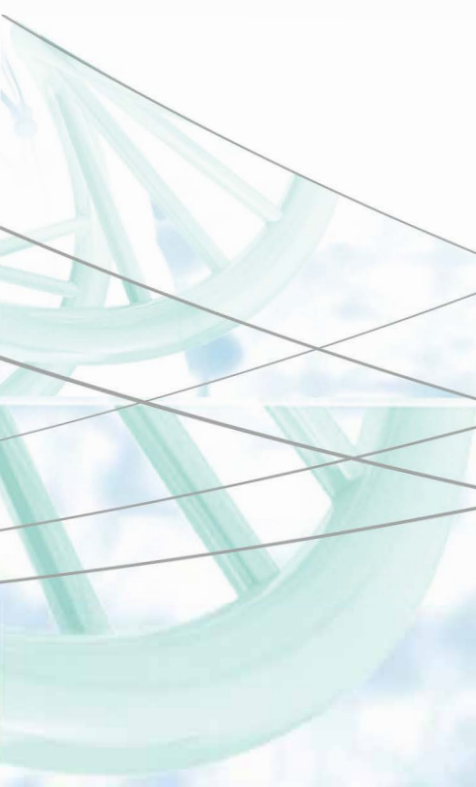


岛津疫苗质量评价新技术方案（一） —多糖疫苗篇



目 录

前 言	2
1 疫苗知多少?	3
2 疫苗生产数据完整性管理——LabSolutions DB/CS.....	7
3 疫苗生产工艺优化与调控--细胞培养上清液组分分析.....	10
4 疫苗有效成分检测	16
4.1 LC-MS/MS 技术用于肺炎多糖疫苗糖单元含量测定	16
4.2 MALDI-TOF 快速鉴定病毒蛋白类疫苗亚基组成	22
4.3 ICP-OES 和 ICP-MS 测定疫苗铝佐剂中铝的含量.....	26
5 疫苗其它物质检测	30
5.1 LC-MS/MS 技术用于疫苗灭活剂去氧胆酸钠和沉淀剂十六烷基三甲基溴化 铵残留的同时检测	30
5.2 Aggregates Sizer 在疫苗聚集体评价系统中的应用.....	35
小结及展望	39

前言

18 世纪的欧洲大陆，让人闻风丧胆的天花挥之不去，每年因此死亡的人数超过 40 万。为了遏制天花，人们甚至采用了极不人道的办法，如烙铁烙烫伤口....然而，事与愿违，死亡仍在继续.....直到 Edward Jenner 发现牛痘痘痂的免疫功能。

自那以后，一次次人类与瘟疫的抗争诞生了一个又一个的疫苗。由于疫苗的接种率上升和接种疫苗种类的增加等原因，自 1990 年以来，5 岁以下儿童的死亡率降低一半。但相对于免疫发达的国家，非洲和拉丁美洲仍然是儿童死亡的高发地区。据《柳叶刀》2016 年统计数据，2015 年全球五岁以下儿童死亡人数约有 590 万，其中 60%发生在非洲和亚洲的 10 个国家。在非洲安哥拉、刚果金、埃塞俄比亚和坦桑尼亚，肺炎是导致儿童死亡的最主要原因。肺炎在不同地区发生率源于与疫苗接种率成负相关。

我国自 1978 年实施免疫规划以来，已成为世界上为数不多的能够依靠自身能力解决全部计划免疫疫苗的国家 and 地区之一，基本覆盖了世界卫生组织推荐的所有重点疫苗种类，从而极大地降低了传染病发病率和死亡率。但随着人民生活水平的提高，对疫苗的种类和质量也在不断的提出更高的要求。

岛津公司成立百年以来，一直以“为了人类和地球的健康”为理念，以“以科学技术为社会做贡献”为宗旨，不断研发先进仪器和软件，并聚集行业精英为各种突发事件、行业难点提供解决方案。岛津公司一直关注疫苗行业发展，努力将现代化的分析技术应用到对疫苗产品的质量控制在评价上。在长期的研究工作中，储备了与疫苗相关的检测新技术方案。

本文集从分析技术方向，为疫苗的生产、质量评价和不良物质检测提供参考技术。



疫苗之父，Edward Jenner

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

1 疫苗知多少？

疫苗是通过传统方法或基因工程等生物技术，由获得的微生物或微生物的蛋白、多糖或核酸等富含免疫原性的生物材料制成，用于人类疾病预防或治疗的生物制品。疫苗的防病效果已为世人公认，如普遍接种的痘苗（vaccinia），实现了全球范围内天花（small-pox）的根除。但近些年来一些新出现和再次出现的传染病对人类健康构成了新威胁，同时现代生物技术和分析技术的发展，又为研发新疫苗和改进现有疫苗奠定了基础，创造了条件。

1. 疫苗的发展

早在公元 10 世纪，我国就采用接种人痘（天花病原体）的方法预防天花。16 世纪，隆庆年间，出现“宁国府太平痘苗”。此后，接种人痘预防天花的方法在我国推广使用，至 17 世纪已传至俄罗斯、日本、朝鲜等国家。西欧各国自 18 世纪也开始采用人痘术。直到 18 世纪晚期，英国医生 Edward Jenner 实验证实接种牛痘（cowpox）可预防天花，开启疫苗时代。

表 1 人用疫苗发展历程

时间	减毒活疫苗	灭活疫苗	蛋白及多糖疫苗	基因工程疫苗
10 世纪	天花（人痘）			
18 世纪	天花（牛痘）			
19 世纪	狂犬病	伤寒 霍乱 鼠疫		
20 世纪（前 50 年）		百日咳 流感 斑疹伤寒	白喉 破伤风	
20 世纪（后 50 年）	脊髓灰质炎（口服） 麻疹 腮腺炎 风疹 腺病毒 伤寒（Ty21a） 水痘 轮状病毒（羊株） 乙型脑炎 甲型肝炎	脊髓灰质炎（注射） 狂犬病（细胞培养） 乙型脑炎 甲型肝炎 森林脑炎 肾综合征出血热	肺炎球菌 脑膜炎球菌 b 型流感嗜血杆 乙型肝炎（血 b 型流感嗜血杆 伤寒 无细胞百日咳 炭疽	乙型肝炎（酵母和 CHO） 百日咳类毒素 霍乱（Rctb+WC） 痢疾（FS） 霍乱（基因缺失） 流感（基因重配）
21 世纪	流感（冷适应型） 轮状病毒（人源） 带状疱疹		肺炎球菌 4 价脑膜炎球菌（结合）	人乳头瘤病毒 轮状病毒（人-牛重配） 幽门螺杆菌 戊肝

2. 疫苗开发技术路线

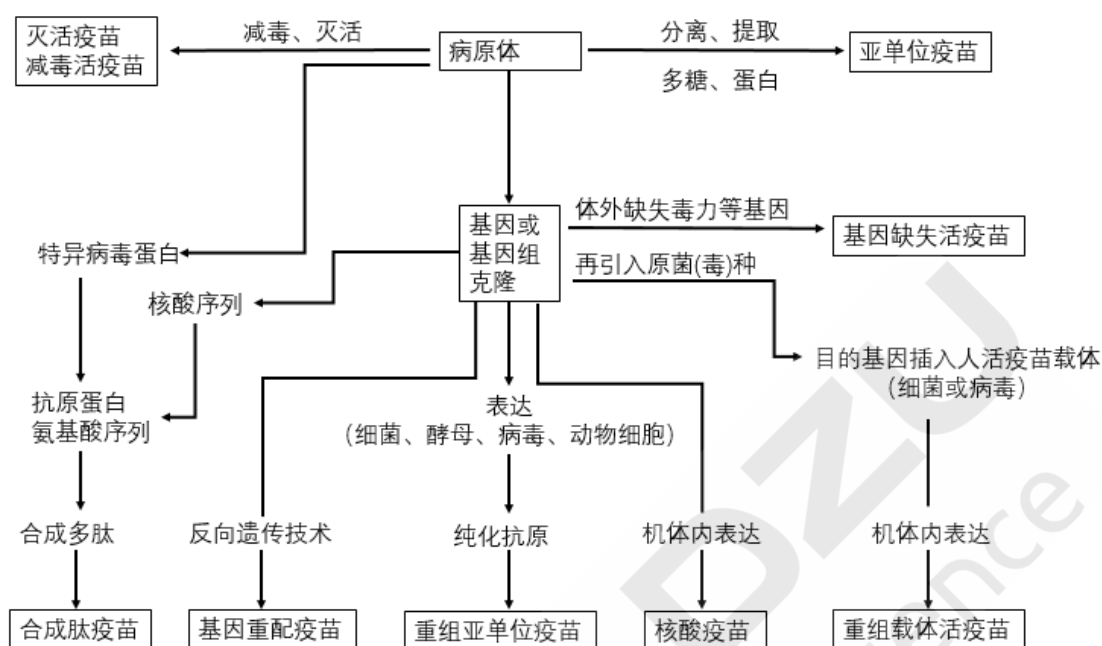


图 1 疫苗开发技术路线

3. 疫苗的分类

按免疫物质理化组成和疫苗工艺，疫苗大致可分为细菌类灭活疫苗（如全细胞百日咳疫苗、钩端螺旋体疫苗）、细菌类减毒活疫苗（如卡介苗、口服伤寒活疫苗）、病毒类灭活疫苗（如灭活狂犬疫苗）、病毒类减毒疫苗、细菌多糖疫苗与多糖蛋白结合疫苗（如肺炎球菌多糖疫苗）、蛋白质类疫苗（如无细胞百日咳疫苗）、联合疫苗（如百白破疫苗）。

4. 全球疫苗动态

据 2015 年 7 月到 2016 年 6 月统计数据，将疫苗销售金额按全球区域划分，北美地区仍然是疫苗覆盖最高的地区（超过 60%），亚、非、澳三个地区不到 20%。在亚洲，日本为最大疫苗覆盖地区并且有 4 家全球排名前十的疫苗企业。中国为亚洲疫苗覆盖率排名第六的国家。与疫苗接种最发达的美国相比，中国疫苗接种还有很大增长空间。疫苗在全球的接种情况与全球儿童存活率几乎完全一致。疫苗接种率高的北美和欧洲是儿童存活率最高的地区，非洲和拉丁美洲为儿童存活率最低的地区。

按品种统计，病毒和蛋白类疫苗仍然占据最大市场规模（约 50%）。同时，病毒和蛋白类疫苗也是品种最多的疫苗类型。因此，建立病毒蛋和蛋白类疫苗的质量评价方法，有利于疫苗行业质量评价水平的提升。本文集以 MALDI-TOF、Aggregates Sizer 和 ICP-MS/OES 分别建立病毒和蛋白类疫苗的亚基评价方法、疫苗聚集体分析和疫苗佐剂含量测定方法。

表 2 为全球市场份额排名前 10 的疫苗品种。从表中数据可知，肺炎仍为全球范围内关注度最高的疾病，这与 WHO 对全球儿童死亡原因统计结果吻合（肺炎为全球儿童致死最高的疾病之一），尤其是疫苗接种率最低的非洲地区。本文集用 LC-MS/MS 技术发展 23 价肺炎多糖疫苗糖单元测定方法、灭活剂去氧胆酸钠和工艺残留试剂十六烷基三甲基溴化铵的含量测定方法。

表 2 全球市场份额排名前 10 疫苗

排名	产品名称（商品名）	疫苗类型（化学物质）
1	肺炎球菌结合疫苗（PREVNAR）	细菌多糖（糖蛋白）
2	水痘带状疱疹疫苗（VARIVAX）	病毒（蛋白+核酸）
3	流感疫苗（VAXIGRIP）	病毒（蛋白+核酸）
4	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 型人	病毒（蛋白+核酸）
5	6, 11, 16 和 18 型人乳头状瘤病毒疫苗	病毒（蛋白+核酸）
6	肺炎球菌疫苗（PNEUMOVAX）	细菌多糖（多糖）
7	水痘带状疱疹疫苗+麻疹、腮腺炎和风疹疫苗	病毒（蛋白+核酸）
8	五联无细胞百日咳疫苗（TRIPACEL）	蛋白+糖蛋白+病毒
9	脑膜炎球菌结合疫苗（MENACTRA）	细菌多糖（多糖）
10	轮状病毒疫苗（ROTATEQ）	病毒（蛋白+核酸）

5. 疫苗生产工艺举例

疫苗生产工艺十分复杂，以肺炎多糖疫苗为例，肺炎多糖的生产需要历经细菌培养、离心去除菌体、多糖纯化、多糖原液、半成品、成品几大主要步骤。其中，仅多糖纯化就需要经过 12 个大环节：1. 终止液体培养（去氧胆酸钠灭活）；2. 连续流离心，收集上清液（加入十六烷基三甲基溴化铵，CTAB）；3. 连续流离心，收集沉淀的复合多糖；4. 复合多糖解聚（加入 CaCl_2 或 NaCl ）；5. 加冷乙醇至 25%，去除沉淀的核酸、杂质；6. 收获离心上清液，补加冷乙醇至 70%-80%，沉淀收获粗多糖；7. 收获离心沉淀的粗多糖（加入醋酸钠溶液溶解）；8. 加 2 倍体积的预冷苯酚溶液，抽提去除蛋白；9. 吸取多糖-醋酸钠溶液相，重复苯酚抽提 2-4 次；10. 于最后一次多糖-醋酸钠溶液相中加冷乙醇至 70%-80%；11. 离心收集沉淀，注射用水溶解；12. 膜除菌过滤，精制多糖原液。

疫苗生产每个环节都需严格监控、步步把关，从培养——纯化——佐剂（辅料）添加——成品灌装（保存），任何一个环节的疏忽都将带来不可挽回的遗憾。

6. 疫苗行业检测技术应用：

在中国，疫苗的质量检测标准大多参考《中华人民共和国药典》（2015 版）第三部（以下简称 ChP），ChP 未收录的品种参考《欧洲药典》和世界卫生组织（WHO）相关规定执行。从 ChP 的相关标准可以看出，紫外分光光度计等仍是疫苗质量控制的主要技术。例如，紫外分光光度计法检测肺炎多糖疫苗糖单元含量、灭活剂去氧胆酸含量和甲醛含量、O-乙酰基含量等。近年来，一些疫苗企业和质量监督部门也在推进

更多的分析技术用于疫苗的质量评价并逐步成为疫苗质量控制的标准方法之一。如 HPLC-RI 技术评价乳糖纯度，原子吸收光谱法测定残留硫柳汞含量等。在全球，对于疫苗的质量控制也有相关标准，如《欧洲药典》、《美国药典》、《英国药典》和《日本药典》等。以上药典收录的疫苗质量评价方法与《中国药典》大体相同。但从近 5 年国外疫苗企业和研究单位发表的研究论文来看，一些更先进的分析技术已经应用到疫苗的质量评价中，如 LC-MS 技术在重组蛋白、类病毒疫苗、灭活病毒颗粒、多糖和多糖蛋白结合疫苗质量评价中的应用。这些数据为寻找疫苗质量差异、监控和优化疫苗工艺提供了有力的支撑。岛津紧跟时代步伐，与疫苗企业和监管单位携手，采用先进仪器为中国疫苗量身定制新型检测技术，所用技术涵盖 LC-MS、MALDI-TOF、生物药物聚集体分析仪和 ICP-MS/ICP-OES 等。新方法可用于过去无法完成的质量评价和生产监控，特编辑成册，供业内人士参考。

——部分数据来源于《疫苗研究与应用》



SHIMADZU
Excellence in Science

2 疫苗生产数据完整性管理

——LabSolutions DB/CS

LC 与 GC 等仪器被以医药品为主的化学与食品安全生产商等企业广泛适用于质量管理与研究开发领域。以医药行业为中心，为了支持数据可靠性的指导方针、FDA 21 CFR Part11、GMP 等规定及指南，需要为装置及分析数据提供更准确、更高效的维护管理。LabSolutions DB/CS 工作站软件正是在这些需求下应运而生的分析数据系统，具有数据管理的完整性、创新性和安全性，符合现代实验室的要求。

LabSolutions DB/CS 软件可控制的仪器种类繁多，不仅包括疫苗产品中的有效成分质量评价以及不良物质监控所用到的 LC、LC-MS/MS、ICP-MS、Aggregates Sizer、GC、GC-MS/MS 等仪器，还包括光谱类、溶出度仪和天平等，都可以由 LabSolutions DB/CS 软件统一控制。完美实现所有数据在数据库中一体化管理。



图 1 LabSolutions CS 系统构架

LabSolutions DB/CS 软件，数据完整性包括两大主要内容：审计追踪和数据安全。

1. 数据安全

LabSolutions DB/CS 软件通过数据库模式实现数据的封闭式管理，有效的控制数据的不合理操作，防止数据的删除或者覆盖，更好的符合法规要求。而且，LabSolutions DB/CS 执行严格的用户管理原则，只有经许可的人员才能进入和使用，具体如下：

- ① 用户账号的管理原则：账号不可重复、用户不可删除、非法登录提示、显示登录时间。
- ② 用户权限管理的基本原则：职责分离原则、未明确允许即为禁止、需求导向及最小授权原则。

- ③ 用户权限管理的范围：访问权限、职责分离。
- ④ 用户密码的管理原则：密码的长度与有效期、密码的复杂性（数字、符号和大小写英文字母的混合）、旧密码不能被重用

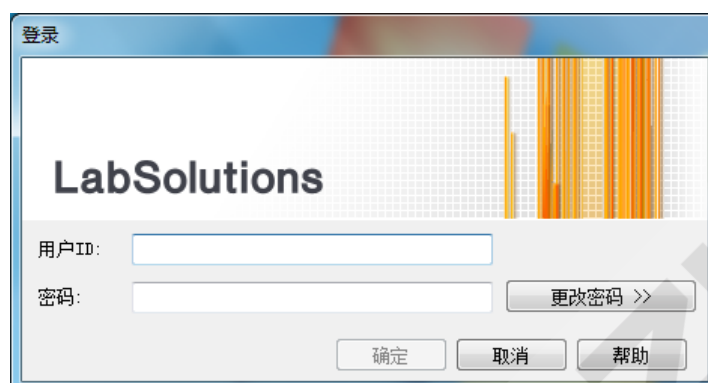


图 2 LabSolutions DB/CS 严格的用户管理模式

2. 审计追踪

GMP 中规定审计跟踪，是一系列有关计算机操作系统、应用程序及用户操作等事件的记录，用以帮助从原始数据追踪到有关的记录、报告或事件，或从记录、报告、事件追溯到原始数据。LabSolutions DB/CS 的审计追踪主要分为四大类：仪器类、数据类、人员类及设置类，现在还能预置变更理由，无需手动输入，仅用鼠标选择，这样既可以符合法规要求，又能减轻操作人员负担。

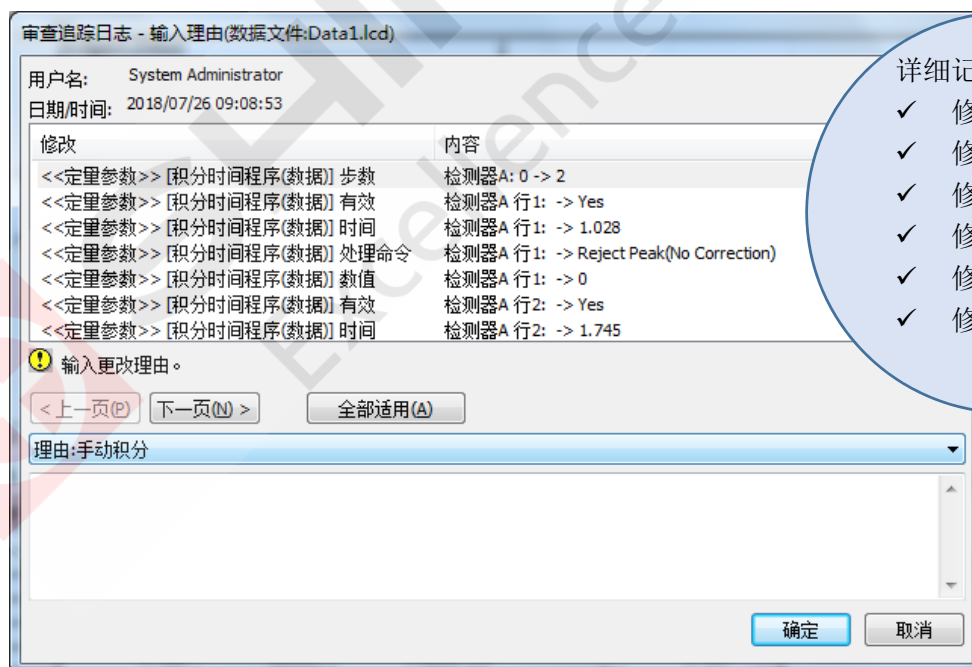
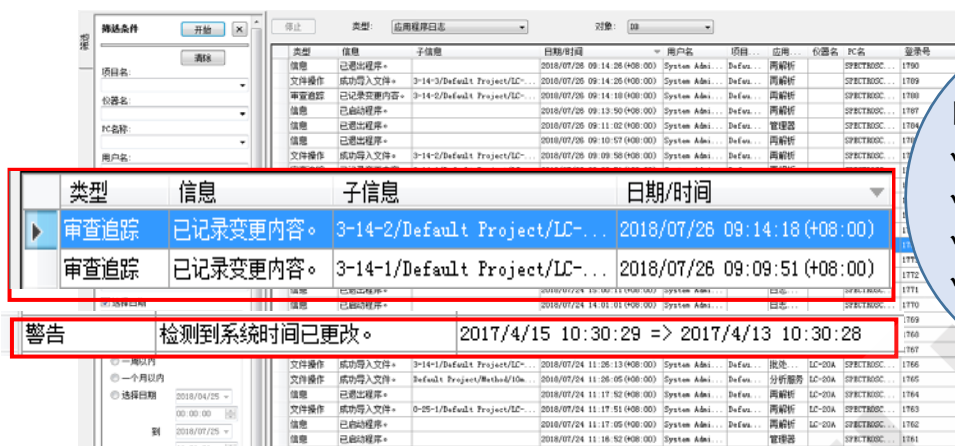


图 3 LabSolutions DB/CS 数据文件审计追踪示例



- 日志:
- ✓ 记录所有操作
 - ✓ 自动记录
 - ✓ 不能修改/删除/覆盖
 - ✓ 备份/恢复

图 4 LabSolutions DB/CS 日志审查追踪示例

对于数据文件，则采用版本号对数据进行管理，保存每次数据修改前后的数据及报告，并可作为最新数据恢复。同时，防止数据的覆盖，实现数据追溯。

文件名	版本号	数据No.	记录日期/时间	记录者	分析日期/时间	分析者
Datal lcd	5	3-14-5	2018/07/26 09:18:18(+)	System Administ	2018/07/24 11:1	System Administ
└Datal lcd	4	3-14-4	2018/07/26 09:17:52(+)	System Administ	2018/07/24 11:1	System Administ
└Datal lcd	3	3-14-3	2018/07/26 09:14:25(+)	System Administ	2018/07/24 11:1	System Administ
└Datal lcd	2	3-14-2	2018/07/26 09:09:58(+)	System Administ	2018/07/24 11:1	System Administ
└Datal lcd	1	3-14-1	2018/07/24 11:26:12(+)	System Administ	2018/07/24 11:1	System Administ

图 5 LabSolutions DB/CS 数据文件信息示例

3. 备份与恢复

以项目为单位，对实验室整体或者部分数据/日志进行定期备份。可备份在 CD/DVD、移动硬盘、磁带等以实现异地备份。

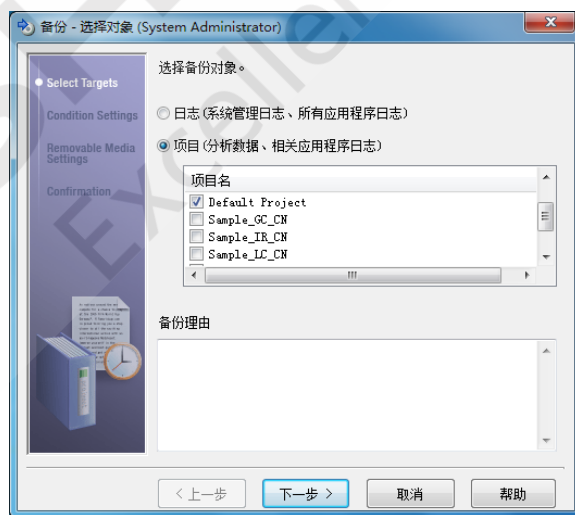


图 6 LabSolutions DB/CS 备份示例

LabSolutions DB/CS 软件为制药企业提供完美的数据完整性方案以应对法规要求。岛津公司作为全球著名的分析仪器厂商，进入中国近四十年，长期以来一致关注国内外药品安全和食品安全，并及时提供全面的解决方案。

3 疫苗生产工艺优化与调控--细胞培养上清液组分分析

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用同时测定细胞培养上清液中 95 种组分，快速分析了 4 种培养工艺中 95 种化合物的相对含量变化趋势，从而为寻找细胞培养工艺的可行性并发现影响生物制品产量和质量的关键因素提供参考。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分离，分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类化合物的高灵敏度快速检测。

关键词： 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 细胞培养工艺

在疫苗生产过程中，为了疫苗的质量和产量，并考虑生产的线性放大等等，需要对培养基、培养工艺进行优化。要实现培养基和培养工艺的优化，需要实时监控生产过程中细胞培养上清液中关键因素的变化，从而得出最优化培养基和培养工艺。

为满足快速全面分析细胞培养上清液组分，将基础碳源、氮源、核苷酸、维生素和其他主要代谢物一起检测分析，得到更多有关生物过程中的详细信息，我们开发出“细胞培养分析方法包”。该技术平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需 17 分钟，即可同时监测分析 95 种细胞培养上清液营养成份和代谢物的相对丰度变化。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用，利用“细胞培养分析方法包”建立了不同细胞培养工艺中营养物质和细胞代谢物的液相色谱-串联质谱的同时分析方法，供相关人员参考。

1 方法学参数

样品前处理方法：取 500 μL 细胞培养液，在室温下离心 1 分钟 (3000 rpm)，吸取 100 μL 离心后上清液到新的离心管中，然后加入 20 μL 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L)，再加入 200 μL 乙腈，涡旋使充分混匀，室温下离心 15 分钟 (15000 rpm)，精密吸取上清液 100 μL ，加入 900 μL 水，涡旋混匀，上机前再用纯水稀释 100 倍。

本文中共涉及 4 个不同的培养工艺，取样点为培养前的新鲜培养基 (D0)、第 1-5 天每天定点取样 (D1-5)。

培养工艺 1: F1-D0, F1-D1, F1-D2, F1-D3, F1-D4, F1-D5

培养工艺 2: F2-D0, F2-D1, F2-D2, F2-D3, F2-D4, F2-D5

培养工艺 3: F3-D0, F3-D1, F3-D2, F3-D3, F3-D4, F3-D5

培养工艺 4: F4-D0, F4-D1, F4-D2, F4-D3, F4-D4, F4-D5

2 实际样品测试

2.1 细胞培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”中的方法对不同培养工艺的细胞培养上清液中组分进行分析，目标组分不同程度被检出，色谱图如图 1 所示。

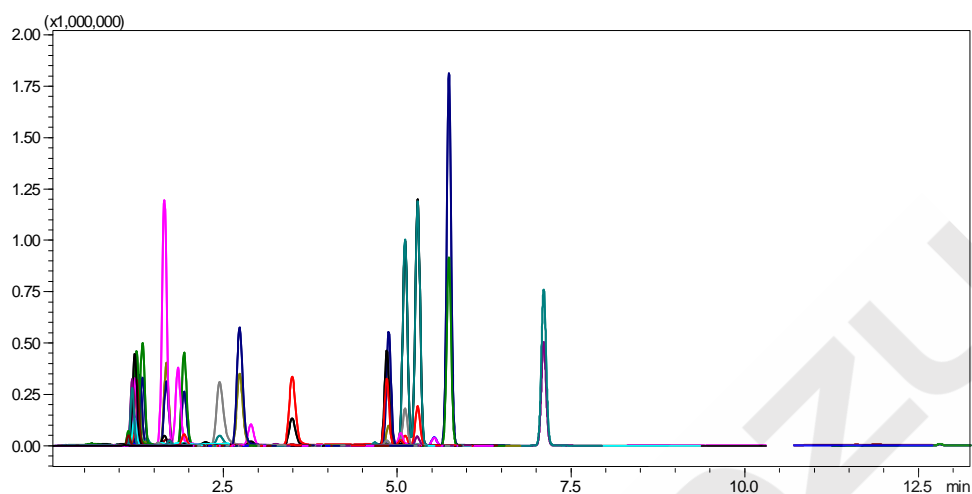
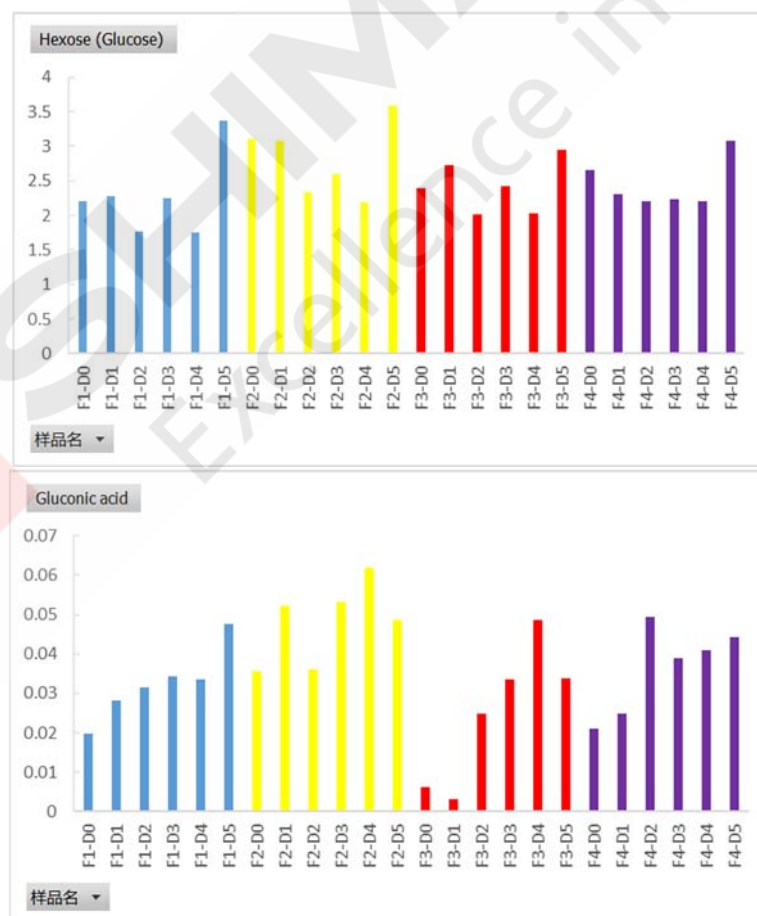


图 1 F1-D3 细胞培养上清液组分分析色谱图

2.2 4 种细胞培养工艺中部分糖、氨基酸、核苷和维生素类化合物的含量变化趋势

以下各柱形图均以培养时间为横坐标，目标化合物与内标化合物的峰面积比为纵坐标进行绘图。

2.2.1 糖类化合物



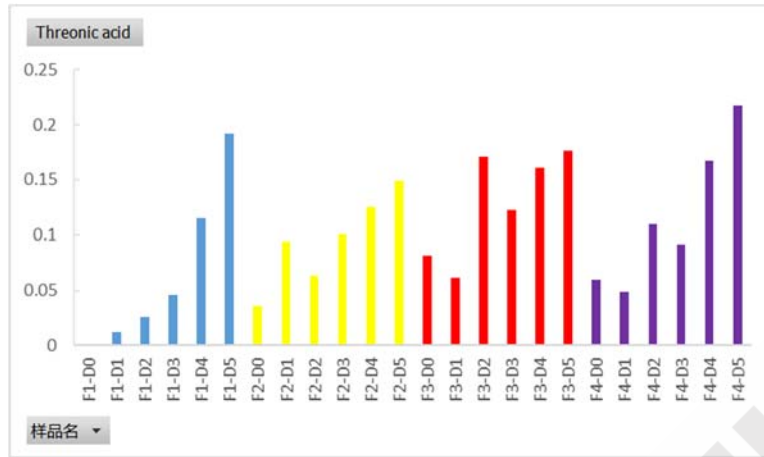
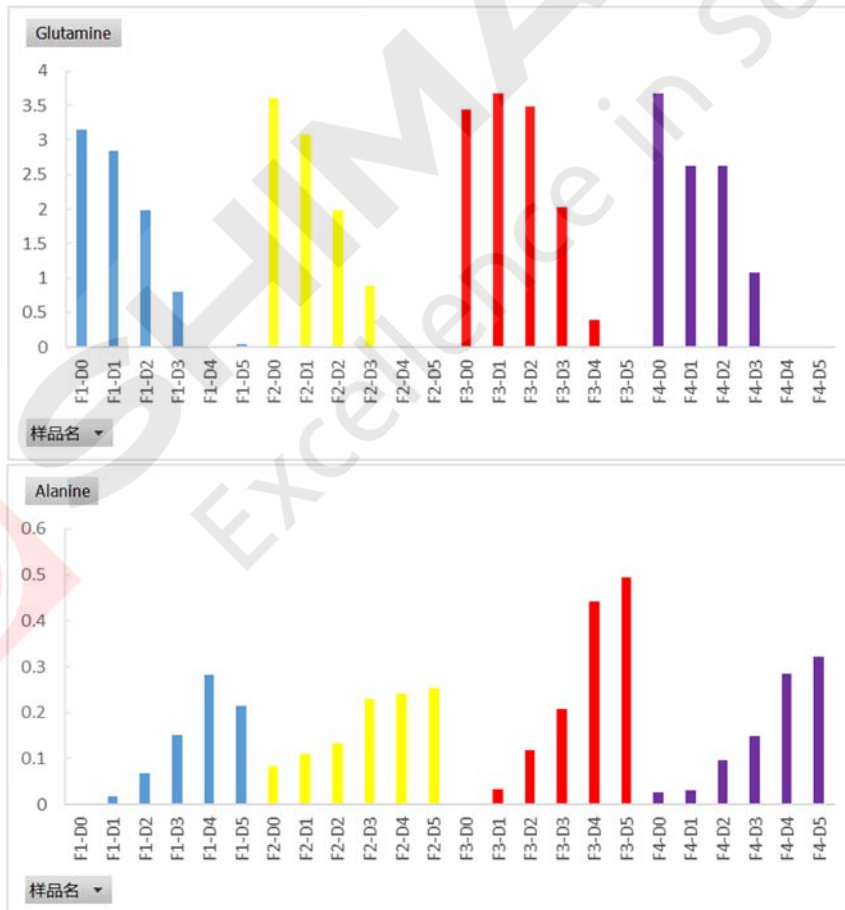


图2 4种细胞培养工艺中部分糖类化合物的相对含量变化趋势

4个不同细胞培养工艺中，葡萄糖（Glucose）的相对浓度基本维持在相当水平，变化幅度很小。葡萄糖酸（Gluconic acid）和苏糖酸（Threonic acid）的相对含量比较低，且在F1培养工艺中苏糖酸（Threonic acid）的相对含量随着培养时间的增加而增加，趋势明显。

2.2.2 氨基酸类化合物



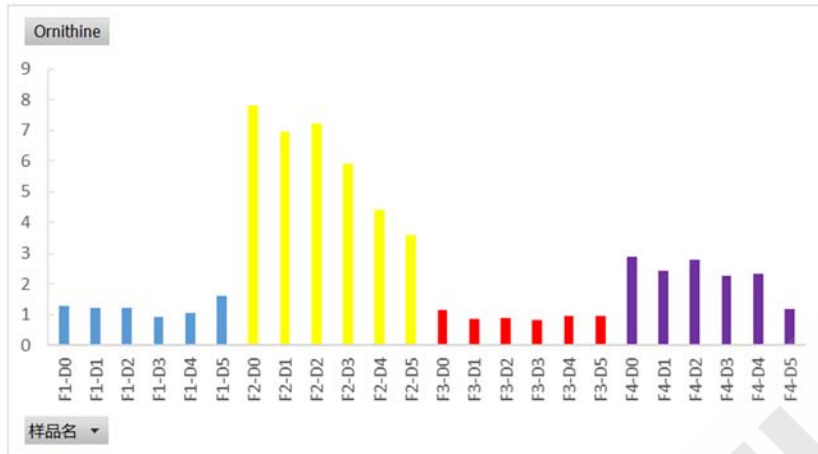
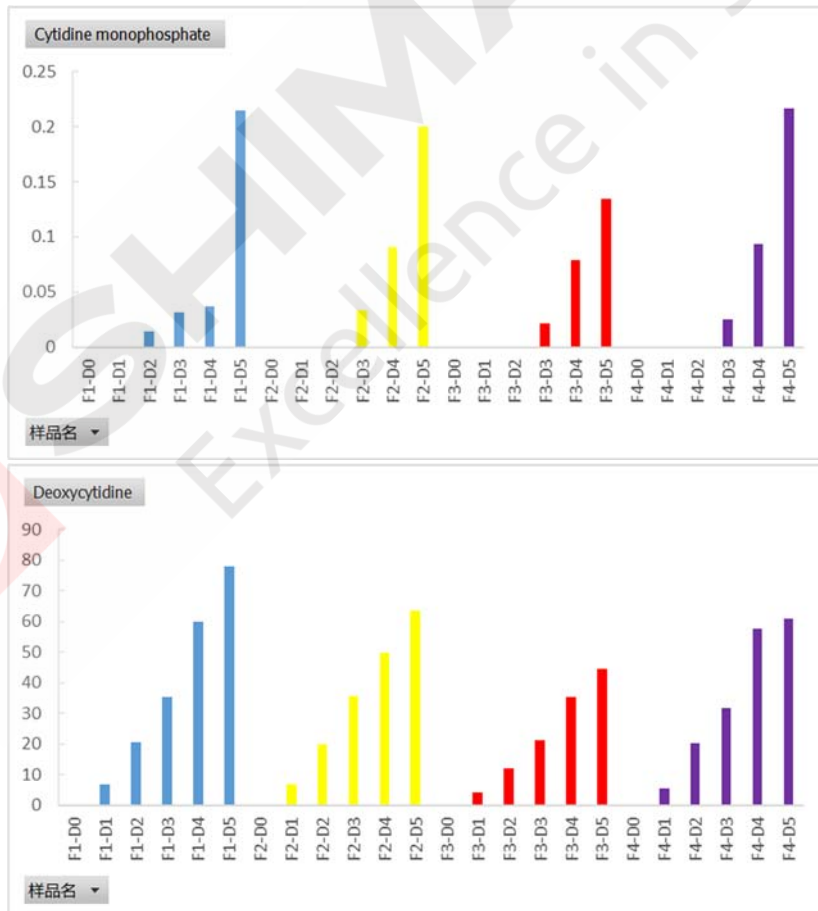


图3 4种细胞培养工艺中部分氨基酸类化合物的相对含量变化趋势

在4个不同的细胞培养工艺中，谷氨酰胺（Glutamine）消耗量比较大，在最后2天的培养过程中几乎耗尽，可根据目标产物的要求适当调整该氨基酸的添加量；丙氨酸（Alanine）随着培养时间的增加相对浓度逐渐变大，初步推断是细胞摄入过多葡萄糖，生成代谢废物丙氨酸；鸟氨酸（Ornithine）在培养过程中基本保持一个稳定浓度，变化微小，可结合最终产物的质量和产量来适当调整该化合物的平衡浓度。

2.2.3 核苷类化合物



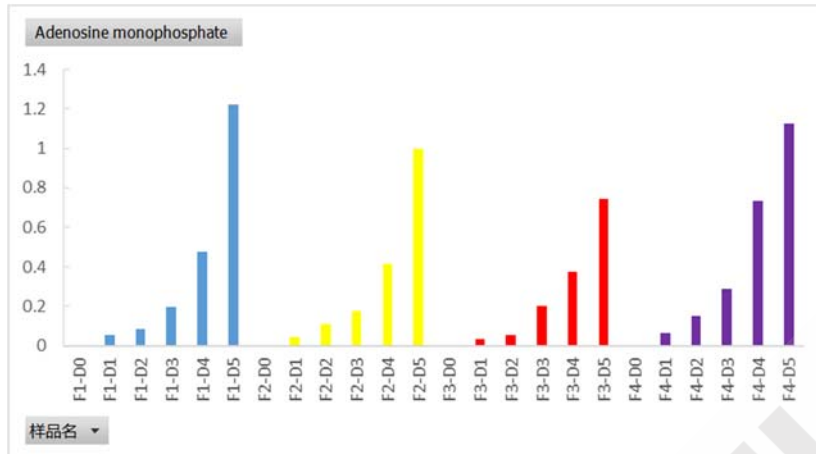
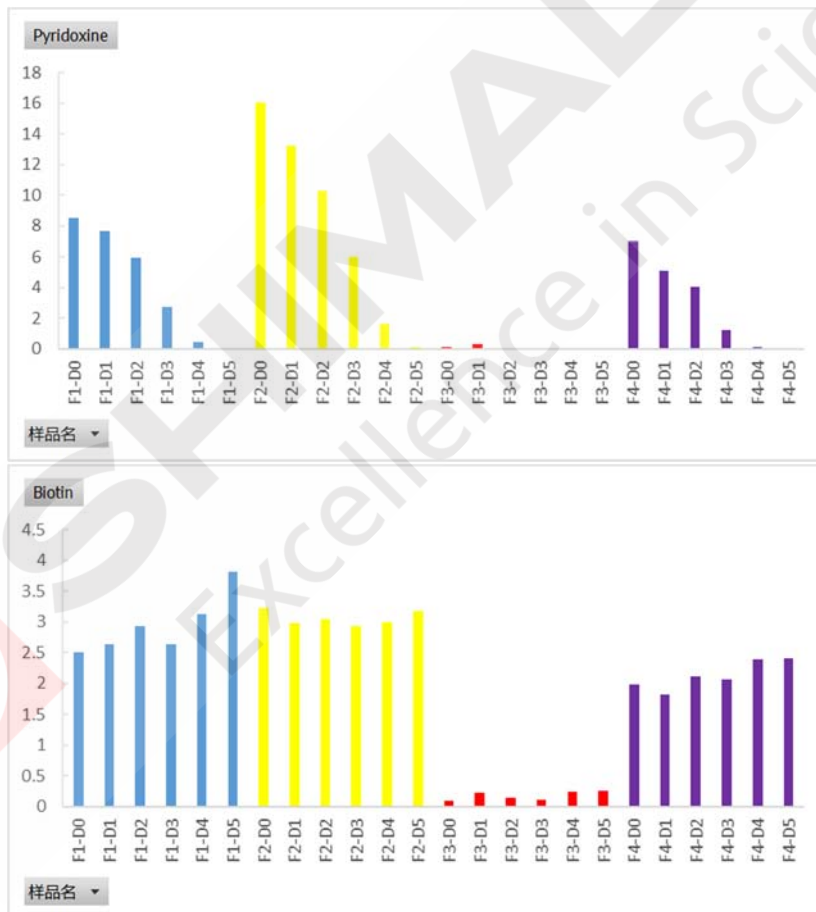


图 4 4 种细胞培养工艺中部分核苷类化合物的相对含量变化趋势

在 4 个不同的培养工艺中，核苷类化合物均随着培养时间的增加而增加，培养基中均不含这 4 个核苷类化合物。

2.2.4 维生素类化合物



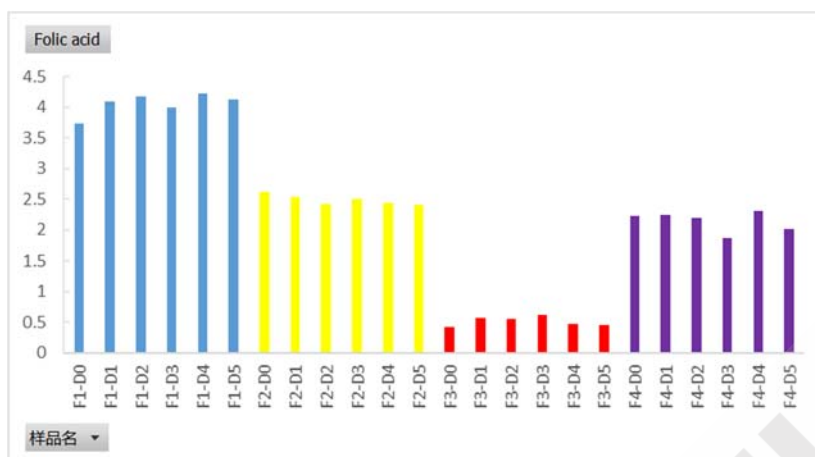


图5 4种细胞培养工艺中部分维生素类化合物的相对含量变化趋势

在4个不同培养工艺中生物素（Biotin）和叶酸（Folic acid）的相对浓度在5天的培养过程中维持在一定水平，而维生素B6（Pyridoxine）随着培养时间的增加，相对浓度逐渐减小，可对其浓度进行适当调整，从而保证目标物最终的质量和产量符合要求。

3 结论

采用岛津公司 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪，结合“细胞培养分析方法包”快速分析了4种培养工艺中95种化合物的相对含量，并对4个细胞培养工艺中部分糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类化合物随着培养时间的变化趋势进行了详细说明，结合生物制品的质量和产量要求，选择高效快速的培养工艺，并发现影响生物制品产量和质量的关键因素，该方法可为细胞培养工艺的选择和优化提供参考。

4 疫苗有效成分检测

4.1 LC-MS/MS 技术用于肺炎多糖疫苗糖单元含量测定

摘要： 针对欧洲药典方法测试 23 种血清类型肺炎多糖疫苗中糖单元耗时较长（完成 23 种血清类型疫苗测试需数周时间）、重复性受基质干扰等问题，本文发展了一种 LC-MS/MS 方法，用于己糖酸、氨基己糖、己糖和甲基戊糖含量的同时测定。该方法与欧洲药典方法相比，具有抗干扰能力强、检测通量高、快速等优点。本文发展的 LC-MS/MS 方法具有灵敏度高（己糖酸 LOD=0.98 $\mu\text{g/L}$ ）、重复性好（峰面积 RSD% 不超过 1.669%）、定量准确度高（线性范围内精确度 92.9%-104.2%）、回收率高（97.6%-99.3%）、线性范围宽、耗时短（6 min 完成 4 类糖单元的同时测定）。将该方法用于 23 种血清类型肺炎多糖疫苗中糖单元的含量测定，并就氨基己糖的含量测定与欧洲药典对比。对比结果表明，本文发展的 LC-MS/MS 方法无须衍生且极大地加快了检测速度和提升了检测通量、具有更好的抗基质干扰能力、更高的选择性、更高的准确度。

关键词： 肺炎多糖疫苗 甲基戊糖 己糖 氨基己糖 糖醛酸 LC-MS/MS

肺炎球菌多糖疫苗（PPSV）是医学史上的里程碑，自 1983 年以来，肺炎球菌多糖疫苗每年挽救数百万的生命。据不完全统计，由于肺炎多糖疫苗的注射，肺炎死亡率从 768/100,000 每年降低到 244/100,000 每年。肺炎球菌多糖疫苗由 23 种血清类型的多糖组成，简称 PPSV-23，主要用于 2 岁以上儿童和老人。糖单元的含量是 PPSV-23 质量控制的关键参数。欧洲药典采用化学衍生-紫外分光光度计测试吸光度值的方法对每一种血清类型肺炎多糖疫苗中氨基己糖、糖醛酸和甲基戊糖进行测试（共 23 种血清类型）。该方法耗时较长且衍生效率受基质组成影响较大。完成一种血清类型 PPSV 中糖单元测试的需要 12 小时以上，23 种血清类型 PPSV 的糖单元测定需耗时数周。常见的 HPLC-UV 方法可降低基质干扰，提高检测准确性，但仍无法避免衍生步骤。通用型检测器，如示差折光检测器（RI）、蒸发光散射检测器（ELSD）和电雾式检测器（CAD）无须衍生即可实现高浓度弱紫外吸收化合物的检测，但通用型检测器选择性较差，受基质干扰较大，难以实现复杂疫苗基质中糖单元含量的准确测定。离子色谱-电化学检测器（IC-ECD）可提高检测选择性且无需衍生，但其定量准确性受分离影响较大且分离时间较长，限制了检测通量。

本文结合质谱的高选择性，发展了一种 LC-MS/MS 方法用于 PPSV-23 中四种糖单元（己糖、氨基己糖、己糖酸和甲基戊糖）的同时测定。

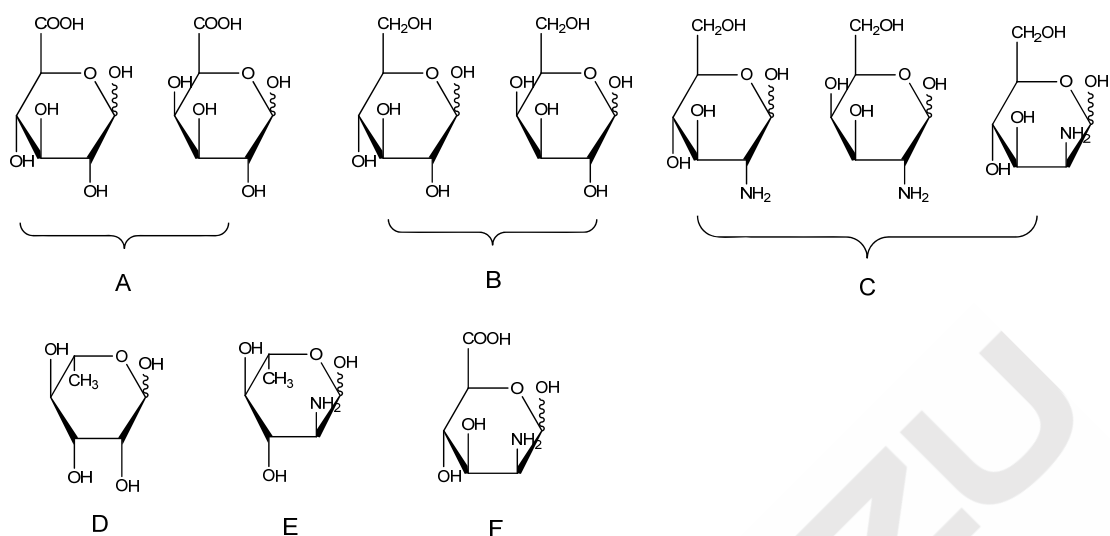


图1 PPSV 水解液中常见糖单元类型：化合物 A-F 分别为糖醛酸、己糖、氨基己糖、甲基戊糖、甲基戊糖胺和 5-氨基-2-羧基己糖

1 方法学参数

欧洲药典以氨基己糖、己糖酸和甲基戊糖含量作为评价 PPSV 质量的重要指标。PPSV 水解液中存在多种糖单元异构体。如己糖酸有葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸（图 1A）、己糖异构体有葡萄糖、半乳糖（图 1B），氨基己糖异构体有氨基葡萄糖、氨基半乳糖和氨基甘露糖（图 1C）。因此，新发展的方法可以通过两种方式与欧洲药典要求结合：第一，将所有异构体基线分离，分别测定其含量，通过加和测得各类糖单元总量。这种方法对分离度要求较高，且所需标准品种类较多，工作曲线的制定时间较长。第二，新方法实现糖单元的分类分离和检测且各异构体在该方法中具有响应一致性。即同一类糖单元的不同异构体线性方程相似，将样品中异构体的峰面积之和带入糖单元的某一种异构体线性方程中，即可测得样品中该类糖单元含量。这种方法所需标准品种类少，可将最易购买所得的标准品用于标准曲线的绘制。本文依据第二种原则发展了 LC-MS/MS 方法，并对各异构体的线性曲线进行测试，其结果如表 1 所示。从表 1 数据可知，同一类型糖单元的不同异构体线性方程相似，如葡萄糖和半乳糖的线性方程。说明在本方法条件下，糖单元异构体具有结构响应一致性，无需实现糖单元的异构体基线分离、用最易获得的标准品绘制工作曲线，即可实现样品中该类糖单元的含量测定。

表 1 己糖、己糖酸、氨基己糖和甲基戊糖方法学参数

化合物	线性曲线 ^a	R ²	准确度 ^b	LOD	LOQ	重复性 ^d	回收率%
葡萄糖	A=2229.4 C+489.4	0.9999	97.6-102.8	3.32 (S/N ^c =5.6)	6.64 (S/N=12.1)	1.669	97.6%
半乳糖	A=2198.9 C+376.5	0.9994					
葡萄糖胺	A=6634.0 C+8907.8	0.9998	97.2-101.3			0.984	98.2%
半乳糖胺	A=6237.9 C+3118.9	0.9996		3.96 (S/N ^c =5.1)	7.92 (S/N=11.0)		
甘露糖胺	A=6214.5 C+1663.1	0.9998					

葡萄糖醛酸	$A = -11.2 C^2 + 16686 C + 51493$	0.9998	92.9-104.2	0.98 (S/N=5.6)	1.96 (S/N=11.5)	1.139	99.3%
半乳糖醛酸	$A = -12.1 C^2 + 15029 C + 10597$	0.9996					
鼠李糖	$A = 4287.7 C + 2102$	0.9996	98.3-102.6	8.20 (S/N=5.2)	16.41 (S/N=10.1)	0.804	98.5%

^aA: 峰面积; C: 浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

^b 准确度% = $\frac{A_{\text{测量值}}}{A_{\text{理论值}}} \times 100\%$;

^cS/N: 信噪比

^d 每个浓度各进样6次测试.

如图2A所示, 本文发展的LC-MS/MS方法仅需6 min (方法长度为10 min, 样品分析用时6 min, 色谱柱平衡用时4 min), 即可实现4类糖单元的分选检测和糖单元异构体的聚类分析。避免峰面积加和, 异构体分别定量等繁琐工作。将本方法用于未水解的PPSV-23检测, 未发现目标峰, 说明本方法不受内源性物质干扰, 具有较高选择性。此外, 还考察了样品残留对本方法检测的影响。如图2C所示, 高浓度样品分析后进样空白样品, 无目标物质检出, 表明该方法无明显残留。

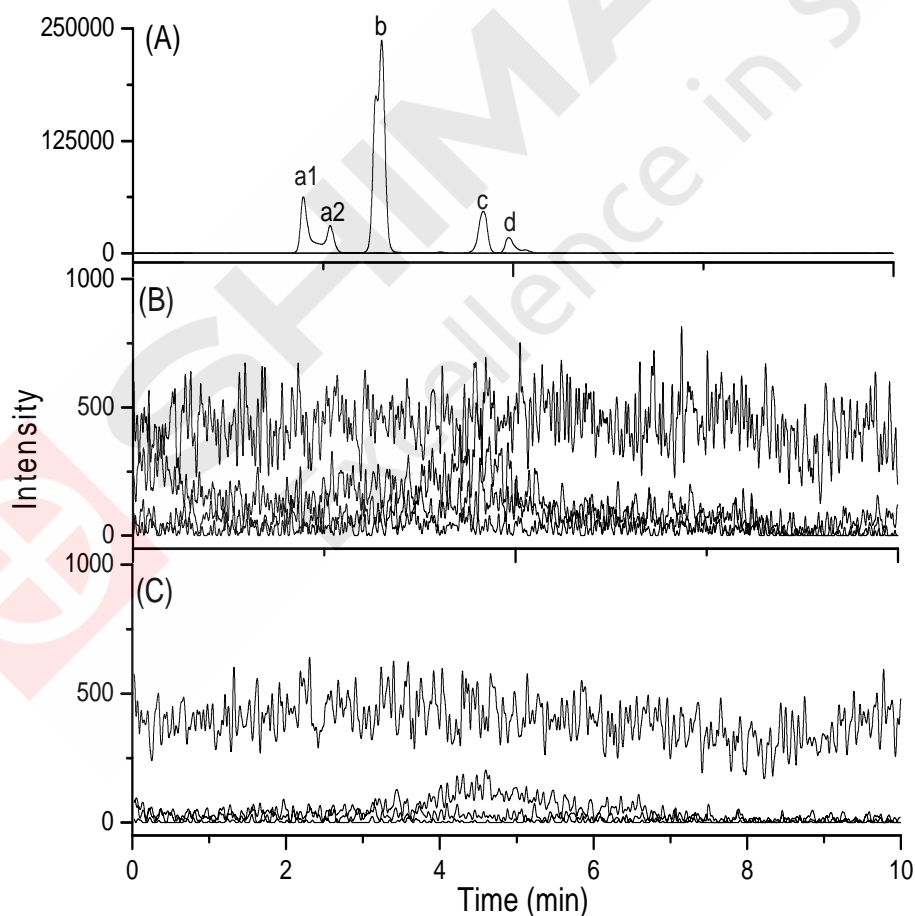


图2 4种疫苗糖单元的MRM色谱图(A), 非水解PPSV-23的MRM色谱图(B), 高浓度样品测试后空白进样色谱图(C)。a1和a2: 鼠李糖; b: 己糖; c: 氨基己糖; d: 糖醛酸

方法稳定性对疫苗质量评价尤为重要。本方法通过长达 3 个月，3000 多针的进样考察，甲基戊糖、己糖、氨基己糖和糖醛酸的保留时间 RSD% 分别为 1.16%，0.34%，1.46% 和 1.64%。

2 LC-MS/MS 同时定量 23 种肺炎多糖疫苗水解液中 4 类糖单元

将优化所得的 LC-MS/MS 方法用于 23 种肺炎多糖疫苗水解液中 4 类糖单元的含量测定（典型色谱图如图 3），并对比 HCl 水解和 TFA 水解，所得结果如表 2 所示。含有目标化合物结构单元的肺炎疫苗，LC-MS/MS 方法均可在其水解物中检出对应糖单元。反之，则不能检出。如 1 型肺炎多糖中仅有 4 类糖单元中的糖醛酸，表 2 结果显示，除糖醛酸以外，其它三种糖单元均不能检出。23 种 PPSV 水解液检测结果表明，LC-MS/MS 方法具有较高的检测选择性。

本文将三种常见的多糖水解方法用于 23 种类型肺炎多糖疫苗的水解研究（TFA，硫酸和 HCl）。其中，硫酸水解碳化非常严重，难以实现目标化合物的稳定获取。HCl 和 TFA 都可以从肺炎多糖疫苗中水解得到糖单元。糖单元在 TFA 中稳定性高于 HCl，但 TFA 水解效率远低于 HCl，综合对比后，选择 HCl 作为肺炎多糖疫苗的水解。

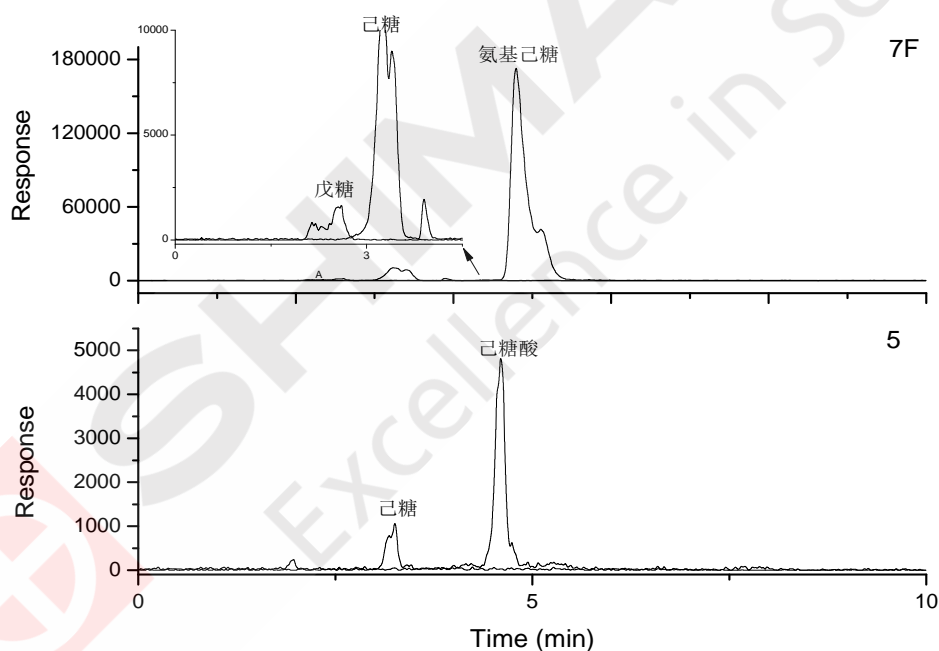


图 3 LC-MS/MS 分析 7F(上) 和 5(下) 水解产物

表 2 不同水解方式所得 23 种 PPSV 中氨基己糖、甲基戊糖、己糖和糖醛酸含量

类型	氨基己糖 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		甲基戊糖 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		己糖 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		糖醛酸 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	HCl	TFA	HCl	TFA	HCl	TFA	HCl	TFA
1	-	-	-	-	-	-	122.5	47.7
2	-	-	1973.1	649.5	1255.6	742.0	388.1	139.6
3	-	-	-	-	755.6	485.0	488.8	526.3
4	642.1	402.9	-	-	-	-	-	-

5	-	-	-	152.0	47.5	54.1
6B	-	680.4	216.1	1457.9	1172.9	-
7F	958.7	834.2	561.0	160.1	1103.8	859.7
8	-	-	-	2095.0	1285.2	366.7
9N	4069.6	2589.7	-	1203.3	688.1	314.4
9V	1279.2	974.7	-	797.8	672.7	214.1
10A	658.9	559.5	-	1876.6	1397.1	-
11A	-	-	-	2524.9	2001.4	-
12F	692.0	537.5	-	1392.4	1043.8	-
14	659.2	519.4	-	1655.7	1136.0	-
15B	734.6	338.4	-	2147.0	1011.5	-
17F	-	519.5	326.8	463.4	952.0	-
18C	-	313.2	116.0	973.7	1299.2	-
19A	703.8	404.1	20.6	246.1	235.2	247.5
19F	926.1	274.2	30.3	214.7	208.5	216.0
20	596.2	469.1	-	2255.4	1571.4	-
22F	-	1089.1	316.7	2057.0	1833.4	334.6
23F	-	1263.4	421.7	1635.6	1154.2	-
33F	-	-	-	3602.7	2651.1	-

3 对比欧洲药典方法和 LC-MS/MS 方法用于氨基己糖含量测定

本节采用欧洲药典中肺炎多糖疫苗水解的方法，即 HCl 水解，水解 23 种肺炎多糖疫苗。水解产物分别用 LC-MS/MS 方法和欧洲药典测试，并汇总结果如表 3 所示。根据 5 型和 7F 型肺炎多糖疫苗结构（图 4），5 型中含有氨基岩藻糖，而非氨基己糖，因此在 LC-MS/MS 中无氨基己糖检出，但在欧洲药典方法中，5 型有明显的氨基己糖检出，说明欧洲药典方法无法区分氨基己糖和氨基岩藻糖，甚至可能无法区分其它含有氨基的化合物和氨基取代糖。根据 7F 型肺炎多糖结果，7F 中有氨基己糖结构单元，LC-MS/MS 亦从 7F 水解液中检测到氨基己糖，但欧洲药典方法无法实现 7F 中氨基己糖的准确测定。综上所述，LC-MS/MS 方法相对于欧洲药典方法具有更高的选择性和抗基质干扰能力，是 PPSV-23 质量评价方法的有利补充。

表 3 对比欧洲药典(EP)和 LC-MS/MS 法用于氨基己糖含量测定

类型	EP	LC-MS/MS	类型	EP	LC-MS/MS
1	-	-	12F	1111.5	692.0
2	-	-	14	699.0	659.2
3	-	-	15B	592.5	734.6
4	465.0	642.1	17F	-	-
5	606.0	-	18C	-	-
6B	-	-	19A	646.8	703.8

7F	-	958.7	19F	742.0	926.2
8	-	-	20	651.0	596.2
9N	1566.0	4069.6	22F	-	-
9V	432.0	1279.2	23F	-	-
10A	480.0	658.9	33F	-	-
11A	-	-			

-无检出。

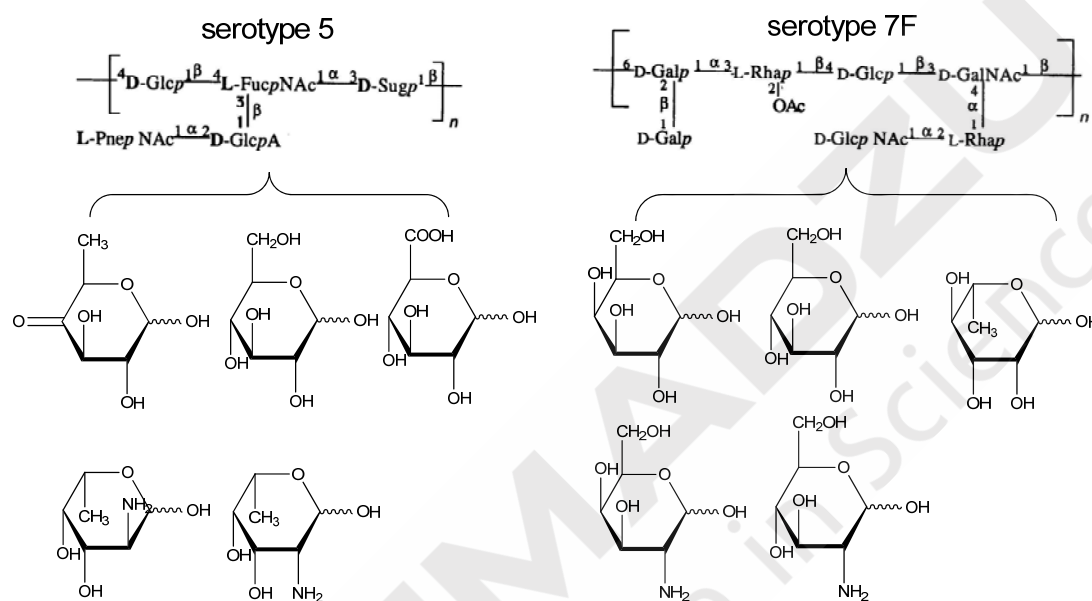


图4 5型和7F型肺炎多糖疫苗结构及可能的水解产物

4 疫苗水解液中其它糖单元的鉴定

除本文测定的4类糖单元以外, PPSV水解液中还有其它糖单元存在, 如图1中化合物E和F。本文用HPLC-IT-TOF从4,5和12F水解液中鉴定到这两种化合物。其中化合物E的分子离子峰为 $[M+H]=164.0996$, 分子式为 $C_6H_{13}NO_4$, 保留时间为4.48 min。化合物F的分子离子峰为 $[M-H]=192.0503$, 分子式为 $C_6H_{11}NO_6$, 保留时间为4.82 min。随着疫苗行业和化学合成行业的发展, 若化合物E和F的对照品商品化, 本文发展的LC-MS/MS方法也可用于肺炎疫苗水解液中化合物E和化合物F的含量测定。

5 结论

本文发展的LC-MS/MS方法可实现23种肺炎多糖疫苗水解液中4类糖单元的同时定量, 且具有灵敏度高(己糖酸LOD=0.98 $\mu\text{g/L}$)、重复性好(峰面积RSD%不超过1.669%)、定量准确度高(线性范围内精确度92.9%-104.2%)、回收率高(97.6%-99.3%)、线性范围宽、耗时短(6 min完成4种糖单元的同时测定)的特点。将该方法用于23种血清类型肺炎多糖疫苗中糖单元的含量测定, 并就氨基己糖的含量测定与欧洲药典对比。对比结果表明, 本文发展的LC-MS/MS方法无须衍生且极大地加快了检测速度和提升了检测通量、具有更好的抗基质干扰能力、更高的选择性、更高的准确度。

注: 本文方法已与合作的疫苗企业共同申请中国专利(ZL 2018 1 0057816.6)。

4.2 MALDI-TOF 快速鉴定病毒蛋白类疫苗亚基组成

摘要： 本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪（MALDI-TOF）检测疫苗蛋白组分，检测各亚基的分子量信息、分布与比例。结果显示标准品具有完整亚基组成，疫苗样品也具有较好的亚基完整性。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。本例表明此方法无需样品前处理、快速简便、可靠性强，可为疫苗亚基组成分析提供有力参考。

关键词： 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF） 疫苗 亚基

接种疫苗可以预防许多流行疾病的发生，是保护婴幼儿、年老体弱者免于病痛的重要手段。蛋白类疫苗是品种最多，接种率最高的疫苗品种，据 2016 年统计数据显示，病毒和蛋白类疫苗占全球疫苗销量 48.9%。亚基是病毒和蛋白类疫苗的微小结构单元，这些亚基按照一定的比例与构象结合形成完整的蛋白，蛋白与核酸结合形成病毒，成为具有免疫活性的疫苗成分（图 1）。因此，疫苗蛋白质各亚基的组分完整性与含量是衡量疫苗免疫能力的重要指标。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）是一种软电离方式，适合蛋白质等大分子的离子化，且具有分析质量范围宽、数据精确、通量高、速度快的优势，可以填补 LCMS/MS 的空白，对疫苗内生物活性大分子成分进行精确地定性分析。

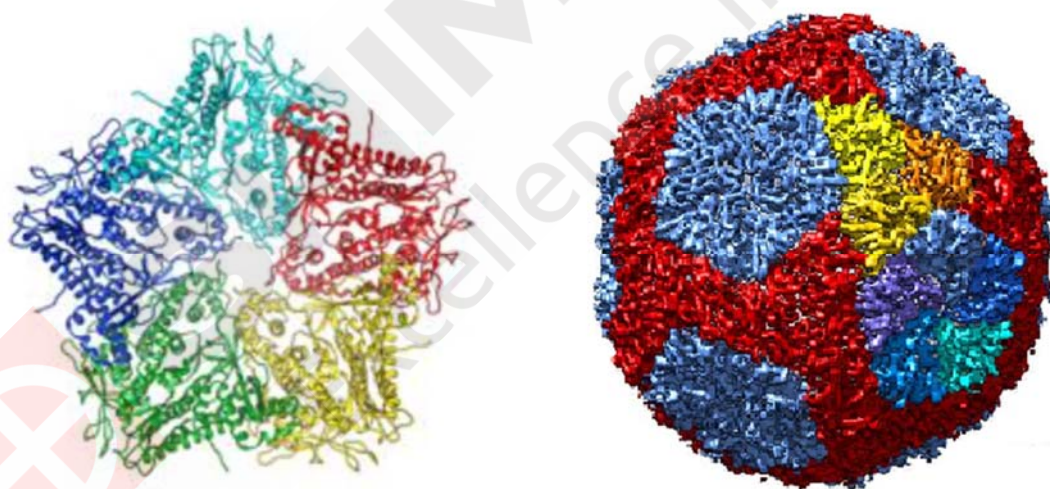


图 1 亚基、蛋白与病毒

以某病毒为例，不同颜色代表的各亚基以一定比例与构象结合形成蛋白质（左）；蛋白质排列并结合核酸最终形成完整病毒（右）。图片来自网络。

本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪分析疫苗亚基组成，检测到了疫苗品中各亚基的存在和分布比例信息，展示了 MALDI-TOF 在疫苗快速检测方面的巨大潜力。

1 方法学参数

利用MALDI-TOF对蛋白疫苗进行组分鉴定。取样品与基质预混后点靶，自然干燥后将靶板放入质谱进行分析。使用355 nm激光器，能量值设定为100-120之间，分子量鉴定范围设定在2000 Da至60000 Da之间，检测目标区域蛋白峰的数量、分子量与信号峰强度。此条件下蛋白峰的分离度较好，结果稳定，重复性高，获得了蛋白疫苗亚基组成质谱图。

2 实际样品测试

2.1 疫苗标准品测试

疫苗质谱检测结果如图2-4所示，显示检测到了标准品中所有亚基，其中A与B亚基的信号峰强度接近2:1，C与D亚基的信号峰强度接近1:1。检测到的分子量精确，与理论相符，质谱图信噪比良好。

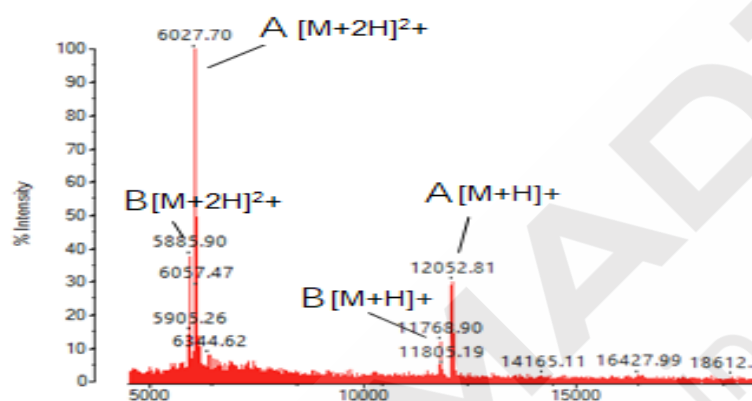


图 2 MALDI-TOF 检测标准品 A, B 亚基的一级质谱图

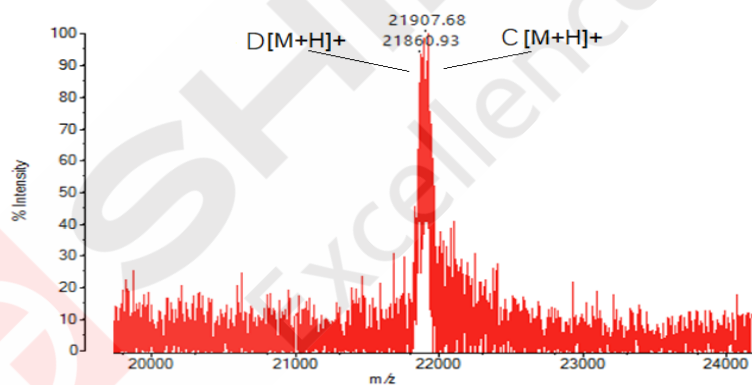


图 3 MALDI-TOF 检测标准品 C, D 亚基的一级质谱图

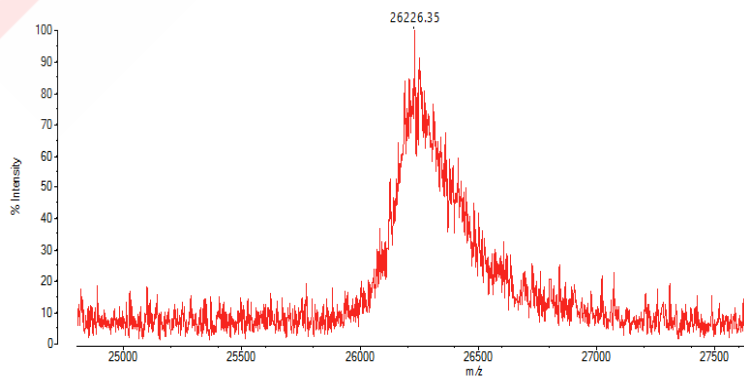


图 4 MALDI-TOF 检测标准品 E 亚基的一级质谱图

2.2 疫苗样品测试

将优化所得的 MALDI-TOF 方法用于疫苗样品亚基的测定（典型谱图如图 5-7），结果显示疫苗样品具有较好的亚基完整性。各亚基全部检测到，其中 A 与 B 亚基的信号峰强度接近 2:1，C 与 D 亚基的信号峰强度接近 1:1。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。

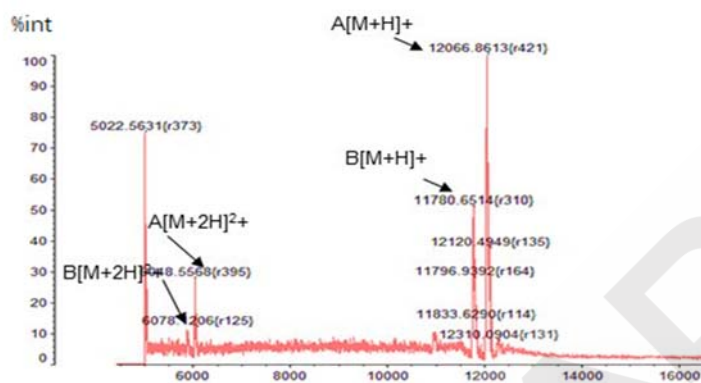


图 5 MALDI-TOF 检测样品 A, B 亚基的一级质谱图

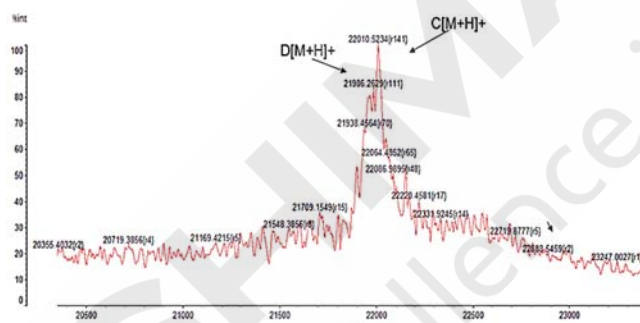


图 6 MALDI-TOF 检测样品 C, D 亚基的一级质谱图

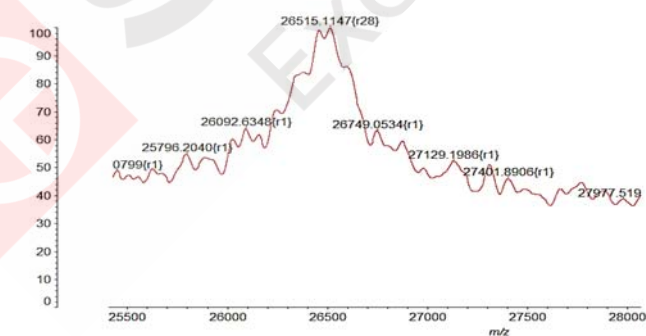


图 7 MALDI-TOF 检测样品 E 亚基的一级质谱图

检测结果表明，利用 MALDI-TOF 检测到了该疫苗的所有亚基，得到了样品单电荷离子、二电荷离子的分子量信息，结果与理论一致。

3 结论

本文发展的基于 MALDI-TOF 对疫苗各亚基快速检测方法可实现蛋白类疫苗各亚基的同步检测，且具有操作简便、灵敏度高、重复性好、准确率高、耗时短的特点，是疫苗、蛋白药快速鉴定强有力的分析手段。



4.3 ICP-OES 和 ICP-MS 测定疫苗铝佐剂中铝的含量

摘要：铝佐剂是应用广泛的一种疫苗佐剂，铝佐剂在使用中会存在一定的健康风险，《中国药典》（2015 版第三部）中规定了疫苗铝佐剂中铝含量限值范围。利用硝酸溶解试样、电感耦合等离子体发射光谱仪（ICP-OES）和电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）测定了吸附破伤风和吸附百白破联合疫苗铝佐剂中铝的含量。分析结果表明，在 0~10 mg/L 范围，线性相关系数为 0.9999，方法检出限为 0.90 mg/L（ICP-OES）和 0.17 mg/L（ICP-MS），加标回收率 107~116%之间，该方法可适用于疫苗铝佐剂中铝含量的快速测定。

关键词：ICP-OES ICP-MS 疫苗 铝佐剂 铝

铝佐剂作为疫苗广泛使用的疫苗佐剂，能够起到增加弱抗原免疫原性，提高免疫反应的速度，增加持久性，调节抗体亲和力、特异性及亚单位分布等重要作用。铝佐剂主要包括氢氧化铝和磷酸铝，氢氧化铝成本低、使用方便，是生物制品生产中应用最广的一种佐剂。由于铝佐剂在使用中会存在一定的健康风险，《中国药典》中要求对铝佐剂疫苗需进行铝含量测定，规定铝含量满足一定的限值要求，如吸附破伤风疫苗要求氢氧化铝含量不高于 3.0 mg/mL（中国药典 2015 版第三部 P89），吸附无细胞百白破联合疫苗氢氧化铝含量为 1.0~1.5 mg/mL（中国药典 2015 版第三部 P102）。《中国药典》中疫苗铝含量按照通则 3106（中国药典 2015 版第四部 P227）进行检测，使用过量 EDTA-2Na 与铝离子反应，再用锌滴定液滴定剩余 EDTA-2Na 来计算铝含量。通则 3106 测定过程较繁琐、效率低，本文采用硝酸溶解试样、电感耦合等离子体发射光谱仪（ICP-OES）和电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）分析疫苗铝佐剂中铝含量，方法简便快捷，可用于疫苗铝佐剂中铝含量快速检测。

一、ICP-OES 测定疫苗铝佐剂中铝的含量

1 方法学参数

疫苗中铝佐剂主要以胶体形式存在，使用酸溶解、稀释后直接仪器分析，ICP-OES 仪器分析条件见表 1。以方法空白溶液连续测定 7 次计算方法检出限，按照取样量 100 μ L 定容到 10 mL 计算，得到方法的检出限（MDL）为 0.90 mg/L。用 2%硝酸将标准溶液稀释为 0、1、2、5、10 mg/L 的标准序列，ICP-OES 标准曲线线性和谱峰轮廓图见图 1、图 2。

表 1 ICP-OES 分析条件

仪 器 参 数	设定值	仪 器 参 数	设定值
高 频 功 率	1.20 kW	等 离 子 体 气 流 速	10.0 L/min
辅 助 气 流 速	0.60 L/min	载 气 流 速	0.70 L/min
炬 管 类 型	微型炬管	雾 化 器 类 型	同轴
雾 化 室	旋流	高 频 频 率	27.12 MHz

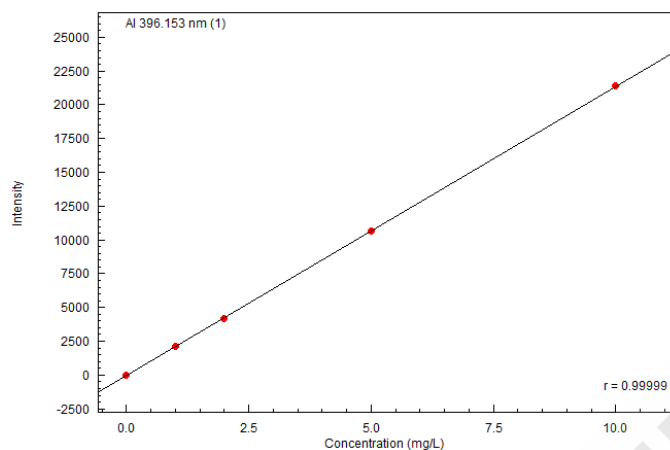


图 1 ICP-OES 铝标准曲线线性图

Al 396.153 Best
条件1

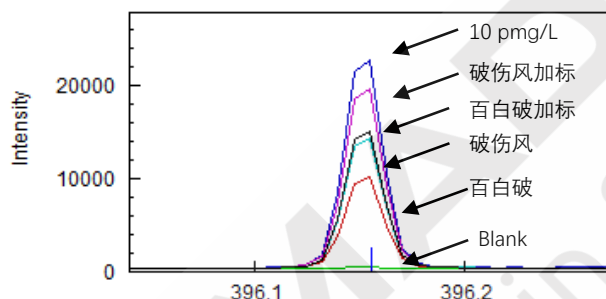


图 2 ICP-OES 铝谱峰轮廓图

2 实际样品测试

分别取两份市售吸附破伤风疫苗和吸附无细胞百白破联合疫苗，酸溶解、定容后 ICP-OES 测定，测定结果见表 2，相对标准偏差 (RSD) 为 1.64%~1.86%，两批次吸附破伤风和吸附无细胞百白破疫苗中氢氧化铝含量检测结果满足中国药典限值要求。加标回收试验结果见表 3，回收率为 113~116%，回收率良好。

表 2 疫苗铝佐剂测定结果 (ICP-OES)

样品	测定值 Al(mg/L)	样品结果 Al(OH) ₃ (mg/mL)	平均值 (mg/mL)	RSD (%)	药典氢氧化铝限值范围 (mg/mL)
吸附破伤风 疫苗	6.28	1.83	1.86	1.64	≤3.0
	6.49	1.89			
吸附无细胞 百白破疫苗	4.37	1.27	1.25	1.86	1.0~1.5
	4.21	1.23			

表 3 样品加标测试结果 (ICP-OES)

样品	样品测试结果 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标测试结果 (mg/L)	回收率 (%)
吸附破伤风疫苗	6.39	2.0	8.65	113

二、ICP-MS 测定疫苗铝佐剂中铝的含量

1 方法学参数

试样使用酸溶解、稀释后直接仪器分析，ICP-MS 仪器分析条件见表 4。以方法空白溶液连续测定 7 次计算方法检出限，按照取样量 100 μL 定容到 10 mL 计算，得到方法的检出限 (MDL) 分为 0.17 mg/L。用 2%硝酸将标准溶液稀释为 0、1、2、5、10 mg/L 的标准序列，以钪 (Sc) 为内标依次测定标准序列及样品，ICP-MS 标准曲线线性和谱峰轮廓图见图 3、图 4。

表 4 ICP-MS 分析条件

参 数	参数设定	参 数	参数设定
高 频 功 率	1.20 kW	等 离 子 体 气 流 速	8.0 L/min
辅 助 气 流 速	1.10 L/min	载 气 流 速	0.70 L/min
炬 管 类 型	Mini炬管	雾 化 器 类 型	同轴
雾 化 室	旋流	雾 化 室 温 度	5 $^{\circ}\text{C}$
采 样 深 :	5.0 mm	高 频 频 率	27.12 MHz

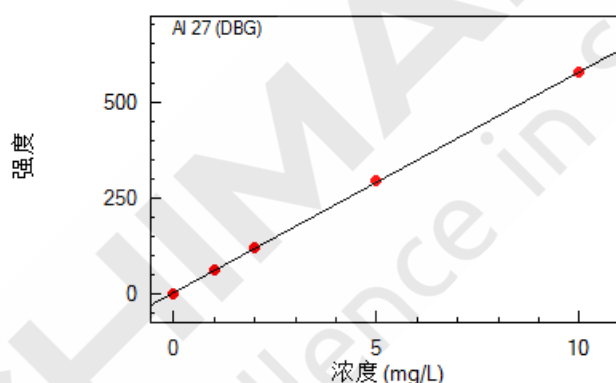


图 3 ICP-MS 铝标准曲线线性图

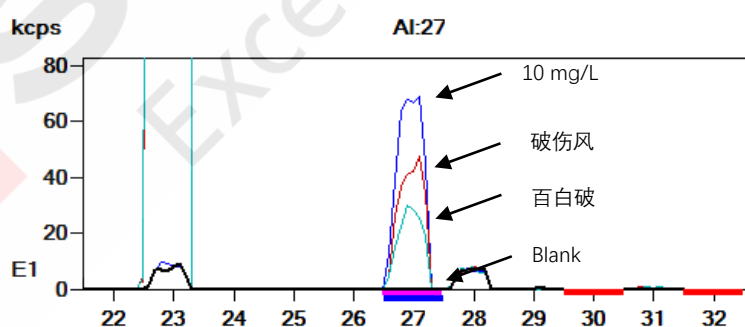


图 4 ICP-MS 铝谱峰轮廓图

2 实际样品测试

分别取两份市售吸附破伤风疫苗和吸附无细胞百白破联合疫苗，酸溶解、定容后 ICP-MS 测定，测定结果见表 5 **错误!未找到引用源。**，相对标准偏差 (RSD) 为 1.10%~1.83%，两批次吸附破伤风和吸附无细胞百白破疫苗中氢氧化铝含量检测结果满足中国药典限值要求。加标回收试验结果见表 6，回收率为 107~116%，回收率良好。

表 5 疫苗铝佐剂测定结果 (ICP-MS)

样品	测定值 Al(mg/L)	样品结果 Al(OH) ₃ (mg/mL)	平均值 (mg/mL)	RSD (%)	药典氢氧化铝限值范围 (mg/mL)
吸附破伤风 疫苗	6.44 6.30	1.88 1.84	1.86	1.10	≤3.0
吸附无细胞 百白破疫苗	4.29 4.45	1.25 1.30	1.27	1.83	1.0~1.5

表 6 样品加标测试结果 (ICP-MS)

样品	样品测试结果 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标测试结果 (mg/L)	回收率 (%)
吸附破伤风疫苗	6.37	2.0	8.50	107
吸附无细胞百白破疫苗	4.37	2.0	6.68	116

三、结论

使用岛津公司 ICPE-9820 全谱直读型电感耦合等离子体发射光谱仪和 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪测定了疫苗铝佐剂中铝元素含量。该方法具有灵敏度高、精密度好、分析速度快、操作简单等特点,可满足疫苗中铝佐剂铝含量检测需求。

5 疫苗其它物质检测

5.1 LC-MS/MS 技术用于疫苗灭活剂去氧胆酸钠和沉淀剂十六烷基三甲基溴化铵残留的同时检测

摘要：本文发展了一种 LC-MS/MS 肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）的快速定量方法。相对于传统方法，本方法具有更好的抗基质干扰能力、更高的选择性和灵敏度。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%）、较好的回收率（90%-103%）和较高的检测灵敏度。此外，本文还系统考察了 CTAB 在液相系统的残留和排除方法。

关键词：LC-MS/MS 肺炎多糖疫苗 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB） 去氧胆酸钠

23 价肺炎多糖疫苗是 23 种血清类型肺炎多糖疫苗的混合物，被称为疫苗史上的路标性疫苗。23 种血清类型包括 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17A、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。自 20 世纪 80 年代研发以后，被广泛用于 2-60 岁人群的免疫。在过去的 40 年间，23 价肺炎多糖疫苗挽救和延长了大量生命。据统计，55 岁以下人群注射 23 价肺炎多糖疫苗，可获得 5 年甚至更长的免疫，降低 85% 的肺炎感染率。由于适用人群较广、效果较好、且肺炎为全球高发生率疾病，23 价肺炎多糖疫苗至今仍是全球排名前十的高销量疫苗品种之一。

23 价肺炎多糖疫苗从收获到最终产品，一般经历以下几个环节：1. 终止液体培养（去氧胆酸钠杀菌）；2. 连续流离心，收集上清液（加入十六烷基三甲基溴化铵，CTAB）；3. 连续流离心，收集沉淀的复合多糖；4. 复合多糖解聚（加入 CaCl_2 或 NaCl ）；5. 加冷乙醇至 25%，去除沉淀的核酸、杂质；6. 收获离心上清液，补加冷乙醇至 70%-80%，沉淀收获粗多糖；7. 收获离心沉淀的粗多糖（加入醋酸钠溶液溶解）；8. 加 2 倍体积的预冷苯酚溶液，抽提去除蛋白；9. 吸取多糖-醋酸钠溶液相，重复苯酚抽提 2-4 次；10. 于最后一次多糖-醋酸钠溶液相中加冷乙醇至 70%-80%；11. 离心收集沉淀，注射用水溶解；12. 膜除菌过滤，精制多糖原液；13. -20°C 以下冷冻保存。去氧胆酸钠和 CTAB 均为弱紫外（无紫外）吸收且具有一定毒性的化合物。未经衍生的这类化合物难以用 UV/Vis 检测和定量。欧洲药典采用衍生-UV/Vis 方法检测疫苗中去氧胆酸钠含量，CTAB 检测方法缺乏。疫苗基质复杂，UV/Vis 检测方法受基质干扰较大，灵敏度和重复性受到极大的限制。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。LC-MS/MS 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。

本文建立了一种 LC-MS/MS 方法，采用液相分离、MRM 模式检测，实现 23 中血清类

型肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 的同时、准确、快速定量, 为该类疫苗的质量控制提供新思路、新方法。

1 方法学参数

取各浓度对照品溶液进行测定 (如图 1)。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 2。各组线性回归方程及相关系数见表 1。结果表明各组分在考察浓度范围内线性关系良好, R^2 大于 0.999, 各标准点准确度在 95-106%之间。

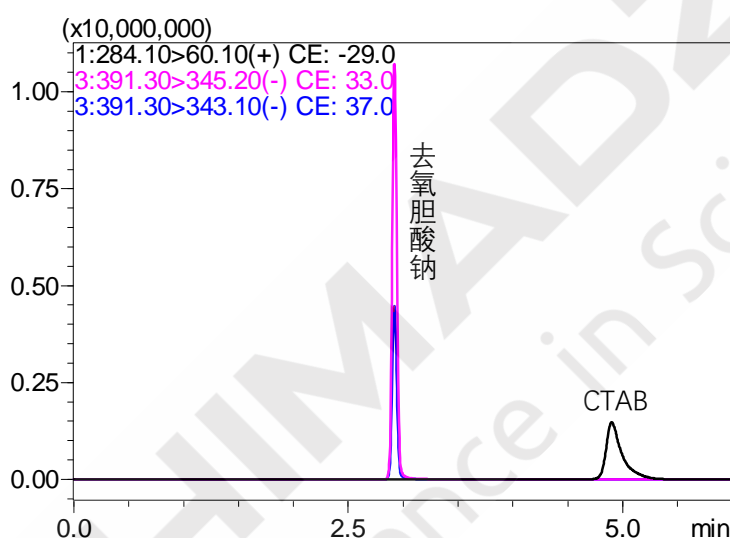


图 1. 去氧胆酸钠和 CTAB 色谱图

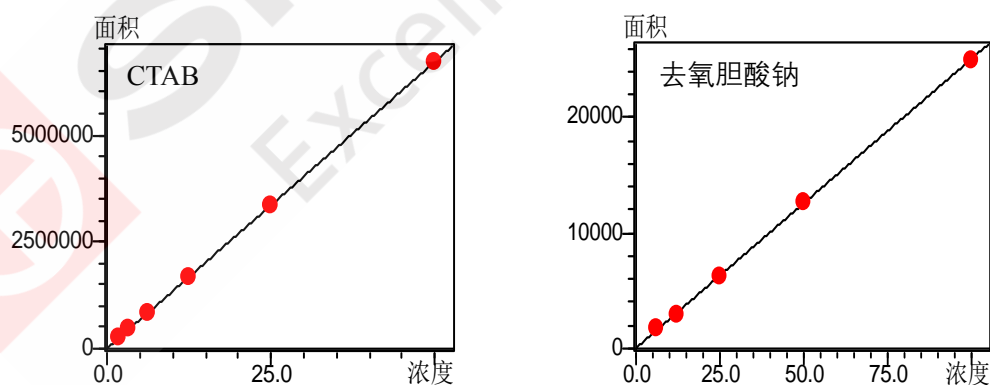


图 2 CTAB 和去氧胆酸钠工作曲线

表 1 各组分工作曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	线性方程	R^2	精准度 (%)
1	CTAB	1.56-50	$A=133056 C-29015$	0.9999	97.4-101.9
2	去氧胆酸钠	6.25-99	$A=250.5 C-59.1$	0.9997	95.4-105.6

取去氧胆酸钠和 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%) 如表 2 所示。分析结果表明，去氧胆酸钠保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.24%和 0.19%，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。

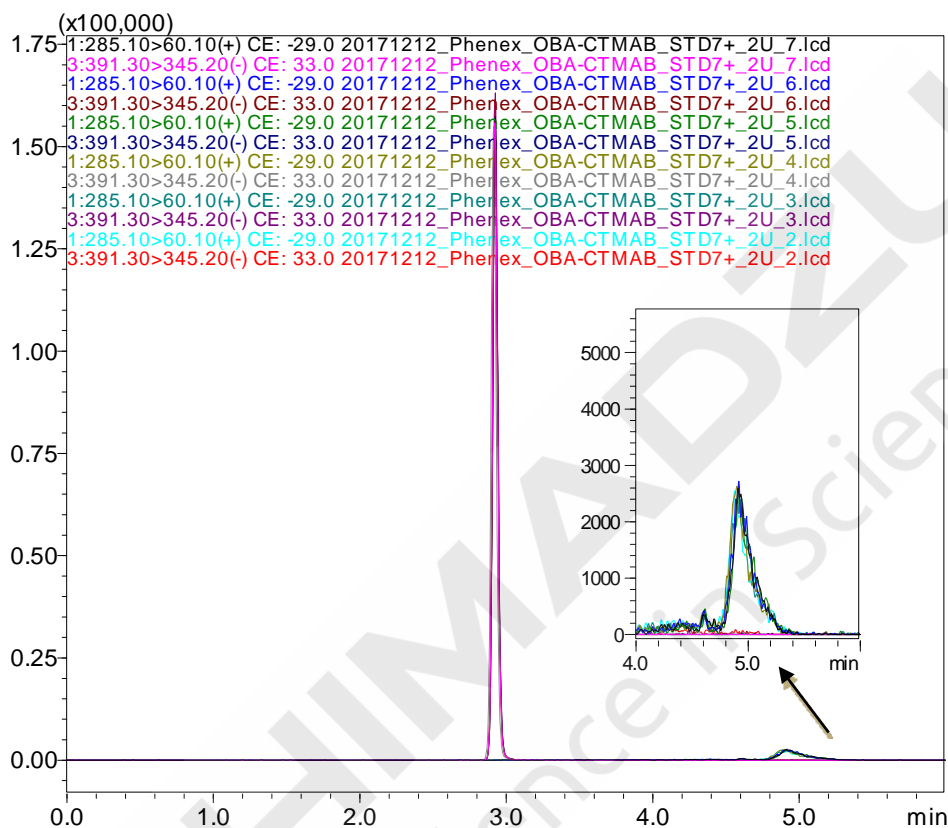


图 3 去氧胆酸钠和 CTAB 对照品重复分析图 (n=6)

2 实际样品测试

将本方法用于 23 种血清类型肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 的残留测定 (典型色谱图如图 4 和图 5)，所得结果如表 3 所示。其中，4、9N、9V 和 15B 型疫苗无明显 CTAB 检出，其余均有不同浓度检出。3 型中 CTAB 的含量高达 13.1 mg/L，需要生产企业确定该含量用于 23 价肺炎多糖疫苗制备以及肺炎多糖疫苗的静脉注射是否存在风险。以 UV/Vis 方法测试 23 种血清类型肺炎多糖疫苗，均含有较高浓度去氧胆酸钠，部分浓度超过 20 mg/L，但 MS 检测结果显示 23 种血清类型肺炎多糖疫苗中，去氧胆酸钠含量均较低。可能的原因如下：第一，去氧胆酸钠在纯化过程中被去除 (与 CTAB 结合、乙醇萃取去除等)；第二，UV/Vis 方法存在较大干扰，测试结果准确度较低。

选择具有代表性的 6 种血清类型肺炎多糖疫苗 (酸性、两性、中性) 考察 CTAB 和去氧胆酸钠回收率，测试结果均在 90-103%之间，表面该方法存在较好的抗干扰能力和选择性。

表 2. 23 种血清类型肺炎疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 含量测定及回收率测定

血清类型	CTAB (μg/L)	去氧胆酸钠 (μg/L)	回收率%	血清类型	CTAB (μg/L)	去氧胆酸钠 (μg/L)	回收率%
1	120.02 ^a	背景较高	103.0	12F	56.90	-	/
2	51.77	背景较高	/	14	243.14 ^b	-	/
3	13105.60 ^b	23.54	91.8	15B	-	-	/
4	-	-	95.6	17F	53.56	-	/
5	788.16	-	92.7	18C	3.91	-	/
6B	6.18	-	96.3	19A	430.96 ^b	29.3	98.2
7F	16.16	-	/	19F	3.11	-	/
8	3.76	-	/	20	199.72 ^b	-	/
9N	-	-	/	22F	61.81	16.94	/
9V	-	19.02	/	23F	32.93	13.37	/
10A	9.87	-	/	33F	25.03	-	/
11A	63.91	-	/				

-: 未检出; /: 未测试

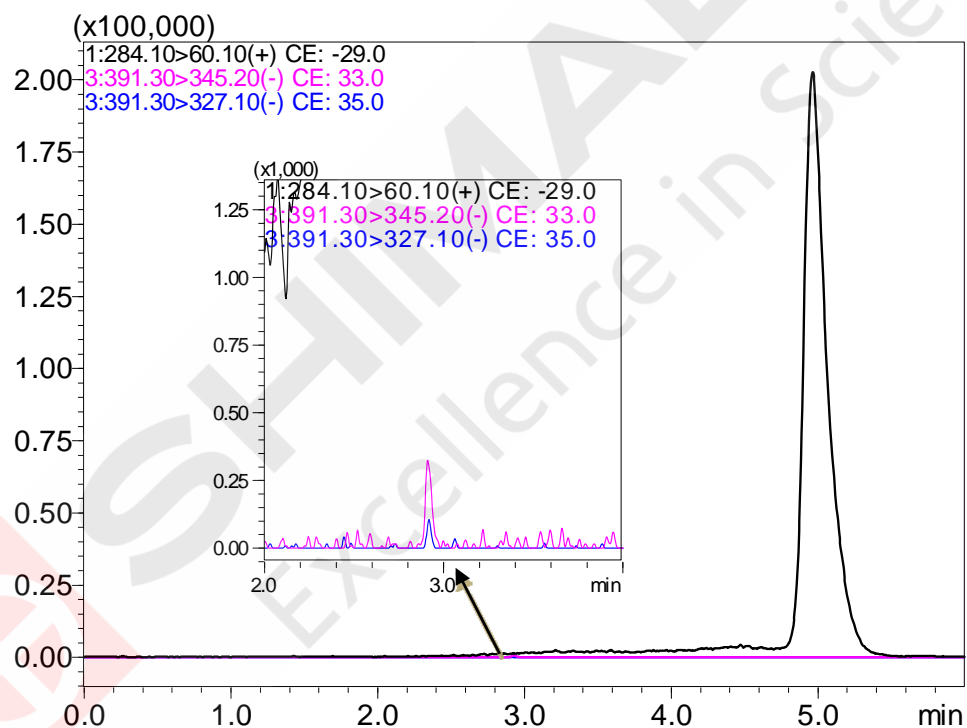


图 4 23F 型肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 的检测

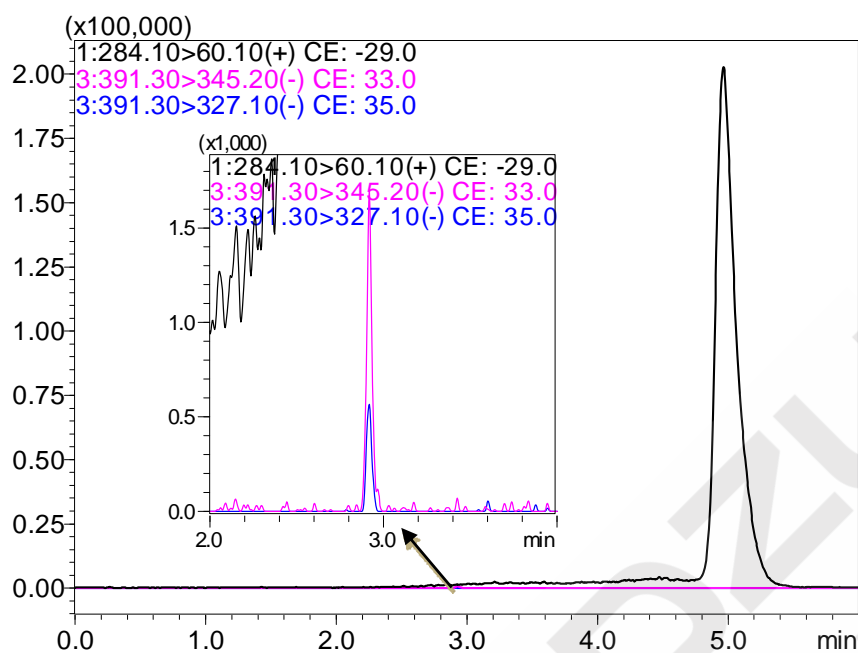


图 5 19A 型肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 的检测

针对表面活性剂在进样系统的残留问题（本文涉及的表面活性剂为 CTAB），可采用岛津自动进样器清洗口+清洗泵的洗针方式，以甲醇：乙腈：异丙醇：水=1:1:1:1, v/v/v/v（含 1%FA）为 R3（清洗泵溶液），10%甲醇水为 R0，进样针外壁清洗方式清洗，清洗时间为 3 s。

3 结论

本文建立了一种快速、高选择性和高灵敏度的 LC-MS/MS 检测方法，用于 23 种血清类型肺炎多糖疫苗中去氧胆酸钠和 CTAB 的同时检测。与 UV/Vis 相比，该方法无须衍生且具有更高的选择性和抗干扰能力。

5.2 Aggregates Sizer 在疫苗聚集体评价系统中的应用

摘要： 本文通过岛津 Aggregates Sizer 生物药物聚集体分析仪测定了疫苗聚集体的粒径和浓度分布，探索了温度、外界压力等对疫苗聚集体产生的影响。结果表明，外界压力和温度都会对聚集体的粒径和浓度产生影响。Aggregates Sizer 生物药物聚集体分析仪可以对疫苗的生产工艺进行监控，评价疫苗药效和安全性能。

关键词： 疫苗 聚集体 Aggregates Sizer

聚集体是多个单体聚合后的物质。与低分子医药相比，生物医药具有抗压能力弱、容易聚合等弱点。有研究表明，生物药品因压力、温度等发生聚合后，会导致药效下降甚至药效消失，严重时还可能会产生副作用。因此，生物药物生产领域研究外界因素（运输、保存等）对其稳定性的影响是非常重要的。

疫苗是生物药品的一种，对其聚集体粒径和浓度的评价是非常重要的。疫苗聚集体的粒径范围通常在 0.2~10 μm 之间，该区域被称作亚可见区域（Sub Visible Particle, SVP）。传统蛋白聚集体评价方法中存在“无法一次性完成 SVP 区域测定”、“无法边施压边测定”、“无法回收已测样品”和“无法完成定量”等问题，为解决上述问题，岛津公司研发了生物医药聚集体分析仪 Aggregates Sizer。

岛津公司聚集体分析仪 Aggregates Sizer 不但可以检测 7 nm 到 800 μm 粒子的粒径范围，而且还能定量分析 40 nm 到 20 μm 范围内生物制药聚集体的浓度，并可监测聚集体的形成过程。

本文利用岛津-Aggregates Sizer 生物药物聚集体分析仪测定了疫苗在不同温度和压力下聚集体粒径和浓度的变化，从而确定温度和压力对疫苗聚集体的影响。

1 实验部分

1.1 样品

市售疫苗

1.2 仪器

岛津公司 SALD-7500nano_Aggregates Sizer，批式池



图 1 生物药品聚集体分析系统（Aggregates Sizer）



图 2 批式池

1.3 测定方法

取市售疫苗一瓶（约 0.5 mL），用纯水定容至 50 mL，取适量样品置于批式池中，改变搅拌时间及温度检测聚集体粒径及浓度变化。

2、结果与讨论

2.1 搅拌对疫苗聚集体粒径分布的影响

测定了市售疫苗搅拌和不搅拌条件下聚集体的变化，搅拌 1 小时后，粒径变小，如图 3 所示，D90 由 32.0 μm 减小至 24.4 μm ，其分布范围也变窄。结果表明，搅拌过程即运输过程会对疫苗聚集体聚合反应产生影响，导致聚集体粒径变小，分布变窄。

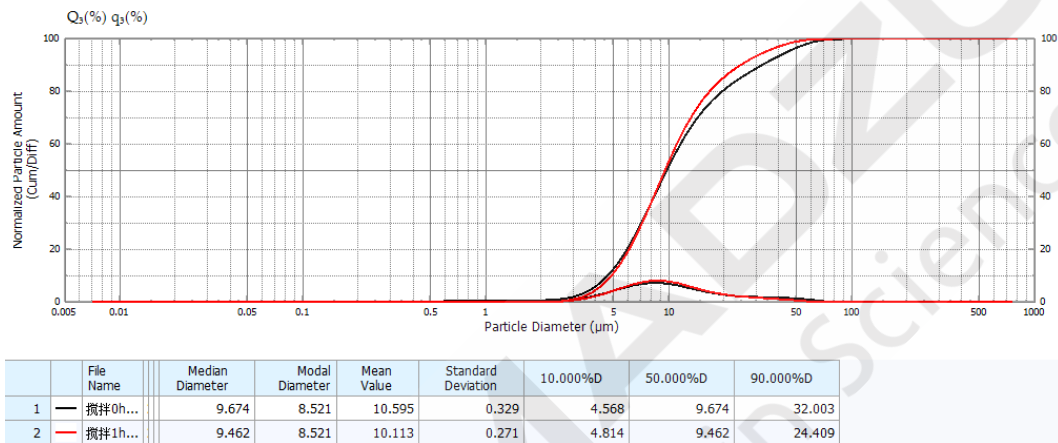


图 3 不同搅拌时间疫苗聚集体的粒径分布

2.2 搅拌对疫苗聚集体浓度分布的影响

检测了市售疫苗在搅拌和不搅拌情况下聚集体浓度的变化，搅拌 1 小时后，亚可见区域（0.1 μm ~10 μm ）聚集体浓度减少，从 32.3 $\mu\text{g/mL}$ 减少至 28.1 $\mu\text{g/mL}$ ，如图 4 所示。综上，搅拌过程即运输过程会对疫苗聚集体浓度产生影响，导致聚集体浓度降低。

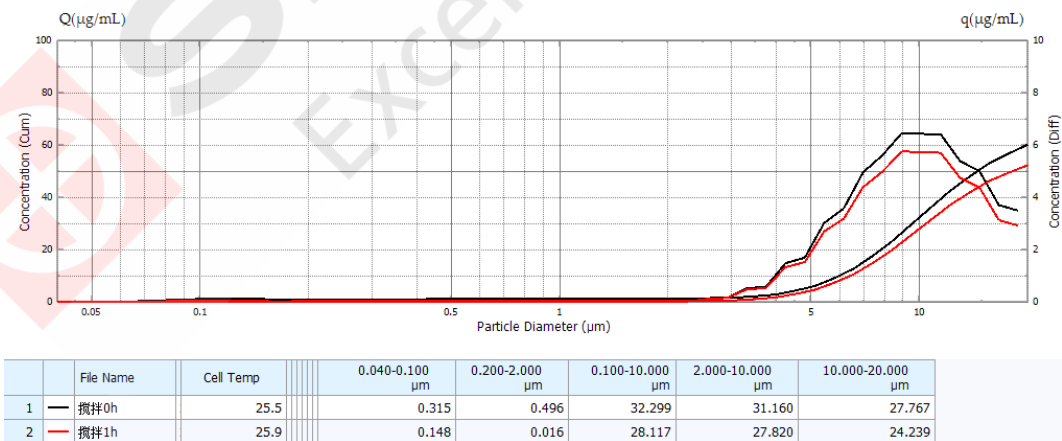


图 4 不同搅拌时间疫苗聚集体的浓度变化

2.3 温度对疫苗聚集体粒径分布的影响

检测了不同温度下聚集体粒径的变化，温度从室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 升高至 35 $^{\circ}\text{C}$ 时，聚集体粒径向小粒径方向移动，如图 5 所示，D90 由 32.0 μm 减小至 20.3 μm ，粒径范围变窄；将样品-20 $^{\circ}\text{C}$

冷冻保存再恢复至室温后检测，发现粒径分布变宽，D90 增大至 35.9 μm 。综上所述，温度也会对疫苗聚集体的粒径分布产生影响，导致粒径变小，分布范围变窄；样品经过-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存后，粒径范围变宽。

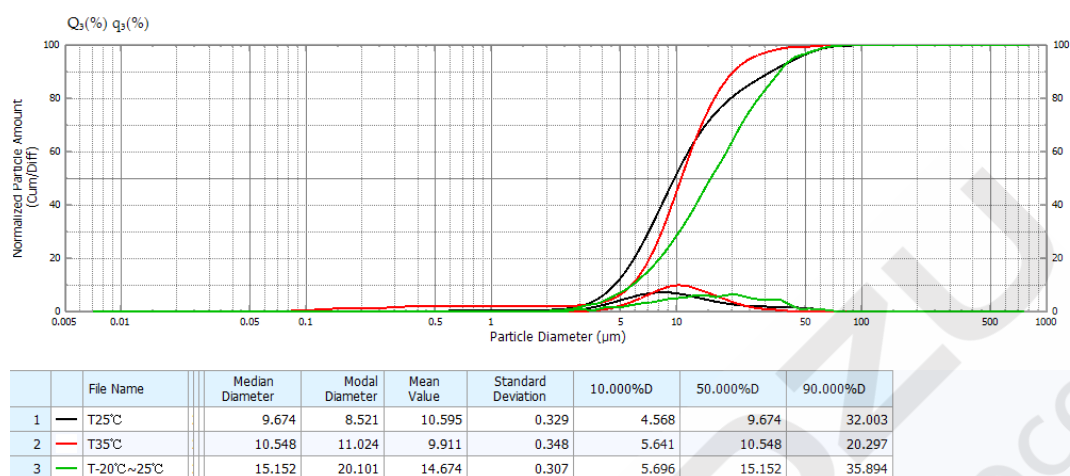


图5 不同温度下疫苗聚集体的粒径分布

2.4 温度对疫苗聚集体浓度分布的影响

如图6所示，温度从25 $^{\circ}\text{C}$ 升高至35 $^{\circ}\text{C}$ 时，聚集体浓度减少，亚可见区域（0.1 μm ~10 μm ）聚集体浓度由43.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 减少至23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将样品-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存再放回至室温后检测，发现聚集体浓度同样减少，亚可见区域（0.1 μm ~10 μm ）聚集体浓度为22.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。综上所述，温度会对疫苗聚集体的浓度分布产生影响，温度升高，粒径变小，分布范围变窄；样品经过-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻之后，聚集体浓度减少，但分布范围变宽。

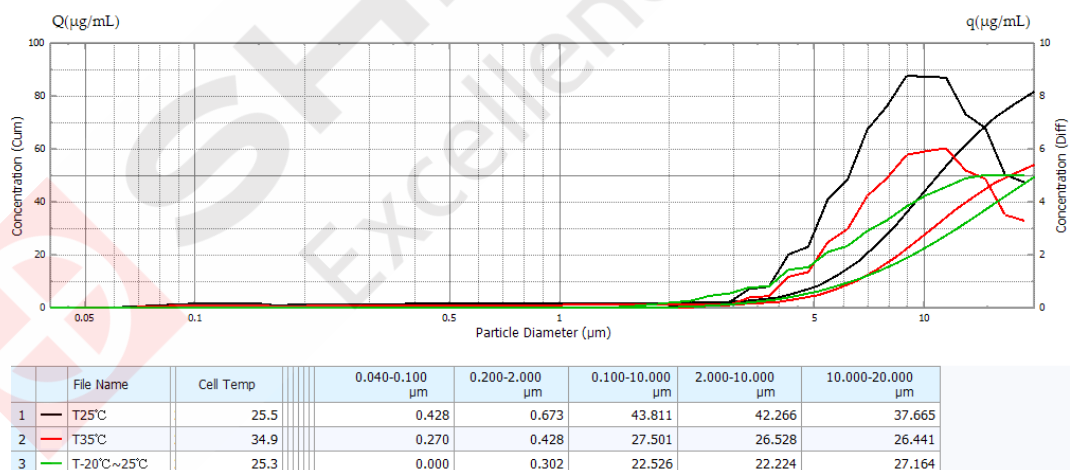
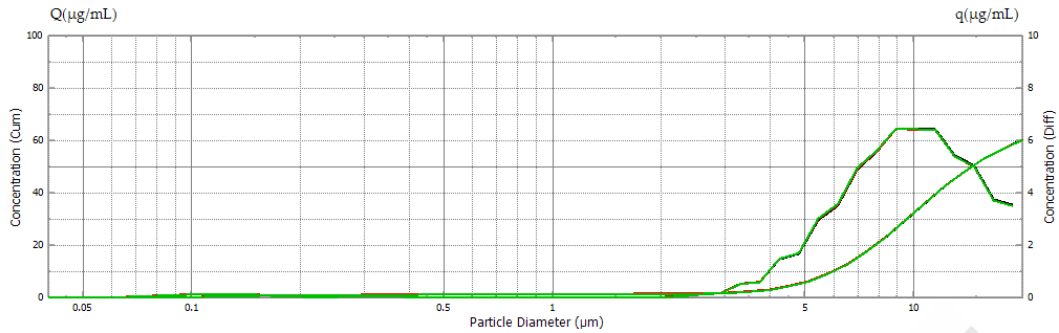


图6 不同温度下疫苗聚集体的浓度变化

2.5 仪器精密度实验

取适量样品置于批式池中，在无搅拌条件下，重复测定3次，考察仪器的精密度，如图7所示，在亚可见区域聚集体浓度3次测定的RSD值小于1%。



	File Name	0.040-0.100 µm	0.200-2.000 µm	0.100-10.000 µm	2.000-10.000 µm	10.000-20.000 µm
1	疫苗-1	0.342	0.586	32.181	30.902	28.005
2	疫苗-2	0.344	0.581	32.355	31.073	27.742
3	疫苗-4	0.315	0.496	32.299	31.160	27.767

图7 疫苗聚集体的浓度结果 (n=3)

3.结论

使用岛津 Aggregates Sizer 生物药物聚集体分析仪测定了疫苗聚集体的粒径和浓度分布，并探讨了搅拌过程和温度对疫苗聚集体聚合反应的影响。通过实验发现，外界压力和温度都会对疫苗聚合体的粒度和浓度产生影响，搅拌以及升高温度，聚合体的粒径变小，分布变窄，且浓度减少。样品经过冷冻后，聚集体粒径变大，范围变宽，浓度减少。该聚集体分析系统操作简单、快速，重复性良好，仪器适应于疫苗聚集体的粒径和浓度分析，可以从聚集体的粒径和浓度方面对疫苗药效、安全性能等进行评价。

小结及展望

优质疫苗的生产要求从生产管理到菌种发酵、从有效物质纯化到有害物质监控层层把关、严格控制。本文集从数据完整性、疫苗生产工艺优化与调控、疫苗有效物质检测和其它物质检测几个方面为疫苗行业的发展提供建议。

数据完整性章节讲述了数据安全性、审计追踪和数据备份与恢复。数据安全性讲解了用户账号管理原则、权限设置原则和密码设置原则等关注度最高的问题。审计追踪讲述了仪器类、数据类、人员类及设置类审计追踪管理中高频关注问题。备份与恢复章节，用图文展示了多种备份方式，满足不同客户的实际工作需求。

疫苗生产工艺优化与调控章节，以细胞培养上清液组成成分为例，讲解如何应用 LC-MS/MS 技术监控细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类化合物等 95 种营养物质在疫苗发酵过程中的变化，检测结果可为疫苗产品质量差异、工艺优化等提供参考。

疫苗质量评价章节中，以全球免疫接种最多的两类疫苗（多糖疫苗和病毒蛋白类疫苗）为例，讲解了现代化分析技术在疫苗质量评价中的作用。LC-MS/MS 技术用于全球销量前十的肺炎多糖疫苗糖单元的含量测定，并与欧洲药典方法对比，该方法具有通量高、快速、准确度高、抗基质干扰能力强等特点。MALDI-TOF 技术用于病毒蛋白类疫苗亚基测试，具有无需酶解、不受分子量限制、可用于蛋白分子量的直接测试等优点。铝佐剂是多种疫苗的重要组成部分，铝佐剂的含量与疫苗的有效性和不良反应息息相关，本章节为铝佐剂的含量测定提供了 ICP-OES 和 ICP-MS 两种解决方案，供不同实验条件疫苗工作者参考。

疫苗中其它物质检测单元章节，同样以多糖类疫苗和病毒蛋白类疫苗为研究对象。LC-MS/MS 技术为多糖疫苗的灭活剂去氧胆酸钠和沉淀剂十六烷基三甲基溴化铵的残留检测提供解决方案。该方法弥补了十六烷基三甲基溴化铵检测方法缺失的现状，与去氧胆酸钠的传统方法（紫外分光光度计方法）相比，具有选择性高、抗干扰能力强的特点。疫苗聚集体变大，不仅会影响药物效果，还可能会产生副作用。本章节用 Aggregates Sizer 生物药物聚集体分析仪测定了疫苗聚集体的粒径和浓度分布，并探讨了搅拌过程和温度对疫苗聚集体聚合反应的影响。

岛津一直关注人类与地球的健康，疫苗行业的解决方案也在持续更新中。如果您希望了解更多疫苗行业解决方案，或希望发展新型疫苗质量评价技术，请与岛津联系。



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号华鑫天地二期C801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

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦I座41层4116室
 邮政编码：430022
 电话：(027) 8555-7910
 传真：(027) 8555-7920

广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼
 邮政编码：510010
 电话：(020) 8710-8603
 传真：(020) 8710-8698

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