



疫苗研发与工艺质量控制

赛默飞色谱与质谱解决方案

ThermoFisher
SCIENTIFIC

赛默飞疫苗研发与工艺质量控制

目录

疫苗简介	3
疫苗开发流程	4
疫苗研发	5
疫苗工艺及质量控制解决方案	7
• 裂解剂	7
• 冻干保护剂	8
• 灭活剂	9
• 培养基	10
• 梯度离心	10
• 佐剂检测	11
• 防腐剂	13
• 多糖疫苗与多糖结合疫苗	14
参考文献	18

疫苗简介

疫苗是指用各类病原微生物制作的用于预防接种的生物制品。疫苗是将病原微生物（如细菌、立克次氏体、病毒等）及其代谢产物，经过人工减毒、灭活或利用转基因等方法制成的用于预防传染病的自动免疫制剂。疫苗保留了病原菌刺激动物体免疫系统的特性。当动物体接触到这种不具伤害力的病原菌后，免疫系统便会产生一定的保护物质，如免疫激素、活性生理物质、特殊抗体等。

疫苗的发展经历了三次革命：传统灭活和减毒疫苗，诞生于 19 世纪末。路易斯·巴斯德，法国著名的微生物学家、化学家，为救被狂犬咬伤的孩子，发明了狂犬疫苗，被称为“疫苗之父”。20 世纪 70 年代，随着遗传学的飞速发展，诞生了由遗传学重组机制产生的疫苗，重组疫苗。是为解决传统疫苗存在的问题，降低免疫原性，提高安全性，减少治疗时间。1993 年 Ulmer 等证实小鼠肌肉注射含有编码甲型流感病毒核蛋白（NP）的重组质粒后，可有效地保护小鼠抗不同亚型、分离时间相隔 34 年的流感病毒的攻击。随后的大量动物实验都说明在合适的条件下，DNA 接种后既能产生细胞免疫又能引起体液免疫。因此，1994 年在日内瓦召开的专题会议上将这种疫苗定名为核酸疫苗，开启了疫苗的第三次革命。

从工作机理来看

传统疫苗

是直接将病原微生物灭活和减毒后制成疫苗，接种后，人体的免疫系统被激活，最终清除病原微生物并产生免疫记忆。

重组疫苗

是将病原微生物的抗原蛋白纯化后制成疫苗，同样在接种后激活免疫系统，清除并产生免疫记忆。

核酸疫苗

是将编码病原微生物的核酸（mRNA）制成疫苗，接种后，核酸在细胞内翻译表达出病毒的抗原蛋白。

疫苗开发流程

传统疫苗的开发经历毒株的分离与鉴定，病毒的扩增、纯化与鉴定，开发生产工艺，到质量评估的流程。



相比传统疫苗，重组疫苗与核酸疫苗也同样遵循毒株分析和鉴定，开发，生产工艺到质量评估的过程。不同的是，重组疫苗的开发需要经历蛋白的构建表达、纯化以及鉴定。



核酸疫苗经历核酸鉴定后，对核酸进行生产、纯化和递送。

赛默飞色谱与质谱针对传统疫苗、重组疫苗和核酸疫苗提供全方位的研发及工艺质控



◎ 疫苗筛选

利用蛋白质组学技术：高通量的鉴定链球菌表面的膜蛋白，筛选候选疫苗

◎ 重组蛋白类疫苗表征分析

◎ 靶向宿主细胞残留蛋白的定量定性

◎ 多糖类疫苗水解产物鉴定



◎ 工艺引进

裂解剂去氧胆酸，梯度离心蔗糖，冻干保护剂 PEG

◎ 工艺残留

灭活剂甲醛、戊二醛，培养基残留蛋白总量测定，氰化物

◎ 后期工艺添加

佐剂（铝、吐温，新型佐剂），防腐剂（硫柳汞、苯酚）

◎ 多糖组成、含量

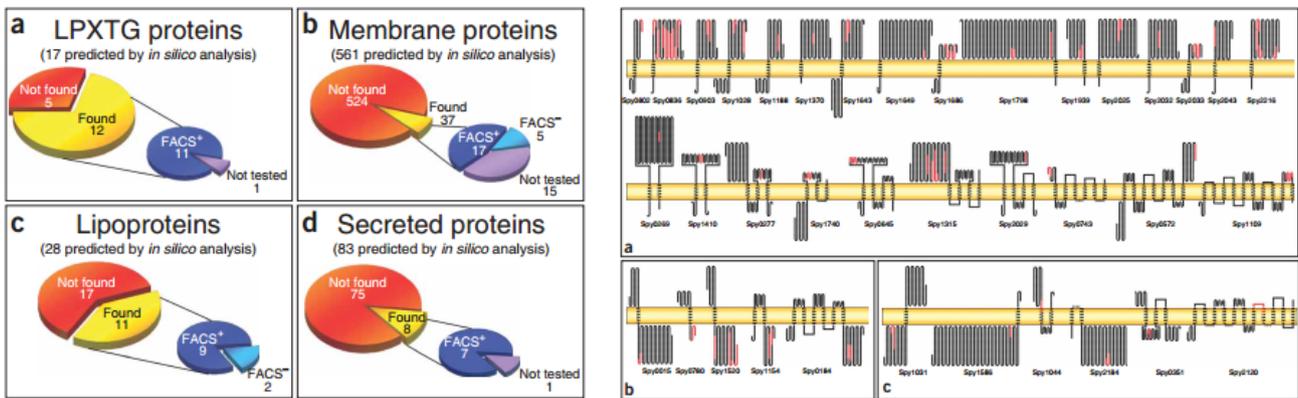
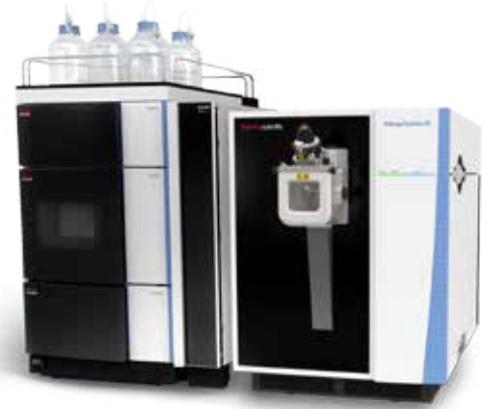


数据合规性

疫苗筛选

疫苗免疫是机体抵御微生物和寄生虫感染的有效措施，然而还有许多病原体缺乏有效的疫苗，疫苗研究任重而道远。随着许多病原体基因组测序的完成，利用基因组学筛选疫苗抗原显示了强大的优势。同时由于近年来比较基因组学、蛋白质组学、抗原组学等的发展，病原体毒力相关蛋白、分泌性蛋白和膜表面结合蛋白基因可以被分离出来，从而可以更加准确地分析候选抗原，极大地提高了疫苗抗原分析的效率。总之，利用基因组和蛋白质组进行疫苗抗原筛选是疫苗研究的革命，将极大地推动疫苗的研究和开发。

蛋白质组学是利用高分辨的蛋白分离技术和高效的蛋白鉴定技术，全景全息地研究在各种特定情况下的蛋白质谱及其变化规律，包括细胞内动态变化的蛋白质谱的组成成分、表达水平、就是状态和蛋白质之间的相互作用等，以揭示蛋白质功能及其生命活动的关系，即在蛋白质水平上整体性、动态和定量地研究生物体。同一基因组，在不同细胞/组织中表达的蛋白质谱不同，统一细胞/组织，在不同时间/不同环境条件下表达的蛋白质谱也不同，因此蛋白质组是空间和时间上动态变化的整体，一个基因组对应多个蛋白组，我们不仅要通过基因组读出序列，还要通过蛋白质组读懂序列。基于 Orbitrap 原理的超高分辨液质联用仪，凭借其出色的分辨力、灵敏度、动态范围及质量精度，一直以来都是蛋白质组学领域的金标准。利用蛋白质组学技术：高通量的鉴定链球菌表面的膜蛋白，筛选候选疫苗。



基因组数据

- 基因组 / 转录组测序

膜蛋白的提取

- Trypsin or proteinase K 酶切

鉴定

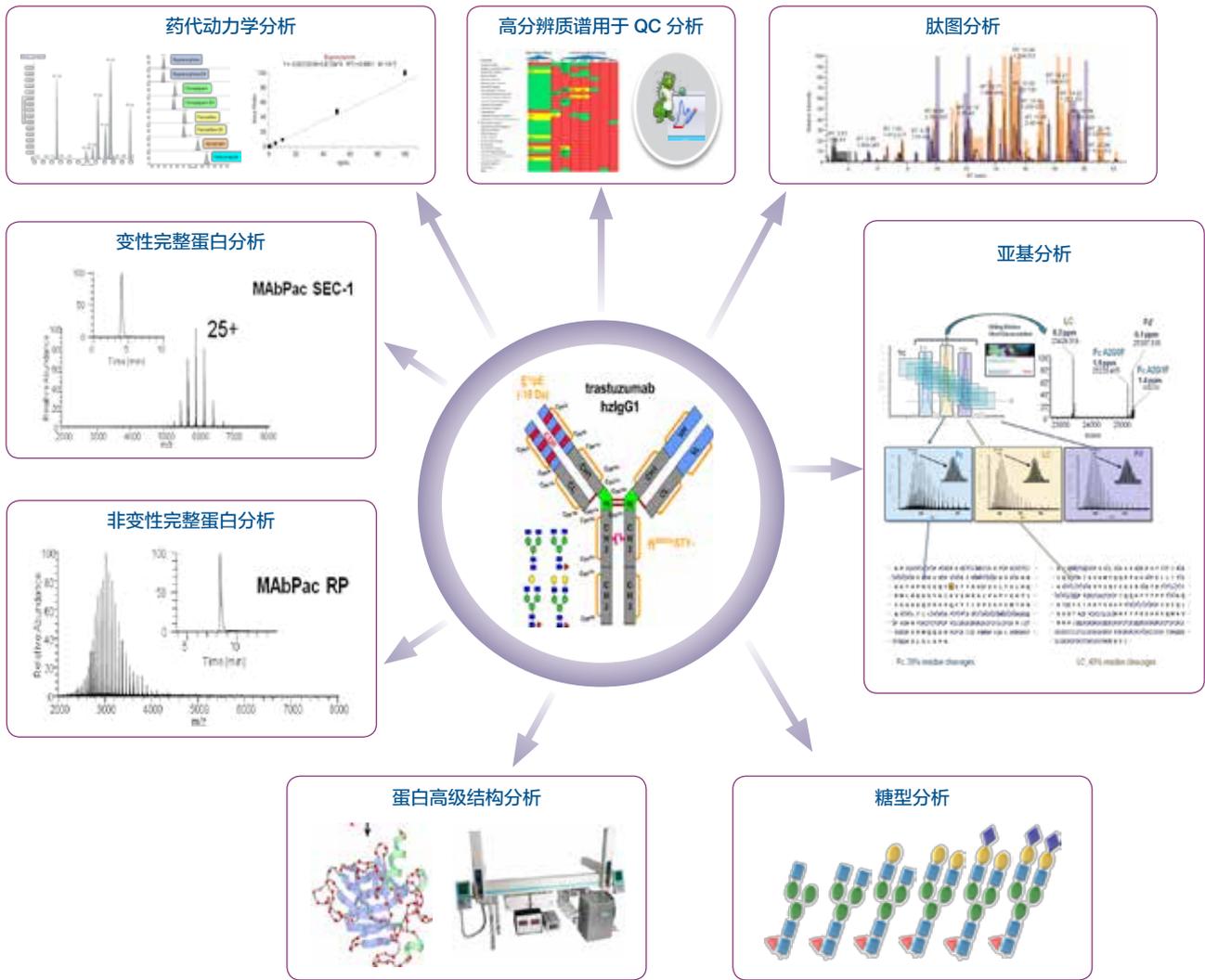
- LC-MS/MS 鉴定

膜蛋白的确认

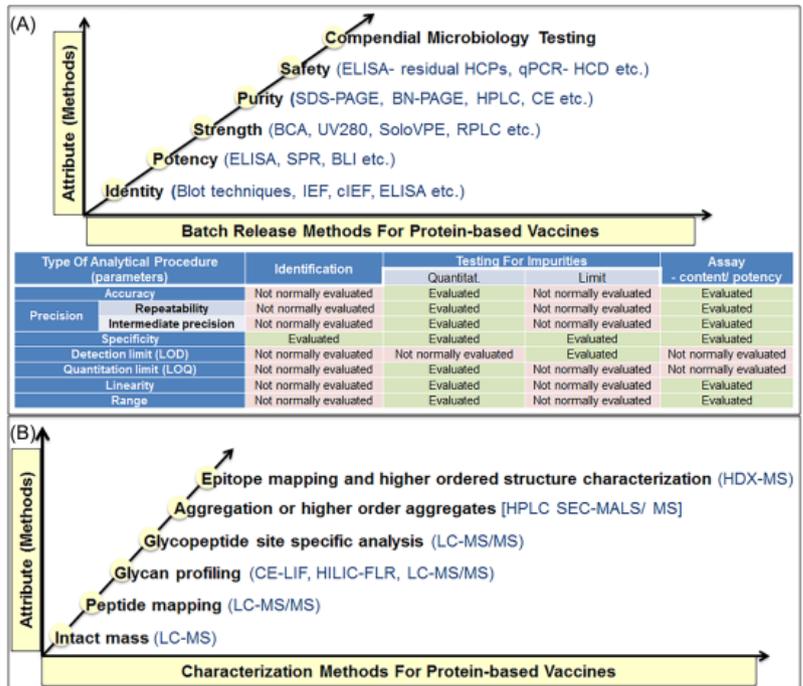
- PSORT 拓扑预测
- 流式分析

重组蛋白类疫苗表征分析

在重组蛋白类疫苗研发和质量控制中，高分辨质谱在其理化性质的鉴定中成为必备的分析方法。赛默飞独有的专利技术 Orbitrap 超高分辨质谱因其优异的性能在蛋白分析科研领域独居鳌头，在重组蛋白类疫苗领域拥有全面的解决方案包括样品前处理、数据采集及解析的详细教程，加速疫苗的发现、开发和质量控制进程，实现高效产出。



在重组蛋白类疫苗的表征分析中，Orbitrap 超高分辨质谱主要应用于：一级结构分子量测定、肽图分析、糖型分析以及氢氘交换技术的高级结构分析。



疫苗工艺及质量控制解决方案

裂解剂

去氧胆酸

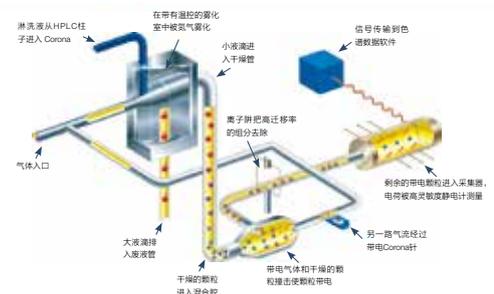
在疫苗制备过程中加入裂解剂，如乙醚、聚山梨酸酯 80、脱氧胆酸钠等，以裂解病毒粒子，再经纯化工艺去除部分病毒成分，以有效降低不良反应，如甲型肝炎灭活疫苗（人二倍体细胞）生产流程中提纯工艺阶段需用去氧胆酸钠进行细胞裂解，疫苗中残留去氧胆酸的含量不得高于 20 µg/mL[1]。

2015 版中国药典采用比色法分析去氧胆酸残留，比色法前处理复杂，灵敏度不高、重现性受人为影响大。去氧胆酸紫外吸收较弱，可检测出的峰个数有限，且灵敏度较差，溶剂等因素干扰较大。目前有部分客户采用蒸发光散射（HPLC-ELSD）方法，存在基线波动大，灵敏度和稳定性较差，无法获得满意的分析结果。

CAD 是一种新型的、质量型通用检测器，不需要发色团，也不需要离子化，具有以下优势：

- 高灵敏性：检测低至 ng 级（柱上样量）
- 更一致的响应，响应与分子结构无关
- 宽动态范围：4 个数量级（ng ~ µg）
- 适用范围广：分析任何非挥发性物质（Non-VOC）和许多半挥发性有机物（SVOC）
- 重现性好：RSDs 一般在 2% 的范围内
- 操作简单：可适用任何实验室，维护成本低

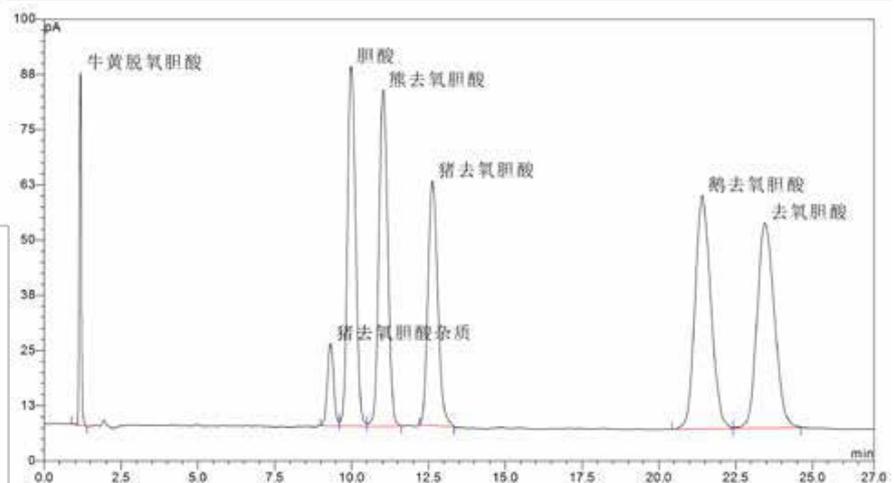
新版美国药典收录 CAD 检测器作为去氧胆酸残留和有关物质的方法。CAD 检测器结合 Acclaim Surfactant 色谱柱，可同时对胆酸、去氧胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸和牛黄脱氧胆酸进行检测，获得高分离度、高灵敏度和重现性的结果。



Desoxycholic Acid
(Title for this monograph—not to change until December 1, 2021)
(Prior to December 1, 2021, the current practice of labeling the article of commerce with the name Desoxycholic Acid may be continued. Use of the name Desoxycholic Acid will be permitted as of December 1, 2016; however, the use of this name will not be mandatory until December 1, 2021. The 60-month extension will provide the time needed by manufacturers and users to make necessary changes.)



Standard solution: 0.01 mg/mL of USP Desoxycholic Acid RS in Diluent
Sample solution: 0.01 mg/mL of Desoxycholic Acid in Diluent
Chromatographic system (See Chromatography (621), System Suitability)
Mode: LC
Detector: Charged aerosol
Column: 4.6-mm x 15-cm; 3-µm packing L1
Flow rate: 1.0 mL/min
Injection volume: 25 µL
Run time: 35 min
System suitability
Sample: Standard solution
[Note—The retention time of desoxycholic acid is about 13.0 min.]

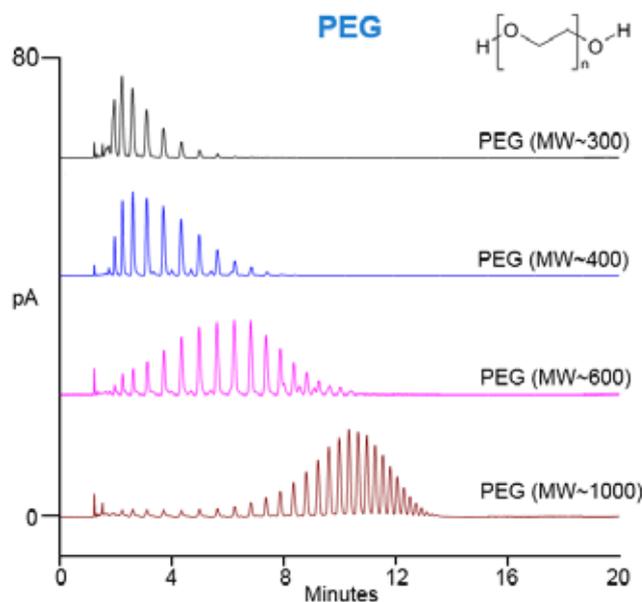


冻干保护剂

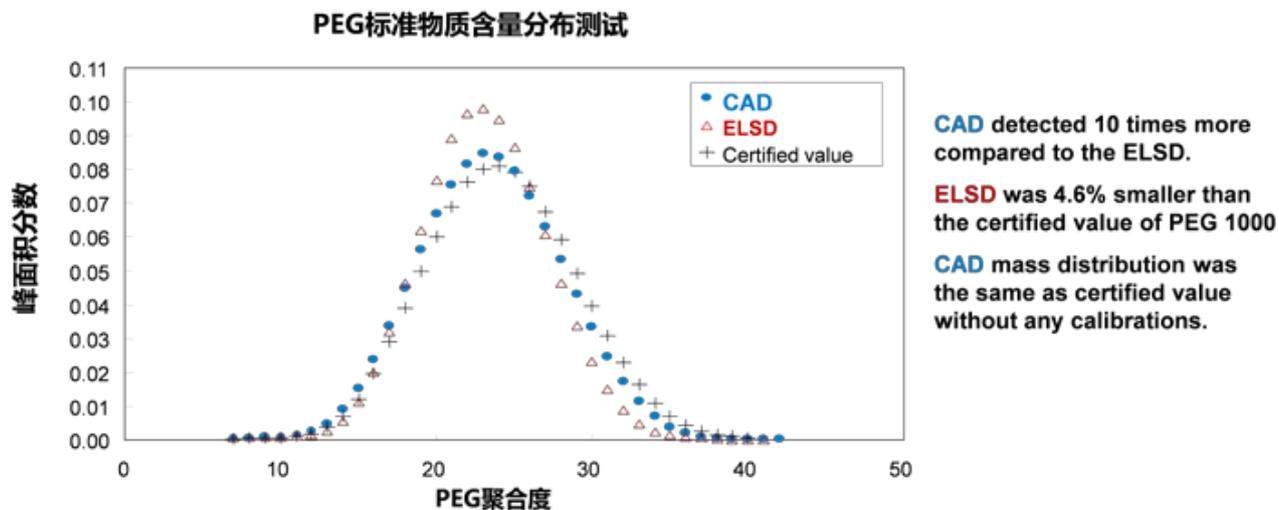
聚乙二醇

冻干制品的整个冻干过程存在着各种各样的应力，这些应力常常是直接或间接导致蛋白质药物不稳定的因素。冻干保护剂是一类能防止活细胞和生物活性物质在冻干过程中受到破坏的物质。聚乙二醇、氯化钙、聚乙烯吡咯烷酮等均是良好的冷冻保护剂。一方面须按药典规定监控聚乙二醇含量不得过 10 $\mu\text{g/mL}$ ，另一方面需要控制聚乙二醇作为辅料本身的质量情况。

当对聚乙二醇的质量进行评估时，希望在色谱上对其进行尽可能的分离，以获得指纹谱图，进行更好的质量控制。Acclaim™ Surfactant Plus 是一款表面活性剂专用柱，尤其适合分析聚合物类的辅料，在对不同聚合度的 PEG 分析时，都能够获得优秀的峰型和分离度。



日本国家产业技术研究院曾使用 PEG 标准物质来考察 CAD 和 ELSD 的实测含量分布情况，从下图中可以看到 CAD 与 PEG 真实含量分布基本一致，较 ELSD 测定准确性高 10 倍以上。



甲醛

甲醛的醛基能破坏微生物蛋白质和核酸的基本结构，导致微生物的死亡而失去感染力，是应用最广泛的灭活剂，也是毒素脱毒的首选脱毒剂。残留的游离甲醛若随疫苗注入机体，会产生刺激性反应，疫苗中残留甲醛的限度规定一般为不高于 50 µg/mL。

作为 Pittcon 2015 “科学家选择奖” 最佳分离产品的 Vanquish 超高效液相色谱，从前端的泵、到进样器、再到检测器，整个部件都有创新设计，该系统使用的专利技术多达 25 个。在高通量多批次检验的情况下，仍可以保证分析物色谱峰拥有尖锐峰形，具有优异的稳定性和重复性。在残留甲醛的分析中，能够轻松获得 0.02 ng 的灵敏度。

更可信的分离

- 两种温控模式
- 5°C to 120°C 温度范围
- 主动预加热功能

更强的动力

- 专利的适应性热效应补偿技术 (ATEC)
- 耐压可达 1500bar (22,000psi)
- 流速可达 5 mL/min
- 2 × 3 溶剂通道

更灵敏的检测

- 动态范围可达 3000 mAU
- 噪音水平低至 ± 3 µAU
- LightPipe™ 专利技术实现最小的扩散

更精准的进样

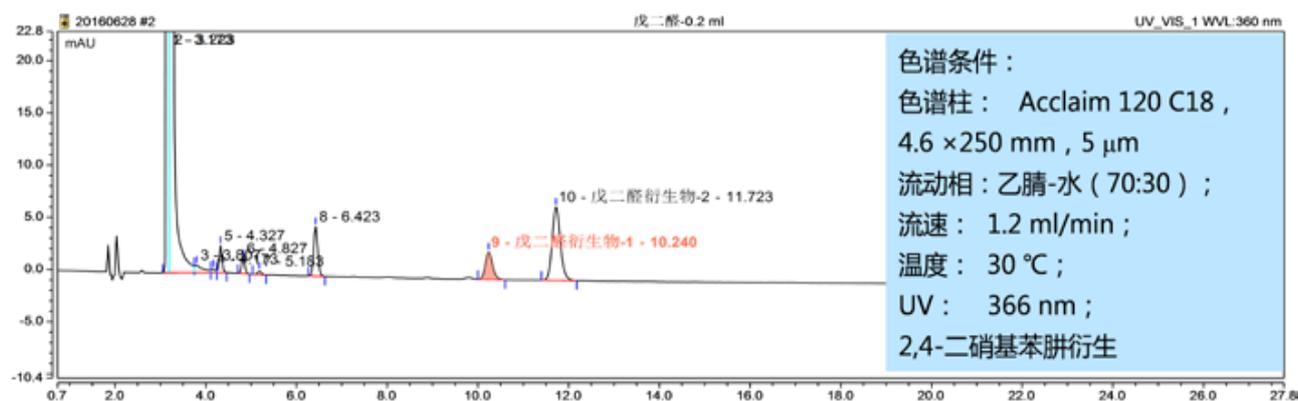
- 同时容纳多达 23 块微孔板，8832 个样品
- 智能的样品预压缩技术提供卓越的重现性
- 集成条码扫描功能，自动识别样品盘



色谱条件：
 色谱柱：Acclaim 120 C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm
 流动相：乙腈 - 水 (50:50) ;
 流速：1 ml/min;
 温度：35 °C ;
 UV：352nm;
 甲醛标准品：与 DNPH (2,4-二硝基苯肼) 衍生

戊二醛

戊二醛被誉为继甲醛和环氧乙烷消毒之后化学消毒灭菌剂发展史上的第三个里程碑。其具有甲醇含量低，无致畸变、无积蓄的特点，广泛用于消毒灭菌、制药等行业。药典规定戊二醛含量不得高于 0.01 g/L (吸附无细胞百白破联合疫苗)。



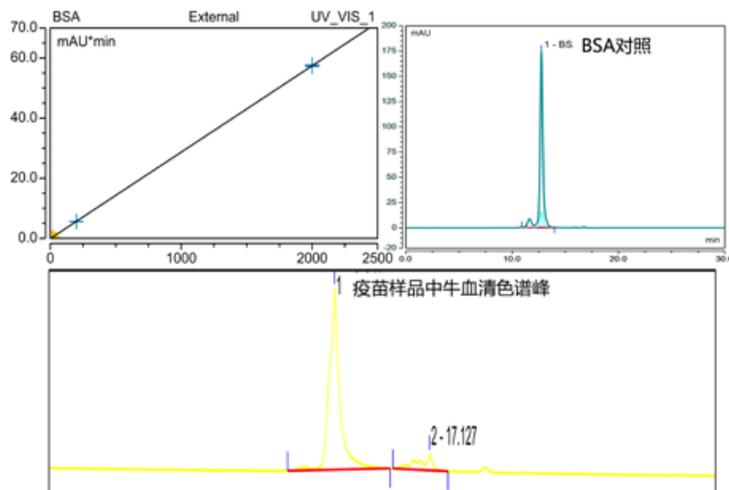
培养基

牛血清白蛋白

牛血清白蛋白用于细胞培养，但它也是一种异种蛋白，残留量偏高的情况下，多次使用能引发机体的过敏反应。药典规定测定病毒类疫苗中残余牛血清白蛋白的含量，应不超过 50 ng/剂。2015 版中国药典蛋白质测定方法采用凯氏定氮、Lowry 法或双缩脲法。

采用 MabPac™ SEC 体积排阻色谱柱结合生物惰性液相 Vanquish 对牛血清白蛋白进行了直接测定，该方法具有以下优势：

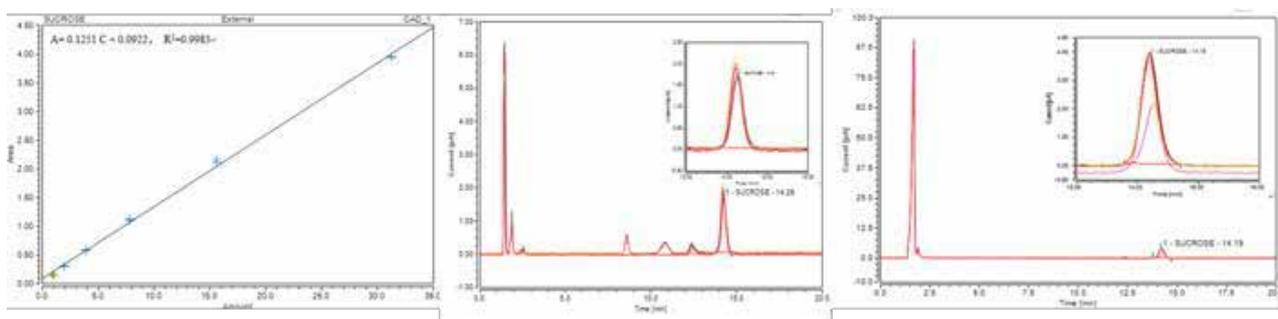
- 无需衍生；
- 有效排除小分子的干扰；
- 排除无/弱紫外吸收大分子辅料干扰(如吐温，PEG 等)；
- 通量高(12 min/针)；
- 生物惰性液相适用于高盐和宽 pH 范围缓冲液，有效防止蛋白吸附。



梯度离心

蔗糖

蔗糖梯度离心是病毒类疫苗和部分蛋白样品常用的浓缩方法，蔗糖紫外弱吸收，衍生法检测重复性和准确性有待改进，高浓度蔗糖有可能导致 ESLD 雾化室污染，CAD 检测器可实现低温雾化，防止雾化室残留，无论是高浓度脱糖起始液还是低浓度终止液，都能够实现有效检测，稳定性好，抗干扰能力强。



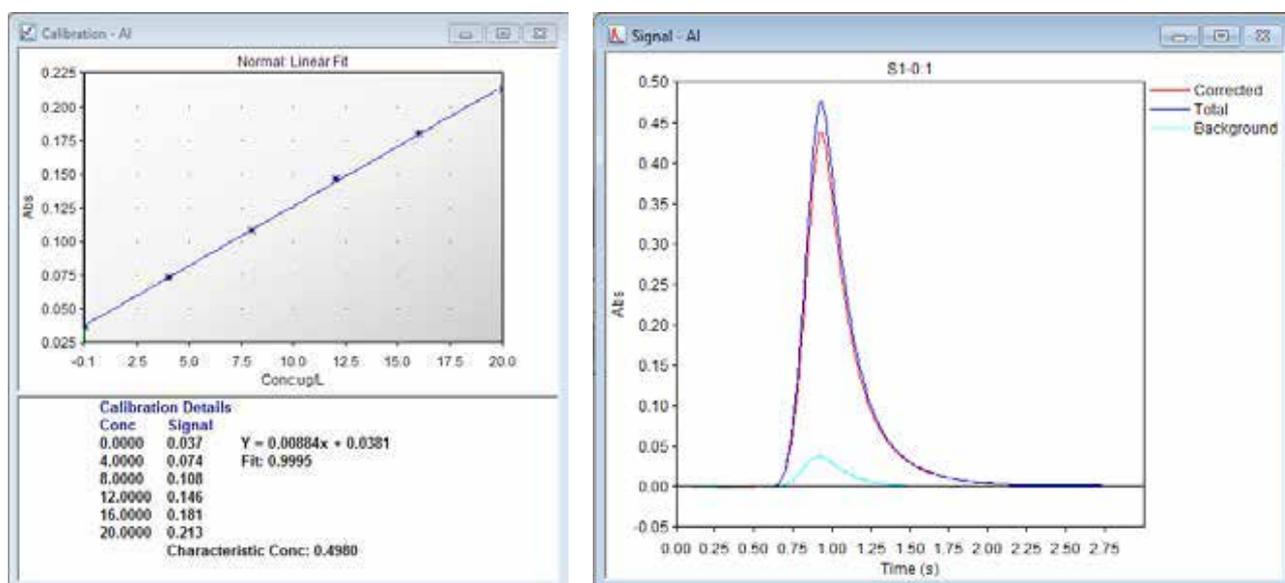
- 方法检测限为 0.146 $\mu\text{g/mL}$
- 标曲浓度从低到高: 0.976 1.95 3.91 7.81 15.63 31.25 $\mu\text{g/mL}$
- 所有脱糖起始液中蔗糖浓度都大于 30%
- 脱糖起始液的蔗糖浓度在 3.5-5 g/L 的范围内
- 稀释 1000 倍后检测
- 所有批次的终止液都满足蔗糖浓度不得超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 的要求
- 蔗糖终止液的蔗糖浓度在 0.04-0.1 g/L 的浓度范围
- 稀释 1000 倍后检测

疫苗佐剂是与特异性抗原共同使用后能产生比单独使用抗原更强免疫力效果的物质。佐剂可以起到增加弱抗原的免疫原性、提高免疫反应的速度，增加其持久性、调节抗体的亲和力、特异性及亚单位分布等重要的作用，在疫苗中有广泛的应用。

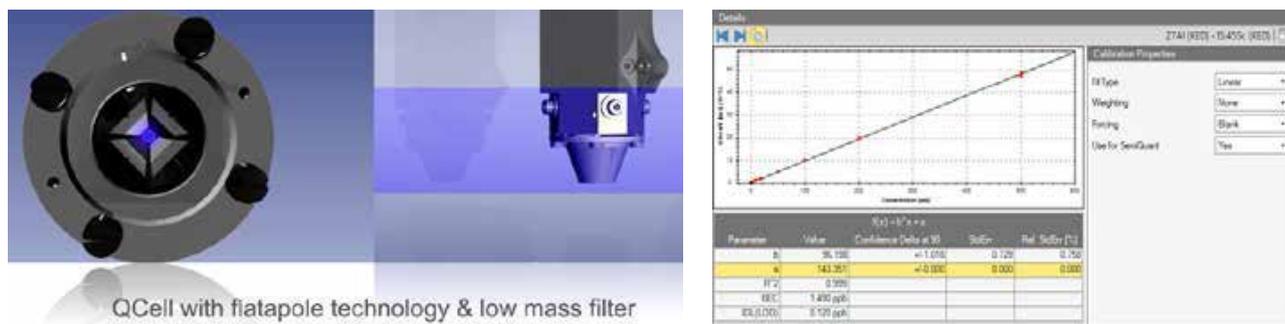
铝佐剂

是最早使用的佐剂，也是目前唯一广泛使用的疫苗佐剂，铝佐剂具有便宜、安全、合成简单的优点，但也存在易在体内蓄积、可能刺激 IgE 产生、无法生物降解等问题。在疫苗成品中需对铝含量进行检测，如 13 价肺炎球菌结合疫苗中铝含量应为 0.15-0.35 mg/ml，吸附白喉疫苗中氢氧化铝不得高于 0.3 mg/ml。

对于佐剂中 Al 含量进行检测，AA、ICPOES 和 ICP-MS 方法均具有极高的灵敏度，iCE3000 系列 AA 优异的光学系统结构、高精度控温和背景扣除技术，可将 Al 元素在石墨炉分析中的发射干扰有效去除；而 iCAP Qnova 系列 ICP-MS 专利技术的 Q Cell 碰撞池结合低质量数剔除技术，能够将 Al 元素在质谱分析中的多原子干扰做到完全去除，这些技术的使用确保了佐剂中 Al 检测获得最佳的准确性和稳定性等方法学数据要求。



iCE 3000 系列原子吸收分析 Al 标准曲线及吸收峰



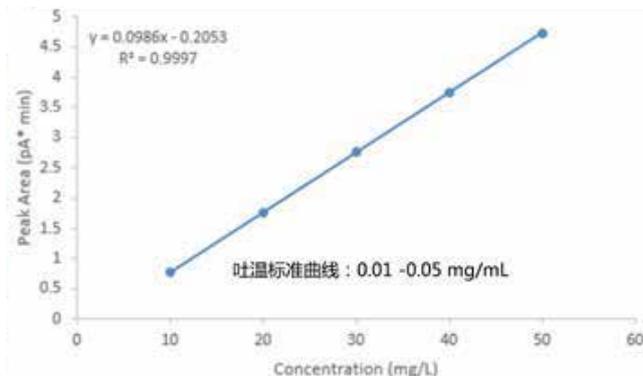
iCAP Qnova 系列 ICP-MS Q Cell 示意图及标准曲线

吐温 80

又称聚山梨酯-80。在人用禽流感病毒裂解疫苗的大规模生产中，往往先加入吐温 80 分散病毒。在水包油佐剂 MF59 中，含 0.5 % 吐温 80、5 % 鲨烯、0.5 % 脱水山梨糖醇三油酸盐，经人类临床试验后，已被美国 FDA 批准成为除铝佐剂外第二个上市的人用佐剂。加拿大和一些欧洲国家生产的流感疫苗也使用吐温 80 作为赋形剂。CAD 较紫外分光光度法、FLD 方法，无需衍生，专属性、通用性更强，较 ELSD 方法灵敏度更高，能够满足疫苗中吐温 80 检测的需求。

赛默飞特异性生物类药物的辅料吐温监测方案

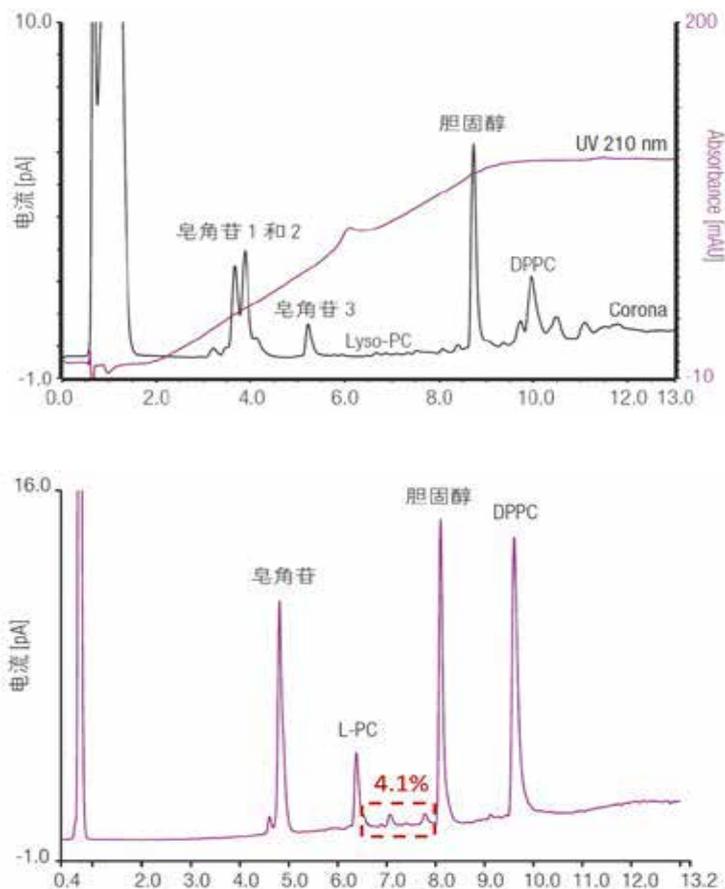
	HPLC-CAD 联用	HPLC-ELSD 联用	HPLC-FLD 联用	衍生 - 紫外分光 光度法
时间成本	0.5 小时	0.5 小时	2 小时	4-8 小时
衍生	无需衍生	无需衍生	自动在线衍生	无需手动衍生
前处理	过滤即可	过滤即可	需除蛋白	需除蛋白、离心
有毒试剂 前处理	无需使用	无需使用	接触 NPN (N- 苯基-1-氨基)	衍生 / 萃取接触硫 氧钴胺、二甲甲烷
重复性	好	差	好	差
基质干扰	无干扰			
通量 / 自动 化程度	高	高	高	低
LOQ	10 ppm	50 ppm	20 ppm	20 ppm



新型佐剂

除上述佐剂外，国外疫苗企业正在研发新型专利佐剂，由的三萜苷、甾醇、脂肪酸和磷脂等组成，此类物质同样缺乏合适紫外可见生色团。右图黑色线为 CAD 的分析色谱图，红线为 210 nm 紫外色谱图，可以看出即便在末端吸收下，这几类物质仍然没有明显信号。而 CAD 的高效液相色谱法克服了此种情况。

由于所有化合物的响应相似，与化学结构无关，因此电雾式检测器的一个优势是：即使无法获得正宗的标准品，尤其是使用反梯度法时，还可非常准确地估计杂质含量。例如，左图中胆固醇和 L-PC (DDPC 降解物) 之间的小杂峰面积等于胆固醇峰值的 4.1%，因此，可估算杂质含量为 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

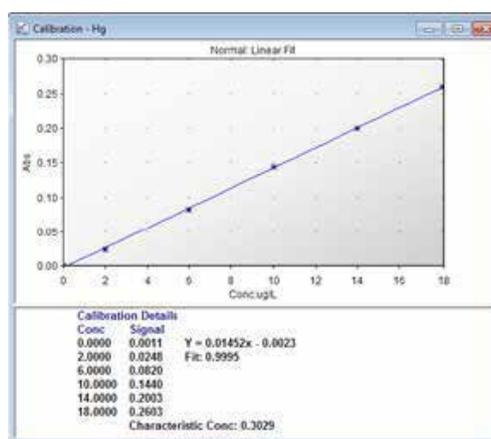


疫苗类生物制品在制造过程中为了脱毒、灭活，或液体制品为避免在储运期间有微量污染的细菌繁殖，保证制品使用安全，需加入适宜的防腐剂，常用的防腐剂有硫柳汞、苯酚、间甲酚等。随着近年来药品 GMP 的实施，生产环境已能保证整个生产过程的无菌，因此 WHO 和其他机构已开展了去除疫苗中防腐剂的行动。

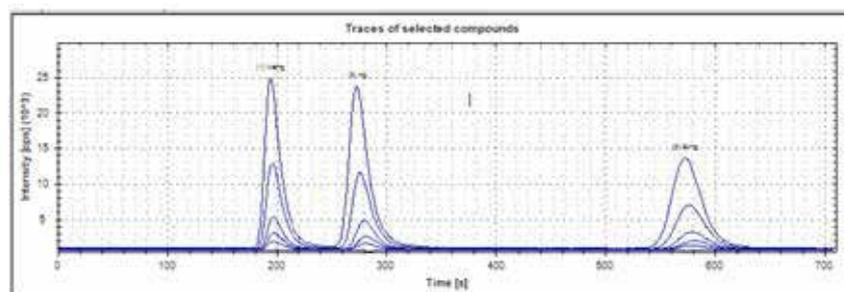
硫柳汞

是使用最普遍的一种生物制品防腐剂，常用的浓度为 0.003 %-0.01%。多年来作为防腐剂为保证疫苗的安全性作出了重要贡献。但硫柳汞可能存在神经发育障碍和肾脏毒性等。

硫柳汞的检测方法常采用滴定法或原子吸收分光光度法。前者的检测机制是汞有机化合物经强酸消化成无机汞离子，与双硫腙溶液形成化合物，根据双硫腙滴定液的消耗量计算出硫柳汞含量。后者是采用原子吸收分光光度法测定汞含量，从而计算硫柳汞含量。在原子吸收分光光度法测定汞含量过程中，均要求采用冷原子吸收或氢化物发生-原子吸收法进行测量，通过 ICE 3000 系列原子吸收与 VP100 氢化物发生器连用技术即可满足该测量要求。



此外，ICP-MS 也是汞分析方法中理想的选择，特别是近年来质谱与色谱的联用分析技术，成为样品多种汞形态和汞总量测量的发展趋势。



汞形态混合标准溶液分离图谱

苯酚

主要用作抗菌防腐剂，对很多微生物如革兰阴性和革兰阳性菌、分枝杆菌和某些真菌及病毒有抗菌活性。苯酚有高度的腐蚀性和毒性，中国药典规定注射剂中如使用苯酚作防腐剂，其浓度应不高于 0.5 %。

多糖疫苗与多糖结合疫苗

细菌多糖疫苗是细菌菌种在适宜培养基中培养后杀菌，通过提取荚膜多糖抗原，经纯化后加入适宜稳定剂制备而成。目前主要有脑膜炎球菌多糖疫苗、伤寒 Vi 多糖疫苗和肺炎球菌多糖疫苗等。多糖结合疫苗是指采用化学方法将多糖共价结合在蛋白载体上所制备的多糖-蛋白结合疫苗，用于提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性。目前主要有 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗、脑膜炎球菌结合疫苗和肺炎结合疫苗等。多糖能客观的反映疫苗的质量，因此需要对其进行研究和检测。

糖类化合物在紫外区一般无吸收或吸收较弱，一般的检测器不能对其进行直接检测。离子色谱根据不同糖类化合物酸碱系数差异引起的离子交换作用差异，以及某些糖类与阴离子交换树脂之间疏水性作用不同，实现糖类化合物的高效阴离子交换、分离。再根据羟基在金电极表面发生氧化反应产生的电流实现糖类、氨基糖类和糖酸的检测。

离子色谱可有效的应用于疫苗中游离单糖、游离多糖、蛋白结合多糖、杂质多糖的检测。

USP40- $\langle 1234 \rangle$ 中罗列了疫苗中多糖组成和含量分析的色谱方法，从下表中可见，高效阴离子色谱法可以覆盖 A 群、C 群、Y 群、W135 脑膜炎球菌、肺炎球菌、伤寒 Vi、结合疫苗的多聚磷酸核糖基核糖醇多糖含量测定。WHO 的脑膜炎球菌疫苗和 Hib 疫苗质量控制指南中均提到可采用 HPAEC-PAD 法对疫苗成品和原液进行多糖含量测定。



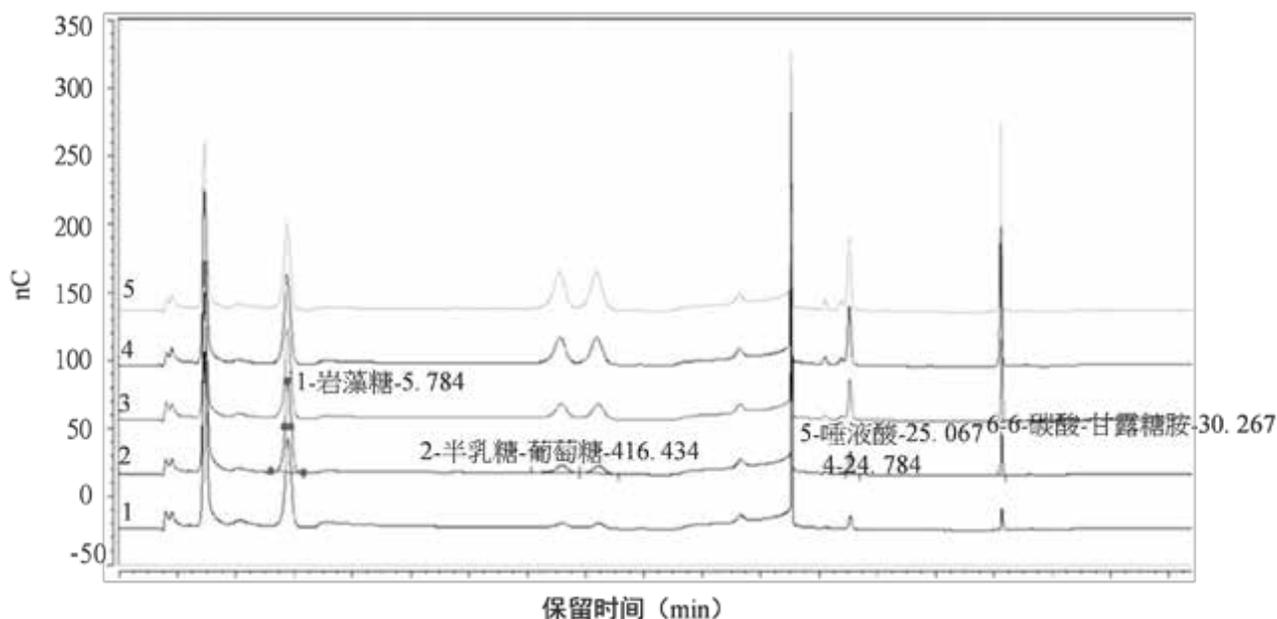
USP40- (1234) 人用疫苗多糖色谱分析方法

多糖抗原	酸解、高校阴离子色谱法	酸解，荧光标记，HPLC	HF 水解、高校阴离子色谱法	碱水解、高校阴离子色谱法	甲醇分析、GC 或高校阴离子色谱法
多聚磷酸核糖基核糖醇	核糖醇	—	磷酸盐	多聚核糖磷酸单体	—
A 群脑膜炎球菌	6- 磷酸甘露糖胺	—	磷酸盐	O- 乙酰基	—
C 群脑膜炎球菌	唾液酸	—	—	O- 乙酰基	—
Y 群脑膜炎球菌	半乳糖、唾液酸	唾液酸	—	O- 乙酰基	—
W135 群脑膜炎球菌	半乳糖、唾液酸	唾液酸	—	O- 乙酰基	—
肺炎球菌 (血清型特异性)	糖醇，甲基戊糖，己糖，氨基己糖，糖醛酸，丙酮酸	—	磷酸盐	O- 乙酰基	糖醇，甲基戊糖，己糖，氨基己糖，糖醛酸
伤寒 Vi	—	—	—	O- 乙酰基 Vi 单体碎片	—

*Man=mannose; Neu=neuraminic acid; Ac=acetyl; Glc=glucosamine; Gal=galactose.

多糖含量检测

传统多糖疫苗检测通过化学反应使多糖组成单位的特异基团转变为在某波长具有吸光值的物质来测定出特异基团的含量，之后再根据特异基团和多糖的理论比例计算多糖的含量，但该方法危险系数较高、操作较复杂，并且灵敏度较低，有时也较容易受到干扰。高效阴离子色谱法无需衍生，操作简便，对糖类的灵敏度可达 pmol 级别，在该项质量控制已逐渐成为一种趋势。唐静等 [2] 采用三氟乙酸对四价脑膜炎球菌结合疫苗进行水解，采用 HPAEC-PAD 法测定总唾液酸、葡萄糖、半乳糖、ManN-6-P 的含量，利用各单糖之间的比例和特异性，实现了对四价脑膜炎球菌荚膜多糖的定量检测。



甲型流感病毒根据表面蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)，分为多个亚型；同时是灭活和重组疫苗重要的抗原成分；流感疫苗的最终剂型配方和填充质量的检测手段：单向辐射状免疫扩散实验 (SRID) 定量疫苗中 HA 已评估效力 (监管方法)；SRID 方法缺点：耗时长，生成经过校准的 SRID 试剂通常需要 2-3 个月；因此建立 LC-MS/MS 方法进行定量监控，耗时长，通过质谱对 HA 定量，评估不同抗体对流感疫苗 HA 的富集能力，测定疫苗的效力。

Amount of H7 immunocaptured using mAb FR-545 Anti-H7N7 and CBER pAb Anti-H7N9 in various A/Shanghai/2/2013 (H7N9) vaccine preparations ($\mu\text{g/mL}$ and % HA immunocaptured).

Identifier	SRID value	mAb Anti-H7N7 IC-IDMS Digest (mean \pm st dev)	pAb Anti-H7N9 IC-IDMS Digest (mean \pm st dev)	IDMS Digest (mean \pm st dev)	Percent (%)H7 Recovered mAb FR-545 Anti-H7N7	Percent (%)H7 Recovered CBER pAb Anti-H7N9
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) allantoic fluid preparation	<LOD	2.5 \pm 0.30	2.9 \pm 0.64	3.0 \pm 0.20	83%	97%
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) purified whole virus preparation	QNS	969.8 \pm 83.8	968.2 \pm 115.9	1103.3 \pm 29.3	88%	88%
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) lyophilized whole virus preparation	60.0	55.2 \pm 4.8	54.1 \pm 5.8	55.5 \pm 9.0	99%	97%
A/Shanghai/2/2013 (H7N9) split monovalent vaccine preparation	193.7	213.8 \pm 18.8	196.5 \pm 24.4	232.9 \pm 32.3	92%	84%

杂质多糖检测

在多糖疫苗及多糖蛋白结合疫苗的制备工艺中，原料多糖中可能会有其他多糖的存在多糖结合疫苗，这些多糖一般不产生保护性免疫或尚存争议，需要控制其含量。如肺炎球菌的 C 多糖，Talaga 等 [3] 通过氢氟酸—三氟乙酸水解 C 多糖得重复单位的特异性糖核糖醇，通过 HPAEC-PAD 检测核糖醇的含量进而确定了 21 个型肺炎球菌荚膜多糖中 C 多糖的含量。

游离多糖的检测

游离糖是多糖与蛋白的结合过程中未能与载体蛋白结合的多糖，是结合疫苗质控的一个重点，通常采用离心过滤去除多糖蛋白结合物，再水解游离糖后用离子色谱进行检测。郭蓉等 [4] 采用 1% 脱氧胆酸钠处理对 A 群脑膜炎球菌结合疫苗分离游离 PS，经三氟乙酸水解后，用 HPAEC-PAD 检测水解产物，该检测结果与改良钼酸铵分光光度法的检测结果相当，离子色谱法灵敏度高、稳定性好，具有钼酸铵分光光度法无法比拟的优点。

高碘酸钠

在制备多糖蛋白结合疫苗时，高碘酸钠可活化多糖与载体蛋白相连，是结合疫苗中的检测项目之一，傅元欣 [5] 等通过抗坏血酸将高碘酸根还原成碘离子，采用离子色谱对其进行高灵敏度检测。

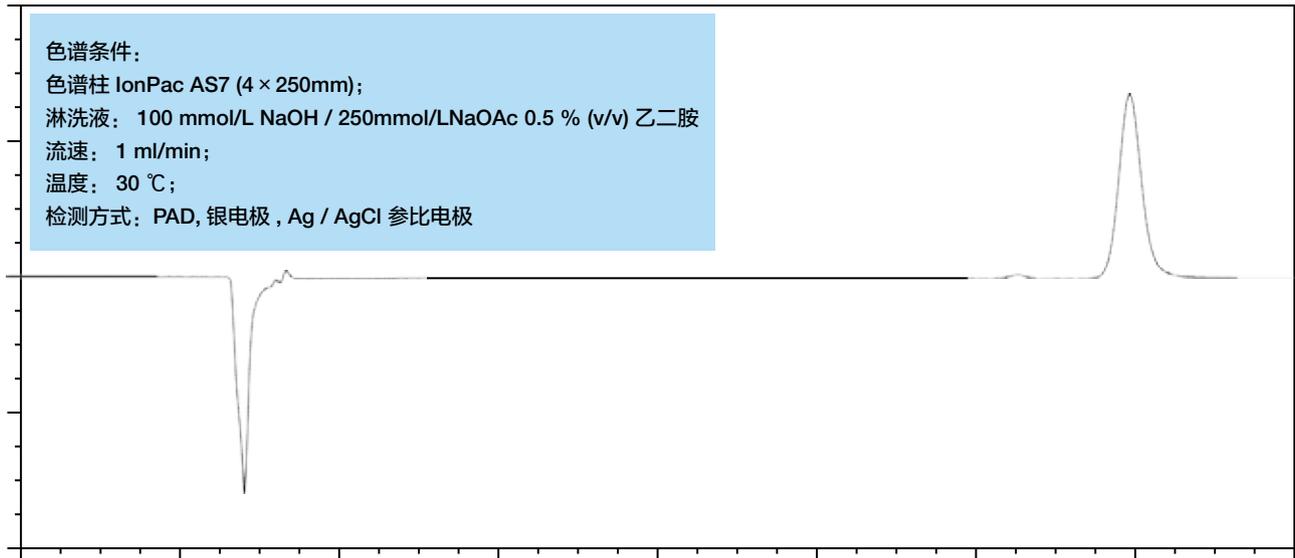
1,4- 丁二胺

还原胺化是一种条件温和相对简便的反应，用于寡糖分子与蛋白质见的共价结合，同时保留载体蛋白的免疫原性，1,4- 丁二胺被用于结合疫苗的多糖和蛋白连接，冯潇等 [6] 使用离子色谱对四价脑膜炎球菌多糖结合疫苗中的 1,4- 丁二胺残留进行了分析。



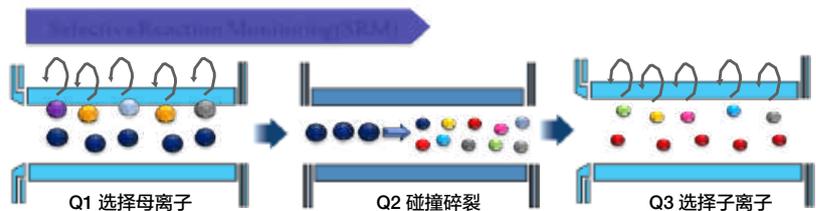
氰化物

利用溴化氰 (CNBr) 或相似的化学试剂活化多糖分子上的羟基, 在多糖分子上形成活性结构—氰化酯, 将氰化酯与连接剂己二酰肼 (ADH) 的一端肼基结合, 可形成多糖衍生物; ADH 的另一个游离肼基基团具有很强的亲核性, 在碳二亚胺 (EDAC) 的作用下与蛋白质分子上的羧基进行加成反应, 形成多糖 - 蛋白质结合物。氰化物具有强烈的毒性, 需要收到严格控制。显色法检测氰化物灵敏度和重现性常常受到挑战, 离子色谱可以克服显色法的诸多弊端, 通过检测氰根离子的方法对氰化物含量进行计算, 完全满足分析要求。



连接剂 ADH、缩合剂 EDAC

己二酰肼 (ADH) 与碳二亚胺 (EDAC) 分别为多糖蛋白结合工艺中使用的连接剂和缩合剂, 其残留量同样需要得到严密的监控。对于此类低限量的目标残留物分析, 可以采用三重四极杆液质联用进行检测, 三重四极杆质谱采用选择反应检测 (Selective Reaction Monitoring) 的方式, 通过母离子和子离子两重过滤, 有效排除干扰离子信号, 实现对微量组分的高选择性定量。



	母离子	碰撞能量 eV	子离子
ADH	175.0	9	143.1
ADH	175.0	15	115.0
EDU (EDAC 转化物)	174.1	10	129.0
EDU	174.1	7	103.0

参考文献

- [1] 王军志. 疫苗的质量控制与评价 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013
- [2] 唐静, 贺鹏飞, 李茂光, 等. 高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法测定四价脑膜炎球菌多糖疫苗的多糖含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26 (9) : 1313-1317.
- [3] Talaga P, Bellamy L, Moreau M. Quantitative determination of C. polysaccharide in Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Vaccine, 2001, 19(20 / 22 1: 2987—2994.
- [4] 郭蓉, 卢佳丽, 薛红刚, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培法对 A 群脑膜炎球菌结合疫苗中游离多糖的检测 [J]. 国际生物制品学杂志, 2014, 37 (6) : 276-280.
- [5] 傅元欣, 马庆华, 冯潇, 等. 离子色谱法测定脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗中的高碘酸钠含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (1) : 103-108.
- [6] 冯潇, 马庆华, 傅元欣, 等. 离子色谱法测定脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗中的 1,4- 丁二胺含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28 (8) : 856-860.
- [7] 王洪海, 祝秉东. 基因组学、蛋白质组学、抗原组学与疫苗发展 [J]. Foreign Medical Science (Microbiology) 2005, 28(4): 1673-6184
- [8] Manuel J Rodríguez-Ortega, etc. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome[J], Nature Biology, 2006, 24: 192-197
- [9] Vaneet Kumar Sharma, Ity Sharma, James Glick, The expanding role of mass spectrometry in the field of vaccine development[J], Mass spectrometry review, 2018: 1-22
- [10] Carrie L. Pierce etc. Quantification of Immunoreactive Viral Influenza Proteins by Immunoaffinity Capture and Isotope-Dilution Liquid Chromatography_Tandem Mass Spectrometry Anal. Chem. 2011: 83, 4729-4737



赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021-61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 +86 10 8794 6888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC