氨酸的浓度均随发酵时间的增加而减少。培养基 B 中甘氨酸的响应显著高于其它培养基，推测培养基 B 中的甘氨酸主要来源于酪蛋白水解液而非谷胱甘肽的水解（酶解）。测试酪蛋白水解液的结果证实了该猜测。培养基 A、C 和 D 中，甘氨酸的起始浓度较低，30 小时后甘氨酸浓度缓慢上升。甘氨酸浓度的上升有两个途径：1) 还原型谷胱甘肽水解（酶解）；2) 其它氨基酸转换所得。培养基 B 中，甘氨酸的浓度从 10 h 开始迅速降低，到 30 h 左右趋于稳定。对比培养基 B 和 A、C、D，推测酪蛋白水解液的加入改变了百日咳菌的甘氨酸代谢方式。烟酸和谷氨酸在百日咳菌发酵的早期并没有明显变化，培养的中期浓度随时间显著降低。百日咳菌发酵的早期主要为百日咳菌的增殖，推测百日咳菌的增殖中无需烟酸和谷氨酸的参与。脯氨酸从 0 小时即急剧降低，到第 20 小时，几乎消耗殆尽，因此有必要从 20 小时开始在发酵中补充脯氨酸。

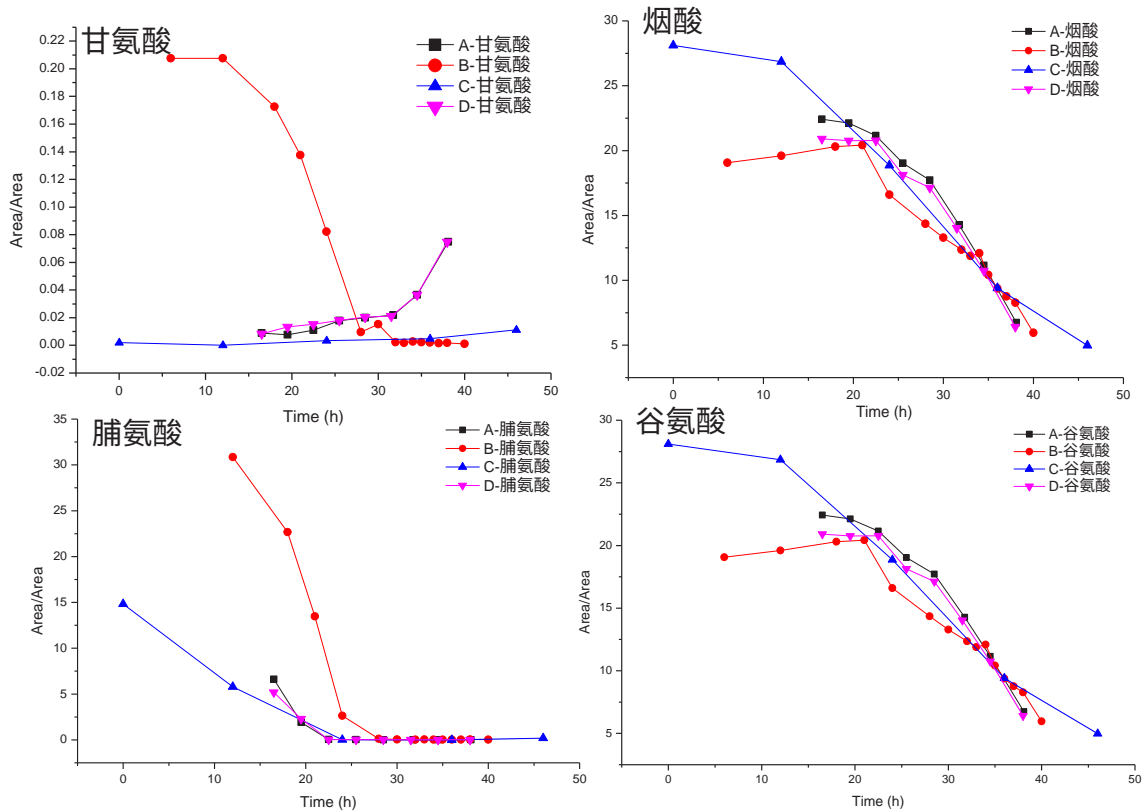


图 1-1. A-D 培养基中共有添加成分监测

## 4.2 氧化型谷胱甘肽

如图 1-2 所示，在培养基 B 和 C 中发现了氧化型谷胱甘肽，培养基 A 和 D 中未检测到明显的氧化型谷胱甘肽。出现该现象的可能原因有：1) 厂家 2 的百日咳菌可将还原型谷胱甘肽转换为氧化型谷胱甘肽；2) 厂家 2 所用还原型谷胱甘肽不纯，其中含有氧化型谷胱甘肽。检测未使用的培养基 B 和 C，发现明显的氧化型谷胱甘肽信号。因此，培养基 B 和 C 中氧化型谷胱甘肽主要来源于原始的添加，即厂家 2 所用还原型谷胱甘肽中含有氧化型谷胱甘肽。

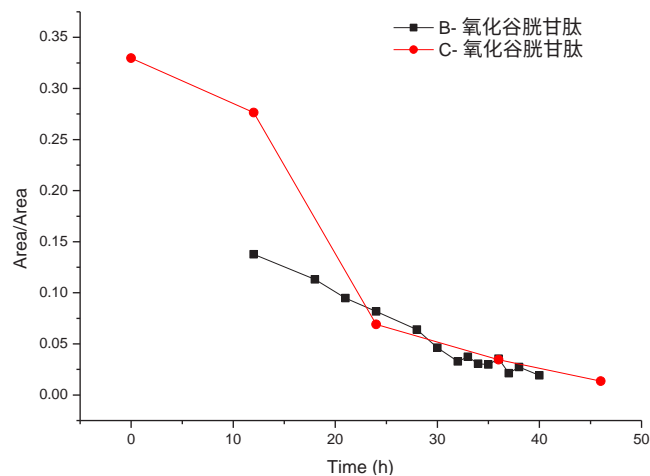


图 1-2. 培养基 B 和 C 中氧化型谷胱甘肽浓度变化趋势

### 4.3 培养基 B 中其它氨基酸变化与其它厂家的异同

在百日咳菌的基础培养基中除添加还原型谷胱甘肽、谷氨酸和脯氨酸以外，并无其它氨基酸的添加，即百日咳抗原蛋白所需的其它氨基酸需通过添加的氨基酸转换而来。但酪蛋白水解液的添加抑制了部分氨基酸的转换，也产生了一些独特的代谢产物。具体情况如下：

培养基 A、C 和 D 中，大部分氨基酸的响应在百日咳菌发酵早期变化不大，发酵中期氨基酸的响应随时间增加而增加。说明百日咳菌的发酵从中期开始需要氨基酸的参与。在培养基 B 中，这些氨基酸的变化趋势与培养基 A、C 和 D 不同，它们的响应随百日咳菌发酵时间的增加而减少。满足以上现象的氨基酸有天冬氨酸 (Aspartic acid)、丝氨酸 (Serine)、蛋氨酸 (Methionine)、异亮氨酸 (Isoleucine) 和苯丙氨酸 (Phenylalanine)、亮氨酸 (Leucine)、组氨酸 (Histidine) 和缬氨酸 (valine)。以缬氨酸为例 (图 1-3)，在培养基 A、C 和 D 中，发酵 20 小时后，缬氨酸的响应缓慢增加，30 小时后呈快速增加趋势。在培养基 B 中，由于有酪蛋白水解液的添加，该水解液含有游离的缬氨酸，缬氨酸的响应较其它培养基中更为显著，且从培养的第 20 小时开始，缬氨酸的响应逐渐下降。以上现象说明，培养基 B 中酪蛋白水解液的添加，改变了大部分氨基酸的代谢。在本次研究中，这种改变主要体现为抑制部分氨基酸的合成和转换。

在培养基 A、C 和 D 中，精氨酸的响应不高 (图 1-4)，但变化趋势明显且与其它氨基酸的变化趋势略有不同。精氨酸的响应随发酵时间的增加，先增加后减少，响应的最高值在 20-30 小时之间。培养基 B 中，精氨酸的响应变化不大，出现该现象与酪蛋白水解液的添加有关。

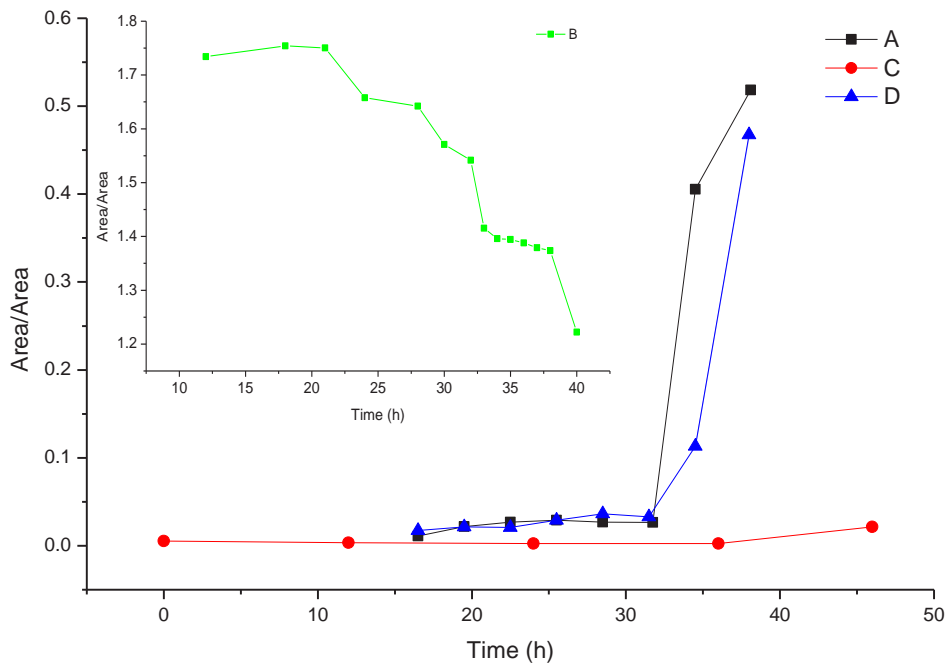


图 1-3. 缬氨酸在培养基 A-D 中的变化趋势

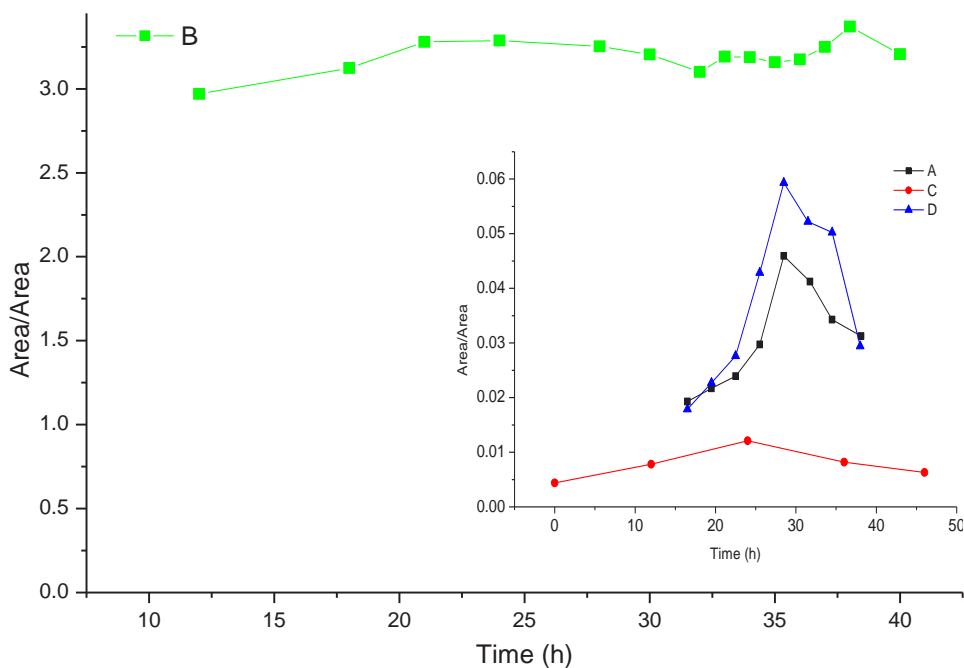


图 1-4. 精氨酸在培养基 A-D 中的变化趋势

色氨酸 (Tryptophan) 的响应在四种培养基中均呈现随时间而增加的趋势 (图 1-5)，从 20 到 30 小时左右增长尤其快速。但相比培养基 A、C 和 D，培养基 B 中色氨酸的增长更为明显，可能的原因是培养基 B 中含有大量丝氨酸和半胱氨酸。细菌体内色氨酸可以由丝氨酸和半胱氨酸转换而来。半胱氨酸在培养基中浓度一直较低，丝氨酸的浓度在 20~30 小时有迅速降低的现象，由此推测色氨酸的增加是由丝氨酸转换而来。

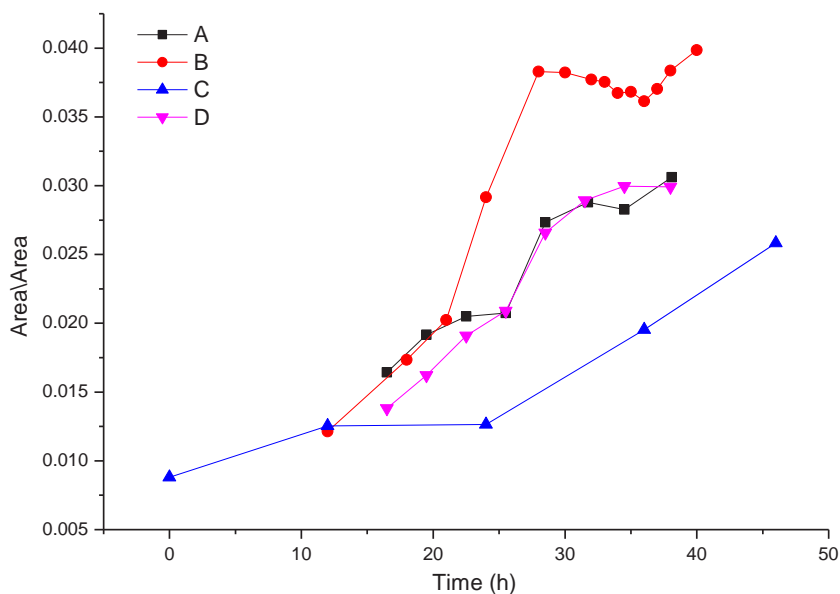


图 1-5. 色氨酸在培养基 A-D 中的变化趋势

酪蛋白水解液的添加不仅改变氨基酸的转换途径,还有独特的代谢产物在培养基B中发现(这些代谢产物在培养基A、C和D中没有明显检出),如蛋氨酸亚砷(Methionine sulfoxide)、瓜氨酸(Citrulline)和胆碱(Choline),如图1-6。蛋氨酸亚砷由蛋氨酸转换而来、瓜氨酸由精氨酸转换而来,是酪蛋白水解液添加引发的两条新代谢通路。胆碱是丝氨酸和甲硫氨酸的代谢产物,由于培养基B中添加的酪蛋白水解液含有较高浓度的丝氨酸和甲硫氨酸,而培养基A、C和D中无这两种氨基酸的添加,因此仅培养基B中检测到明显的胆碱信号。

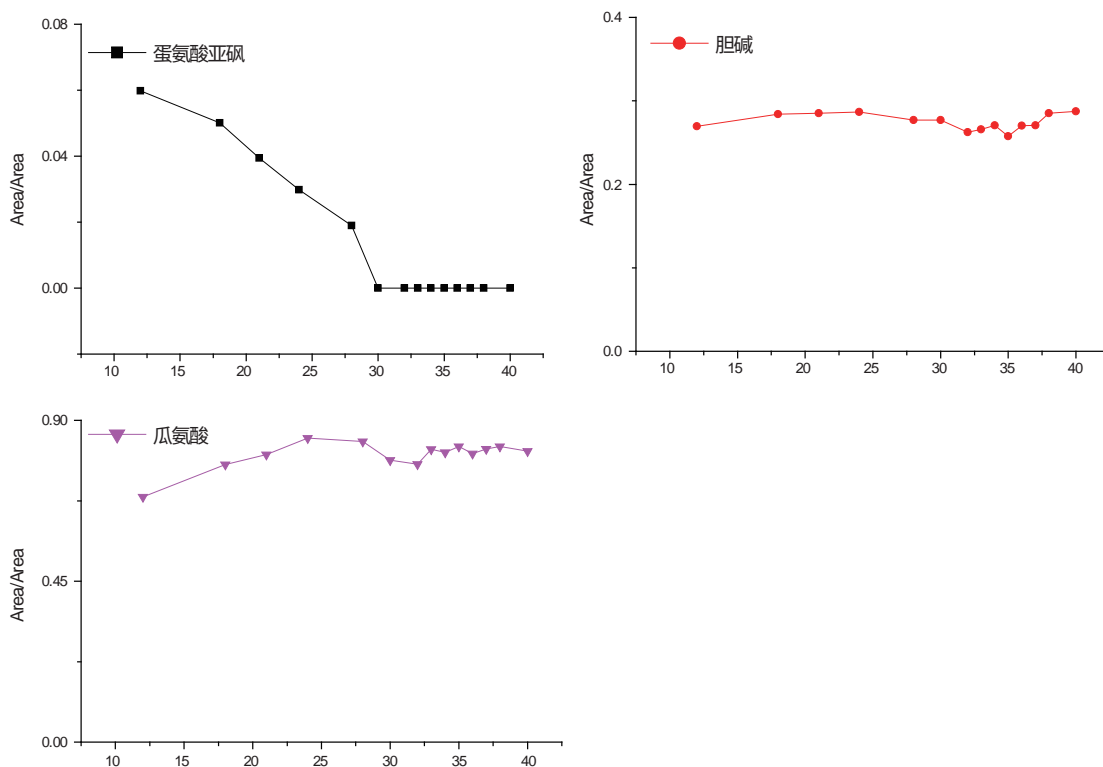


图 1-6. 培养基 B 中蛋氨酸亚砷、胆碱和瓜氨酸随时间变化趋势

#### 4.4 其它成分变化

如图 1-7,除氨基酸的变化和部分代谢产物的差异,四个厂家中存在较多共有的培养基代谢产物且变化趋势相同,如腺苷类物质(腺苷(一磷)酸(Adenosine monophosphate)、胸腺嘧啶(Thymine)、鸟苷(Guanosine)、胸(腺嘧啶脱氧核)苷(Thymidine)、腺嘌呤(Adenine)、腺苷(Adenosine)和脱氧胞苷(Deoxycytidine))和有机酸(苹果酸(Malic acid)、苏糖酸(Threonic acid)、4-氨基丁酸(4-Aminobutyric acid)和胞苷酸(Cytidine monophosphate))等,几乎都随时间的增加而增加且增加趋势从第一个监测点即已开始。

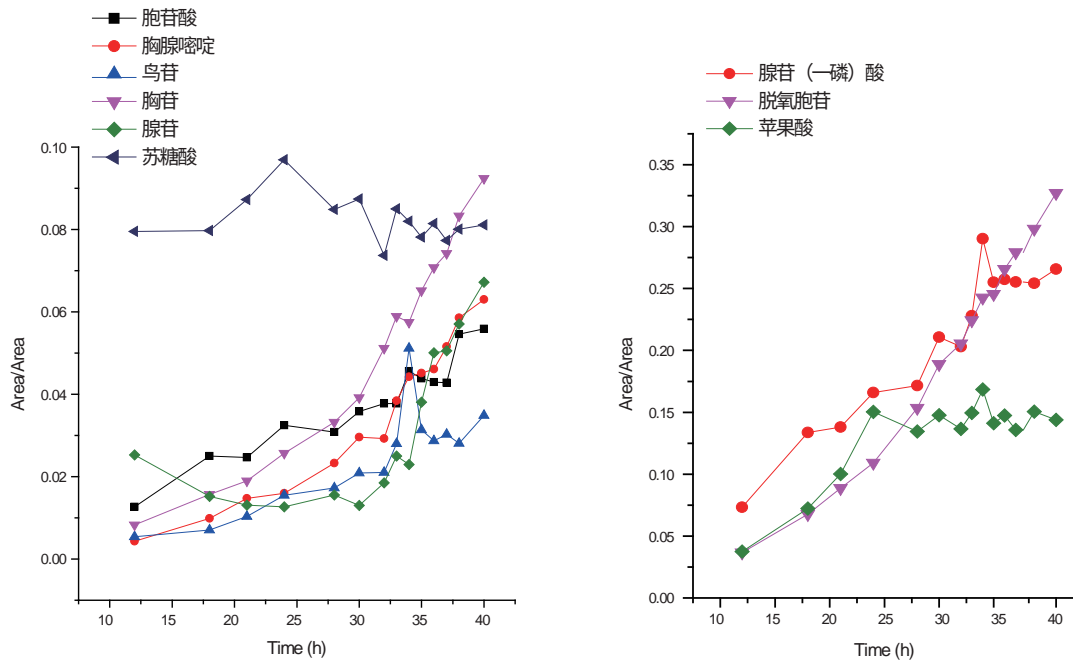


图 1-7. 培养基 B 中其它物质的浓度变化

## 5. 结论

细胞培养基上清液方法包与液相色谱质谱结合可实现不同来源、不同时间段的百日咳菌发酵液的监测。不仅可以实现已知添加物的浓度变化监测，还可实现未知代谢物的监测。此次监测的化合物种类有氨基酸、维生素、有机酸、核苷酸等。通过比较是否添加酪蛋白水解液的发酵液变化，发现酪蛋白水解液的添加改变了百日咳菌的某些氨基酸代谢途径，同时有新的代谢产物出现。维生素 C 在各家培养基中均有添加，但并未检测到维生素 C 的明显信号，推测维生素 C 在发酵前即已发生氧化，并未在培养过程中发挥实际作用。此外，相同培养基用于不同厂家的百日咳菌培养代谢产物也存在一定差异，如氧化型谷胱甘肽只在厂家 2 的 B、C 培养基中有检出，在厂家 1 的 A 和 D 培养基中无检出。

# 百日咳疫苗发酵过程抗原蛋白累计曲线



摘要：以百日咳抗原蛋白定量方法包为基础，发展百日咳疫苗发酵过程中抗原蛋白累计曲线的监控方法，并将该方法用于两种不同生产工艺百日咳疫苗的比较。结果显示，不同的培养工艺对抗原蛋白的生长有较大影响。

关键词：百日咳 百日咳抗原蛋白累计曲线 发酵工艺



## 1. 引言

百日咳菌在发酵过程中产生 PT、FHA、PRN、FIM 和 ACT（争议蛋白）等抗原蛋白。抗原蛋白累计曲线可用于指导培养工艺的监控，如培养基的添加、抗原蛋白的收获时间等。本文以百日咳抗原蛋白定量方法包为基础，发展两种不同工艺百日咳发酵过程中抗原蛋白的监控，对比不同培养工艺对抗原蛋白累计曲线的影响。





## 2. 方法

样品前处理方法: 取不同发酵时间段的百日咳发酵液, 按百日咳抗原蛋白定量方法包处理后, 用岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析。

## 3. 实际样品测试

### 3.1 两种不同工艺所得 PT S1 生长曲线

PT 的所有亚基均呈现相似的趋势 (图 2-1)。相对于工艺 1, 工艺 2 中 PT S1-S5 亚基的生长更早开始, 但生长速度明显慢于工艺 1。工艺 1 中 PT S1-S5 的生长开始较晚, 但由于其生长速度快, 在 27 h 左右工艺 1 的发酵罐中 PT S1-S5 的浓度超过工艺 2 并在更快的时间内达到生长曲线的峰值。

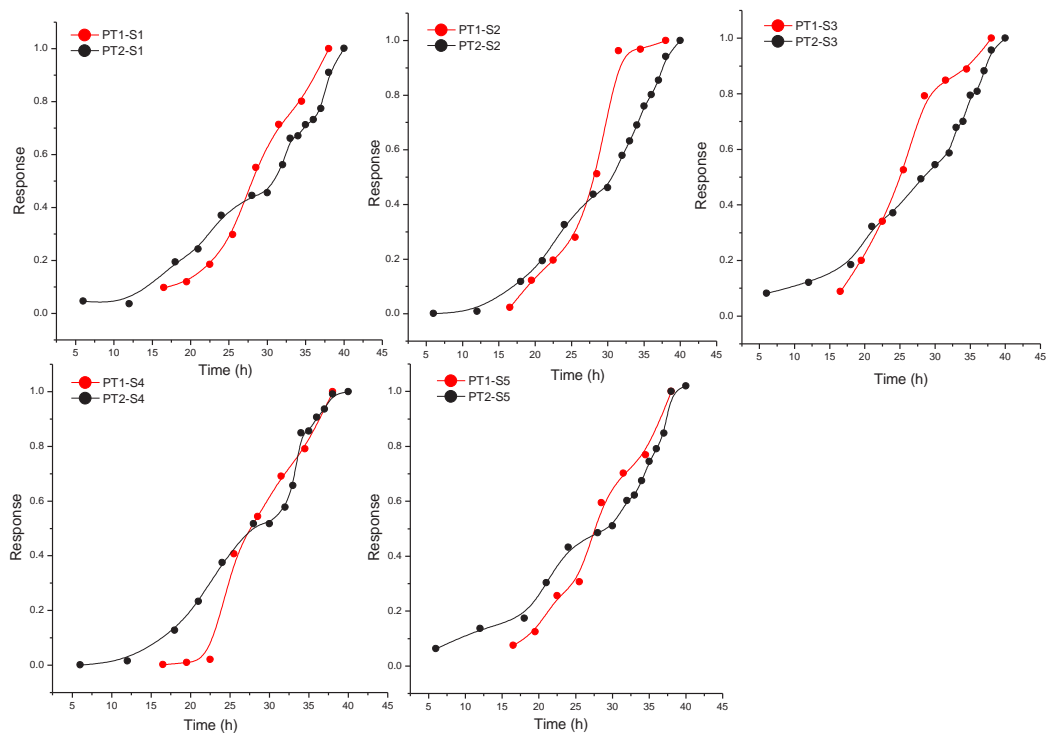


图 2-1 两种不同工艺所得 PT S1-S5 生长曲线

### 3.2 两种不同工艺所得 FHA 生长曲线

FHA 和 PRN 的生长曲线与 PT 类似：相对于工艺 1，工艺 2 中 FHA 的生长更早开始，但生长速度明显慢于工艺 1。工艺 1 中 FHA 的生长开始较晚，但由于其生长速度快，在 27 h 左右工艺 1 的发酵罐中 FHA 的浓度超过工艺 2 并在更快的时间内达到生长曲线的峰值。以 FHA 生长曲线为例，见图 2-2。

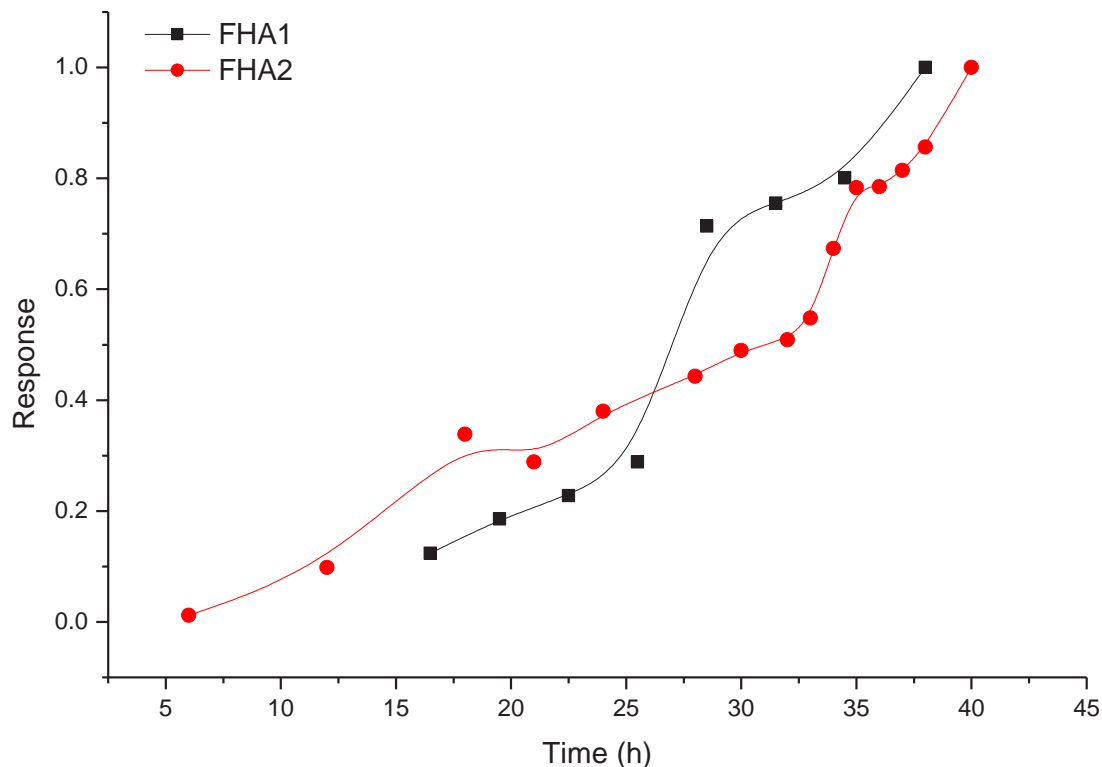
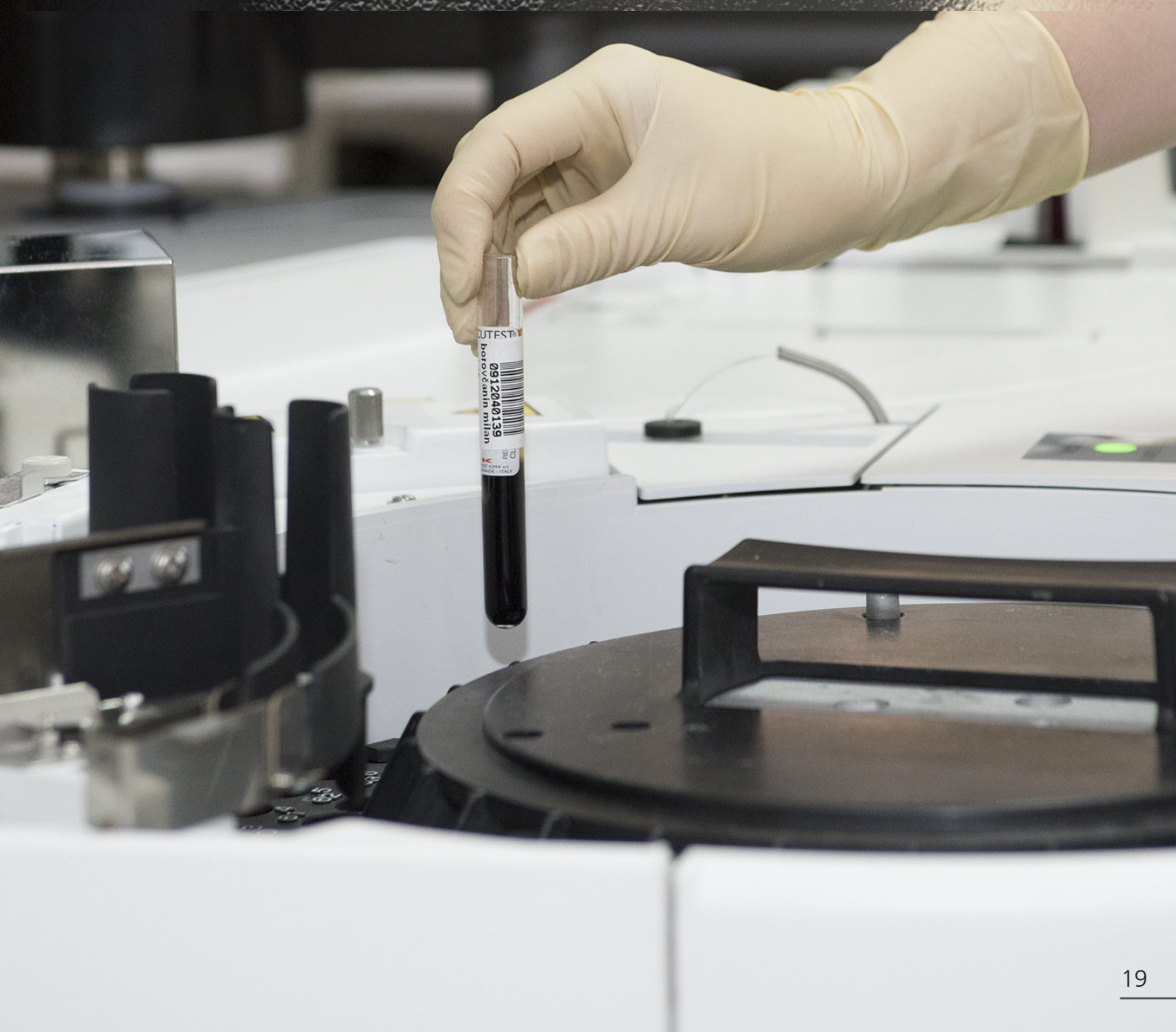


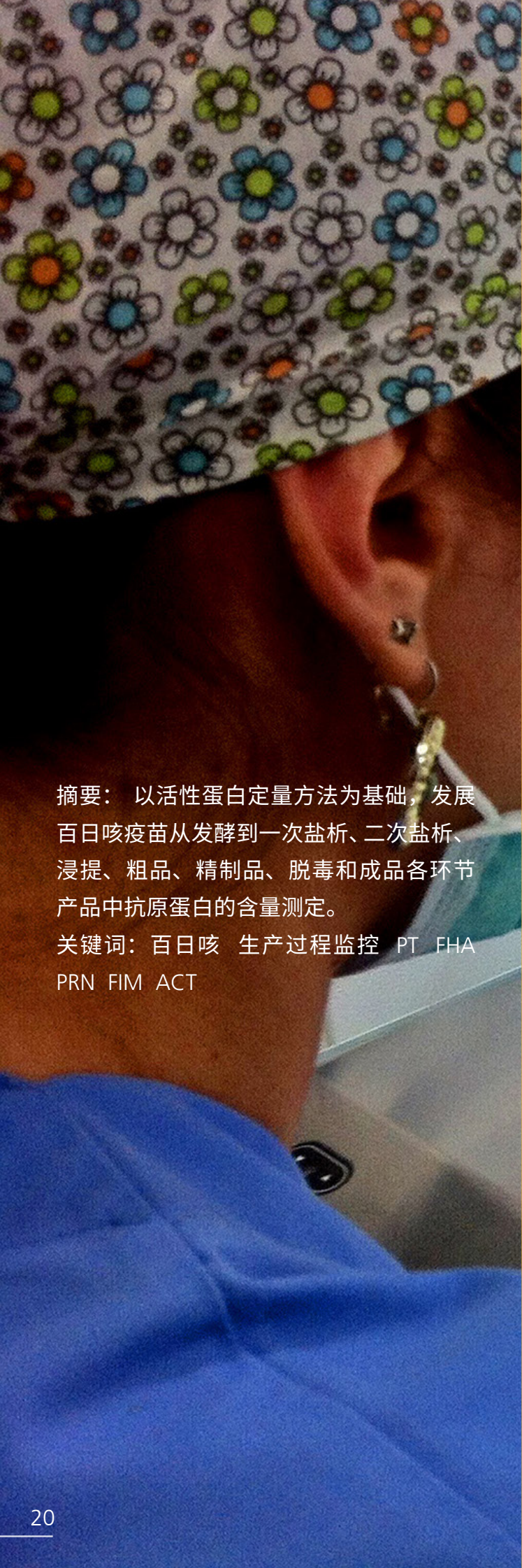
图 2-2 两种不同工艺所得 FHA 生长曲线

## 4. 结论

发酵工艺不同直接导致抗原蛋白累计曲线不同且培养工艺对抗原蛋白 PT S1-S5、FHA 和 PRN 的影响类似。工艺 1 中抗原蛋白的生成时间较工艺 1 更晚，但抗原蛋白的生长速度显著高于工艺 2，且在 27 h 左右抗原蛋白含量超过工艺 1。

# 百日咳疫苗生产各环节**抗原蛋白**含量测定





摘要：以活性蛋白定量方法为基础，发展百日咳疫苗从发酵到一次盐析、二次盐析、浸提、粗品、精制品、脱毒和成品各环节产品中抗原蛋白的含量测定。

关键词：百日咳 生产过程监控 PT FHA PRN FIM ACT

## 1. 引言

百日咳菌在发酵后大致需要经过一次盐析、二次盐析、浸提、粗品、精制品、脱毒几个步骤，各环节检测合格后加入佐剂吸附制得疫苗成品。在液相色谱串联三重四极杆质谱方法发展以前，仅有限的几个环节可用 ELISA 或 Lowry 法监控，缺乏全过程通用的监测方法。其中 Lowry 仅可用于纯蛋白的含量测定，无法应对复杂基质中某特定蛋白的定量分析。ELISA 方法存在试剂盒开发周期长、仅适用于本企业产品、无法用于不同企业之间产品的比较，甚至难以实现工艺变更前后产品的对比和评价。液相色谱串联三重四极杆质谱为基础的抗原蛋白定量方法很好的弥补了 Lowry 法和 ELISA 方法的不足，可用于全过程产品的监控、同一企业不同阶段产品的比较以及不同企业产品的评价和对比。

本文以岛津百日咳抗原蛋白定量方法包为基础，用于百日咳生产全过程中抗原蛋白的含量监控。

## 2. 方法学参数

样品前处理方法：取不同阶段百日咳产品，按百日咳抗原蛋白定量方法包的方法处理后，用岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析。

## 3. 实际样品测试

### 3.1 不同阶段 PT 的含量变化

如表 3-1，PT 的工艺稳定性较好，3 个批次 PT 含量在各个阶段均呈现出批次 3>2>1 的趋势；从发酵液可知，各批次中 PT 均具有较好的完整性，从 S1 到 S5 亚基可检测到，且亚基比例与中国 PT 标品接近；4 种透过液和两次盐析上清液中目标蛋白浓度较低，表明在这些步骤中没有明显的 PT 损失；浸提上清透过液中检测到较高浓度的目标蛋白提示有生产步骤导致了目标蛋白的碎裂，碎片透过超滤膜出现在透过液中。

表 3-1 三批次百日咳过程样品中 PT 抗原蛋白含量测定

	S1			S2			S3			S4			S5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
发酵液	9.4	12.1	14.6	10.9	13.8	18.1	10.9	13.3	18.0	9.7	12.9	15.2	22.2	23.1	27.9
发酵液透过液	0.6	1.7	2.4	-	1.4	2.8	-	2.0	2.9	-	2.3	2.6	2.3	9.0	10.0
一段盐析上清	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-
一段盐析上清透过液	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
一次浸提上清	44.1	62.7	70.9	56.7	80.0	84.6	43.5	63.8	67.0	55.3	78.3	81.6	92.4	145.0	151.9
一次浸提上清透过液	18.0	33.4	43.7	25.2	40.5	51.4	19.5	32.5	42.2	24.2	42.1	50.7	37.9	59.8	76.9
二次盐析上清	1.1	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	2.3	-
二次盐析上清透过液	0.1	0.2	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
粗制	104.4	177.2	281.2	105.6	162.5	252.1	92.4	142.3	197.0	218.5	347.6	493.2	349.4	374.6	554.0
精制	71.4	115.1	-	105.9	169.6	-	89.8	138.6	-	117.2	184.7	-	164.8	265.3	-
超滤透过液	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：为保护用户产品信息，表中数据经过一定处理，所示数据不代表产品本身。

### 3.2 不同阶段 FHA、PRN、FIM 和 ACT 含量测定

如表 3-2 所示，与 PT 的趋势一样，整个生产过程中，FHA、PRN、FIM 和 ACT 含量在 3 个批次各个阶段都呈现出批次 3>2>1；生产各阶段均有 ACT 检出。与 PT 一样，4 种透过液和两次盐析上清液中目标蛋白浓度较低，表明在这些步骤中没有明显的 FHA、PRN、FIM 和 ACT 损失；一次浸提上清透过液中检测到较高浓度的目标蛋白，提示有生产步骤导致了目标蛋白的碎裂，碎片透过超滤膜出现在透过液中。

表 3-2 三批次百日咳过程样品中 FHA、FRN、FIM 和 ACT 抗原蛋白含量测定

	FHA			PRN			FIM			ACT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
发酵液	9.9	12.0	20.2	3.4	6.1	6.0	11.2	6.9	3.8	1.2	-	1.2
发酵液透过液	2.1	4.4	7.0	-	1.1	1.3	2.3	3.6	3.2	-	-	1.3
一段盐析上清	7.1	2.9	3.0	-	-	-	1.0	3.4	0.9	2.9	1.7	-
一段盐析上清透过液	2.4	2.0	1.8	-	-	-	1.0	3.1	0.8	-	-	-
一次浸提上清	171.6	188.2	184.6	52.4	65.3	62.7	23.8	31.9	30.2	14.2	41.8	41.8
一次浸提上清透过液	79.4	95.0	116.7	23.0	32.9	39.6	4.0	13.4	17.1	9.5	20.8	24.8
二次盐析上清	3.8	9.7	-	-	1.8	-	2.2	3.9	-	-	2.7	-
二次盐析上清透过液	2.6	4.9	2.4	-	-	-	0.8	3.0	-	-	-	-
粗制	700.9	857.2	1067.8	150.2	349.4	436.1	82.8	149.4	141.9	120.8	168.5	223.0
精制	240.4	295.0	-	83.4	108.5	-	5.5	16.6	-	56.2	79.5	-
超滤透过液	1.2	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-

注：为保护用户产品信息，表中数据经过一定处理，所示数据不代表产品本身。

### 3.3 三批次中 PT-FHA-PRN 含量比

各个批次发酵液浓缩液中 PT: FHA: PRN 浓度比例基本符合 1:1:0.3 的要求，与现在组分百日咳疫苗抗原比例一致，如图 3-1 所示。

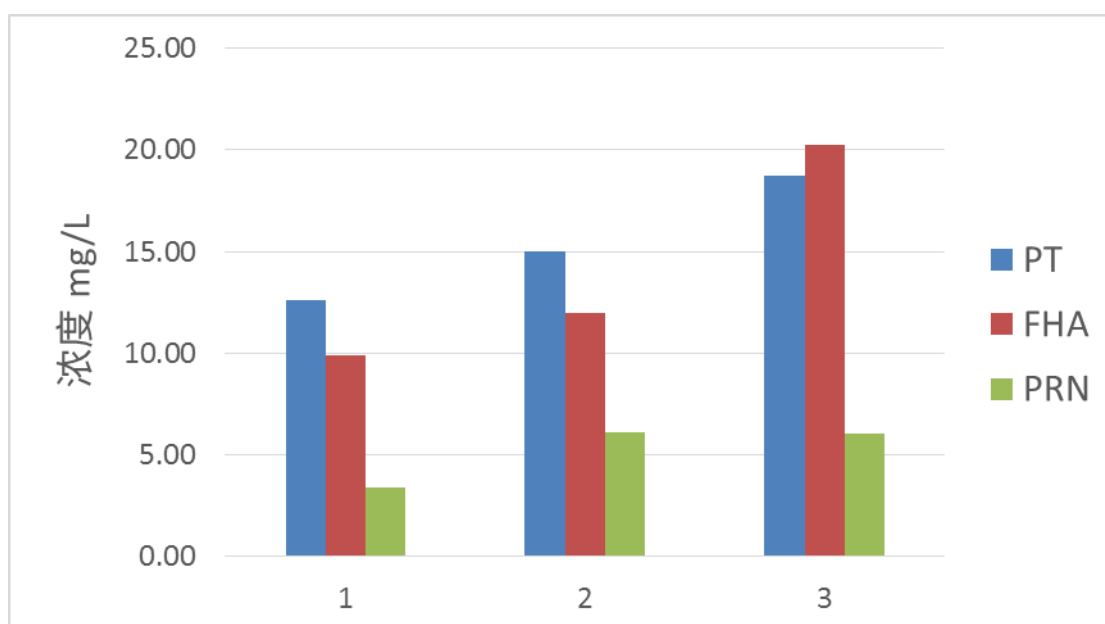


图 3-1 3 批次发酵液中抗原蛋白比例



#### 4. 结论

- 1-3 批次各蛋白变化趋势可以看到该生产工艺较为稳定；
- 从发酵液上清可以看到 PT 亚基完整性较好；
- 无论是发酵上清还是粗制和精制样品中均发现 ACT 相关肽段；
- 除浸提透过液以外，其余透过液和盐析上清液中均未发现明显目标蛋白，说明盐析和超滤过程中无明显目标蛋白损失；
- 浸提透过液中目标蛋白肽段的检出提示有生产步骤导致了蛋白的碎裂。

# 百日咳和百白破疫苗中 TCT 含量测定



**摘要：**百日咳杆菌气管细胞毒素（TCT）是一种引起百白破疫苗（DTP）不良反应的毒性糖肽。尽管各国药典均规定了百日咳疫苗产品中TCT的含量限度，但均没有推荐TCT的含量测定方法。本研究以岛津液相色谱串联质谱为基础发展了一种TCT含量测定方法。本研究优化了包括色谱柱类型和流动相组成在内的TCT色谱条件。虽然TCT在反相色谱模式和本方法所选特殊模式均具有较好的保留，但本方法所选模式与蛋白沉淀的前处理方法溶剂兼容，因此采用本方法所选模式分离TCT。优化所得方法具有较宽的线性范围（5.77-369 ng/L），良好的重复性（峰面积RSD不大于3.88%），各种基质中均较好的回收率（95%-102.5%）且比衍生-紫外法灵敏度高9781倍，是药典要求的TCT最高限量的1/5116。将本方法用于共纯化百日咳疫苗、组分百日咳疫苗、共纯化无细胞百白破疫苗（co-purified DTaP）和组分无细胞百白破疫苗（DTaCP），所有产品均未有TCT检出，表明被检样品具有较好的工艺条件可避免TCT在产品中的残留。

**关键词：**液相色谱串联质谱 百日咳杆菌气管细胞毒素 百白破 百日咳 TCT

## 1. 引言

百白破 (DTP) 疫苗由百日咳疫苗、白喉疫苗和破伤风疫苗联合组成, 是全球范围内应用最广的疫苗之一, 同时也是已报道不良反应次数最多的疫苗。2015 年, 百白破疫苗不良反应约占中国疫苗不良反应的三分之一。百日咳杆菌气管细胞毒素 (TCT) 最早由 Goldman 等人从百日咳杆菌培养液中发现, 它的存在被认为是导致百日咳疫苗和百白破疫苗不良反应的原因之一。在呼吸上皮细胞培养实验中发现, 浓度为  $1\ \mu\text{M}$  的 TCT 即可摧毁纤毛细胞群。当纤毛细胞被破坏以后可以产生类似百日咳的症状, 如咳嗽甚至肺部感染。由于 TCT 的高活性和破坏力, 各国药典均对百日咳疫苗中 TCT 的最高含量做出了限定, 不得超过  $2\ \text{pmol}/\text{剂}$ 。

尽管各国药典均对 TCT 的含量做出了限定, 但由于无商品化 TCT 对照品、TCT 对照品制备困难和缺乏高灵敏度、高选择性 TCT 检测方法等原因, 目前各国药典均无 TCT 的检测方法记载。由于 TCT 无强紫外吸收基团 (图 1) 且受疫苗基质干扰, 即使采用低波长检测, 仍然无法实现复杂疫苗基质中 TCT 的高灵敏度、准确检测。例如, 以  $204\ \text{nm}$  为检测波长, 进样  $10\ \mu\text{L}$  浓度为  $2\ \text{nmol}/\text{L}$  的 TCT 对照品, 无明显紫外吸收峰检出, 该浓度为药典规定 TCT 不得残留量最高限度 ( $2\ \text{pmol}/\text{剂}$ , 即  $4\ \text{nmol}/\text{L}$ )。Goldman 等人将柱前衍生-HPLC-UV 方法用于疫苗中 TCT 的含量测定, 该方法在进样  $200\ \mu\text{L}$  时, 可实现浓度为  $5\ \text{pmol}/\text{mL}$  TCT 的检测, 该方法灵敏度与药典需要尚存在一定差距, 且方法耗时较长 ( $45\ \text{min}$ )。此外, 衍生效率受基质和衍生试剂干扰, 从而影响定量的准确性、重复性和再现性, 不能实现疫苗中 TCT 的高灵敏度、高选择性、准确筛查, 且定量所需消耗的对照品较多, 增加了 TCT 对照品制备的工作量。通用型检测器被报道为紫外检测器的有利补充, 无需衍生即可实现弱紫外吸收和无紫外吸收化合物的检测。但通用型检测器的灵敏度通常在  $\text{mg}/\text{L}$  级别, 无法满足各国药典对 TCT 含量检测的限量要求。更重要的是, 无论是紫外检测器还是通用型检测器均需要对照品, 通过对比样品和对照品保留时间定性。目前尚无商品化的 TCT 对照品, 且 TCT 对照品的制备复杂。通过  $48\ \text{h}$  培养、纯化  $1\ \text{L}$  TCT 培养液最多只能制备得到  $700\ \text{nmol}$  的 TCT 粗品。

为了实现疫苗中 TCT 的有效定性和定量分析, 需要发展一种无须衍生、灵敏度、选择性较高、适合百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 快速筛查的方法。本文发展了一种 LC-MS/MS 方法用于百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的定性和定量分析。从百日咳杆菌培养液中纯化得到 TCT 样品后, 通过 LC-IT-TOF 表征确定其结构后作为对照品, 用于 LC-MS/MS 定量方法的发展。系统优化了 TCT 检测的 MRM 参数和色谱条件, 并对方法的重复性、回收率、线性、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和残留进行了考察。方法优化后, 将其用于两种主流工艺 (共纯化和组分) 所得百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的检测。

## 2. 方法学参数

按 TCT 分析方法包操作步骤处理后, 用岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 方法学考察

本文从选择性、样品残留、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ)、重复性、定量准确度和线性范围对发展的 LC-MS/MS 方法进行了考察。

使用开发的岛津液相色谱串联质谱方法分别分析了样品溶剂 (乙腈水溶液)、百日咳疫苗和百白破疫苗基质样品, 在 TCT 出峰处均无明显信号峰, 表明该方法不受样品处理溶剂和疫苗基质的干扰, 可在复杂的疫苗基质中选择性检测 TCT, 是一种高选择性的分离检测方法。用 LC-MS/MS 方法分析高浓度 TCT 样品 (369 ng/L), 随后进空白溶剂分析, 在 TCT 出峰处无明显 MRM 信号峰检出, 表明该方法无明显残留 (图 3D)。因此, 该方法可以用于较宽浓度范围内样品的分离检测, 高浓度样品分析后无需增加色谱柱和系统清洗步骤, 即可实现低浓度样品的分离检测。

方法 LOD 用统计学方法计算所得, 并用实验验证后确定。统计学公式为 Keshishian 等报道 [20]:

$$\text{LOD} = \text{Mb} + t_{0.95} (\text{SDB} + \text{SDs})/\sqrt{n}$$

其中, Mb 和 SDB 分别为空白样品的平均偏差和标准偏差, SDs 为线性曲线最低浓度点样品的标准偏差。t<sub>0.95</sub> 是样本量 n=4 时的 t 分布值。LOQ 为  $\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD}$ 。经测试和计算所得本方法 LOD 和 LOQ 分别为 0.72 ng/L 和 2.88 ng/L。配置 LOQ 和 LOD 对应浓度 TCT 样品进样测试, 实验测试所得 0.72 ng/L (S/N=3.2) 和 2.88 ng/L (S/N=13.4) TCT 样品的 S/N 分别不低于 3 和 10。对比本方法 LOQ 和文献报道灵敏度最高的衍生-HPLC-UV 方法 [2] (进样 200 μL, LOQ 为 1408.5 ng/L), 本方法灵敏度比文献方法高 9781 倍。本方法定量限远低于药典对 TCT 含量的控制浓度。药典规定疫苗中 TCT 含量不得超过 2 pmol 每剂。按照通常疫苗体积 0.5 mL 计算, 药典控制浓度应为 3684 ng/L, 是本方法 LOQ (2.88 ng/L) 的 5116 倍。此外, 该方法仅需 10 min (含色谱柱平衡) 即可完成一个样品中 TCT 的检测, 与 HPLC-UV 方法 (超过 45 min) 相比, 具有更高的检测通量。

配制浓度从 5.77 ng/L 到 369 ng/L 范围内的 TCT 对照品溶液, 共 7 个浓度样品, 每个浓度样品进样三次。将每个浓度所得 TCT 的峰面积与对应浓度作线性曲线, 得工作曲线: 峰面积 = 1164.7 × 样品浓度 - 1201.7, R<sup>2</sup> = 0.9995。线性曲线的定量准确性用回收率 R 表示。R = C 测试浓度 / C 标准浓度 × 100%。C 测试浓度是计算浓度, 计算方法为将线性曲线浓度点峰面积带入工作曲线, 计算所得浓度, C 标准浓度为配制线性曲线的实际浓度。经计算所得, 线性曲线的 7 个浓度点回收率在 98.7% 到 104.8% 范围内, 表明该方法用于 5.77 ng/L 到 369 ng/L 浓度范围内 TCT 含量测定具有较高的准确性。

考察低浓度 (11.5 ng/L) 和中等浓度 (92.3 ng/L) TCT 样品进样 5 次的峰面积重复性 [6]。浓度为 11.5 ng/L 和 92.3 ng/L 的 TCT 溶液峰面积 RSD 分别为 3.88% 和 2.66%。TCT 为疫苗中需严格控制的有毒物质, 如果疫苗中存在 TCT, 为保证定量准确性, 避免疫苗质量的误判, 测定其含量所用标准曲线建议每天测试。

### 3.2 百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的含量测定

将优化后的岛津液相色谱串联质谱方法用于 9 个不同厂商生产的共纯化百日咳疫苗、组分百日咳疫苗、共纯化百白破疫苗 (DTwP) 和组分百白破疫苗 (DTaP) 中 TCT 筛查和含量测定。如表 4-1 所示, 9 个被测厂商送检的当前批次疫苗中均无 TCT 检出, 表明这些疫苗均未受 TCT 污染。方法回收率由以下方法测试 [3, 16]:

$$\text{回收率} = (\text{C 加标} - \text{C 样品}) / \text{C 标} \times 100\%$$

C 加标为疫苗加标后所得 TCT 浓度, C 样品为样品中 TCT 浓度; C 标为标准品溶液浓度。如表 1 所示, TCT 在所有样品基质中均具有较好的回收率, 表明共纯化百日咳疫苗、组分百日咳疫苗、共纯化百白破疫苗 (co-purified DTaP) 和组分百白破疫苗 (DTacP) 基质均对 TCT 检测没有明显抑制作用。

表 4-1 百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的检测和回收率

疫苗	厂家	含量 (ng/L)	回收率 %
Co-purified PT	1	-	102.5%
	2	-	101.7%
	3	-	100.0%
Component PT	4	-	97.4%
	5	-	98.8%
co-purified DTaP	6	-	96.4%
	7	-	99.5%
DTacP	8	-	98.3%
	9	-	102.5%

-: 未检出

## 4. 结论

本文发展了一种液相色谱串联质谱方法用于共纯化百日咳疫苗、组分百日咳疫苗、共纯化百白破疫苗 (co-purified DTaP) 和组分百白破疫苗 (DTacP) 中 TCT 的检测。该方法无需标准品, 即可实现不同厂家百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的高灵敏度 (LOD=0.72 ng/L) 快速筛查。使用 TCT 标准品, 即可实现准确定量。本文实现了百日咳细胞培养液中 TCT 的纯化和结构鉴定。系统考察了色谱模式和流动相组成 (流动相 pH 值、缓冲盐浓度和起始乙腈含量) 对 TCT 保留行为的影响。优化所得液相色谱串联质谱法方法具有线性范围宽 (5.77-369 ng/L)、重复性好 (峰面积 RSD% 不超过 3.88%)、无明显残留和可用于高通量样品检测等优点。用于 9 个不同厂家、不同生产工艺百日咳疫苗和百白破疫苗中 TCT 的检测均具有较好的回收率 (96.5%-102.5%), 其灵敏度比已报道的衍生 -HPLC-UV 方法高 9781 倍, 是药典要求疫苗中 TCT 最高残留量的 1/5116。

# 百白破疫苗中抗原蛋白含量测定



## 1. 引言

无论是共纯化疫苗还是组分疫苗，均需要严格控制抗原蛋白的含量。目前仅有 ELISA 方法用于 PT 测定，但 ELISA 方法开发周期长，且只适合特定厂家特定工艺所得百白破疫苗中某一种抗原蛋白的含量测定，无法用于不同批次、不同工艺、不同厂家产品的对比以及不同抗原蛋白的同时定量和对比。岛津百白破抗原蛋白定量方法包可以完美解决以上困惑，为百白破疫苗成品的质量控制提供参考。

**摘要：** 疫苗成品中抗原蛋白的完整性和含量与疫苗的有效性直接相关。本文将百白破疫苗抗原蛋白含量测定方法包用于百白破疫苗成品中抗原蛋白 PT、FHA、PRN、FIM 和 ACT 的含量测定。

**关键词：** 液相色谱串联质谱 PT FHA PRN FIM ACT 百白破



## 2. 仪器、试剂和方法条件

按百白破抗原蛋白定量方法包操作步骤处理后，用岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析。

## 3. 结果与讨论

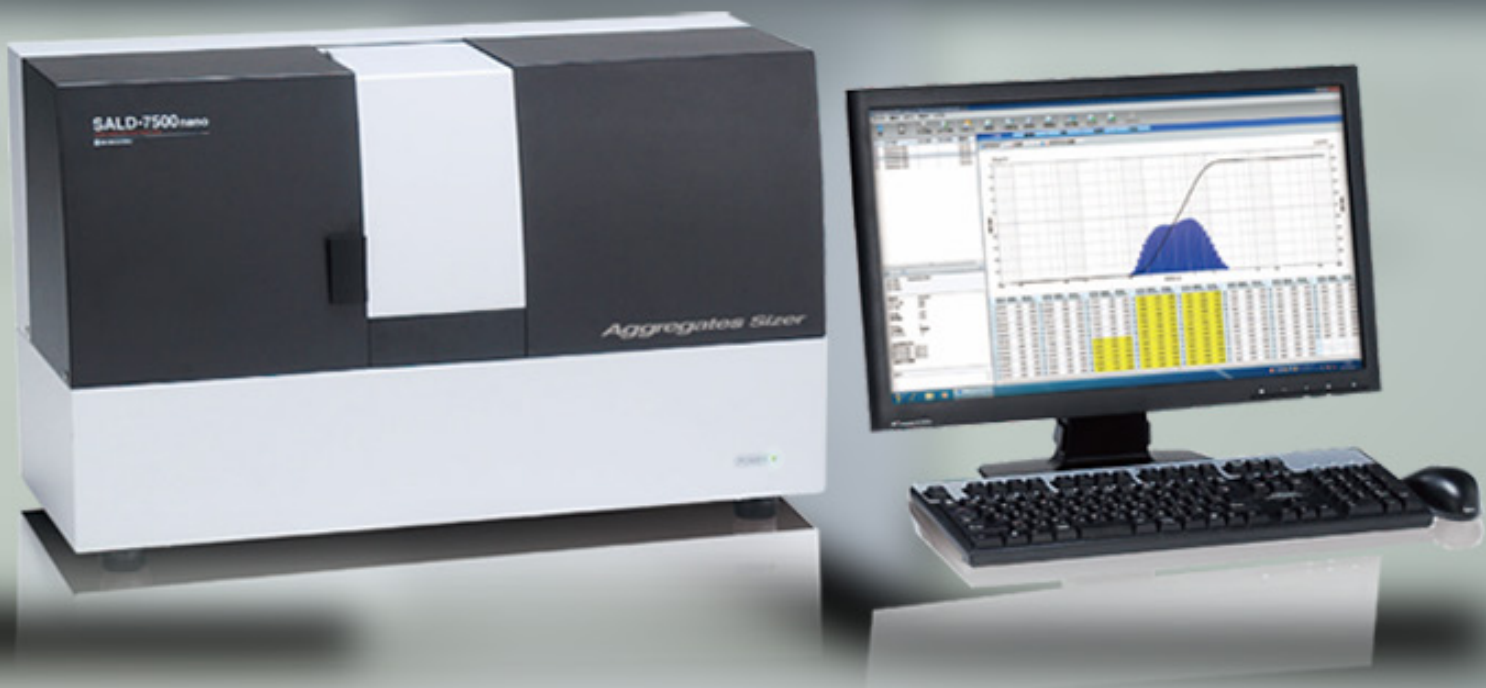
本次共测试了 5 个厂家 10 批次百白破疫苗成品，包括共纯化工艺（厂家 4 和 5）、组分百白破工艺（厂家 1 和 2）以及未知工艺百白破疫苗（厂家 3），测试结果如表 5-1 所示。共纯化疫苗普遍存在批次重复性的问题，如抗原蛋白含量差异和比例差异等。比如厂家 4 的两个批次中，抗原蛋白 PT，FHA 和 PRN 均存在较大的批次差异。但也不乏将共纯化疫苗批次重复性做的较好的厂家，如厂家 5，无论是 PT，还是 FHA、PRN，其含量的批次差均较小。组分疫苗中抗原蛋白普遍高于共纯化疫苗，如厂家 1 和厂家 2，尤其是 PT 抗原蛋白。此外，组分疫苗还保有了较好的抗原完整性，如厂家 2 的 PT，从 S1-S5 均能较好检出。厂家 3 为未知工艺百白破疫苗，从抗原完整性、抗原含量及其高度的批次重复性，推测可能为组分百白破疫苗。

表 5-1 百白破疫苗中抗原蛋白的含量测定

Sample	PT (mg/L)					FHA (mg/L)	PRN (mg/L)	FIM (mg/L)
	S1	S2	S3	S4	S5			
Manufacture 1	9.33	13.29	3.17	3.88	-	12.99	2.99	4.03
Manufacture 2	25.75	23.24	4.15	9.56	1.16	37.77	0.40	3.63
Manufacture 3 batch1	12.48	14.42	2.23	2.56	1.21	20.80	7.92	2.95
Manufacture 3 batch2	11.61	13.92	2.44	3.03	1.09	20.12	7.25	3.37
Manufacture 3 batch3	11.80	13.80	2.44	2.48	1.14	20.82	7.53	3.14
Manufacture 4 batch1	1.24	1.22	0.48	0.36	-	4.22	0.68	2.96
Manufacture 4 batch2	0.97	1.41	0.45	0.54	-	8.50	1.27	3.80
Manufacture 5 batch1	2.44	3.02	0.53	1.25	-	6.78	2.53	2.27
Manufacture 5 batch2	2.44	2.99	0.68	1.15	-	6.94	2.82	3.18
Manufacture 5 batch3	2.48	3.15	0.47	1.11	-	7.21	2.66	2.82



# 百白破疫苗颗粒粒度分析



## 6.1 SALD-7500nano 测定百白破疫苗颗粒的大小和分布

摘要：本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其批式池附件测定了百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒的大小和分布，仪器测定重现性好，六次测定 RSD 小于 3.0%。该方法一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好。根据百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布的测定结果，进而初步评价佐剂对抗原蛋白的吸附效果，抗原蛋白与佐剂吸附完全；且铝佐剂吸附蛋白后，颗粒与颗粒之前存在不同程度的聚集。

关键词：激光粒度仪 抗原蛋白 铝佐剂 疫苗 批式池





## 1. 引言

百白破疫苗是百日咳、白喉、破伤风三合一疫苗，用以预防由百日咳杆菌、白喉杆菌和破伤风杆菌感染引起的疾病。其主要接种对象为 3 月龄至 6 周岁的儿童，是中国婴幼儿计划免疫的重要组成部分。世界卫生组织（WHO）2018 年统计数据显示，百白破已成为全球覆盖度最为广泛的疫苗品种。

百白破疫苗在生产工艺上需要添加佐剂来吸附抗原蛋白，抗原蛋白与佐剂结合后形成疫苗颗粒。疫苗颗粒的大小和分布变化会影响疫苗有效性和安全性，严重时会导致过敏、发热、红肿等不良反应。百白破抗原蛋白颗粒一般在几十纳米至几百纳米之间，佐剂颗粒在几微米到几十微米之间。抗原蛋白与佐剂结合后的百白破疫苗颗粒通常在零点几微米至几十微米之间，属于亚微米（ $0.1\ \mu\text{m}$ - $1\ \mu\text{m}$ ）、亚可见区（ $1\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$ ）颗粒。对疫苗颗粒大小及分布的检测尚无明确的国标方法，《中国药典》、《美国药典》和《欧洲药典》对注射剂中大于  $10\ \mu\text{m}$  和  $25\ \mu\text{m}$  的不溶微粒做出了限量要求，指定的检测方法为光阻法和光学显微镜法。



这些方法具有较长的历史，其局限性尤其是在疫苗检测中的局限也多有报道。光阻法在疫苗检测中存在局限如下：1、百白破疫苗为半透明 - 浑浊液体，光阻法不适用于半透明样品的测定，且百白破疫苗颗粒浓度高，测定过程中容易堵塞仪器；2、用样体积大，药典指定一次测定用样 25 mL，而一支成品疫苗仅 0.5 mL；3、测定对象主要为大于 1  $\mu\text{m}$  的颗粒，其测量结果不能覆盖疫苗颗粒全范围。显微镜法存局限如下：1、要求操作人员有一定的目测经验，操作效率较低，结果受人为因素影响；2、主要测定对象为 1  $\mu\text{m}$  以上的颗粒，同样测定结果不能覆盖疫苗颗粒全范围。对 1  $\mu\text{m}$  以下颗粒大小和分布检测常用方法有尺寸排阻色谱法、超速离心分析和场流分离法等方法，同样存在的突出问题是单一检测方法不能覆盖疫苗颗粒全范围，且多种方法测量结果由于测定原理不同，无法完美拼接比对。

本次研究使用激光粒度仪测定了百白破疫苗抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒的大小和分布，一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好。该方法操作简易快速、稳定性高，适用于百白破疫苗颗粒大小及分布的测定。

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器、分析条件

疫苗企业提供的百白破疫苗的抗原蛋白、铝佐剂和疫苗。

### 2.2 仪器

岛津公司 SALD-7500nano，配备批式池附件。

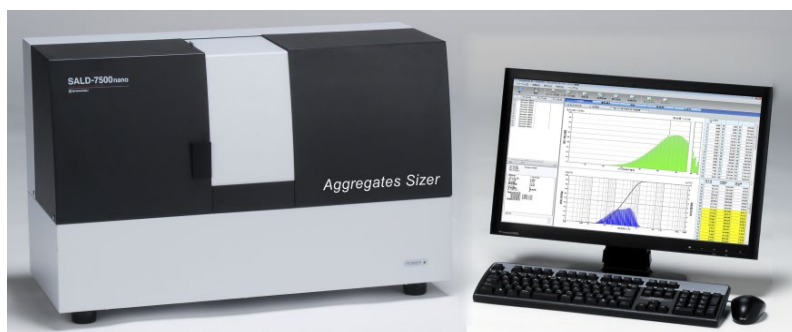


图 6.1-1 岛津激光粒度仪 SALD-7500nano

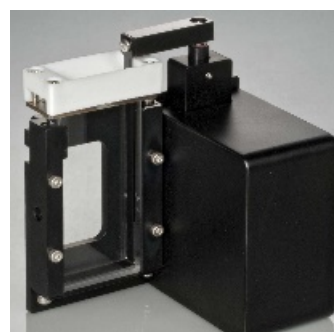


图 6.1-2 批式池

### 2.3 术语解释

DD10 (10%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 10% 时所对应的粒径值；

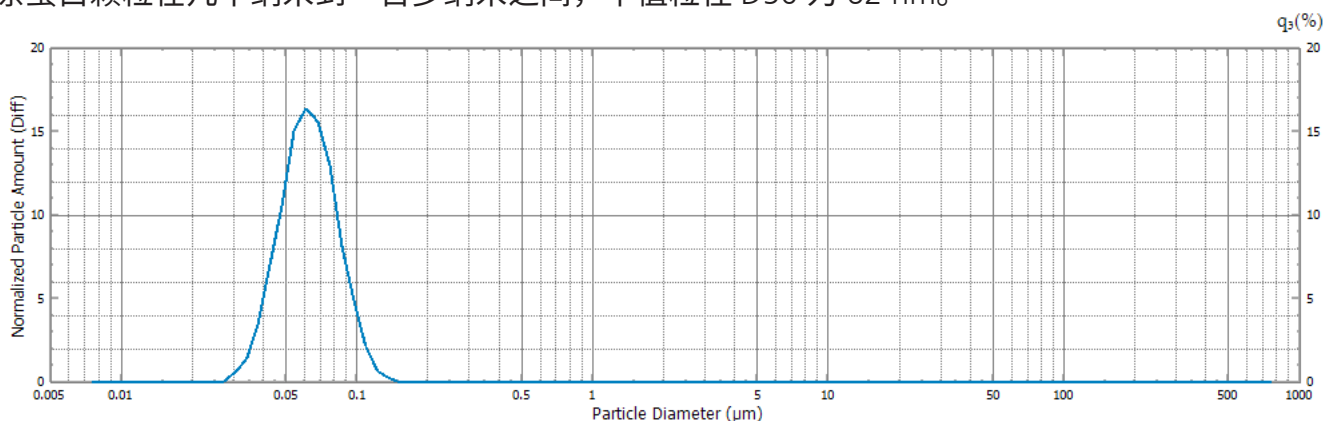
D50 (50%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 50% 时所对应的粒径值；

D90 (90%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 90% 时所对应的粒径值。

## 3. 样品测定及结果

### 3.1 抗原蛋白颗粒的测定及结果

取抗原蛋白 5 mL 于批式池中，用激光粒度仪进行检测，使用 Wing SALD II 软件采集散射衍射光光强数据，根据光强数据换算得出颗粒粒径大小和分布数据，测定结果如图 6.1-3 所示。抗原蛋白颗粒在几十纳米到一百多纳米之间，中值粒径 D50 为 62 nm。

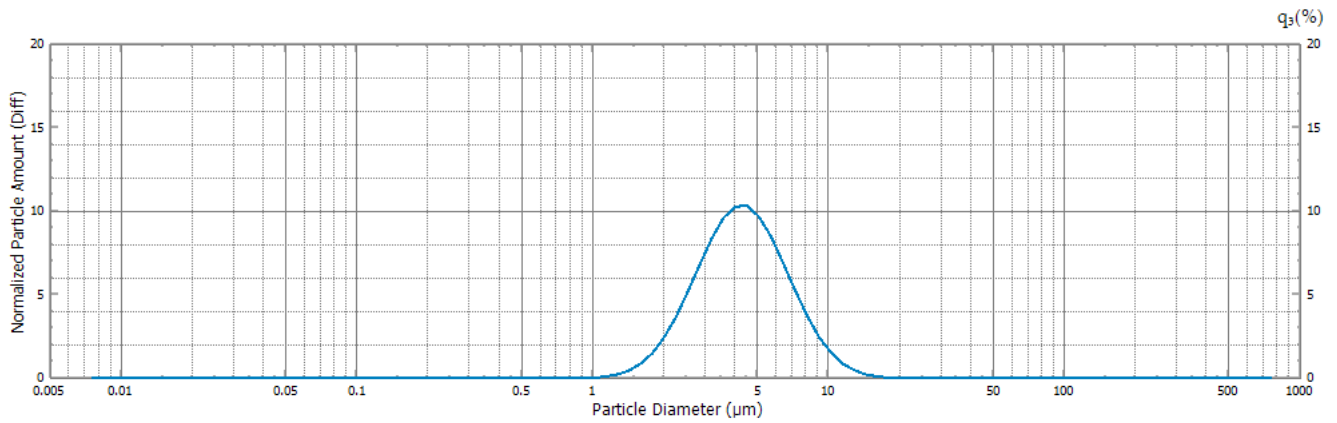


	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	B厂家蛋白...	0.009	1.45-0.50i	0.062	0.056	0.062	0.121	0.042	0.062	0.090

图 6.1-3 蛋白原液颗粒大小与分布

### 3.2 铝佐剂颗粒的测定及结果

用超纯水将铝佐剂稀释 500 倍后，取 5 mL 于批式池中，用激光粒度仪进行检测，使用 Wing SALD II 软件采集散射衍射光光强数据，根据光强数据换算得出颗粒粒径大小和分布数据，测定结果如图 6.1-4 所示。铝佐剂颗粒分布在 1 μm 到 20 μm 之间，中值粒径 D50 为 4.27 μm。

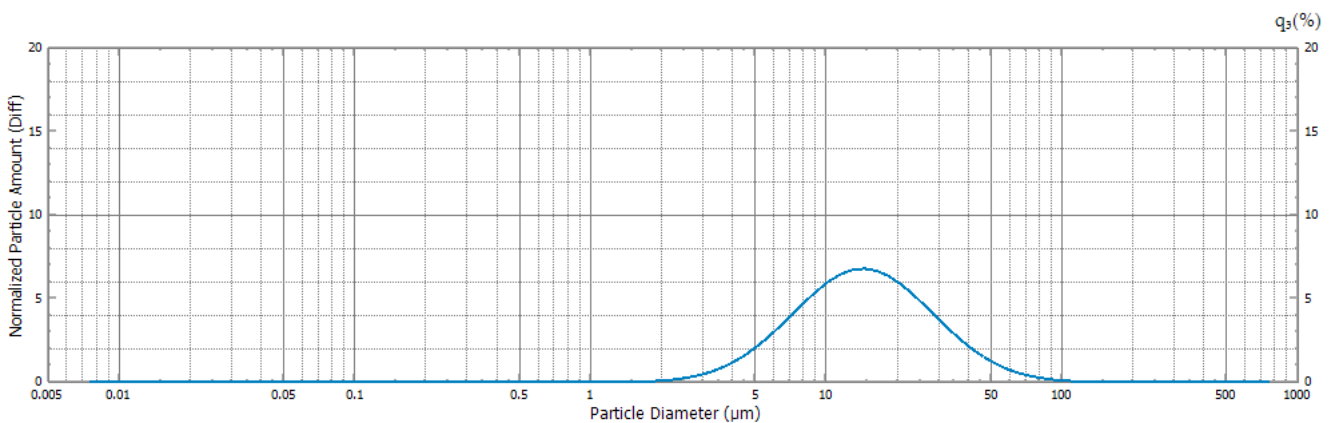


	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	B厂家佐剂...	0.046	1.55-0.50i	4.267	4.467	4.264	0.194	2.387	4.267	7.613

图 6.1-4 铝佐剂颗粒大小与分布

### 3.3 疫苗颗粒的测定及结果

百白破疫苗静置后会有沉淀，测量前将其轻微摇匀。取 0.1 mL 百白破疫苗样品于离心管中，用超纯水定容至 5 mL，即稀释 50 倍。取稀释后样品于批式池中，使用激光粒度仪进行检测。使用 Wing SALD II 软件采集散射衍射光光强数据，根据光强数据换算得出颗粒粒径大小和分布数据，测定结果如图 6.1-5 所示。疫苗颗粒分布在几微米到几十微米之间，中值粒径 D50 为 14.2 μm。



	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	B厂家疫苗	0.062	1.55-0.50i	14.223	14.125	14.224	0.297	5.888	14.223	34.406

图 6.1-5 疫苗颗粒大小与分布

### 3.4 重复性考察

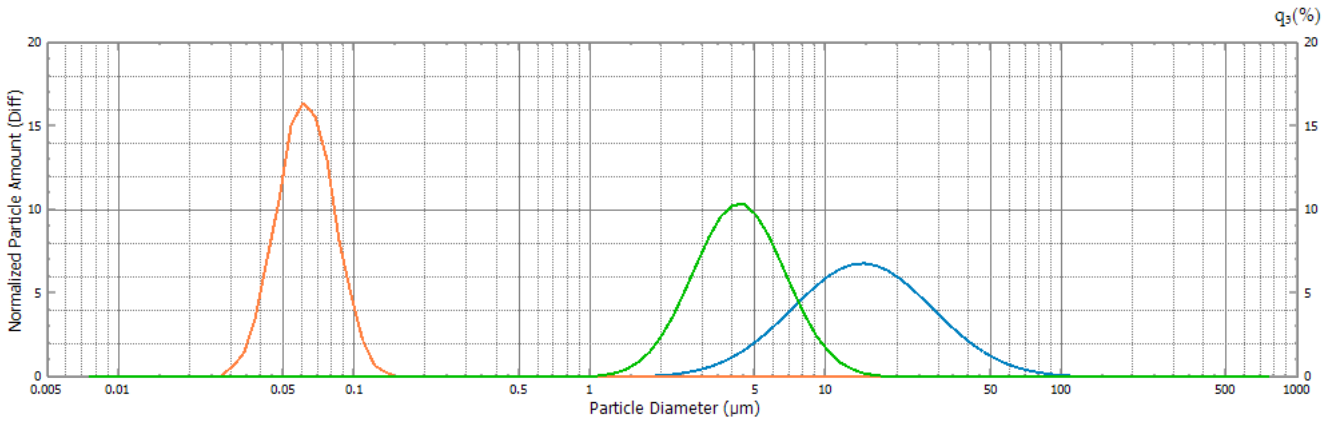
将上述抗原蛋白、铝佐剂和疫苗样品用批式池分别重复测定 6 次，将 6 次所得结果计算相对标准偏差（即重复性），结果如表 6.1-1 所示。仪器测定的重现性好，6 次重复测定 D10、D50 和 D90 的 RSD 均小于 3.0%。

表 6.1-1 重复性考察结果

样品类型	D10 重复性 (%)	D50 重复性 (%)	D90 重复性 (%)
抗原蛋白	1.3	0.66	0.45
铝佐剂	0.85	0.31	0.63
百白破疫苗	1.9	1.3	2.3

## 4. 讨论

根据百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布的测定结果，进而初步评价佐剂对抗原蛋白的吸附效果，百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布叠加图见图 6.1-6。抗原蛋白颗粒小于 0.2  $\mu\text{m}$ ，铝佐剂颗粒在 1-20  $\mu\text{m}$  之间，疫苗颗粒在 2-100  $\mu\text{m}$  之间。疫苗中没有小于 0.2  $\mu\text{m}$  的颗粒，表明抗原蛋白与佐剂吸附完全；且疫苗颗粒明显大于铝佐剂颗粒，中值粒径是铝佐剂的 3-4 倍，表明铝佐剂吸附蛋白后，颗粒与颗粒之间存在不同程度的聚集。



	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	B厂家疫苗	0.062	1.55-0.50i	14.223	14.125	14.224	0.297	5.888	14.223	34.406
2	B厂家蛋白原	0.009	1.45-0.50i	0.062	0.056	0.062	0.121	0.042	0.062	0.090
3	B厂家佐剂	0.046	1.55-0.50i	4.267	4.467	4.264	0.194	2.387	4.267	7.613

图 6.1-6 百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布叠加图

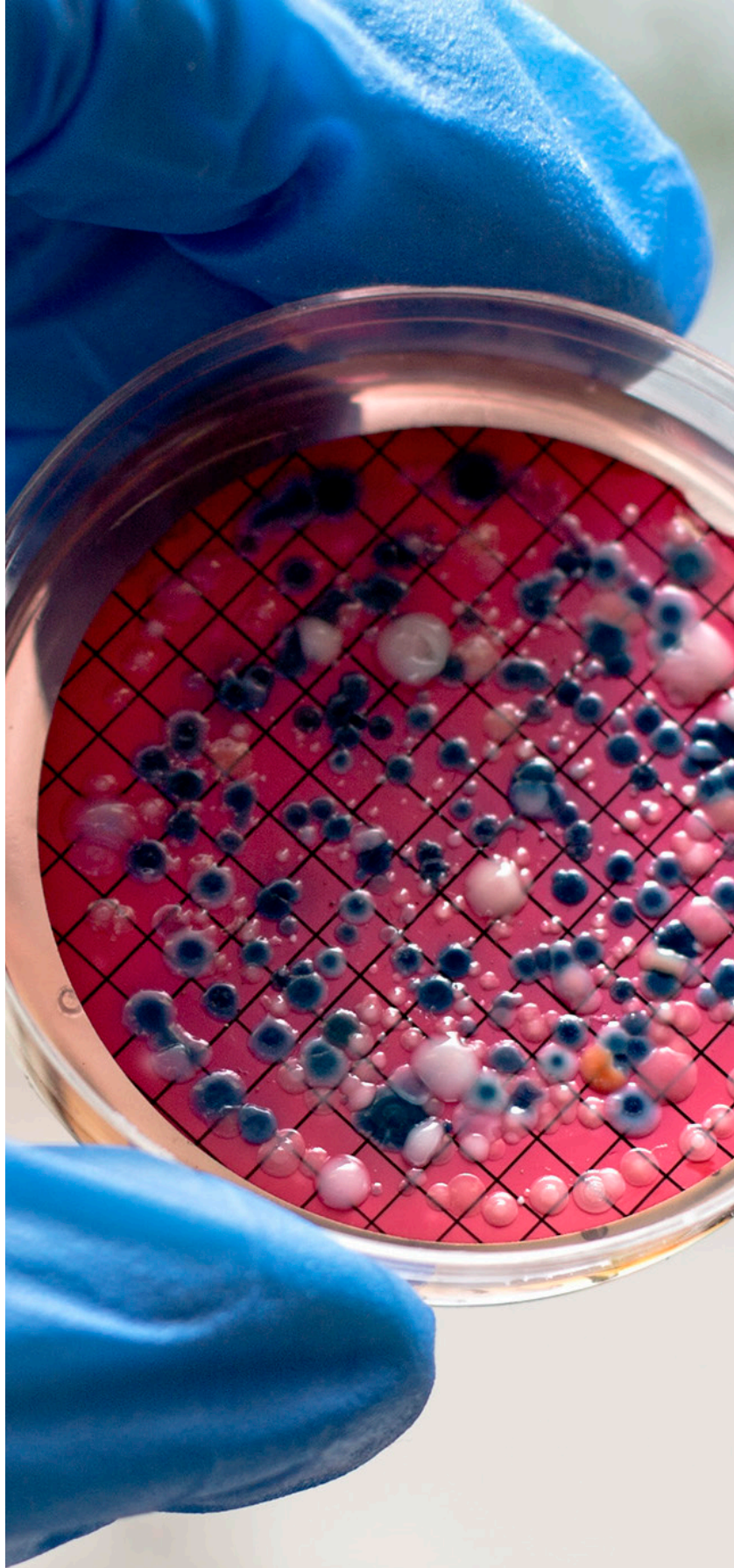
## 5. 结论

本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其批式池附件测定了百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒的大小和分布。抗原蛋白颗粒在几十纳米到一百多纳米之间，中值粒径 D50 为 62 nm；铝佐剂颗粒分布在 1  $\mu\text{m}$  到 20  $\mu\text{m}$  之间，中值粒径 D50 为 4.27  $\mu\text{m}$ ；疫苗颗粒分布在几微米到几十微米之间，中值粒径 D50 为 14.2  $\mu\text{m}$ 。仪器测定重现性好，六次测定 RSD 小于 3.0%。根据百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布的测定结果，进而初步评价佐剂对抗原蛋白的吸附效果，抗原蛋白与佐剂吸附完全；且铝佐剂吸附蛋白后，颗粒与颗粒之间存在不同程度的聚集。该方法一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好，适用于百白破抗原蛋白、铝佐剂和疫苗颗粒大小和分布的测定。

## 6.2 SALD-7500nano 在疫苗颗粒批次一致性评价中的应用

**摘要：** 本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其高浓度池附件测定了百白破疫苗颗粒的大小和分布，根据不同批次百白破疫苗颗粒的大小和分布测定结果，进而评价百白破疫苗颗粒大小批次一致性。C-2、C-3 和 C-4 三批次疫苗颗粒 D50 值比较接近，其变异系数 CV 为 11.5%。C-1、C-2、C-3 和 C-4 四批次疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 23.3%，C-1 批次疫苗导致变异系数 CV 成倍数增加，说明 C1 批次疫苗颗粒一致性较其它批次相对较差。该方法一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好，适用于疫苗颗粒的批次一致性评价研究。

**关键词：** 激光粒度仪 百白破疫苗 高浓度池





## 1. 引言

百白破疫苗是百日咳、白喉、破伤风三合一疫苗，用以预防由百日咳杆菌、白喉杆菌和破伤风杆菌感染引起的疾病。其主要接种对象为 3 月龄至 6 周岁的儿童，是中国婴幼儿计划免疫的重要组成部分。世界卫生组织（WHO）2018 年统计数据显示，百白破已成为全球覆盖度最为广泛的疫苗品种。

根据世界卫生组织及国家食品药品监督管理局的相关规定，新疫苗在申请生产批件之前，需开展批次一致性研究，以验证疫苗生产过程的一致性。影响疫苗批次一致性因素很多，如疫苗活性成分含量，疫苗颗粒分布等。疫苗颗粒大小和分布会随着生产、保存和运输条件的改变而变化，如保存时间的长短、保存及运输过程中的温度变化、运输过程中的机械震动等都会影响疫苗颗粒



的大小，从而在不同程度上影响疫苗的批次的一致性，严重时影响疫苗的安全性和有效性。传统的疫苗批次一致性研究主要通过临床试验来评价疫苗的免疫原性和安全性，对疫苗颗粒大小和分布的批次一致性研究甚少。

本研究以百白破疫苗为例，使用岛津激光粒仪测定了疫苗颗粒大小和分布，进而评价了疫苗颗粒批次一致性，该方法一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好。

## 2. 实验部分

### 2.1 样品

疫苗企业提供的百白破疫苗。

### 2.2 仪器

岛津公司 SALD-7500nano，配备高浓度池附件。



图 6.2-1 岛津激光粒度仪 SALD-7500nano

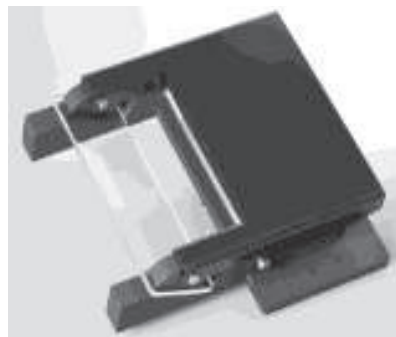


图 6.2-2 高浓度池

### 2.3 术语解释

D10 (10%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 10% 时所对应的粒径值；

D50 (50%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 50% 时所对应的粒径值；

D90 (90%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 90% 时所对应的粒径值。

## 3. 样品测定及结果

百白破疫苗静置后会有沉淀，测量前将其轻微摇匀。取 0.1 mL 百白破疫苗样品于离心管中，用超纯水定容至 1 mL，即稀释 10 倍。取稀释后样品于高浓度池中，使用激光粒度仪进行检测。使用 Wing SALD II 软件采集散射衍射光光强数据，根据光强数据换算得出颗粒粒径大小和分布数据。共测定四批次百白破疫苗，测定结果如图 3 所示。

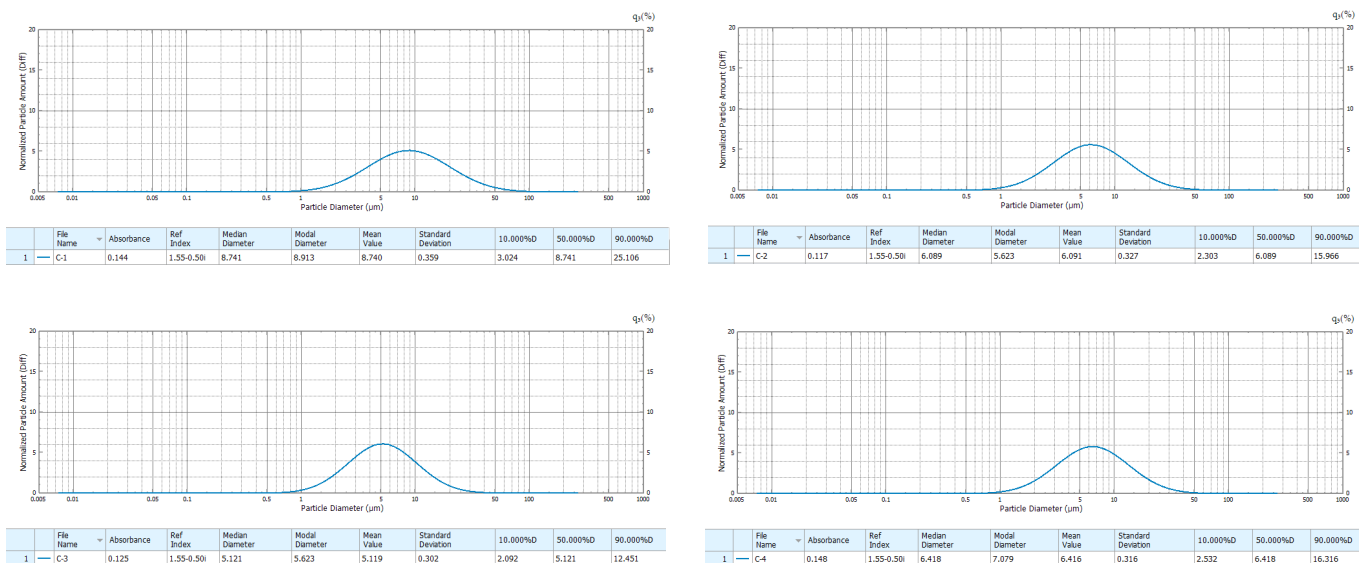


图 6.2-3 批次 C-1 (左上)、C-2 (右上)、C-3 (左下)、C-4 (右下) 百白破疫苗颗粒大小和分布图

备注：百白破疫苗批次号为代称号。

## 4. 疫苗颗粒批次一致性评价

根据不同批次百白破疫苗颗粒的大小和分布测定结果，进而评价百白破疫苗颗粒大小批次一致性。不同批次疫苗颗粒大小与分布叠加图如图 6.2-4 所示，从分布叠加图来看，C-2 和 C-4 两批次百白破疫苗颗粒分布比较一致，C-3 批次百白破疫苗颗粒分布略小，而 C-1 批次百白破疫苗颗粒分布偏大。

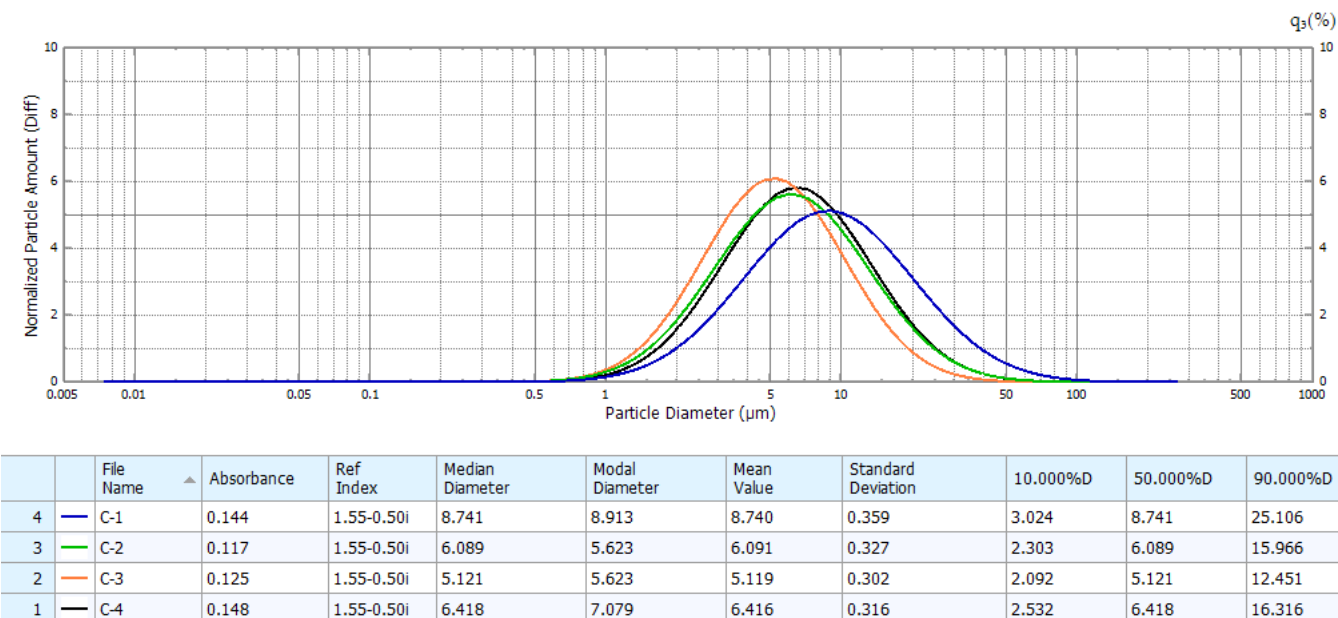


图 6.2-4 不同批次疫苗颗粒大小与分布的叠加图

不同批次疫苗颗粒的 D10、D50、D90 值见表 6.2-1。C-1 批次疫苗颗粒中值粒径 D50 为 8.7  $\mu\text{m}$ ，较其它批次偏大；C-2、C-3 和 C-4 批次疫苗颗粒中值粒径比较接近，分别为 6.1  $\mu\text{m}$ 、5.1  $\mu\text{m}$  和 6.4  $\mu\text{m}$ 。C-2、C-3 和 C-4 三批次疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 11.5%，C-1、C-2、C-3 和 C-4 四批次疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 23.3%，C-1 批次疫苗导致变异系数 CV 成倍数增加，说明 C1 批次疫苗颗粒一致性较其它批次相对较差。

表 6.2-1 不同批次百白破疫苗的 D10、D50、D90 值

批次	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )
C-1	3.02	8.74	25.1
C-2	2.30	6.09	16.0
C-3	2.09	5.12	12.5
C-4	2.53	6.42	16.3

## 5. 结论

本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其高浓度池附件测定了百白破疫苗颗粒的大小和分布，根据不同批次百白破疫苗颗粒的大小和分布测定结果，进而评价百白破疫苗颗粒大小批次一致性。C-2、C-3 和 C-4 三批次疫苗颗粒 D50 值比较接近，其变异系数 CV 为 11.5%。C-1、C-2、C-3 和 C-4 四批次疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 23.3%，C-1 批次疫苗导致变异系数 CV 成倍数增加，说明 C1 批次疫苗颗粒一致性较其它批次相对较差。该方法一次测定覆盖了疫苗颗粒大小全范围，无需多方法测量，无需拼接数据，数据完整性好，适用于疫苗颗粒的批次一致性评价研究。



## 6.3 SALD-7500nano 在疫苗颗粒稳定性评价中的应用

**摘要：**本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其高浓度池附件测定了不同温度处理后百白破疫苗颗粒的大小和分布，根据测定结果进而评价温度对百白破疫苗颗粒稳定性的影响。结果表明，37°C 热处理后疫苗颗粒有变大的趋势，但与保存条件下疫苗颗粒相比无明显变化，D50 值变异系数小，颗粒稳定性良好；而 -20°C 冷冻处理后疫苗颗粒明显变大，D50 超过保存条件的两倍，其变异系数大，颗粒稳定性差。该方法操作简单快速，适用于疫苗颗粒稳定性评价研究。

**关键词：**激光粒度仪 百白破疫苗 高浓度池





## 1. 引言

百白破疫苗是百日咳、白喉、破伤风三合一疫苗，用以预防由百日咳杆菌、白喉杆菌和破伤风杆菌感染引起的疾病。其主要接种对象为 3 月龄至 6 周岁的儿童，是中国婴幼儿计划免疫的重要组成部分。世界卫生组织（WHO）2018 年统计数据显示，百白破已成为全球覆盖度最为广泛的疫苗品种。

疫苗颗粒的大小和分布不仅会影响疫苗的有效性和安全性，还会影响疫苗的稳定性和有效期。疫苗稳定性研究用于确定疫苗的保存条件及有效期，证明在有效期内疫苗的有效性和安全性。为保证疫苗质量，世界卫生组织发布《WHO 疫苗稳定性评价指南》，中国药典也明确要求开展疫苗及需要放置的中间产物，在生产、运输和贮存过程中可能暴露的所有条件下的稳定性研究。疫苗稳定性主要评估标准通常是看其效力能否保持合格，也可结合理化分析和生物学方法进行稳定性评



价。

目前稳定性评价研究多集中在效力评估，缺乏对疫苗颗粒的大小和分布的理化指标稳定性研究。疫苗储存和运输过程中温度变化，以及运输过程中的机械震动都会影响疫苗颗粒大小和分布，从而影响疫苗的稳定性的。

本研究以百白破疫苗为例，使用岛津激光粒仪测定了不同温度处理 24h 后疫苗颗粒大小和分布，进而评价温度对疫苗颗粒稳定性的影响。仪器配备温控功能，可实现在线加热，操作简便快捷。

## 2. 实验部分

### 2.1 样品

疫苗企业提供的百白破疫苗。

### 2.2 仪器

岛津公司 SALD-7500nano，配备高浓度池附件。



图 6.3-1 岛津激光粒度仪 SALD-7500nano



图 6.3-2 高浓度池

### 2.3 术语解释

D10 (10%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 10% 时所对应的粒径值；

D50 (50%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 50% 时所对应的粒径值；

D90 (90%D) 指颗粒累积体积百分含量达到 90% 时所对应的粒径值。

## 3. 样品测定及结果

取两支同批次百白破疫苗在 37°C 和 -20°C 条件各处理 24 小时。将处理后的疫苗轻微摇匀，取 0.1 mL 百白破疫苗样品于离心管中，用超纯水定容至 1 mL，即稀释 10 倍。取稀释后样品于高浓度池中，使用激光粒度仪进行检测。使用 Wing SALD II 软件采集散射衍射光光强数据，根据光强数据换算得出颗粒粒径大小和分布数据。同时测定保存条件下疫苗颗粒的大小和分布，测定结果如图 3-5 所示。

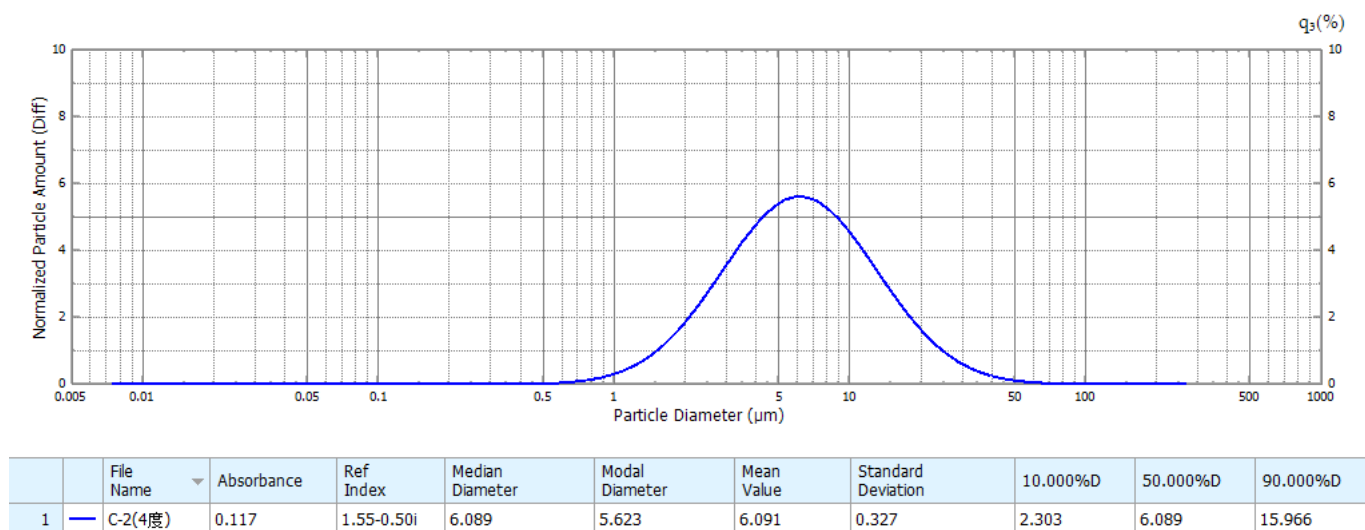
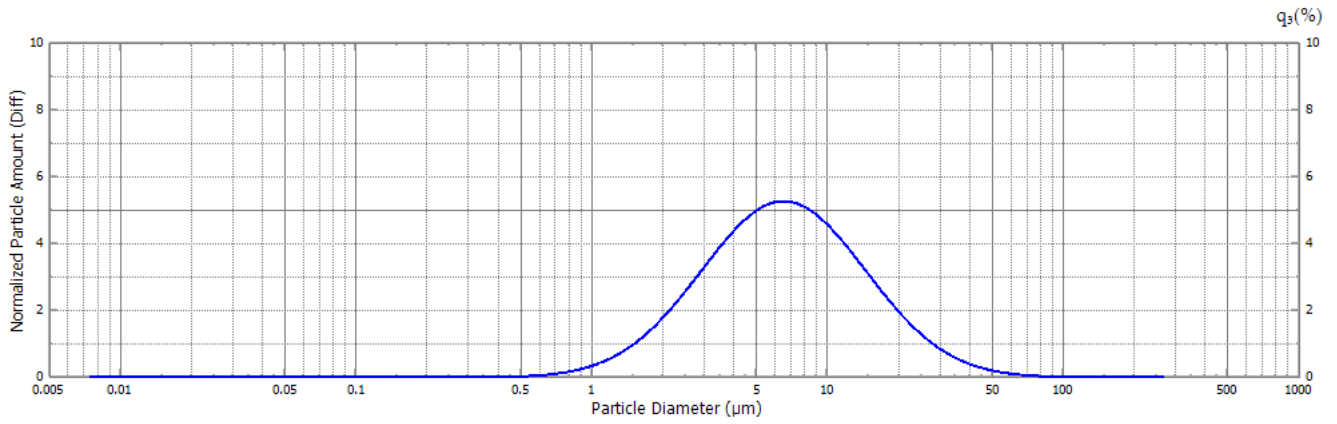
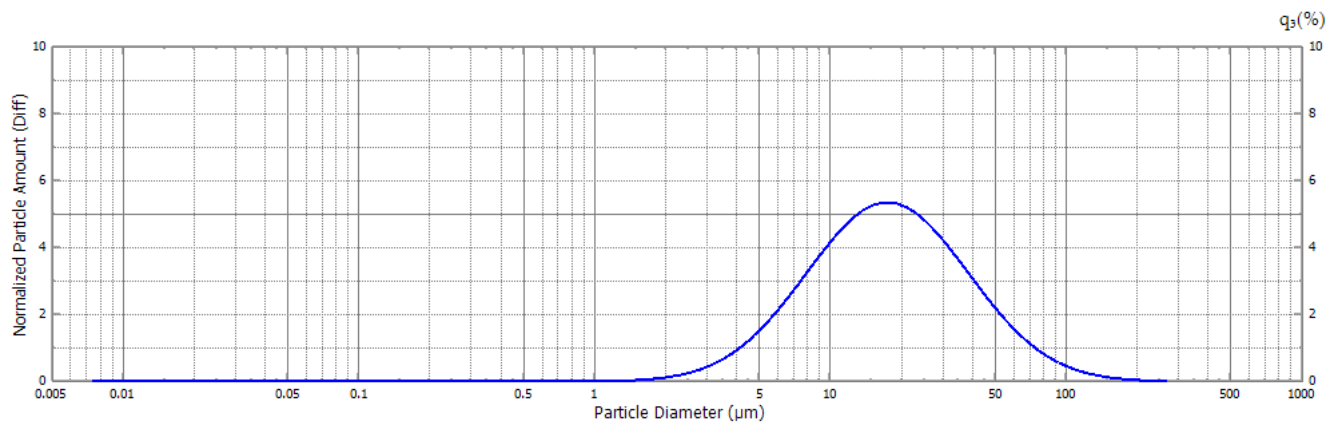


图 6.3-3 保存条件 (4°C) 下百白破疫苗颗粒大小和分布图



	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	C-2(37度)...	0.135	1.55-0.50i	6.468	7.079	6.467	0.348	2.299	6.468	18.198

图 6.3-4 37°C 加热处理后百白破疫苗颗粒大小和分布图

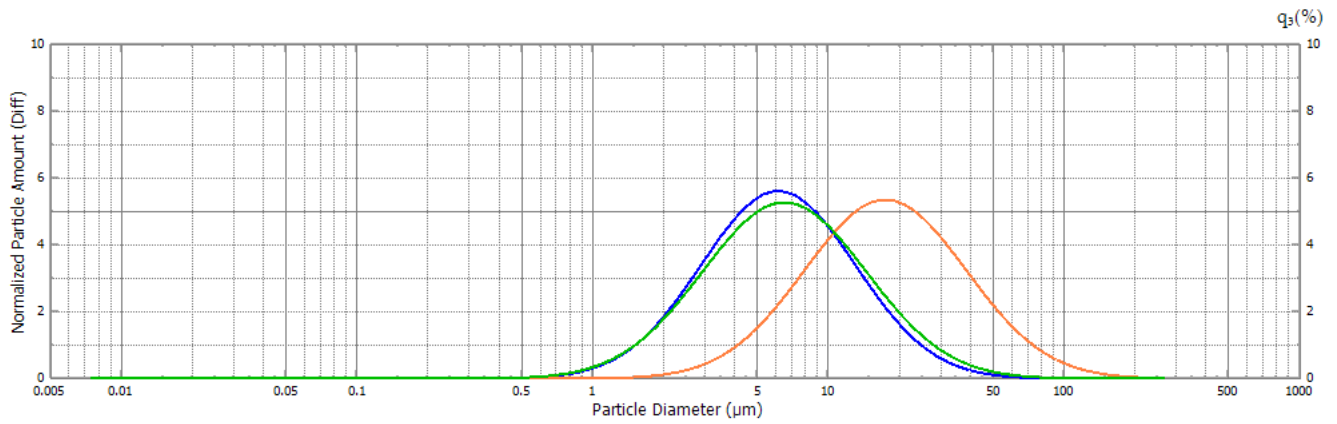


	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	C-2(-20度)...	0.174	1.55-0.50i	17.351	17.783	17.348	0.343	6.323	17.351	47.908

图 6.3-5 -20°C 冷冻处理后百白破疫苗颗粒大小和分布图

#### 4. 评价温度对疫苗颗粒稳定性的影响

根据不同温度条件下处理后百白破疫苗颗粒的大小和分布测定结果，进而评价温度对百白破疫苗颗粒稳定性的影响。不同温度条件处理后的测定结果叠加图如图 6 所示，从分布叠加图来看，37°C 处理后疫苗颗粒有变大的趋势，但与 4°C 保存条件下的疫苗颗粒大小无明显区别，而 -20°C 处理后疫苗颗粒明显变大。



	File Name	Absorbance	Ref Index	Median Diameter	Modal Diameter	Mean Value	Standard Deviation	10.000%D	50.000%D	90.000%D
1	C-2(4度)	0.117	1.55-0.50i	6.089	5.623	6.091	0.327	2.303	6.089	15.966
3	C-2(37度)-...	0.135	1.55-0.50i	6.468	7.079	6.467	0.348	2.299	6.468	18.198
2	C-2(-20度)...	0.174	1.55-0.50i	17.351	17.783	17.348	0.343	6.323	17.351	47.908

图 6.3-6 不同温度条件处理后疫苗颗粒大小与分布的叠加图

不同温度条件处理后疫苗颗粒的 D10、D50、D90 值见表 1。37°C 处理后疫苗颗粒 D50 值为 6.47 μm，比保存条件下（4°C）疫苗颗粒的 D50 值略大；且 37°C 处理后疫苗与保存条件下疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 4.28%，其变异系数小，表明百白破疫苗颗粒在 37°C 条件下的热稳定良好。而 -20°C 处理后疫苗颗粒 D50 为 17.4 μm，超过保存条件下疫苗颗粒 D50 值的两倍；且 -20°C 处理后疫苗与保存条件下疫苗颗粒 D50 值的变异系数 CV 为 68.1%，变异系数大，表明百白破疫苗颗粒在 -20°C 冷冻条件下的稳定性差。

表 6.3-1 不同温度处理后百白破疫苗的 D10、D50、D90 值

疫苗	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
4 °C 保存	2.30	6.09	16.0
37 °C 处理	2.30	6.47	18.2
-20 °C 处理	6.32	17.4	47.9

## 5. 结论

本文使用岛津激光粒度仪 SALD-7500nano 及其高浓度池附件测定了不同温度处理后百白破疫苗颗粒的大小和分布，根据测定结果进而评价温度对百白破疫苗颗粒稳定性的影响。结果表明，37 °C 热处理后疫苗颗粒有变大的趋势，但与保存条件下疫苗颗粒相比无明显变化，D50 值变异系数小，颗粒稳定性良好；而 -20°C 冷冻处理后疫苗颗粒明显变大，D50 超过保存条件的两倍，其变异系数大，颗粒稳定性差。该方法操作简单快速，适用于疫苗颗粒稳定性评价研究。

# 百白破疫苗形貌分析



**摘要：** 疫苗佐剂是指加入疫苗中能够增强疫苗抗原免疫原性的物质，本文以百白破疫苗为例，利用电子探针对疫苗佐剂的微观形态及元素组成进行分析，从而探索佐剂对抗原的吸附情况，为铝佐剂的质量评价提供新的途径。

**关键词：** 百白破疫苗 佐剂 电子探针  
微区测试



## 1. 引言

百白破疫苗，是由百日咳疫苗、精制白喉和破伤风类毒素按适量比例配制而成。国内外多年实践证明，对百日咳、白喉、破伤风有良好的预防效果。在百白破疫苗及其它诸多品种疫苗中，除疫苗抗原（或糖）以外，还存在另一种重要的成分——佐剂。疫苗佐剂是指加入疫苗中能够增强疫苗抗原免疫原性的物质。在疫苗中使用佐剂可实现4个目标：1) 增强超纯或重组抗原的免疫原性；2) 减少抗原的使用量或免疫接种的次数；3) 提高疫苗对新生儿，老年人或免疫缺陷者的效果；4) 提高抗原递呈系统通过黏膜对抗原的摄取。虽然佐剂具有诸多益处，但佐剂的引入同时也带来了问题。近年频发的疫苗事件不乏佐剂身影的出现，如某品牌百白破疫苗因佐剂不合格撤出中国市场事件。铝佐剂是目前为止 WHO 批准唯一可以用于人用疫苗的佐剂。铝佐剂对抗原的吸附和解吸附能力直接关系到疫苗的有效性；铝佐剂的纯度与疫苗的安全性有着重要关联。综上所述，佐剂的质量关系诸多疫苗品种的安全性和有效性。

本文以百白破疫苗为例，利用电子探针对疫苗佐剂的微观形态及元素组成进行分析，从而探索佐剂对抗原的吸附情况，为铝佐剂的质量评价提供新的途径。

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器

岛津电子探针显微分析仪（EPMA-1720）



### 2.2 分析条件

加速电压：15 kV

束流：形貌观察 0.1 nA、定性分析 20 nA

测试时间：定性分析 15 min

强度单位：Counts

### 2.3 样品及处理

用移液枪吸取少量原始液态疫苗清液，滴至粘有导电胶带的铝制样品托上，自然风干后喷镀碳膜，上机测试。

## 3. 结果与讨论

利用二次电子像在较低放大倍数下观察疫苗微观形态，如图 1 所示，两组疫苗微观形态明显不同，疫苗 A 颗粒之间更为分散，而疫苗 B 明显发生团簇；

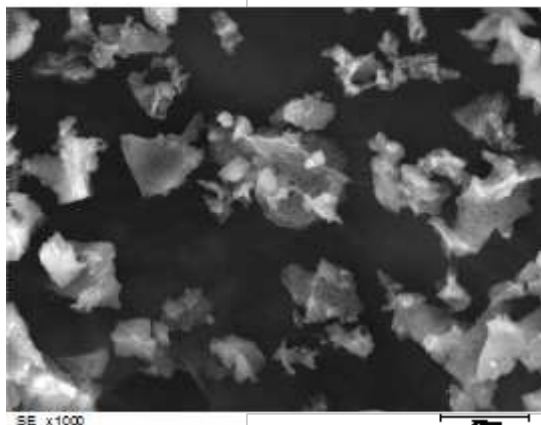


图 7-1-1 疫苗 A 二次电子像（600X）

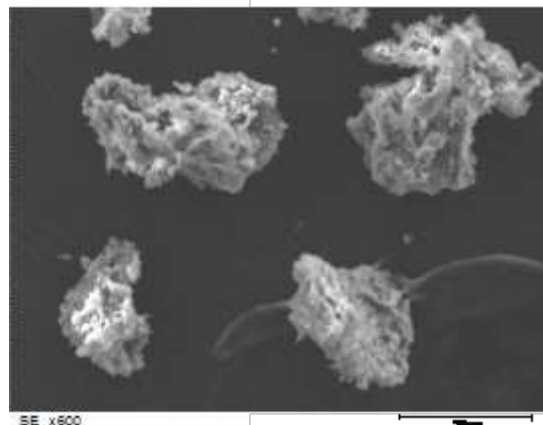


图 7-1-2 疫苗 B 二次电子像（600X）

图 7-1 疫苗样品低倍二次电子像

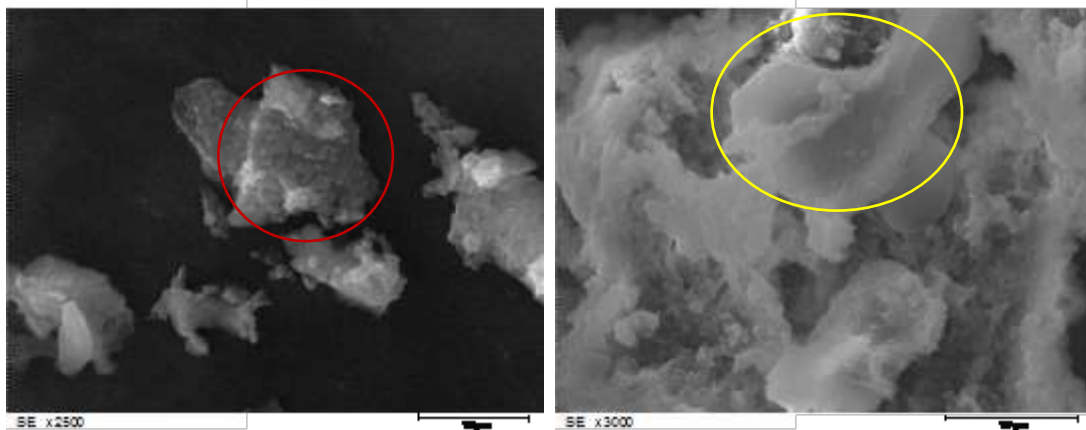


图 7-2-1 疫苗 A 二次电子像 (2500X)

图 7-2-2 疫苗 B 二次电子像 (3000X)

图 7-2 疫苗样品高倍二次电子像

在更大倍数下进一步观察微观细节，如图 7-2-1 红圈标记处所示，大尺寸的佐剂颗粒表面吸附有尺寸更为细小的颗粒（细小颗粒应为抗原及其它结晶物）；较之疫苗 A，疫苗 B 中大尺寸佐剂颗粒周围吸附的小颗粒数量明显更多（图 7-2-2 黄圈标示处大尺寸颗粒为佐剂，周边絮状物为大量细小抗原及其它结晶物颗粒团簇后效果），由于佐剂较强的吸附作用，导致多个佐剂颗粒之间簇成一团，即表现为图 7-1-2 中的大团絮状。

对疫苗 A、疫苗 B 佐剂颗粒进行微区成分定性分析（测试位置分别为图 2-1 中红圈、图 7-2-2 黄圈标示处），定性谱图及半定量结果分别见图 7-3、图 7-4。

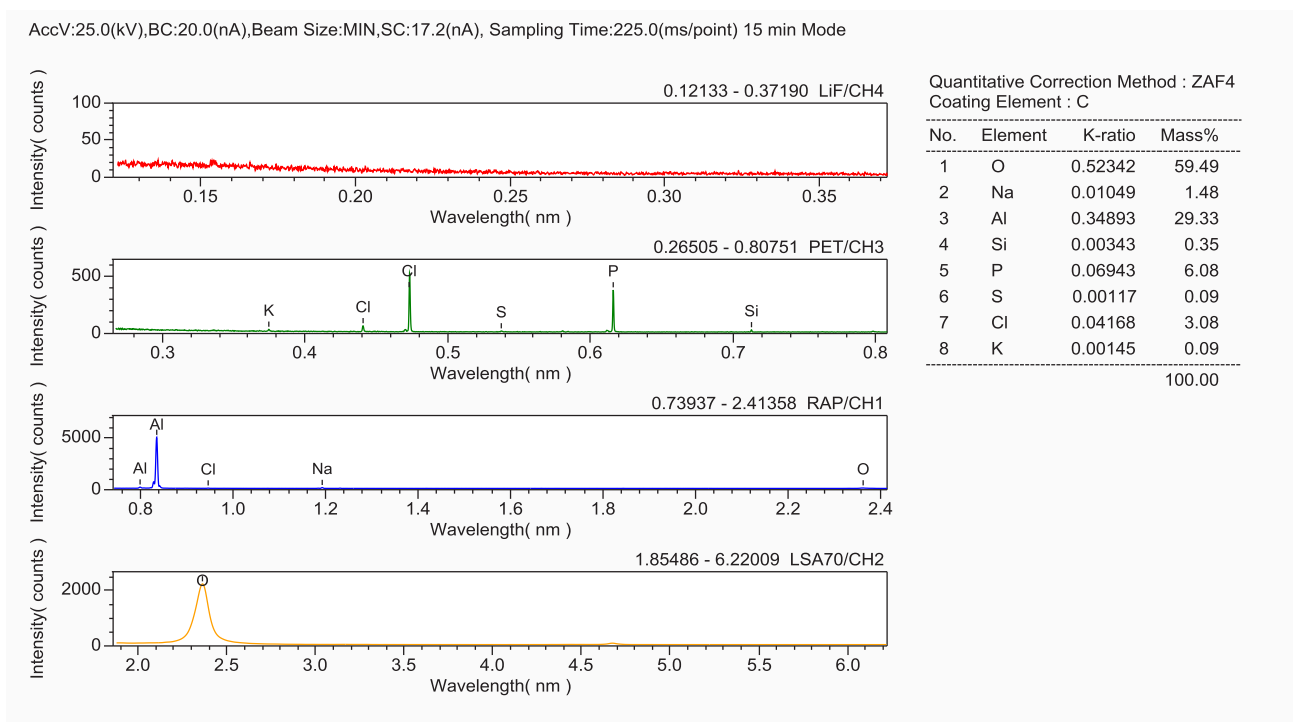


图 7-3 疫苗 A 佐剂定性分析结果

AccV:25.0(kV),BC:20.0(nA),Beam Size:MIN,SC:17.2(nA), Sampling Time:225.0(ms/point) 15 min Mode

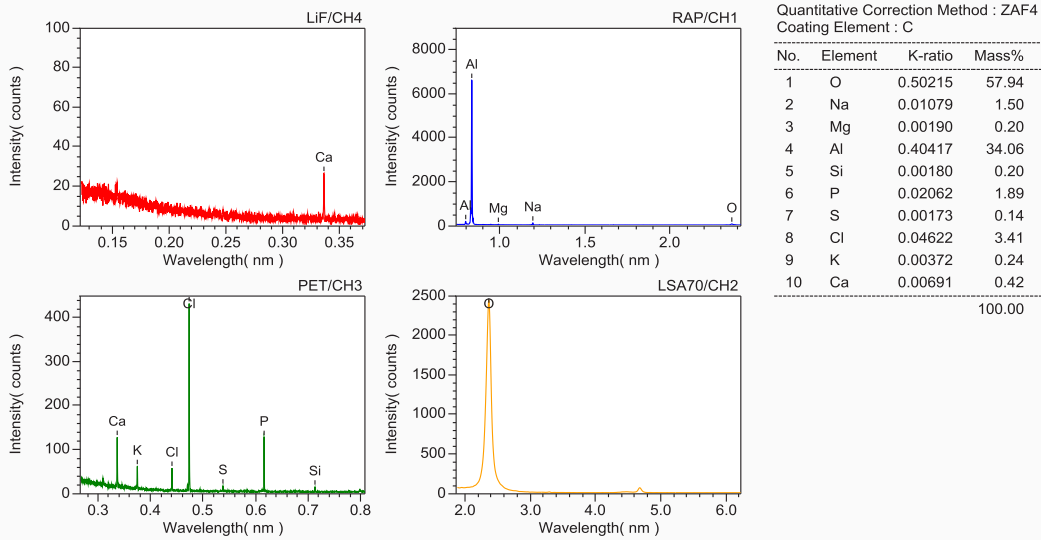
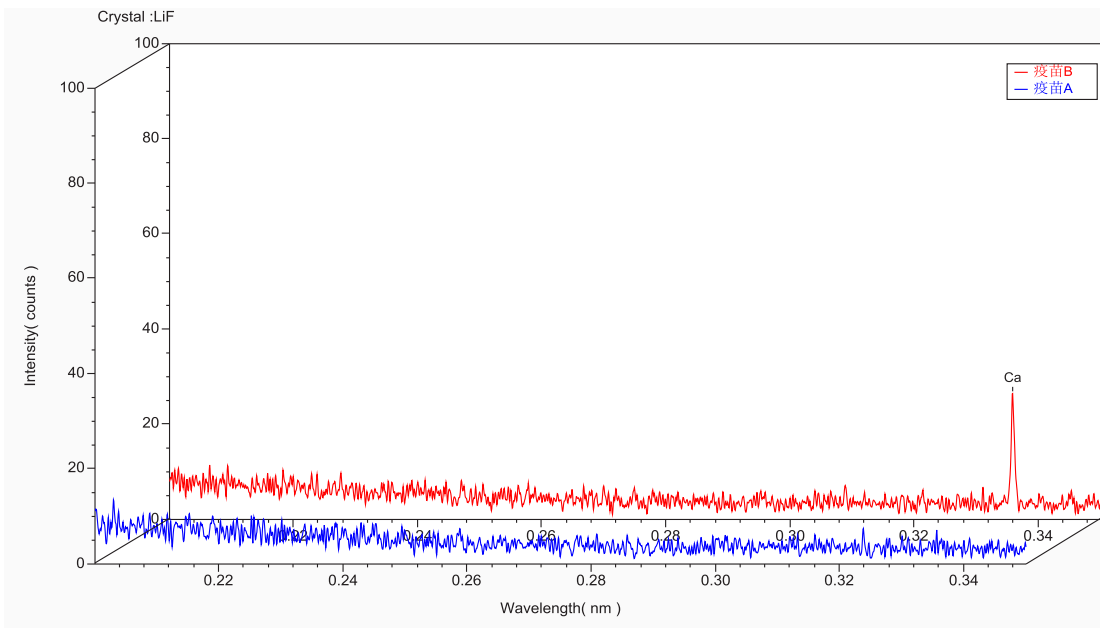


图 7-4 疫苗 B 佐剂定性分析结果

由图 7-3 及图 7-4 定性谱图及半定量结果可知，两组疫苗佐剂颗粒均检出了 O、Al、P、Cl、Na、K、S、Si 等元素；其中，O、Al 为主量元素，表明两组疫苗采用的佐剂均为铝佐剂；P、Cl、Na、K 元素应来自 PBS 缓冲液，PBS 缓冲液是液体疫苗的重要组成部分，主要成分为  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$  和  $\text{KCl}$ ，起溶解保护试剂的作用。微量的 S 元素可能来自蛋白质和疫苗生产工艺中硫酸铵沉淀环节，S 的检出说明硫酸铵在疫苗成品中有所残留。微量的 Si 元素，可能来自铝佐剂的制备过程。

图 7-5 为疫苗 A 和疫苗 B 定性谱图局部放大对比，可见，相较疫苗 A，疫苗 B 中还检出了微量 Mg、Ca 元素；Mg、Ca 元素应该也来自缓冲液，作用是提供双价阳离子；这表明，两组疫苗明显采用了不同组分的 PBS 缓冲液。



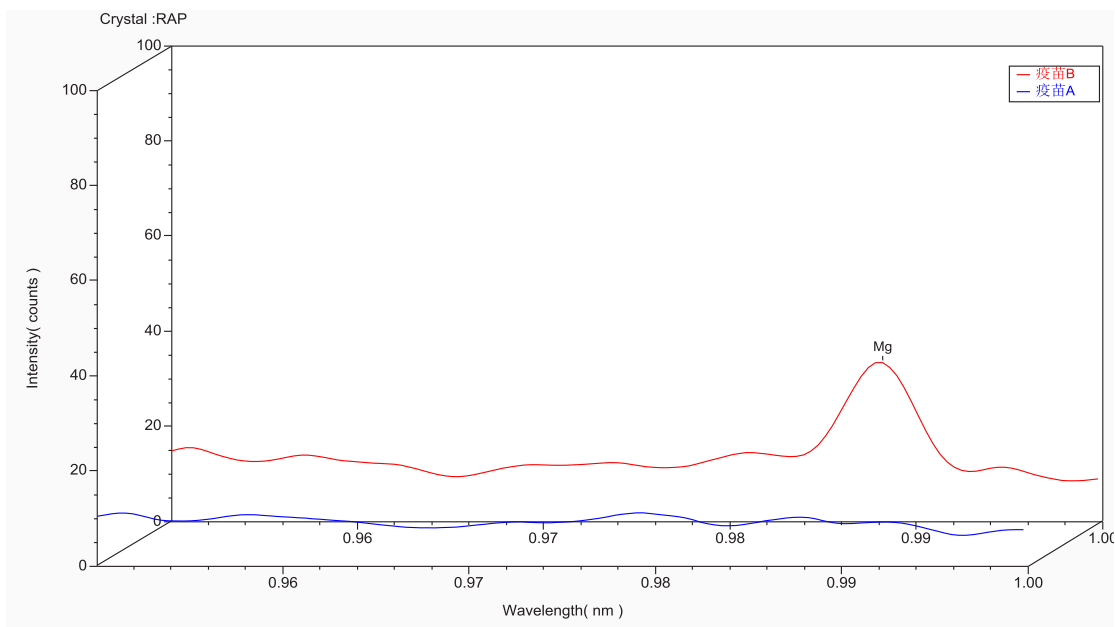


图 7-5 疫苗 A 与疫苗 B 定性谱图局部放大对比

将两组疫苗佐剂颗粒微区成分分析半定量结果汇总于表 7-1 进行对比。

表 7-1 疫苗佐剂半定量结果 (mass%)

	O	Al	P	Cl	Na	K	Mg	Ca	S	Si
疫苗 A	59.49	29.33	6.08	3.08	1.48	0.09	-	-	0.09	0.35
疫苗 B	57.94	34.06	1.89	3.41	1.50	0.24	0.20	0.42	0.14	0.20

由表 7-1 中 P 元素半定量结果可见，疫苗 A 中 P 元素含量明显比疫苗 B 高的多；有研究表明，佐剂对抗原的吸附能力与原液中的磷酸根  $\text{PO}_4^{3-}$  含量有关，磷酸根含量越高，佐剂的吸附率越低，这应该是疫苗 B 吸附能力较强进而表现为团簇状（见图 1-2）的原因所在。

综上所述，微观形态观察表明，两组疫苗佐剂微观形态、吸附程度存在明显差异；微区成分分析表明，两组疫苗明显采用了不同组分及配比的 PBS 缓冲液；而造成两组疫苗吸附程度的差异的可能原因，推测是两者磷酸根  $\text{PO}_4^{3-}$  含量不同造成的。至于微观形态、吸附程度、佐剂类型等对疫苗最终效价的影响，需要进行生物实验测定，本文不再展开，感兴趣的业内人士可做进一步研究论证。

## 4. 结论

本文使用岛津 EPMA-1720 型电子探针对两组疫苗样品进行了测试，微区形貌观察表明，两组样品佐剂与抗原之间的吸附程度不同，疫苗 B 佐剂对抗原的吸附更强，多个佐剂颗粒之间簇成一团；微区成分定性分析表明，两组疫苗佐剂主要组分均为铝盐佐剂；相较于疫苗 A，疫苗 B 中检出了微量的 Mg、Ca 元素，表明两者采用了不同组分及配比的 PBS 缓冲液；而两组疫苗 P 元素含量的明显差异，应是造成佐剂吸附程度差异的主要原因。类似的工作，可拓展用于疫苗行业质量评价及基础研究工作。

# 疫苗中甲醛残留检测



摘要： 本文使用 Nexis GC-2030 气相色谱仪建立了测定百白破中甲醛的方法。检测结果表明，本例中在 1~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内建立的标准曲线线性关系良好（相关系数 0.9998）。在百白破疫苗中加标浓度为 2、10 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲醛标液，测定得回收率在 83.16%~90.35% 范围内。发展使用该方法完成 6 个厂家共 18 批次百白破疫苗中甲醛的含量测定，测的甲醛含量在 6.81-43.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。用于以上数据分析表明，此方法结果可靠，可为百白破中甲醛含量的测定提供参考。

关键词： Nexis GC-2030 气相色谱仪

百白破 甲醛

## 1. 引言

百白破 (DTP) 疫苗是百日咳、白喉类毒素和破伤风类毒素按照一定比例组成的三联疫苗，用于预防百日咳、白喉和破伤风三种疾病。它是全球接种率最高的疫苗。

甲醛是百白破疫苗中白喉类毒素和破伤风类毒素的脱毒剂。过多甲醛的残留会导致人体的不良反应：甲醛可以与蛋白质的氨基、巯基、羟基等多种基团发生反应，从而破坏蛋白质结构。不同厂家百白破疫苗中甲醛的残留量，反应了不同厂家脱毒工艺的差异性。因此，需要对甲醛的残留量进行严格监控。

《中华人民共和国药典》第三部 (2015 版)，以下简称“中国药典”，以衍生 - 紫外分光光度法为检测方法，检测百白破等疫苗中甲醛的残留。受限于检测方法的灵敏度和选择性，以该方法为基础的疫苗中甲醛的限定浓度均较高，如百白破疫苗中甲醛的限定浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。较低的方法灵敏度使得各厂家百白破疫苗中均难有甲醛检出，即现有药典检测方法难以实现对现有百白破疫苗工艺的监控作用。为了提高检测灵敏度，武汉生物制品所发展了衍生 - 高效液相色谱法，用于百白破疫苗中甲醛和戊二醛的检测，该方法在一定程度上解决了甲醛检测灵敏度的问题，其线性范围为 20-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。但该方法采用衍生后直接进样的方式，导致铝佐剂、疫苗抗原蛋白等杂质吸附在色谱柱中，从而影响方法的长期稳定性。气相色谱通常采用弱极性溶剂作为样品处理溶剂，铝佐剂和疫苗抗原蛋白等杂质在该类溶剂中的溶解度小，可有效降低复杂基质对检测的干扰、提高方法稳定性。本文以气相色谱为基础，建立了甲醛的含量测定方法，并用于多厂家、多批次国内外主要百白破疫苗产品中甲醛的检测。

## 2. 仪器及检测条件

用岛津疫苗中甲醛含量测定方法包处理后，用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪分析。

## 3. 方法学参数

图 8-1 为甲醛标准品色谱图。本文从线性范围、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ)、重复性和定量准确度 (回收率) 等方面对该 GC 方法进行了考察。

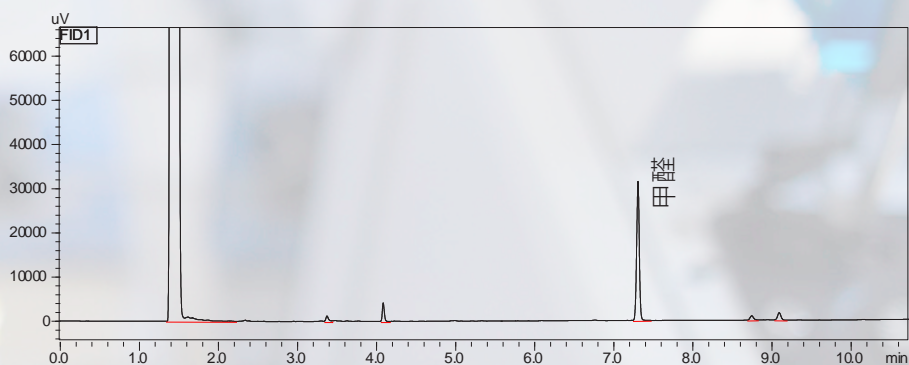


图 8-1 甲醛标准品色谱图

### 3.1 标准曲线

取各浓度甲醛标准溶液进行测定，以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，如图 8-2 所示，标准曲线相关系数系数达到 0.9998。

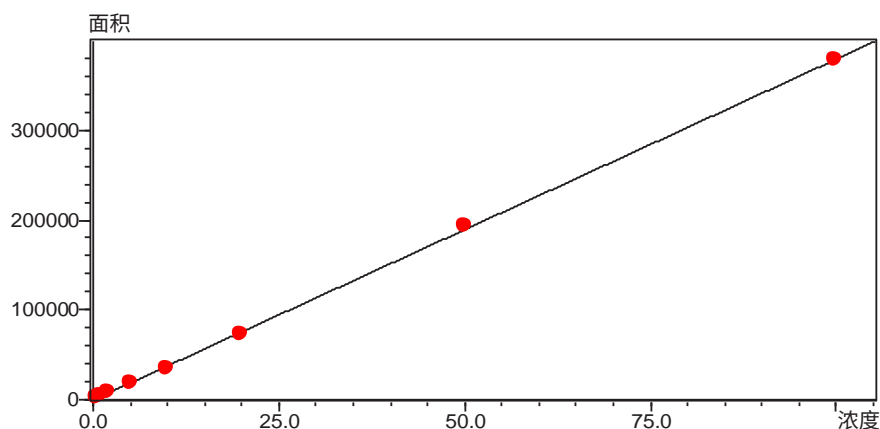


图 8-2 甲醛标准曲线

### 3.2 重复性

取 1  $\mu\text{L}$  对应甲醛浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标样进气相色谱仪，连续进样 6 次，以峰面积 RSD 考察重复性，峰面积 RSD% 为 1.73%。

### 3.3 检出限

以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  甲醛标准测定液的数据，3 倍信噪比计算甲醛出限，计算结果为 0.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 3.4 定量限

以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  甲醛标准测定液的数据，10 倍信噪比计算甲醛出限，计算结果为 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 3.5 回收率

取含量较低的疫苗样品，分别添加 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  三个浓度的标准溶液，按照样品前处理方法进行处理，计算回收率如表 8-1 所示：

表 8-1 百白破中甲醛回收率分析结果 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

	浓度 1	浓度 2	浓度 3
加标浓度	2	10	50
测得含量 (扣本底)	1.803	8.316	45.175
回收率	90.15%	83.16%	90.35%

## 4. 实际样品测试

本次共测试 6 个厂家共 18 批次百白破疫苗。按照实验前处理方法进行处理后，进气相色谱仪分析，检测结果如表 8-2 所示。

表 8-2 百白破疫苗产品甲醛含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

厂家编号	批次	甲醛含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	厂家编号	批次	甲醛含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
A	1	27.78	D	1	37.3
	2	28.01		2	39.82
	3	27.59		3	43.89
B	1	23.55	E	1	26.66
	2	25.86		2	27.16
	3	24.66		3	26.27
C	1	-	F	1	15.52
	2	6.81		2	15.58
	3	6.81		3	15.65

-: 表示有检出，但含量低于定量限

从同一厂家的三批次结果来看，其中五个厂家批次间差异不大，推测这五个厂家甲醛脱毒工艺稳定；其中一个厂家的一个批次甲醛残留量与另外两个批次间差异较大，推测此批次百白破疫苗的脱毒过程与其它两批次存在明显差异。

从整体结果对比不同厂家的结果，除 C 厂家批次 1 以外，六个厂家百白破疫苗的甲醛残留量范围为 6.81~43.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。C 厂家批次 1 与其它样品一样有甲醛检出，但含量较低，低于本方法定量限。本文发展方法的线性范围可满足这些样品中残留甲醛的测定。同时，也反映被检测的 6 个厂家疫苗产品均符合中国药典 2015 年版三部吸附无细胞百白破联合疫苗中规定的“不高于 0.2 g/L”。

## 5. 结论

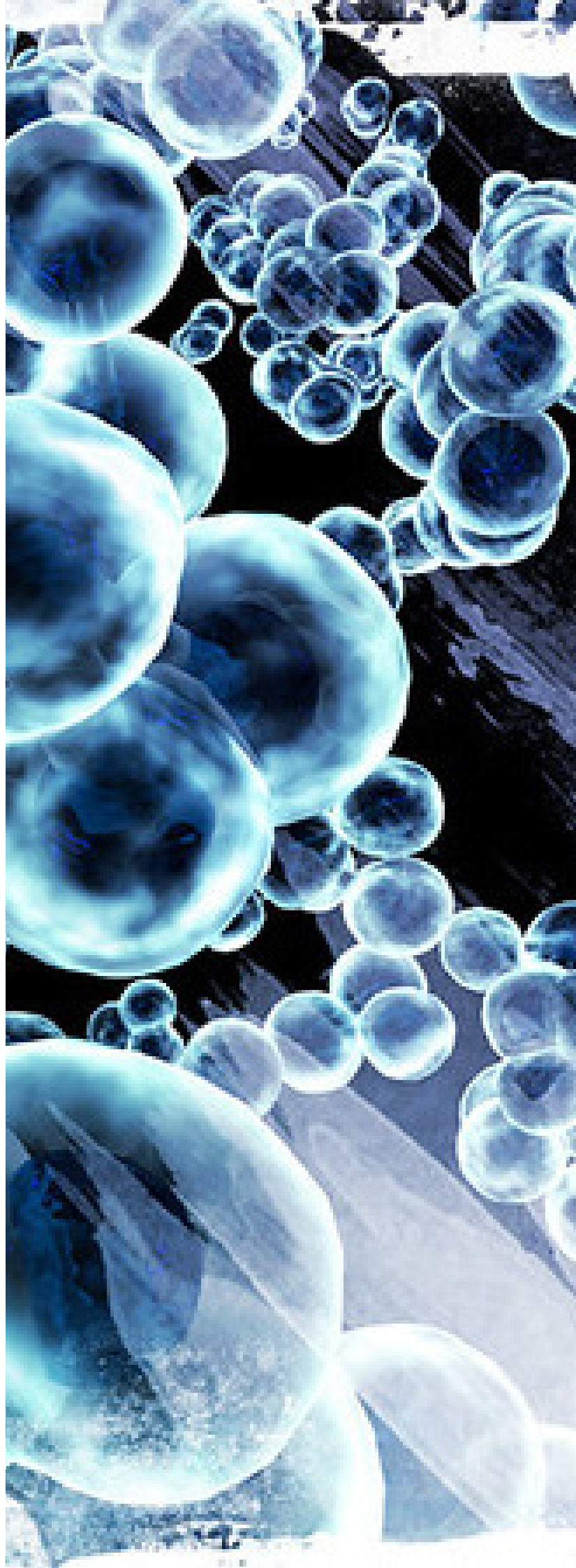
本文用岛津 Nexis GC-2030 气相色谱仪建立了百白破疫苗中甲醛的含量测定方法。检测结果表明，本例中标准曲线的线性相关度为 0.9998，六厂家百白破的甲醛含量均在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下，该方法能对低于此值的甲醛含量有很好的区分度，有利于疫苗厂家监测生产流程，在百白破疫苗中添加甲醛标样进行测试，回收率在 83.16%~90.35%，标准样品精密度 RSD 值为 1.73%。数据结果表明，Nexis GC-2030 适合用于百白破疫苗中的甲醛的检测。

# Hib 疫苗和脑膜炎四价疫苗中 CTAB 的含量测定方法



**摘要：** 本文发展了一种液相色谱串联质谱方法用于 Hib 疫苗和脑膜炎四价疫苗中十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）的快速定量方法。本方法弥补了 Hib 疫苗和脑膜炎四价疫苗中 CTAB 含量监控方法缺失的问题。本方法具有较宽的线性范围（1.56-50  $\mu\text{g/L}$ ）、较好的重复性（ $<2\%$ ）和较高的检测灵敏度。

**关键词：** 液相色谱串联质谱 Hib 疫苗 脑膜炎疫苗 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）





## 1. 引言

十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）是常见的多糖沉淀剂，用于培养液中多糖的富集和粗制。虽然从理论上分析，后续制备工艺中添加的醋酸钠、苯酚等试剂具有去除 CTAB 的作用。但 CTAB 残留量和生产工艺去除 CTAB 的能力评价等缺乏评价方法。

CTAB 是一种极易残留且具有一定毒性的化合物，但由于检测方法的缺陷，药典至今尚无 CTAB 残留检测方法。CTAB 为弱紫外（无紫外）吸收且缺乏衍生基团，难以用 UV/Vis 检测和定量。通用型检测器可用于弱紫外化合物的直接检测，无须衍生。但该类检测器灵敏度较低且受基质干扰较大，不适合疫苗基质中微量残留物质的检测。岛津公司于 2018 年在《疫苗质量评价新技术》文集中首次发布了 CTAB 的液相色谱串联质谱方法检测方法。该方法兼具 LC 的分离能力，又具有前体离子和产物离子双重选择性（MRM 模式），可提高检测的准确性和抗基质干扰能力，适合快速检测方法的发展。本文在上一版文集的基础上进一步扩大方法试用范围，将其用于 Hib 和脑膜炎四价疫苗粗品和精制产品的检测，实现 CTAB 的含量监控同时对工艺进行评价。

## 2. 前处理

按岛津 CTAB 方法包步骤处理样品后，用岛津液相色谱串联三重四极杆质谱分析。

## 3. 方法学参数

取各浓度对照品溶液进行测定。用 ASTM 法，以 LOD 浓度目标化合物 S/N 不小于 3，测得本方法中去氧胆酸钠 LOD 为 1.02  $\mu\text{g/L}$  (S/N:5.6)。由于 CTAB 的残留无法彻底消除，难以测定 LOD 和 LOQ。当 CTAB 浓度大于等于 1.56  $\mu\text{g/L}$  时，残留 CTAB 对线性曲线测定无明显影响。以待测样品大致浓度为中心，取 5-6 个浓度点，以浓度为横坐标，目标化合物峰面积为纵坐标，外标法制作工作曲线见图 9-1。各组分线性回归方程及相关系数见表 9-1。结果表明各组分在考察浓度范围内线性关系良好，R2 大于 0.9999，各标准点准确度在 95-106% 之间。

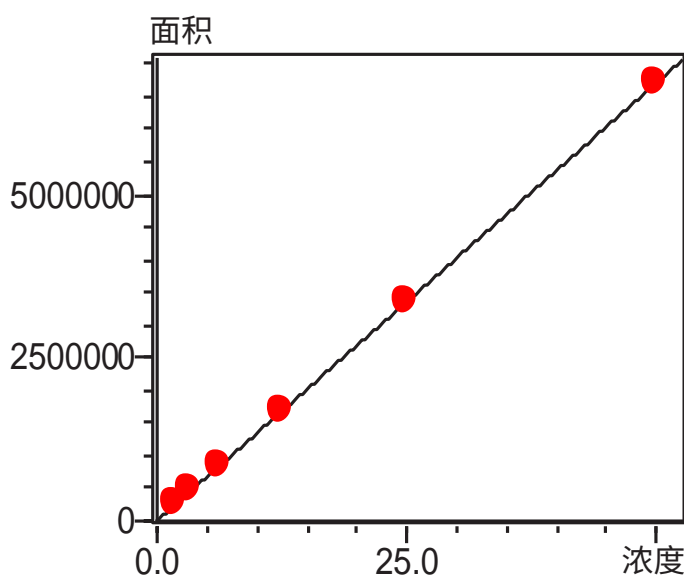


图 9-1 CTAB 工作曲线

表 9-1 CTAB 工作曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	线性方程	R2	精准度 (%)
1	CTAB	1.56-50	A=133056 C-29015	0.9999	97.4-101.9

取 CTAB 对照品溶液，平行进样 6 针，计算目标化合物的峰面积和保留时间相对标准偏差 (RSD%)。分析结果表明，CTAB 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.91% 和 0.12%，，可满足定量分析的需求。

## 4. 实际样品测试

将本方法用于 3 批次 Hib 粗制品和精制品中 CTAB 的残留测定，典型色谱质谱图如图 2 所示，检测结果如表 2 所示。相对于批次 2，批次 1 和批次 3 所用工艺能更好的去除 CTAB。

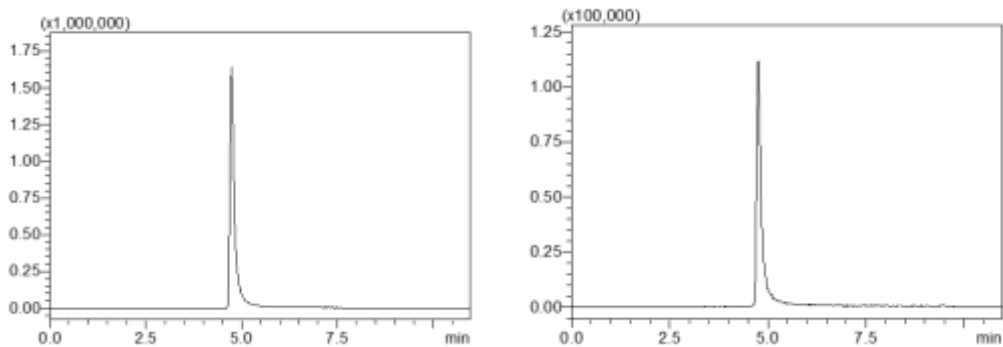


图 9-2 Hib 粗品（左）和精制品（右）中 CTAB 的含量测定

表 9-2. 3 批次 Hib 疫苗粗品和精制产品中 CTAB 的含量测定

样品	CTAB ( $\mu\text{g/L}$ )	样品	CTAB ( $\mu\text{g/L}$ )
批次 1 粗品	253.02	批次 1 精制品	1.30
批次 2 粗品	237.80	批次 2 精制品	33.32
批次 3 粗品	302.66	批次 3 精制品	1.33

注：为保护产品信息，表中 CTAB 含量并未实际测定产品含量。

除 Hib 疫苗以外，本方法同样适用于脑膜炎 4 价疫苗中 CTAB 的含量检测。本次共收集 3 批次脑膜炎 A, C, W 和 Y 疫苗粗制和精制品，用液相色谱串联质谱法测定其含量见表 9-3，典型色谱质谱图见图 3。

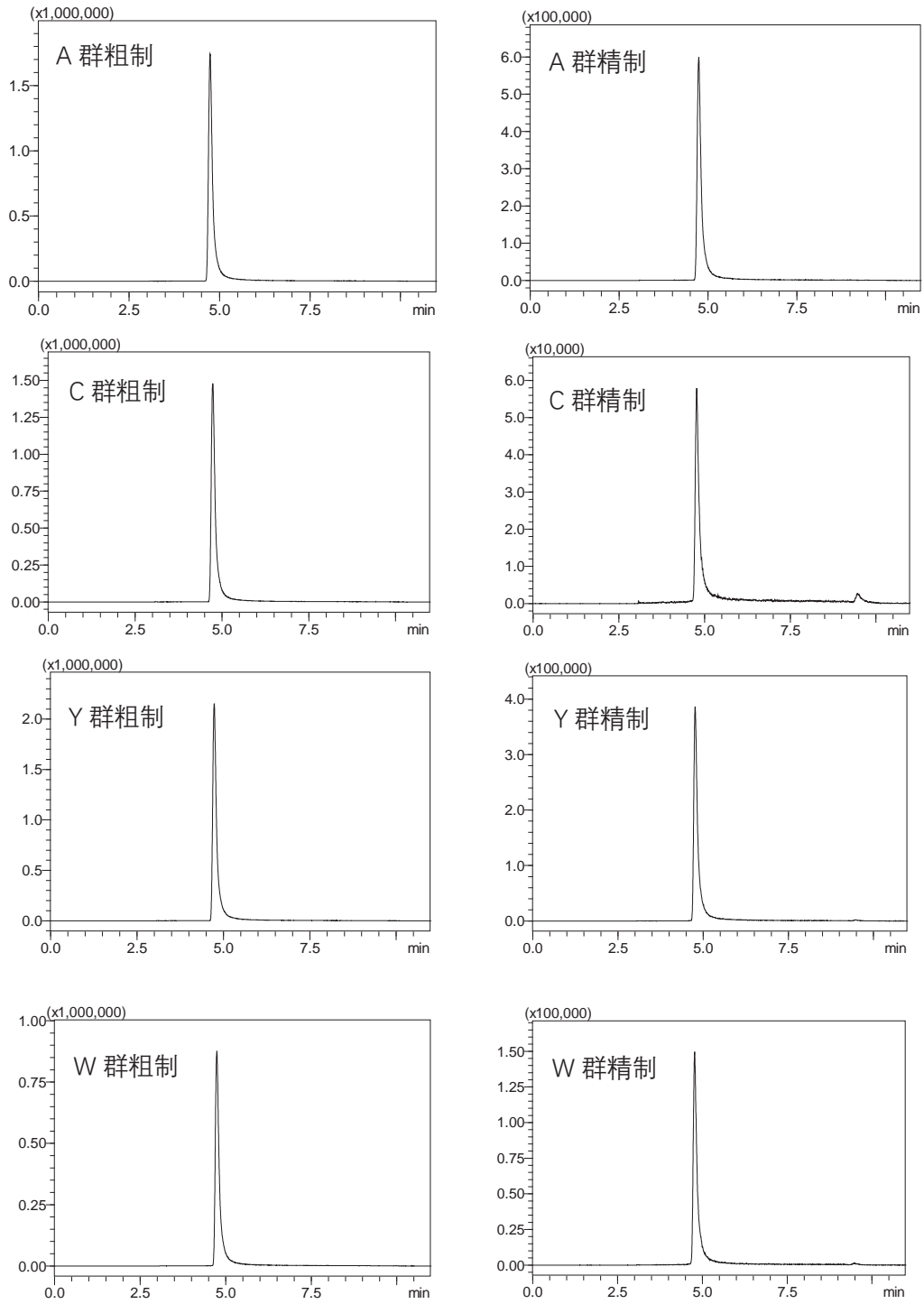


图 9-3 脑膜炎四价粗品（左）和精制品（右）中 CTAB 的含量测定

表 9-3. 3 批次脑膜炎四价粗品和精制产品中 CTAB 的含量测定

样品	CTAB (µg/L)	样品	CTAB (µg/L)
批次 1A 群脑膜炎球菌粗制多糖	263.16	批次 1A 群脑膜炎球菌精制多糖	2.96
批次 2A 群脑膜炎球菌粗制多糖	47.80	批次 2A 群脑膜炎球菌精制多糖	0.49
批次 3A 群脑膜炎球菌粗制多糖	22.48	批次 3A 群脑膜炎球菌精制多糖	8.64
批次 1C 群脑膜炎球菌粗制多糖	228.86	批次 1C 群脑膜炎球菌精制多糖	0.48
批次 2C 群脑膜炎球菌粗制多糖	341.92	批次 2C 群脑膜炎球菌精制多糖	1.46
批次 3C 群脑膜炎球菌粗制多糖	215.22	批次 3C 群脑膜炎球菌精制多糖	0.27
批次 1Y 群脑膜炎球菌粗制多糖	322.94	批次 1Y 群脑膜炎球菌精制多糖	5.10
批次 2Y 群脑膜炎球菌粗制多糖	274.52	批次 2Y 群脑膜炎球菌精制多糖	0.58
批次 3Y 群脑膜炎球菌粗制多糖	249.50	批次 3Y 群脑膜炎球菌精制多糖	0.016
批次 1W 群脑膜炎球菌粗制多糖	129.68	批次 1W 群脑膜炎球菌精制多糖	1.97
批次 2W 群脑膜炎球菌粗制多糖	87.06	批次 2W 群脑膜炎球菌精制多糖	0.73
批次 3W 群脑膜炎球菌粗制多糖	125.24	批次 3W 群脑膜炎球菌精制多糖	2.17

注: 为保护产品信息, 表中 CTAB 含量并未实际测定产品含量。

## 5. 结论

本文采用了一种快速、高选择性和高灵敏度的 LC-MS/MS 检测方法, 用于 Hib 疫苗和脑膜炎四价疫苗粗品和精制品中 CTAB 的检测, 解决了 CTAB 残留无法定量监控的问题, 同时为多糖疫苗的精制工艺改进提供了方向。



## 小结及展望

本文集为《岛津疫苗质量评价新技术方案（二）》——蛋白疫苗篇，收录岛津疫苗行业组从2018年到2019年最新的疫苗开发应用，是《岛津疫苗质量评价新技术方案（一）》——多糖疫苗篇的延续。本文集主要涉及的疫苗品种有百日咳疫苗、百白破疫苗和多糖蛋白结合疫苗（Hib和脑膜炎疫苗）。

在本文集中，疫苗行业组以岛津液相色谱串联三重四极杆质谱仪、激光粒度仪、电子探针和气相色谱仪等现代化理化分析技术为基础，为百白破疫苗的全过程质量评价发展方法。在百日咳疫苗发酵阶段，岛津疫苗行业组创新性的将岛津专利技术“细胞培养基上清液方法包”和具有极高定量稳定性和灵敏度的岛津液相色谱串联三重四极杆质谱结合，首次实现了百日咳发酵液组成随时间变化曲线的监控；同时，还将岛津与中检院合作专利技术“百日咳抗原蛋白定量方法包”用于发酵液中百日咳抗原蛋白定量曲线的绘制，首次“看”到了发酵过程中抗原蛋白的生长趋势，并对比了不同工艺对抗原蛋白累计曲线的影响。在百日咳的纯化阶段，“百日咳抗原蛋白定量方法包”的优势再次凸显，该方法包可用于百日咳纯化阶段任意步骤中抗原蛋白的含量测定，从而帮助评估纯化工艺并为纯化工艺的改进提供“量”的依据。这是第一次让纯化工艺监控不再是“凭经验”的操作，而是有“数”有“据”的优化。组分百日咳疫苗的修饰和纯度是联合疫苗生产的重要评价指标，“百日咳抗原蛋白定量方法包”助力纯度评价，岛津液相色谱-四极杆飞行时间质谱定性评价组分百日咳疫苗修饰，让联合疫苗的生产环节“有理有据”。百白破的成品质量评价是疫苗接种前的最后一道关卡，岛津多重技术为您“把好关”：岛津液相色谱三重四极杆质谱定量抗原蛋白含量，岛津激光粒度仪评价百白破疫苗与铝佐剂的结合情况，从而监控疫苗稳定性和批次一致性；岛津电子探针评价百白破疫苗形貌和组成；气相色谱（气相色谱质谱）监控追踪残留溶剂含量。多重技术监控，让您放心用好“苗”。TCT是困扰百日咳疫苗70余年来的难题，岛津与中检院合作专利“百日咳和百白破疫苗中TCT含量测定”方法首次实现了疫苗成品中TCT的含量测定，同时为百日咳工艺是否能去除TCT的能力验证提供帮助。

岛津《疫苗质量评价新技术》系列应用文集仍在继续，除了您已阅读的第一版和第二版，第三版的实验也正在进行中，更多精彩内容，敬请期待。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理 ( 中国 ) 有限公司 / 岛津 ( 香港 ) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F  
 邮政编码: 100020  
 电话: (010) 8525-2310/2312  
 传真: (010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋  
 邮政编码: 200233  
 电话: (021) 3419-3888  
 传真: (021) 3419-3666

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F  
 邮政编码: 110016  
 电话: (024) 2325-5577  
 传真: (024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
 邮政编码: 610015  
 电话: (028) 8619-8421/8422  
 传真: (028) 8619-8420

### 武汉

湖北省武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室  
 邮政编码: 430060  
 电话: (027) 59080488  
 传真: (027) 59080470

### 广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦4-5楼  
 邮政编码: 510656  
 电话: (020) 37183888  
 传真: (020) 37183804

### 西安

陕西省西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501  
 邮政编码: 710000  
 电话: (029) 6273-7878  
 传真: (029) 6273-7879

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
 邮政编码: 830000  
 电话: (0991) 230-6271/6272  
 传真: (0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室  
 邮政编码: 650021  
 电话: (0871) 315-2987  
 传真: (0871) 315-2991

### 南京

南京市鼓楼区汉中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元  
 邮政编码: 210005  
 电话: (025) 8689-0258  
 传真: (025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室  
 邮政编码: 400010  
 电话: (023) 6380-6057/6058  
 传真: (023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2.6-1C  
 邮政编码: 518042  
 电话: (0755) 8340-2852  
 传真: (0755) 8389-3100

### 河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
 邮政编码: 450007  
 电话: (0371) 8663-2981  
 传真: (0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City.  
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
 电话: (00852) 2375-4979  
 传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439  
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知