



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018253 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910300815.4

(22)申请日 2019.04.15

(71)申请人 艾美卫信生物药业(浙江)有限公司

地址 315609 浙江省宁波市宁海县科技工业园竹泉路29号

(72)发明人 曹方 马伟 李强

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/34(2006.01)

G01N 30/74(2006.01)

G01N 30/86(2006.01)

G01N 30/88(2006.01)

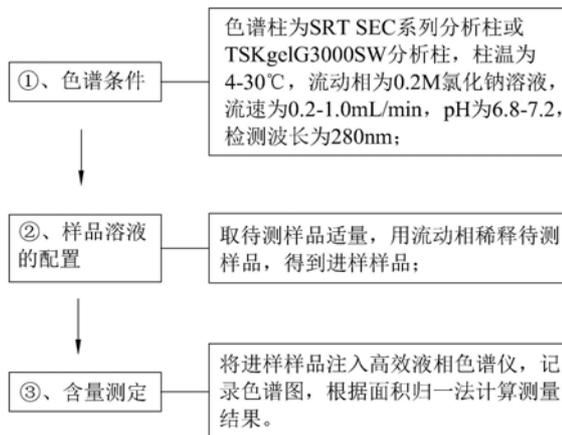
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法

(57)摘要

本发明属于游离蛋白含量的检测领域,特别公开一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,包括色谱条件:色谱柱SRT SEC系列分析柱或TSKgel G3000SW分析柱,柱温4-30℃,流动相0.2M氯化钠溶液,流速0.2-1.0mL/min,pH 6.8-7.2,检测波长280nm;样品溶液的配制:取待测样品适量,用流动相稀释,得到进样样品;含量测定:将进样样品注入高效液相色谱仪,记录色谱图,并计算测量结果。本发明能够精确测定出结合疫苗中游离的CRM197蛋白的含量,保证了结合疫苗的有效性和安全性,具有成本低廉、精确度高、重复性好、检测简便快捷、便于被广泛推广和应用的特点。



1. 一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,包括以下步骤:

①、色谱条件:

色谱柱为SRT SEC系列分析柱或TSKgelG3000SW分析柱,柱温为4-30℃,流动相为0.2M氯化钠溶液,流速为0.2-1.0mL/min,pH为6.8-7.2,检测波长为280nm;

②、样品溶液的配制:

取待测样品适量,用流动相稀释待测样品,得到进样样品;

③、含量测定:

将进样样品注入高效液相色谱仪,记录色谱图,根据面积归一法计算测量结果。

2. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述SRT SEC系列分析柱为SRT SEC-300分析柱,所述TSKgelG3000SW分析柱的规格为7.5mm×600mm。

3. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述柱温为20-26℃。

4. 根据权利要求3所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述柱温为 $23 \pm 1$ ℃。

5. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述流速为0.4-0.75mL/min。

6. 根据权利要求5所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述流速为0.5mL/min。

7. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤①中,所述pH为 $7.0 \pm 0.02$ 。

8. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤②中,所述进样样品中总蛋白含量为 $> 12.5 \mu\text{g}$ 。

9. 根据权利要求8所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,步骤②中,所述进样样品中总蛋白含量为20-50 $\mu\text{g}$ 。

10. 根据权利要求1所述的一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其特征在于,适用于结合疫苗中游离CRM197蛋白的含量测定。

## 一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于游离蛋白含量的检测技术领域,特别涉及一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法。

### 背景技术

[0002] 多糖疫苗可对成人提供良好的免疫保护作用,但对2周岁以下儿童几乎无作用,原因是CPS为胸腺非依赖性抗原(Thymus independent antigen, TI-Ag),研究表明,将多糖与蛋白载体偶联制备结合疫苗,可使TI-Ag转变为胸腺依赖性抗原(Thymus dependent antigen, TD-Ag),改变CPS的抗原性质,增强其免疫原性,诱导出免疫记忆,为2岁以下儿童提供长期的保护作用。

[0003] 在结合疫苗的制备过程中,会存在少量的载体蛋白未能与多糖结合,这部分的载体蛋白即成为游离蛋白。目前常用的载体蛋白包括有破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、白喉减毒毒素(CRM197蛋白)以及其他可起到载体蛋白效应的氨基酸片段。

[0004] 研究表明,游离蛋白含量超过规定的限度可能会降低疫苗的免疫原性或提高副作用的发生率,WHO推荐在细菌多糖蛋白结合疫苗中游离蛋白含量应小于总蛋白含量的5%,因此,结合疫苗中游离蛋白含量是疫苗质量控制的重要指标。

[0005] 现有检测结合疫苗中游离蛋白含量的方法主要有聚丙烯酰胺凝胶电泳法(简称SDS-PAGE法)和高效液相色谱法(简称HPLC法)。其中SDS-PAGE法具有试验周期长,精密度低,准确度差,重复性较差等缺点。HPLC法相比较简便、精密度高、准确度高、重复性高,但是要建立良好的HPLC检测结合疫苗中游离蛋白的方法,又受到结合疫苗的性质、载体蛋白的性质、检测分析柱的选型等各方面的影响。

[0006] 其中,游离蛋白最常使用的检测标准为2015版《中国药典》记载的HPLC法。然而,本申请人在使用该检测方法检测由白喉减毒毒素(CRM197蛋白)作为载体蛋白而制成的结合疫苗时,该结合疫苗中游离的CRM197蛋白难以精确检出其含量,由此,使得该结合疫苗具有较高的安全隐患。

### 发明内容

[0007] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,其通过结合CRM197蛋白的性质,对色谱柱、流动相以及各项实验参数加以摸索,筛选出了一种高效、精密、准确的高效液相测定方法,能够精确测定结合疫苗中游离的CRM197蛋白的含量。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,包括以下步骤:

①、色谱条件:色谱柱为SRT SEC系列分析柱或TSKgelG3000SW分析柱,柱温为4-30℃,流动相为0.2M氯化钠溶液,流速为0.2-1.0mL/min, pH为6.8-7.2,检测波长为280nm;

②、样品溶液的配制:取待测样品适量,用流动相稀释待测样品,得到进样样品种;

③、含量测定：将进样样品注入高效液相色谱仪，记录色谱图，根据面积归一法计算测量结果。

[0009] 本发明通过采用上述技术方案，结合疫苗中游离的CRM197蛋白能够在SRT SEC系列分析柱或TSKgel G3000SW分析柱中用0.2M氯化钠以0.2-1.0mL/min的流速洗脱出来，使得结合疫苗中的结合物和游离蛋白有效分离，从而有助于高效液相色谱仪精确测定出游离的CRM197蛋白的含量，操作人员可根据其检测结果对结合疫苗的生产加以管控，以保证结合疫苗的有效效价和安全性。其中，0.2M氯化钠溶液组分简单，相对于PBS缓冲液还能减少成本，从而使得本发明的测定方法在一定程度上有效降低了检测成本，便于被广泛推广和应用。

[0010] 进一步地，步骤①中，所述SRT SEC系列分析柱为SRT SEC-300分析柱，所述TSKgelG3000SW分析柱的规格为7.5mm×600mm。

[0011] 通过采用上述技术方案，通常情况下，分析柱的柱长越长，分离度越好，但是同时会导致游离蛋白的保留时间增加，从而使得色谱图中游离蛋白的出峰较晚；此外，SRT SEC-300分析柱相对于SRT SEC-600分析柱和TSKgelG3000SW分析柱成本较低。基于此，SRT SEC系列分析柱优选SRT SEC-300分析柱，TSKgelG3000SW分析柱的规格优选为7.5mm×600mm，且两个分析柱中优选SRT SEC-300分析柱；

进一步地，步骤①中，所述柱温为20-26℃。

[0012] 进一步地，步骤①中，所述柱温为23±1℃。

[0013] 通过采用上述技术方案，20-26℃通常为实验室的室温，柱温在该温度下能够精确的对CRM197蛋白的含量加以测定，同时减少实验室为控制实验温度而对柱温加以调控，在一定程度上降低了游离蛋白的检测成本。其中，当柱温为23±1℃时，其检测精确度最高。

[0014] 进一步地，步骤①中，所述流速为0.4-0.75mL/min。

[0015] 进一步地，步骤①中，所述流速为0.5mL/min。

[0016] 通过采用上述技术方案，经过大量实验验证，当流速为0.4-0.75mL/min时，CRM197蛋白在SRT SEC-300分析柱中的蛋白回收率较高，其中0.5mL/min时最优。

[0017] 进一步地，步骤①中，所述pH为7.0±0.02。

[0018] 通过采用上述技术方案，当pH为7.0±0.02时，CRM197蛋白能够保持其自身的结构特性，使得CRM197蛋白与其形成的结构蛋白有效分离，提高检测的精确度。

[0019] 进一步地，步骤②中，所述进样样品中总蛋白含量为>12.5μg。

[0020] 进一步地，步骤②中，所述进样样品中总蛋白含量为20-50μg。

[0021] 通过采用上述技术方案，当进样样品中的总蛋白含量为>12.5μg时，能够精确测定出结合疫苗中的CRM197蛋白的含量。其中，将进样样品的总蛋白含量控制在20-50μg，能够减少待测样品的用量，从而在一定程度上减少了游离蛋白的检测成本。

[0022] 进一步地，本发明的测定方法适用于结合疫苗中游离CRM197蛋白的含量测定。

[0023] 综上所述，本发明具有以下有益效果：

1、本发明对色谱柱、流动相以及各项实验参数加以摸索，能够精确测定出结合疫苗中游离的CRM197蛋白的含量，保证了结合疫苗的有效效价和安全性，具有成本低廉、精确度高、重复性好、检测简便快捷、便于被广泛推广和应用的特点；

2、本发明通过进一步限定色谱柱的规格和柱温、流动相的流速和pH、进样样品中的蛋

白浓度以及蛋白对照品,有效提高了游离CRM197蛋白含量的检测精确度和重复性。

## 附图说明

[0024] 图1为测定结合疫苗中游离蛋白含量的操作流程图中;

图2为结合物a的色谱图;

图3为结合物b的色谱图;

图4为结合物c的色谱图。

## 具体实施方式

[0025] 以下结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0026] 一、检测使用设备及溶液

1、设备及型号:安捷伦1260高效液相色谱仪。

[0027] 2、色谱柱:

东曹株式会社TSKgelG3000SW (7.5mm×600mm) 分析柱;

东曹株式会社TSKgel G5000PWXL (7.8mm×300mm) 分析柱;

苏州赛分科技有限公司SRT SEC-300 (7.8mm×300mm) 分析柱;

苏州赛分科技有限公司SRT SEC-600 (7.8mm×600mm) 分析柱。

[0028] 3、流动相:

注射用水;

0.45wt%氯化钠溶液、0.9wt%氯化钠溶液和0.2M氯化钠溶液均使用注射用水与氯化钠色谱级按比例配制而成;

PBS缓冲液:50mM PB+0.3mol/L NaCl。

[0029] 4、蛋白:

蛋白对照品:本申请所采用的蛋白对照品和结合疫苗载体蛋白相同,即为CRM197蛋白,是通过发酵、提纯、盐析、柱纯化、冻干等一系列手段获得纯度≥95%的冻干粉,亦可通过第三方购买获得CRM197蛋白粉。本专利中所用的CRM197蛋白相关信息为:本企业自制,批号201810006。

[0030] 5、测定样品:

本发明以脑膜炎球菌多糖结合疫苗、b型流感嗜血杆菌多糖结合疫苗、肺炎链球菌多糖结合疫苗为例,但不单单限于这三种结合疫苗,作为测定样品,依次命名为结合物a、结合物b、结合物c。本专利中所用的结合物a、结合物b、结合物c均为本企业自制,其中结合物a的生产批号为201803004,结合物b的生产批号为201804001,结合物c的生产批号为201806003。

[0031] 二、检测方法具体实施过程

一种生物制品中游离蛋白含量的高效液相测定方法,参见图1,包括以下步骤:

①、色谱条件:色谱柱为SRT SEC系列分析柱或TSKgelG3000SW分析柱,柱温为4-30℃,流动相为0.2M氯化钠溶液,流速为0.2-1.0mL/min,pH为6.8-7.2,检测波长为280nm。

[0032] ②、样品溶液的配制:取待测样品适量,用0.2M氯化钠溶液稀释待测样品,得到进样样品;

③、含量测定:将进样样品注入高效液相色谱仪,记录色谱图,根据面积归一法计算测

量结果。

[0033] 1、流动相的选择及专属性确认

选用东曹株式会社TSKG5000PWXL分析柱(2015版中国药典推荐用),在结合物a、结合物b、结合物c中分别加入5wt%的CRM197蛋白作为进样样品,使用100 $\mu$ l进样环将进样样品注入高效液相色谱仪的分析柱中,分别使用注射用水、0.45wt%氯化钠、0.90wt%氯化钠、0.2M 氯化钠以及PBS缓冲液作为流动相,同时设定柱温为 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、流速为0.5mL/min、pH为 $7.0\pm 0.02$ 、检测波长为280nm。根据色谱图的出峰情况以及信噪比,分析进样样品适宜的流动相,各组重复试验3次,测定结果参见下表一。

表一 4种流动相洗脱CRM197蛋白时的信噪比

| 结合物   | 流动相        | 次数 | 是否出现明显的结合物特征峰 | 是否出现明显的CRM197 蛋白特征峰 | CRM197 蛋白的信噪比 |
|-------|------------|----|---------------|---------------------|---------------|
| 结合物 a | 注射用水       | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.45wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.90wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | √                   | 212           |
|       | 0.2M 氯化钠   | 1  | √             | √                   | 434           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 321           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 482           |
|       | PBS 缓冲液    | 1  | √             | √                   | 352           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 421           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 378           |
| 结合物 b | 注射用水       | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.45wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.90wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | √                   | 238           |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.2M 氯化钠   | 1  | √             | √                   | 404           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 381           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 422           |
|       | PBS 缓冲液    | 1  | √             | √                   | 432           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 415           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 368           |
| 结合物 c | 注射用水       | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.45wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.90wt%氯化钠 | 1  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 2  | √             | ×                   | 0             |
|       |            | 3  | √             | ×                   | 0             |
|       | 0.2M 氯化钠   | 1  | √             | √                   | 388           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 452           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 406           |
|       | PBS 缓冲液    | 1  | √             | √                   | 452           |
|       |            | 2  | √             | √                   | 398           |
|       |            | 3  | √             | √                   | 420           |

[0034] 参见表一,使用注射用水或0.45wt%氯化钠作为流动相时,仅出现明显的结合物

特征峰,不能出现明显的CRM197蛋白特征峰,且信噪比为0。使用0.90wt%氯化钠作为流动相时,3次试验仅有1次同时有明显的结合物特征峰和明显的CRM197蛋白特征峰。由此,以注射用水以及0.45wt%氯化钠和0.90wt%氯化钠作为流动相,难以检测出或难以稳定检测出结合疫苗中的游离蛋白的特征峰。

[0035] 使用0.2M氯化钠和PBS缓冲液作为流动相时,其测定结果能同时有明显的结合物特征峰和明显的CRM197蛋白特征峰,且信噪比较高。但是由于PBS缓冲液组分复杂且成本较高,本发明使用0.2M的氯化钠便能达到与PBS缓冲液相近的检测结果,有效降低了检测成本,因此优选0.2M氯化钠作为流动相。

#### [0036] 2、分析柱的选择

采用0.2M氯化钠溶液为流动相、流速为0.5mL/min、pH为7.0±0.02、检测波长为280nm,分别在结合物a、结合物b和结合物c中加入5wt%的CRM197蛋白作为进样样品种,选用不同色谱柱:东曹株式会社TSKgel G3000SW (7.5mm×600mm)分析柱、东曹株式会社TSKgel G5000PWXL (7.8mm×300mm)分析柱、苏州赛分科技有限公司SRT SEC-300 (7.8mm×300mm)分析柱、苏州赛分科技有限公司SRT SEC-600 (7.8mm×600mm)分析柱,使用100 μl进样环将进样样品种注入高效液相色谱仪的分析柱中,控制柱温为23±1℃进行过柱分析。通过评价结合物的信噪比以及结合物与CRM197蛋白的分离度,最终选择适宜的分析柱,测定结果参见下表二。

表二 结合物和CRM197蛋白的信噪比和分离度

| 结合物   | 流动相                               | 结合物的信噪比 | 结合物与CRM197蛋白的分离度 |
|-------|-----------------------------------|---------|------------------|
| 结合物 a | TSKgel G3000SW<br>(7.5mm×600mm)   | 258     | 1.89             |
|       | TSKgel G5000PWXL<br>(7.8mm×300mm) | 412     | 1.34             |
|       | SRT SEC-300<br>(7.8mm×300mm)      | 423     | 1.92             |
|       | SRT SEC-600<br>(7.8mm×600mm)      | 430     | 1.94             |
| 结合物 b | TSKgel G3000SW<br>(7.5mm×600mm)   | 340     | 1.80             |
|       | TSKgel G5000PWXL<br>(7.8mm×300mm) | 428     | 1.36             |
|       | SRT SEC-300<br>(7.8mm×300mm)      | 413     | 1.90             |
|       | SRT SEC-600<br>(7.8mm×600mm)      | 430     | 1.91             |
| 结合物 c | TSKgel G3000SW<br>(7.5mm×600mm)   | 275     | 1.85             |
|       | TSKgel G5000PWXL<br>(7.8mm×300mm) | 390     | 1.30             |
|       | SRT SEC-300<br>(7.8mm×300mm)      | 420     | 1.92             |
|       | SRT SEC-600<br>(7.8mm×600mm)      | 443     | 1.98             |

[0037] 参见表二,TSKgel G5000PWXL分析柱分离样品时,分离度略小于1.5不符合分离要

求,该分析柱虽能检出CRM197蛋白的存在与否,但难以准确测定出CRM197蛋白的含量。因此,在本实验条件下不适用。TSKgel G3000SW分析柱、SRT SEC-300和SRT SEC-600分析柱分离效果差距不大,都达到分离度 $>1.5$ 的分离要求。但是考虑到TSKgel G3000SW分析柱的成本明显高于SRT SEC-300分析柱和SRT SEC-600的成本,而且前者的信噪比明显低于后者的信噪比,因此优先选择SRT SEC系列分析柱作为检定的分析柱。

[0038] 另外,使用长度为300mm以及600mm的SRT SEC系列分析柱分离样品时,分离度相近且均 $>1.90$ ,分析柱的分离度都较好。考虑到“柱长越长,分离度越好,但是同时会导致游离蛋白的保留时间增加,色谱图中游离蛋白的出峰较晚”这一特性,SRT SEC-300分析柱检测相比SRT SEC-600分析柱要更快捷,最后优先选择SRT SEC-300分析柱作为检定的分析柱。

#### [0039] 3、检测限及定量限的确定

采用色谱柱为SRT SEC-300 (7.8mm $\times$ 300mm) 分析柱、柱温为 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、0.2M氯化钠作为流动相、流速为0.5mL/min、pH为 $7.0\pm 0.02$ 、检测波长为280nm,分别在结合物a、结合物 b和结合物c中加入不同含量的CRM197蛋白对照品作为进样样品,使用100 $\mu\text{l}$ 进样环将进样样品注入高效液相色谱仪的分析柱中进行分析。通过评价CRM197蛋白的信噪比,确定合理的进样蛋白含量,检测结果参见下表三。

表三 不同浓度CRM197蛋白的信噪比

| CRM197 蛋白含量/ $\mu\text{g}$ | 25.0 | 15.0 | 10.0 | 5.0 | 2.5 | 1.25 | 1.0 | 0.625 | 0.3125 | 0.15625 |
|----------------------------|------|------|------|-----|-----|------|-----|-------|--------|---------|
| 结合物 a 中 CRM197 蛋白的信噪比      | 434  | 482  | 354  | 103 | 55  | 29   | 23  | 12.5  | 6.6    | 3.1     |
| 结合物 b 中 CRM197 蛋白的信噪比      | 432  | 465  | 369  | 122 | 61  | 30   | 25  | 13.0  | 7.0    | 2.9     |
| 结合物 c 中 CRM197 蛋白的信噪比      | 412  | 443  | 348  | 100 | 53  | 28   | 22  | 11.3  | 5.6    | 2.3     |

[0040] 参见表三,根据检测结果,可以确定有无CRM197蛋白的检测限约在0.15625 $\mu\text{g}$  (重量单位),再结合行业标准中信噪比 $>10.0$ 的规定,可以确定CRM197蛋白含量的定量限约在0.625 $\mu\text{g}$  (重量单位)。

[0041] 根据定量限的数值,以及本样品中对于游离蛋白的质量标准要求(应小于5%),大致可以确定进样样品中总蛋白含量最小应在 $0.625\mu\text{g}\div 5\%=12.5\mu\text{g}$  (重量单位)以上为佳。考虑到样品成本及试验的可控性,蛋白样品浓度上限根据样品特性可在分析柱可承受范围内进行自行确定。本发明中,进样样品中总蛋白含量在20-50 $\mu\text{g}$ 之间时,其对应的信噪比均 $>10.0$ ,以此不但能够较好的测定出CRM197蛋白的含量,还能有效降低样品的使用量,具有检测结果精确、检测成本低的特点,因此进样样品的总蛋白含量优选为20-50 $\mu\text{g}$ 。

#### [0042] 4、柱温的选择

采用色谱柱为SRT SEC-300 (7.8mm $\times$ 300mm)、流动相为0.2M氯化钠溶液、流速为0.5mL/min、pH为 $7.0\pm 0.02$ 、检测波长为280nm、固定进样体积为100 $\mu\text{l}$ ,在结合物a、结合物b、结合物c中分别加入5wt%的CRM197蛋白作为试验样品,通过评价CRM197蛋白的信噪比和分离度,确定合理的柱温,检测结果参见下表四。

表四 不同柱温对CRM197蛋白的信噪比和分离度的影响

|                      | 柱温/℃ | CRM197 蛋白的信噪比 | 结合物与 CRM197 蛋白的分离度 |
|----------------------|------|---------------|--------------------|
| 结合物 a+5wt% CRM197 蛋白 | 4    | 89            | 1.82               |
|                      | 8    | 154           | 1.87               |
|                      | 15   | 339           | 1.90               |
|                      | 20   | 415           | 1.93               |
|                      | 23   | 443           | 1.95               |
|                      | 26   | 460           | 1.95               |
|                      | 30   | 438           | 1.91               |
| 结合物 b+5wt% CRM197 蛋白 | 4    | 94            | 1.85               |
|                      | 8    | 177           | 1.88               |
|                      | 15   | 370           | 1.89               |
|                      | 20   | 436           | 1.90               |
|                      | 23   | 476           | 1.92               |
|                      | 26   | 423           | 1.92               |
|                      | 30   | 410           | 1.90               |
| 结合物 c+5wt% CRM197 蛋白 | 4    | 112           | 1.88               |
|                      | 8    | 243           | 1.90               |
|                      | 15   | 412           | 1.90               |
|                      | 20   | 433           | 1.92               |
|                      | 23   | 456           | 1.93               |
|                      | 26   | 460           | 1.92               |
|                      | 30   | 415           | 1.90               |

[0043] 参见表四,柱温设定在4-30℃时,CRM197蛋白的信噪比均>10.0,结合物与CRM197蛋白的分离度均>1.5,因此可在本实验条件下适用。其中,当柱温在20-26℃时,CRM197蛋白的信噪比以及结合物与CRM197蛋白的分离度较高,进一步优选为23±1℃的柱温。

#### [0044] 5、pH的选择

采用色谱柱为SRT SEC-300 (7.8mm×300mm)、柱温为23±1℃、流动相为0.2M氯化钠溶液、流速为0.5mL/min、检测波长为280nm、固定进样体积为100μl,在结合物a、结合物b、结合物c中分别加入5wt%的CRM197蛋白作为试验样品,通过评价CRM197蛋白的信噪比和分离度,确定合理的pH,检测结果参见下表五。

表五 不同pH对CRM197蛋白的信噪比和分离度的影响

|                      | pH       | CRM197 蛋白的信噪比 | 结合物与 CRM197 蛋白的分离度 |
|----------------------|----------|---------------|--------------------|
| 结合物 a+5wt% CRM197 蛋白 | 6.8±0.02 | 410           | 1.92               |
|                      | 7.0±0.02 | 443           | 1.95               |
|                      | 7.2±0.02 | 378           | 1.93               |
| 结合物 b+5wt% CRM197 蛋白 | 6.8±0.02 | 425           | 1.90               |
|                      | 7.0±0.02 | 476           | 1.92               |
|                      | 7.2±0.02 | 413           | 1.89               |
| 结合物 c+5wt% CRM197 蛋白 | 6.8±0.02 | 385           | 1.90               |
|                      | 7.0±0.02 | 456           | 1.93               |
|                      | 7.2±0.02 | 403           | 1.91               |

[0045] 参见表五,pH设定在6.8-7.2时,CRM197蛋白的信噪比均>350,结合物与CRM197

蛋白的分离度均 $>1.5$ ,因此可在本实验条件下适用。其中,当pH在 $7.0\pm 0.02$ 时,CRM197 蛋白的信噪比以及结合物与CRM197蛋白的分离度较高,因此优选pH为 $7.0\pm 0.02$ 。

#### [0046] 6、准确度及重复性的确认

本实验设计以加样回收率来考察本检测方法的精确度,每个样品检测三次进行重复性判定。

[0047] 色谱条件:采用色谱柱为SRT SEC-300 (7.8mm $\times$ 300mm)、柱温为 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、流动相为0.2M氯化钠溶液、流速为0.2-1.0mL/min、pH为 $7.0\pm 0.02$ 、检测波长为280nm,固定进样体积为100 $\mu\text{l}$ 。

[0048] 样品准备:选用结合物a、结合物b和结合物c作为样品,用0.2M氯化钠稀释样品至蛋白浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,各取1mL,分别加入0wt%、1wt%、3wt%、5wt%的CRM197蛋白,检测结果参见下表六-表八,由于不同流速的色谱图之间主要区别点在于出峰时间不同,因此以流速0.5mL/min为例,对应得到如图2-图4所示的色谱图。

表六 测定结合物a的准确度和重复性

| 样品名称                     | 流速<br>mL/min | 结合物<br>信噪比 | 分离<br>度 | CRM197 蛋<br>白面积比% | CRM197 蛋<br>白回收率% | CV<br>% |
|--------------------------|--------------|------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| 结合物<br>+0wt%CRM197<br>蛋白 | 0.2          | 457        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                          | 0.4          | 446        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                          | 0.5          | 431        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                          | 0.75         | 421        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                          | 1.0          | 415        | /       | 0                 | /                 | /       |
| 结合物<br>+1wt%CRM197<br>蛋白 | 0.2          | 486        | 1.75    | 1.121             | 112.10            | 3.53    |
|                          | 0.4          | 458        | 1.75    | 1.113             | 111.30            |         |
|                          | 0.5          | 446        | 1.75    | 1.026             | 102.60            |         |
|                          | 0.75         | 420        | 1.75    | 1.110             | 111.00            |         |
|                          | 1.0          | 473        | 1.75    | 1.089             | 108.90            |         |
| 结合物<br>+3wt%CRM197<br>蛋白 | 0.2          | 390        | 1.74    | 2.893             | 96.43             | 4.14    |
|                          | 0.4          | 430        | 1.74    | 2.995             | 99.83             |         |
|                          | 0.5          | 416        | 1.74    | 2.941             | 98.03             |         |
|                          | 0.75         | 423        | 1.74    | 3.123             | 104.10            |         |
|                          | 1.0          | 439        | 1.74    | 3.193             | 106.43            |         |
| 结合物<br>+5wt%CRM197<br>蛋白 | 0.2          | 431        | 1.70    | 5.341             | 106.82            | 4.88    |
|                          | 0.4          | 412        | 1.70    | 5.320             | 106.40            |         |
|                          | 0.5          | 389        | 1.70    | 5.146             | 102.92            |         |
|                          | 0.75         | 425        | 1.70    | 4.960             | 99.20             |         |
|                          | 1.0          | 403        | 1.70    | 4.881             | 97.62             |         |

表七 测定结合物b的准确度和重复性

| 游离蛋白浓度%                   | 流速<br>mL/min | 结合物<br>信噪比 | 分离<br>度 | CRM197 蛋<br>白面积比% | CRM197 蛋<br>白回收率% | CV<br>% |
|---------------------------|--------------|------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| 结合物<br>+0wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 438        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.4          | 430        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.5          | 431        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.75         | 425        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 1.0          | 410        | /       | 0                 | /                 | /       |
| 结合物<br>+1wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 426        | 1.75    | 1.115             | 111.50            | 3.49    |
|                           | 0.4          | 470        | 1.75    | 1.150             | 115.00            |         |
|                           | 0.5          | 446        | 1.75    | 1.051             | 105.10            |         |
|                           | 0.75         | 465        | 1.75    | 1.132             | 113.20            |         |
|                           | 1.0          | 473        | 1.75    | 1.089             | 108.90            |         |
| 结合物<br>+3wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 398        | 1.74    | 2.893             | 96.43             | 3.82    |
|                           | 0.4          | 422        | 1.74    | 2.985             | 99.50             |         |
|                           | 0.5          | 416        | 1.74    | 2.941             | 98.03             |         |
|                           | 0.75         | 445        | 1.74    | 3.021             | 100.70            |         |
|                           | 1.0          | 439        | 1.74    | 3.193             | 106.43            |         |
| 结合物<br>+5wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 428        | 1.70    | 5.240             | 104.80            | 2.71    |
|                           | 0.4          | 412        | 1.70    | 5.086             | 101.72            |         |
|                           | 0.5          | 395        | 1.70    | 5.105             | 102.10            |         |
|                           | 0.75         | 432        | 1.70    | 4.876             | 97.52             |         |
|                           | 1.0          | 403        | 1.70    | 4.980             | 99.60             |         |

表八 测定结合物c的准确度和重复性

| 游离蛋白浓度%                   | 流速<br>mL/min | 结合物<br>信噪比 | 分离<br>度 | CRM197 蛋<br>白面积比% | CRM197 蛋<br>白回收率% | CV<br>% |
|---------------------------|--------------|------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| 结合物<br>+0wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 417        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.4          | 420        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.5          | 435        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 0.75         | 420        | /       | 0                 | /                 | /       |
|                           | 1.0          | 411        | /       | 0                 | /                 | /       |
| 结合物<br>+1wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 443        | 1.75    | 1.103             | 101.30            | 4.45    |
|                           | 0.4          | 462        | 1.75    | 1.142             | 114.20            |         |
|                           | 0.5          | 440        | 1.75    | 1.050             | 105.00            |         |
|                           | 0.75         | 423        | 1.75    | 1.185             | 118.50            |         |
|                           | 1.0          | 454        | 1.75    | 1.130             | 113.00            |         |
| 结合物<br>+3wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 412        | 1.74    | 2.805             | 93.50             | 4.37    |
|                           | 0.4          | 379        | 1.74    | 2.973             | 99.10             |         |
|                           | 0.5          | 416        | 1.74    | 2.941             | 98.03             |         |
|                           | 0.75         | 465        | 1.74    | 3.130             | 104.33            |         |
|                           | 1.0          | 430        | 1.74    | 3.098             | 103.27            |         |
| 结合物<br>+5wt%CRM197 蛋<br>白 | 0.2          | 420        | 1.70    | 5.245             | 104.90            | 2.24    |
|                           | 0.4          | 418        | 1.70    | 5.116             | 102.32            |         |
|                           | 0.5          | 398        | 1.70    | 5.185             | 103.70            |         |
|                           | 0.75         | 412        | 1.70    | 4.976             | 99.52             |         |
|                           | 1.0          | 423        | 1.70    | 4.983             | 99.66             |         |

[0049] 参见表六至表八,本发明以脑膜炎双球菌结合疫苗、Hib结合疫苗、肺炎球菌结合疫苗对应的结合物为样品,加入样品中的CRM197蛋白在设定的试验参数和条件下,回收率皆处于80-120%的范围之间、CV%皆小于5%,由此表示本检测方法准确可信,可重复性较高。其中,当流速为0.4-0.75mL/min时,CRM197蛋白的回收率在95-107%的范围之间,并呈先上升后下降的趋势,因此优选流速为0.4-0.75mL/min,进一步优选的流速为0.5mL/min。

[0050] 7、总结

综上,本发明中色谱柱优选为SRT SEC系列分析柱,次选为TSKgelG3000SW(7.5mm×600mm)分析柱,柱温为4-30℃,流动相为0.2M氯化钠溶液,流速为0.2-1.0mL/min,pH为6.8-7.2,检测波长为280nm;进样样品中总蛋白含量为>12.5μg;蛋白对照品为CRM197蛋白。以此,能够精确测定出结合疫苗中游离的CRM197蛋白的含量,保证了结合疫苗的有效效价和安全性,具有成本低廉、精确度高、重复性好、检测简便快捷、便于被广泛推广和应用的特点。

[0051] 本具体实施例仅仅是对本发明的解释,其并不是对本发明的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

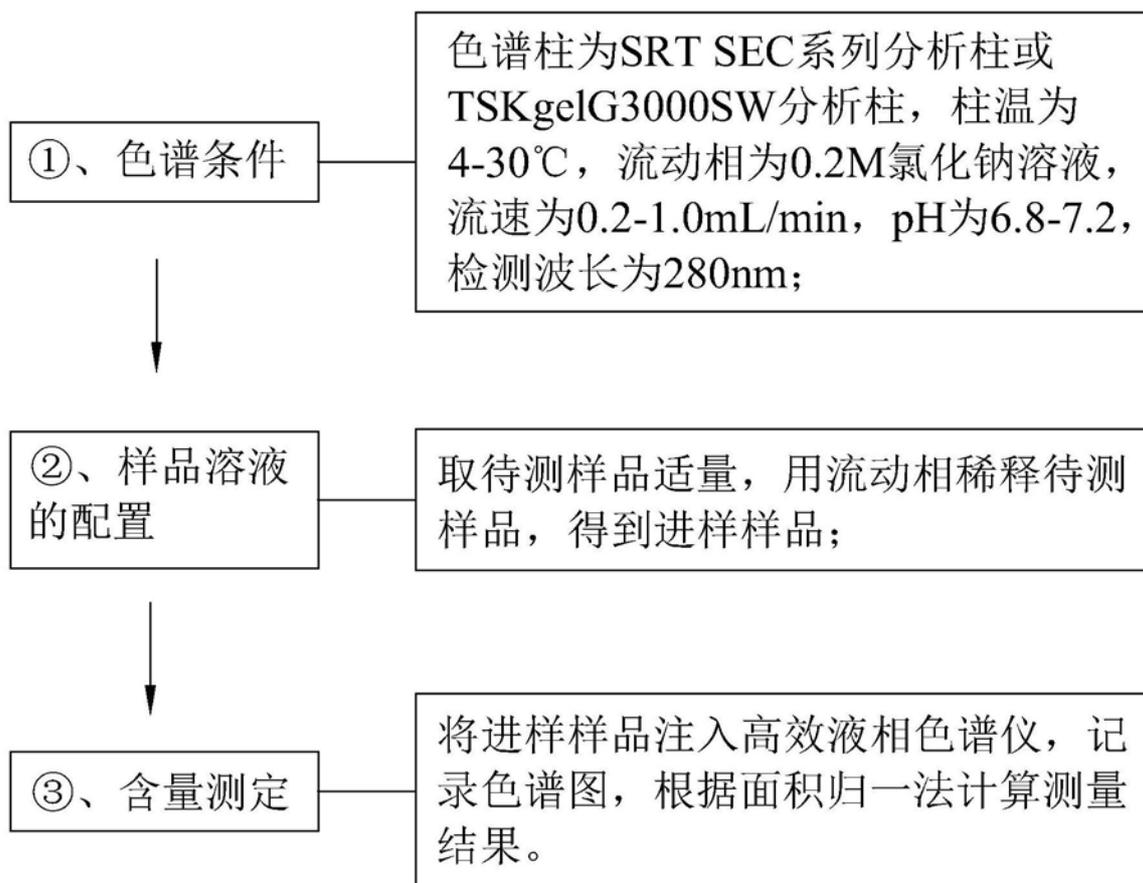


图1

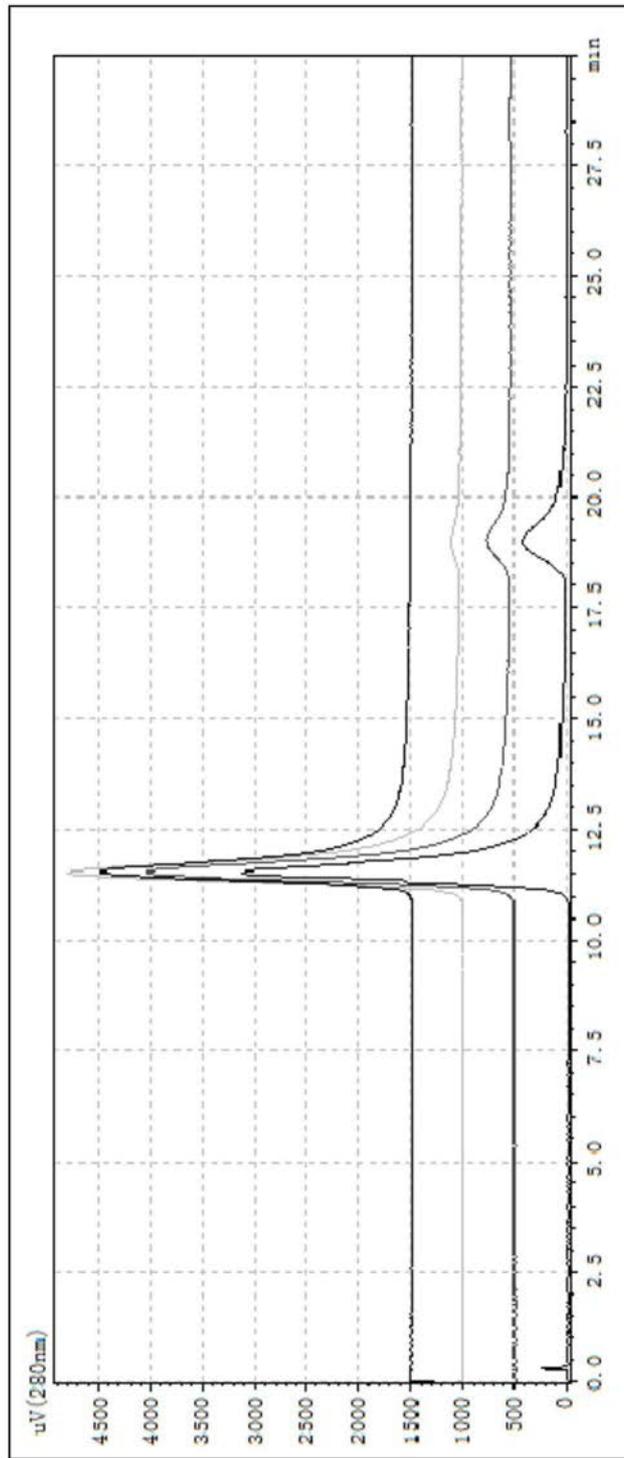


图2

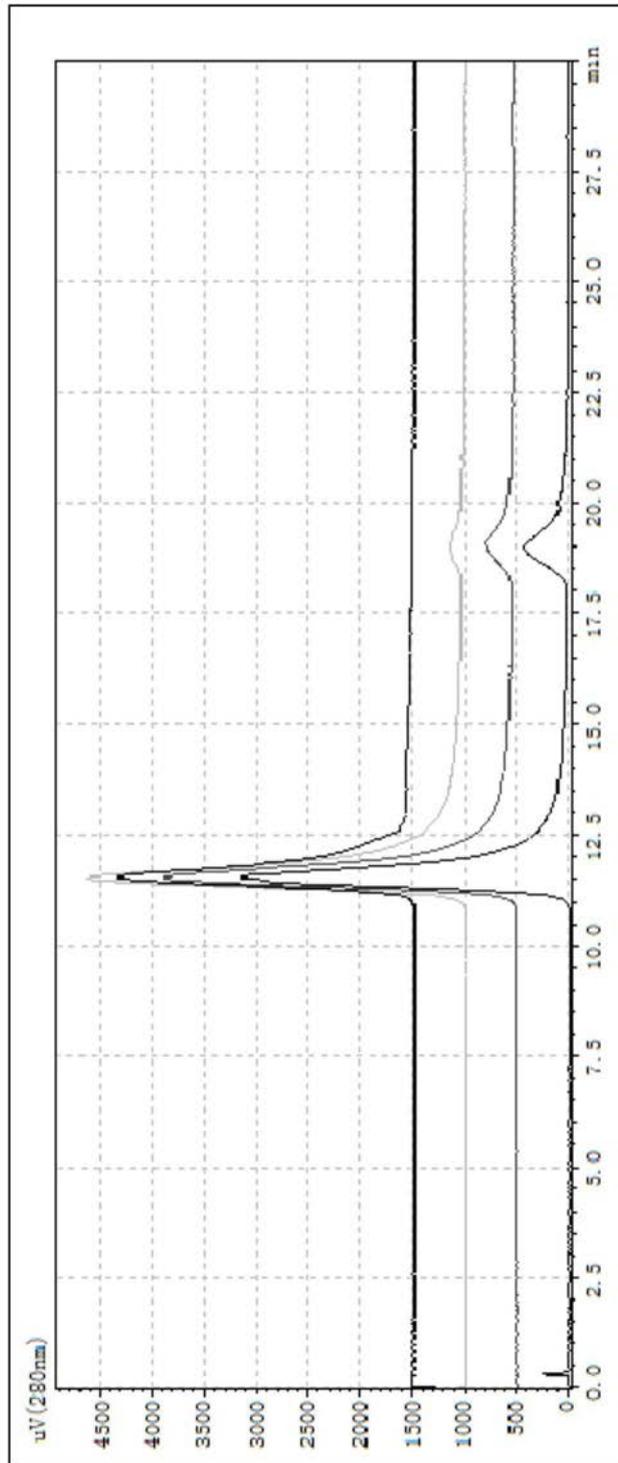


图3

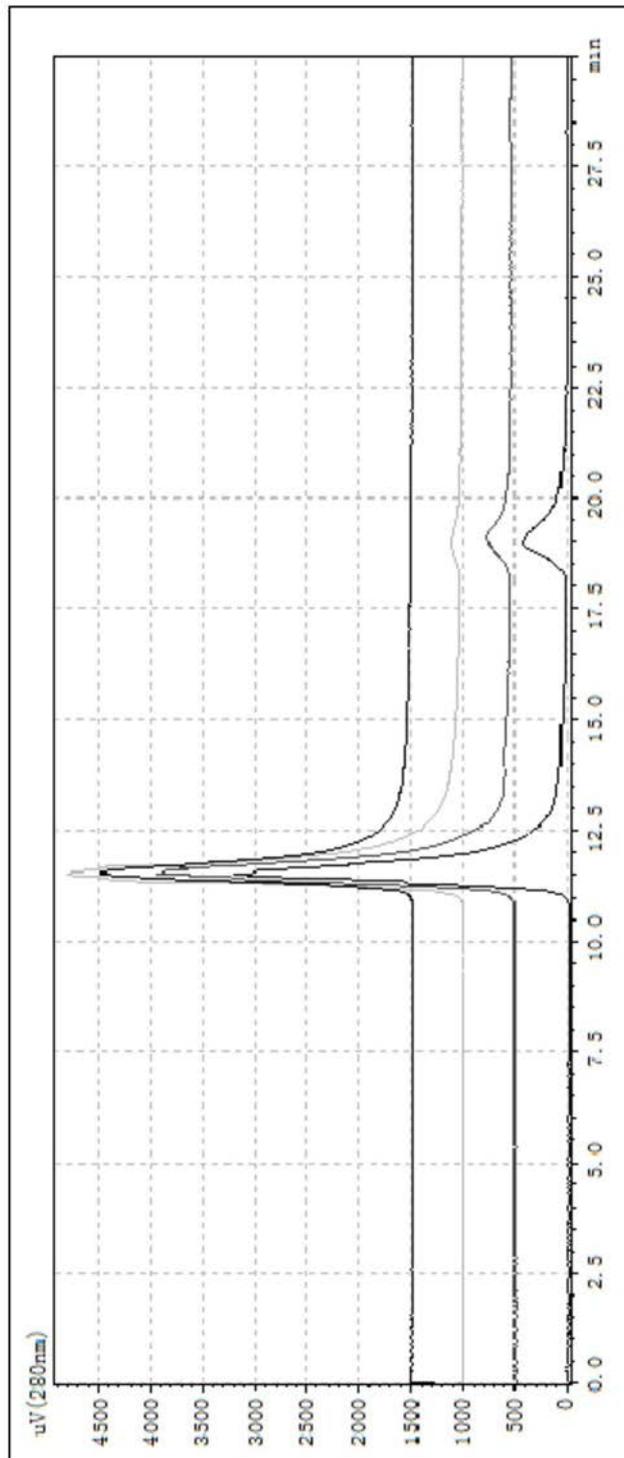


图4