

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)24-0097-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.24.020



疫苗磷酸铝佐剂沉降率检测方法的建立*

王逸冉, 刘晶晶, 何欢, 邵天舒, 纪宏, 李文东, 李玉立[△]

(北京市药品检验研究院·北京市疫苗检验中心国家药品监督管理局创新药物安全研究与评价重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立检测疫苗磷酸铝佐剂沉降率的方法。方法 选取 2 家企业自制的 6 批磷酸铝佐剂, 以静置时间、pH、铝含量、检测体积、检测温度为影响因素, 以沉降率为评价指标进行考察, 并以 zeta 电位值结果验证优选工艺的稳定性。结果 铝含量是影响磷酸铝佐剂沉降率的主要因素, 其次是 pH, 磷酸铝佐剂沉降率最佳测定方法为用稀盐酸或氢氧化钠溶液将样品 pH 调为 6.0~7.0, 铝含量调至 1 mg/mL, 振摇 30 s, 取 25 mL 溶液, 室温(25℃)静置 24 h。验证试验中 6 批样品的 zeta 电位为 -18.91~-5.98 mV, 绝对值均低于初始条件。结论 需综合评估对不同抗原蛋白疫苗的磷酸铝佐剂, 确定最优条件, 以增强佐剂与抗原的结合力。

关键词:磷酸铝; 佐剂; 疫苗; 沉降率; 铝含量; 稳定性

Establishment of A Detection Method for the Sedimentation Rate of Aluminum Phosphate Adjuvant in Vaccines

WANG Yiran, LIU Jingjing, HE Huan, SHAO Tianshu, JI Hong, LI Wendong, LI Yuli

(NMPA Key Laboratory for Safety Research and Evaluation of Innovative Drug, Beijing Institute for Drug Control·Beijing Center for Vaccine Control, Beijing, China 102206)

Abstract: **Objective** To establish a method for detecting the sedimentation rate of aluminum phosphate adjuvant in vaccines. **Methods** Six batches of self-prepared aluminum phosphate adjuvant from two manufacturers were selected. Static time, pH, aluminum content, detection volume, and detection temperature were set as influencing factors, and sedimentation rate was set as the evaluation index, the stability of the optimized process was verified by zeta potential values. **Results** Aluminum content was the primary factor affecting the sedimentation rate of aluminum phosphate adjuvant, followed by pH. The optimal determination method for the sedimentation rate of aluminum phosphate adjuvant was as follows: the pH of the samples adjusted to 6.0-7.0 with dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide solution, the aluminum content to 1 mg/mL, and shook for 30 s, took 25 mL of the solution, and let it stand at room temperature (25℃) for 24 h. In the validation test, the zeta potential of the six batches of samples ranged from -18.91 to -5.98 mV, with absolute values all lower than the initial conditions. **Conclusion** Comprehensive evaluation of aluminum phosphate adjuvant of vaccines with different antigen proteins is required to determine the optimal conditions, so as to enhance the binding force between the adjuvant and the antigen.

Key words: aluminum phosphate; adjuvant; vaccine; sedimentation rate; aluminum content; stability

自 1926 年英国免疫学家 Alexander Glenny 首次发现硫酸铝钾(明矾, 铝佐剂)能增强白喉毒素的免疫原性以来, 佐剂作为免疫增强剂, 临床应用范围逐渐扩大^[1-8], 其中磷酸铝、氢氧化铝等铝佐剂已被广泛应用于人类及动物疫苗的制备^[9-11]。有研究表明, 磷酸铝佐剂因具有独特的物理化学特性(如粒径、等电点、表面特性等), 使其在吸附阳离子抗原方面表现出色, 能有效增强疫苗的免疫反应^[1, 10-13]。磷酸铝佐剂为无定形羟基磷酸铝盐, 沉降率是评估其稳定性的重要参数, 直接影响疫苗的均一性和有效性。沉降率是评估磷酸铝佐剂吸附能力的重要参数, 而佐剂与抗原之间的静电吸引和配位基交换是疫苗吸附和解吸的主要作用机

制, 带相反电荷的佐剂与抗原, 静电吸引作用增强, 高离子强度会降低佐剂的表面电荷分布, 从而减少其通过静电吸引吸附的抗原量, 低离子强度介质下静电吸附更有优势^[14]。目前国内尚无磷酸铝佐剂的沉降率标准。为此, 本研究中参考国家药品监督管理局《预防用含铝佐剂疫苗技术指导原则》^[2]及相关文献^[15-16], 对不同企业磷酸铝佐剂开展稳定性研究, 考察 pH、温度、铝含量、体积等指标对沉降率的影响, 以期为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Sorvall ST 40R 型离心机, 多功能涡旋混合器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SevenCompact 型酸

*基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订研究课题[2023Y035]。

第一作者: 王逸冉, 女, 博士研究生, 药师, 研究方向为生化药物分析及生物制品质量控制, (电子信箱)wyrscarlet@163.com。

[△]通信作者: 李玉立, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品标准及生物制品质量控制, (电子信箱)rene8765@163.com。

度计、XSR205DU 型电子天平(精度为 0.01 mg),均购自瑞士 Mettler Toledo 公司;Mastersizer 2000 型激光散射粒度分布仪、Zetasizer Nano 型纳米粒度电位仪,均购自英国 Malvern Panalytical 公司。

试药:磷酸铝佐剂(企业 A,批号分别为 A22A2401081-05、A22A2411181-01、A22A2411181-02,编号 S1-S3;企业 B,批号分别为 62-2311004、62-2403001、62-2409002,编号 S4-S6);试验所用试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 测定指标

样品基本信息:1)铝含量,按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 3106 氢氧化铝(或磷酸铝)测定法^[18]进行检测。2)pH:取样品适量,涡旋混匀,用酸度计测定。3)等电点与 zeta 电位,取上述样品各适量,100 00 r/min 离心 15 min(下同),去上清,沉淀用水复溶,离心,重复 3 次,将沉淀用水稀释至铝含量 0.5 mg/mL。用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 7~8,使用纳米粒度电位仪测定等电点,并读取为初始 zeta 电位值。4)粒径:取上述样品各适量,采用激光散射粒度分布仪检测。结果见表 1。

表 1 6 批样品基本信息

Tab. 1 Basic information of six batches of samples

样品编号	pH	粒径(μm)	铝含量(mg/mL)	等电点	zeta 电位(mV)
S1	6.30	3.14	1.41	5.65	-19.50
S2	6.44	3.30	1.37	5.33	-27.02
S3	6.43	3.27	1.39	5.30	-26.87
S4	4.47	8.53	1.00	5.38	10.91
S5	4.41	8.34	0.99	5.49	13.69
S6	4.29	9.03	0.98	5.39	13.89

沉降率:取样品各适量,涡旋混匀,精密量取 25 mL,置 50 mL 比色管中,室温静置 12,24,48 h 时读取上清液体积。参考 2020 年版《中国药典(三部)》通则 3650 氢氧化铝佐剂沉降率测定方法^[17],计算公式为沉降率(%)=上清液体积/总体积×100%。

2.2 因素考察

静置时间:取样品 S1-S6 各适量,涡旋混匀,精密量取 25 mL,置 50 mL 比色管中,铝含量为 1.0 mg/mL, pH 6~7,分别于室温静置 12,24,48 h 时读取上清液体积,按 2.1 项下方法计算沉降率。结果静置 12~48 h 后,6 批样品沉降率无明显变化($RSD \leq 5.0\%$),表明静置时间对沉降率无明显影响。详见表 2。

pH:取样品 S4-S6 各适量,涡旋混匀,精密量取 25 mL,置 50 mL 比色管中,铝含量为 1.0 mg/mL,用氯化钠溶液将 pH 由 4~5 调为 6~7,于室温静置 24 h 时读取上清液体积,按 2.1 项下方法计算沉降率。结果调整 pH

表 2 不同静置时间沉降率测定结果(%)

Tab. 2 Determination results of sedimentation rate at different static times (%)

编号	24 h	48 h	72 h	RSD
S1	42.01	44.40	46.03	4.58
S2	37.62	40.01	40.42	3.84
S3	36.40	39.22	39.64	4.59
S4	63.61	64.44	64.80	0.95
S5	67.24	68.42	69.21	1.45
S6	66.03	67.62	68.40	1.79

表 3 pH 对沉降率的影响

Tab. 3 Effect of pH on sedimentation rate

编号	pH		沉降率(%)		SD
	调整前	调整后	调整前	调整后	
S4	4.47	6.05	63.62	60.81	2.26
S5	4.41	6.23	67.23	59.04	6.49
S6	4.29	6.18	66.01	59.03	5.58

后,3 批样品沉降率均降低($SD \leq 7.0\%$),表明 pH 对 B 企业产品沉降率有一定影响。详见表 3。

铝含量:取样品 S1-S3 各适量,涡旋混匀,精密量取 25 mL,置 50 mL 比色管中,用水将样品稀释至含铝 5 mg/mL,如铝含量低于 5 mg/mL,调整 pH 后用 9 g/L 氯化钠溶液稀释至 1 mg/mL;如铝含量低于 1 mg/mL,静置,吸弃上清液,最终调整样品中铝含量为 1 mg/mL,于室温静置 24 h 时读取上清液体积,按 2.1 项下方法计算沉降率。结果样品调整铝含量后沉降率明显升高($SD > 14\%$),表明铝含量可明显影响 A 企业产品沉降率。详见表 4。

表 4 铝含量对沉降率的影响

Tab. 4 Effect of aluminum content on sedimentation rate

编号	铝含量(mg/mL)		沉降率(%)		SD
	调整前	调整后	调整前	调整后	
S1	1.41	1.00	42.03	56.82	14.96
S2	1.37	1.00	37.61	52.01	16.07
S3	1.39	1.00	36.42	52.04	17.66

检测体积:取样品 S1-S6 各适量,涡旋混匀,分别精密量取 15,25,50 mL,置 50 mL 比色管中,铝含量为 1.0 mg/mL, pH 6~7,于室温静置 24 h 时读取上清液体积,按 2.1 项下方法计算沉降率。结果样品 S1-S3 检测体积为 25 mL 时沉降率检测结果最接近均值。样品 S4-S6 不同检测体积的沉降率呈随机变化。综合考虑,测定体积建议采用 25 mL。详见表 5。

检测温度:取样品 S1-S6 各适量,涡旋混匀,精密量取 25 mL,置 50 mL 比色管中,铝含量为 1.0 mg/mL, pH 6~7,于室温(25℃)、4℃静置 24 h 时读取上清液体积,按 2.1 项下方法计算沉降率。结果与室温比较,样品

表 5 检测体积对沉降率的影响

Tab. 5 Effect of detection volume on sedimentation rate

编号	检测体积 (mL)	沉降率 (%)	$\bar{X}$	编号	检测体积 (mL)	沉降率 (%)	$\bar{X}$
S1	15	59.29	56.77	S4	15	54.68	59.00
	25	56.81		S4	25	62.80	
	50	54.20		S4	50	59.52	
S2	15	50.73	52.11	S5	15	59.17	56.17
	25	52.02		S5	25	55.03	
	50	53.58		S5	50	54.32	
S3	15	56.01	52.87	S6	15	52.39	56.34
	25	52.03		S6	25	59.03	
	50	50.56		S6	50	57.61	

表 6 检测温度对沉降率的影响

Tab. 6 Effect of detection temperature on sedimentation rate

编号	温度(℃)	沉降率(%)	编号	温度(℃)	沉降率(%)
S1	25	56.80	S4	25	62.78
	4	64.02	S4	4	72.01
S2	25	52.03	S5	25	55.04
	4	61.18	S5	4	64.51
S3	25	52.04	S6	25	59.03
	4	58.02	S6	4	67.46

S1 – S3 于 4℃ 静置下的沉降率明显升高,表明室温静置对样品沉降率影响更小。详见表 6。

2.3 验证试验

检测条件下的 zeta 值主要用于分析不同企业间体系稳定性的差异。根据上述考察结果,拟订沉降率检测方法为用稀盐酸或氢氧化钠溶液将样品 pH 调为 6.0 ~ 7.0,铝含量调至 1 mg / mL,振摇 30 s,取 25 mL 溶液,置量筒或刻度比色管,25℃ 静置 24 h, S1、S2、S3、S4、S5、S6 的 zeta 电位分别为 - 16.73, - 18.16, - 18.91, - 5.98, - 8.56, - 10.92 mV,绝对值均低于初始条件,表明测定环境稳定,符合测定规律。

3 讨论

本研究中,不同企业样品的沉降率存在较大差异,主要与铝含量、pH、粒径等因素相关,通过实验发现,铝含量是沉降率的主要影响因素。同时,粒径较大的样品,沉降率整体偏高,但因本研究样品粒径均为微米级,其差异程度未作为主要影响因素。2 个企业样品的等电点基本一致,但在不同的 pH 条件下其 zeta 电位存在差异。zeta 电位的绝对值越高,体系越稳定,凝聚较慢,导致沉降率偏低;zeta 电位绝对值越低,体系越易于凝聚,导致沉降率偏高故以 zeta 电位评估制剂稳定性。当按拟订方法调节 pH 与铝含量相同时,不同企业样品的沉降率结果与 zeta 电位的相关性仍符合以上规律。当

铝含量不一致时,较高的铝含量会导致表面积增大,相互吸附及凝聚的过程延长,使得相同 pH 条件下,铝含量较高的样品沉降率偏低。选取同一企业的样品进行铝含量对沉降率的影响因素考察,结果铝含量大的样品沉降率偏低。pH 的变化可能会影响佐剂的表面电荷,进而影响沉降率。本研究中 1 批样品调整后随 pH 增高,沉降率明显降低,另 2 批变化不大。这可能是由于 pH 的变化会影响磷酸铝颗粒表面电荷,从而改变颗粒间的静电斥力,导致沉降率有所变化。本研究中选取 2 个企业样品进行了不同体积检测条件下对沉降率的影响实验,结果 25 mL 体积的检测结果相对稳定。不同测定时间对沉降率的影响实验结果表明,不同静置时间条件下,沉降率的结果基本一致,表明静置测试时间对沉降率的测定影响较小,从检验效率的角度考虑,建议静置 24 h。

本研究中 4℃、25℃ 对于 2 个企业样品沉降率的影响不一致。低温条件时,磷酸铝的溶解度可能降低,导致更多的磷酸铝颗粒以沉淀形式存在,从而升高沉降率。研究表明,冷冻后的铝佐剂会出现粒子聚集现象,在其中加入冷冻保护剂对佐剂具有保护作用^[19]。同时,低温也可能导致颗粒更易聚集,形成较大的团聚体,这些较大的颗粒会加速沉降,从而导致沉降率变大。

综上所述,铝含量是影响沉降率的主要因素,其次是 pH 环境。疫苗生产企业需针对不同抗原蛋白,对磷酸铝佐剂的 pH 及铝含量进行综合的筛选评估,以增强对目标抗原蛋白吸附能力。

参考文献

[1] BURRELL L, LINDBLAD E, WHITE J, et al. Stability of aluminum – containing adjuvants to autoclaving[J]. Vaccine, 1999,17(20 – 21):2599 – 2603.

[2] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布预防用含铝佐剂疫苗技术指导原则的通告(2019 年第 90 号)[A / OL]. (2019 – 12 – 09)[2025 – 01 – 02]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20191212145901474.html>.

[3] TOM J, ALBIN T, MANNA S, et al. Applications of immunomodulatory immune synergies to adjuvant discovery and vaccine development[J]. Trends Biotechnol, 2019,37(4):373 – 388.

[4] PULENDRAN B, ARUNACHALAM P, O'HAGAN D. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants[J]. Nat Rev Drug Discovery, 2021,20(6):454 – 475.

[5] MONI S, ABDELWAHAB S, JABEEN A, et al. Advancements in vaccine adjuvants: the journey from alum to nano formulations[J]. Vaccines, 2023,11(11):1704 – 1731.

[6] O'HAGAN D, LODAYA R, LOFANO G. The continued advance of vaccine adjuvants – 'we can work it out'[J]. Semin Immunol, 2020,50:101426 – 101440.

[7] 任红梅,熊晔蓉,荀校莹,等. 新型含铝疫苗佐剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2024,56(2):236 – 243.