

Hib 多糖衍生物中残余 CDAP 检测方法的建立

朱文勇 管娇琼 朱 喆 李双丽 徐 倩 魏茂琪 杨增福 杨晓蕾 陈洪波 廖国阳

摘要 目的 在 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗生产过程中有效监控 1-氰基-4-二甲基氨基-吡啶四氟化硼 (CDAP) 的残留量。**方法** 在已有针对流脑多糖衍生物的基于强阳离子交换层析检测法的基础上进行改进。**结果** 该法具有良好的专属性、准确度、精密度,最低检出限为 $6\mu\text{g/L}$,且在 $20\sim 100\mu\text{g/L}$ 的范围内线性良好。**结论** 建立了一种针对 b 型流感嗜血杆菌多糖衍生物中 CDAP 的检测方法。

关键词 b 型流感嗜血杆菌 结合疫苗 1-氰基-4-二甲基氨基-吡啶四氟化硼 检测

中图分类号 R1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.009

Establishment of the Method to Detect the Residual Content of CDAP in Hib Polysaccharide Derivative. Zhu Wenyong, Guan Jiaoqiong, Zhu Zhe, et al. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming City Center Disease Control and Prevention, Yunnan 650000, China

Abstract Objective To monitor the residual of polysaccharide activating agent 1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP) effectively in the process of preparing Hib conjugate vaccine. **Methods** The method was improved based on high performance cation exchange chromatography for meningococcus polysaccharide derivative. **Results** The validation results showed that this method had good specificity, accuracy and precision. The limit of detection was $6\mu\text{g/L}$. There was a good linearity between $20\mu\text{g/L}$ and $100\mu\text{g/L}$. **Conclusion** A method to detect the residual content of CDAP in Hib polysaccharide derivative was successfully established.

Key words *Haemophilus influenzae* type b (Hib); Conjugate vaccine; 1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP); Detection

b 型流感嗜血杆菌 (*haemophilus influenzae* type b, Hib) 为荚膜型致病菌,可导致败血症、会厌炎、肺炎、脑膜炎等多种侵袭性疾病^[1]。目前,接种 Hib 结合疫苗是预防感染的强有力措施^[2]。1980 年首次利用溴化氰 (CNBr) 活化法制备了 Hib 结合疫苗,随后该方法经完善至今,生产工艺一直沿用此法^[3]。但是 CN-Br 本身毒性极高,对操作人员的身体健康及自然环境影响极大,且在多糖活化过程中反应剧烈,难以控制,与其相比,1-氰基-4-二甲基氨基-吡啶四氟化硼 (1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetr-afluoroborate, CDAP) 反应则相对温和,能够更好地保护多糖结构,并且其活化效率比 CNBr 高,因此,CDAP 活化法已被应用在多种多糖-蛋白结合疫苗

制备工艺中^[4-11]。

虽 CDAP 的毒性远低于 CNBr,但为确保疫苗的安全性,在疫苗生产过程中仍要对其进行监控。2011 年,马庆华等^[12]建立了基于高效阳离子交换层析的检测方法,主要针对流脑多糖-蛋白结合疫苗生产过程中残留 CDAP 的检测,所用检测分析仪器为离子色谱仪,本研究中笔者利用蛋白纯化常用仪器 AKTA purifier 基于类似检测原理,对其方法进行了相应改进。

材料与方法

1. 材料:AKTA purifier 纯化仪,色谱柱型号:Hi-TrapTM 1ML SP FF,检测波长 280nm。CDAP 化学标准品(美国 Sigma 公司,纯度 >99%),Hib 荚膜多糖及其 CDAP 活化的衍生物均为自制(中国医学科学院医学生物学研究所生物制品五室),2mol/L NaCl 溶液,配制溶液均用注射用水。超滤离心管 (Millipore, 10kDa)。

2. 方法:(1)按照参考文献[12]配制各浓度 CDAP 标准品工作液。(2)将 Hib 荚膜精制多糖用 0.05mol/L NaCl 溶液溶解至 10mg/ml 的原液,再稀

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (109008002);云南省科技计划项目 (2015BC009);北京协和医学院协和青年基金资助项目 (3332015150)

作者单位:650000 昆明,中国医学科学院医学生物学研究所(朱文勇、管娇琼、朱喆、李双丽、徐倩、杨增福、杨晓蕾、陈洪波、廖国阳);昆明医科大学(管娇琼);昆明疾控中心(魏茂琪)(注:朱文勇与管娇琼为共同第一作者)

释至 5.0mg/ml,使用 10kDa 的超滤离心管,5000r/min 离心 30min,滤出液为空白对照溶液。(3) 衍生物样品用注射水溶至 10mg/ml,分成两组,一组经 0.45μm 滤器过滤后备用,另一组使用 10kDa 的超滤离心管,5000r/min 离心 30min 后备用。(4) Hib 多糖原液添加一定浓度的 CDAP 后,使用 10kDa 的超滤离心管,5000r/min 离心 30min,滤出液为加标样品溶液。(5)使用 AKTA purifier 纯化仪,洗脱条件为进样完成后继续用注射水洗脱 2 个柱体积,然后立即调用 7.0% 2.0mol/L NaCl 溶液进行洗脱,流速为 1.0ml/min,上样量为 1.0ml。

3. 方法验证:(1)将浓度为 5mg/ml 的 Hib 荚膜精制多糖空白对照品、100μg/L 浓度的 CDAP 标准品、多糖衍生物溶液及经 10kDa 超滤离心管过滤的多糖衍生物溶液上样检测,比较色谱图,观察 CDAP 出峰处有无干扰峰出现。(2)分别配制 4、5、6、7、8、9、10μg/L 的 CDAP 标准品,上样检测结果满足信噪比至少为 3:1 的标准品浓度即为此方法的最低检出限。(3)配制 1mg/L CDAP 标准工作液,用其配制 20、40、60、80、100μg/L 的标准溶液。每次 5 个样品依次上样,共重复检测 5 次,计算相关系数,要求相关系数 ≥ 0.99。(4)分别对加标样品和标准品进行重复性试验,加标样品及标准品中 CDAP 的浓度为均 50μg/L,重复测定 6 次,计算平均值及变异系数,要求变异系数应该 ≤ 5%。(5)分别对低、中、高 3 个浓度的标准品和样品准确度进行验证,每个样品重复测定 3 次,计算平均值后,利用平均值和理论值计算回收率,回收率的范围应为 90% ~ 110%。样品浓度分别为 30、50、70μg/L,标准品浓度分别为 40、60、80μg/L。(6)配制 20、40、60、80、100μg/L 5 个稀释度的 CDAP 标准品,每个稀释度测定 3 次,计算每个稀释度的 3 个测定值之间的 CV 值, CV 值应 ≤ 10%。

结 果

方法学验证:(1) 专属性验证结果:100μg/L 浓度的 CDAP 在 8 ~ 9min 明显出峰(图 1 中 b),而 Hib 荚膜多糖原液对照品在该位置附近未出现任何吸收峰(图 1 中 a),衍生物样品经 10kDa 超滤离心处理后检测在 CDAP 对应位置出现峰,而无其他杂峰(图 1 中 d),证明该方法具有良好的专属性。但是衍生物样品如不经超滤离心管处理,则会在 CDAP 峰前出现另 1 个峰(图 1 中 c),会影响峰面积计算。因此,在检测衍生物 CDAP 含量时,须经 10kDa 以下孔径超滤离心管处理。(2) 最低检出限验证结果:将配制好的

一系列低浓度标准品上样检测,当浓度为 6μg/L 时,其信噪比仍能满足 3:1(表 1),而 5μg/L 时则达不到此信噪比,因此,得到此法的最低检出限为 6μg/L。(3)线性验证结果:试验作了 5 个 CDAP 浓度的标准曲线(表 2、图 2),相关系数 R^2 达到 1, > 0.99,说明其线性成立且相关性较好。(4)精密度验证结果:对加标样品和标准品进行重复性试验,结果显示相对标准偏差结果百分率(RSD,%)均为 0.1%(表 3),远 < 5%,证明该试验的精密度良好。(5)准确度验证结果:选取的低、中、高 3 个浓度加标样品及 CDAP 标准品各 3 份,每份各测 3 次的测定结果见表 4、表 5。回收率均在 95% ~ 105% 之间,证明其准确度良好。(6)测定范围验证结果:配制 5 个稀释度的 CDAP 标准品,每个稀释度测定 3 次。每个稀释度的 3 个测定值之间的 CV 值均 ≤ 1%(表 6),远 < 10%,说明 CDAP 在 20 ~ 100μg/L 范围内可以用该方法检测。

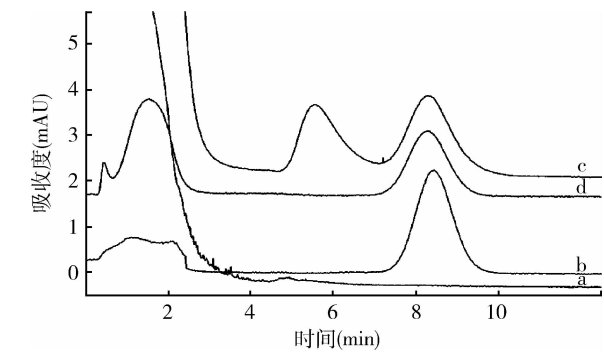


图 1 专属性验证结果

a. Hib 荚膜多糖原液对照品;b. 100μg/L CDAP 标准品;c. 衍生物未经超滤离心管过滤;d. 衍生物经超滤离心管过滤

表 1 最低检出限结果

测试次数	浓度 (μg/L)	保留时间 (min)	信噪比(S/N)
1	6	8.40	3.301
2	6	9.16	3.473
3	6	9.17	4.158
平均值	6	8.91	3.644

表 2 标准曲线测定结果

CDAP 浓度 (μg/L)	保留时间 (min)	峰面积 (mAU × min)	峰高度 (mAU)	检测浓度 (μg/L)
20	8.482	0.481	0.450	19.989
40	8.450	0.960	0.890	39.995
60	8.446	1.440	1.322	60.021
80	8.458	1.920	1.766	80.041
100	8.482	2.398	2.246	99.975

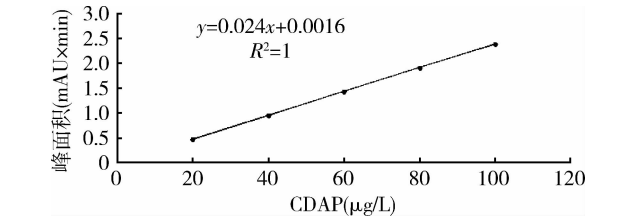


图 2 标准曲线

表 3 精密度测定结果

CDAP 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	检测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
50 (标准品)	49.9987	50.0001	0.0065
	49.9946		
	49.9987		
	49.9987		
	50.0029		
	50.0071		
50 (加标样品)	50.0363	50.0259	0.0292
	50.0405		
	49.9904		
	50.0446		

表 4 样品的准确度测定结果

CDAP 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	检测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
30	30.0238	29.9821	0.9994
	29.9529		
	29.9654		
	29.9487		
	29.9821		
	30.0029		
	29.9904		
	29.9779		
	29.9946		
	50.0363		
50	50.0405	50.0182	1.0004
	49.9904		
	50.0446		
	50.0196		
	50.0238		
	50.028		
	49.9737		
	50.0071		
	70.0572		
	70.0405		
70	70.0238	70.0358	1.0005
	70.0196		
	70.0321		
	70.0328		
	70.0613		
	70.0405		
	70.0238		
	70.0321		
	70.0328		
	70.0613		

表 5 标准品的准确度数据

CDAP 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	检测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
40	41.6091	40.173	1.0043
	40.0405		
	39.9946		
	39.9821		
	39.9779		
	39.9821		
	39.9904		
	39.9821		
	39.9987		
	60.0238		
60	60.0321	60.0196	1.0003
	60.0196		
	60.0071		
	60.0238		
	60.0071		
	60.0196		
	60.0363		
	60.0071		
	80.0363		
	80.0572		
80	80.0196	80.0368	1.0005
	80.0405		
	80.0488		
	80.028		
	80.0363		
	80.0196		
	80.0446		
	80.0446		
	80.0446		
	80.0446		

表 6 测定范围结果

CDAP 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	检测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
20	20.0363	20.021	0.24
	20.0697		
	19.957		
40	39.9779	40.0043	0.07
	40.0405		
	39.9946		
60	60.0238	60.0252	0
	60.0321		
	60.0196		
80	80.0363	80.0377	0.02
	80.0572		
	80.0196		
100	100.3575	100.2046	0.03
	99.8611		
	100.3951		

讨 论

CDAP 活化法以其具备的优势逐步被人重视和应用。反应结束后,除氰酸酯、痕量的无活性的氨基甲酸盐和酰亚胺碳酸盐外,还会有大量的吡啉衍生物,此类物质在 280nm 下具有强吸收^[5]。与马庆华

等^[12]建立的检测方法相比,检测仪器更为普遍,且检测波长即为 280nm,一般蛋白纯化仪器均具备此检测波长,不用再配备 260nm。虽进样量加大,其检出最低限也大幅降低,样品用量也在可接受范围内,也正是因此,使其在精密度、准确度等方面更优于之前的检测方法。除此之外,吡啶衍生物的检测方法还有气相法、HPLC 及波谱(氢谱)法,这些方法的检测下限仅为微克/毫升($\mu\text{g/ml}$)级别,在现行药典中规定,吡啶在药品中的残留限度为 0.02%。因此,利用上述方法基本可以达到检测要求。

在专属性验证过程中发现,如果在多糖原液中直接添加 CDAP 不需滤过,对检测没影响,但在实际反应物中,在游离 CDAP 出峰之前,还会出现另外的峰,会影响到检测结果,经滤过后此峰消失,说明此峰分子质量要 $>10\text{kDa}$,因此推断,该物质应该是由在活化过程中 CDAP 反应不彻底,游离的 CDAP 又与衍生后衍生物的己二酸二酰肼(ADH)上的氨基结合,形成高分子。因此,该高分子物质的出现,可能会从实质上降低衍生率,所以,在后续疫苗生产中应继续优化条件,降低该物质的出现,可提高衍生率,降低 CDAP 的用量。同时,根据检测结果,该高分子吡啶衍生物出现的含量也在纳克(ng)级别,远低于药典规定的限度,不会对疫苗的安全性造成危害。

参考文献

- 1 Zarei AE, Almeshdar HA, Redwan EM. Hib vaccines: past, present, and future perspectives [J]. J Immunol Res, 2016, 2016:7203587
- 2 Zanella RC, Brandileone MCC, Andrade AL, et al. Evaluation of *Haemophilus influenzae* type b carrier status among children 10 years after the introduction of Hib vaccine in Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo

- Cruz, 2015, 110(6):755-759
- 3 Beurret M, Hamidi A, Kreeftenberg H. Development and technology transfer of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines for developing countries [J]. Vaccine, 2012, 30(33):4897-4906
- 4 王明清,管娇琼,朱文勇,等. B 型流感嗜血杆菌疫苗的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44(6):155-157
- 5 Joachim K, Meir W. 1-Cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate as acyulating agent for the covalent attachment of ligand to polysaccharide resins [J]. FEBS Lett, 1983, 154(1):209-210
- 6 Jin Z, Chu C, Robbin JB, et al. Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice [J]. Infect Immunol, 2003, 71(9):5115-5120
- 7 吴雅楠,王明清,朱文勇,等. 通过 CDAP 活化多糖制备 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖-D 蛋白疫苗初探 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(12):22-25
- 8 熊慧玲,王公孝,谭柯,等. 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶·四氟化硼活化 A 群脑膜炎球菌多糖制备的结合疫苗的免疫原性及其工艺稳定性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(12):1497-1502
- 9 谢茂超,陈明拓,姜晓,等. 铜绿假单胞菌 3 型 O-特异性多糖-破伤风类毒素结合疫苗的制备及其免疫特性分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 25(12):1565-1568
- 10 陈玉秋,何建东,范荣坤,等. 22F 型肺炎球菌荚膜多糖的活化及其多糖蛋白结合物的免疫原性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5):479-487
- 11 萧在澜,徐永浩,刘佳,等. CDAP 活化制备 C 群脑膜炎球菌结合疫苗原液的稳定性试验 [J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(5):27-32
- 12 马庆华,傅元欣,冯潇,等. 疫苗中残余 CDAP 检测方法的建立 [J]. 微生物学免疫学进展, 2011, 39(4):34-39

(收稿日期:2016-05-04)

(修回日期:2016-05-31)

压力负荷诱导的大鼠舒张性心力衰竭模型的改良及效果探讨

刘 静 崔海峰 李思耐 林 谦

摘 要 目的 利用改良术式制备压力负荷诱导大鼠舒张性心力衰竭模型并探讨其效果。方法 Wistar 大鼠 40 只随机分为正常组、腹主动脉缩窄 0.6、0.7 及 0.8mm 组。3 组模型大鼠利用改良术式将腹主动脉分别缩窄至 0.6、0.7、0.8mm,观测术后大鼠存活率。术后 8 周及 12 周进行超声心动检测,术后 12 周检测血流动力学舒张功能指标。结果 术后模型组存活率分别为:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81373779)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院(刘静、李思耐、林谦);中国中医科学院医学实验中心(崔海峰)

通讯作者:林谦,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:13910565673@126.com