

优化间苯二酚显色法测定唾液酸含量的验证

任静, 陈亚黎, 姜珊, 姜宝芹, 赵一欢, 周晖国, 张丽君^{通讯作者}

兰州生物制品研究所有限责任公司, 甘肃省疫苗工程技术研究中心, 甘肃兰州市 730046

摘要: 通过对间苯二酚显色法中的最佳沸水浴加热时间、加热之后的冰浴放置时间进行优化, 并对优化后的方法进行线性、重复性及精密度的验证。实验最佳沸水浴加热时间 12 min 及沸水浴后冰浴放置时间 8 min; 结果显示优化后方法线性范围良好, $R^2=0.9994$; 在检测 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗时, 两组 (1 组和 2 组) 间差异无统计学意义 ($t=0.3244$, $P=0.7619$, $P>0.05$), 说明此方法重复性好; 实验中具有良好的精密度, 样品进行检测, 变异系数 (coefficient of variation, CV) 分别为 2.98% 和 2.70%; 且两个重复间差异无统计学意义 ($t=0.09348$, $P=0.9300$, $P>0.05$)。优化后间苯二酚显色法检测结果稳定可靠, 线性良好, 重复性较好且具有良好的适用性。

关键词: 间苯二酚显色法; 唾液酸; 精密度; 统计学分析; A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗

Determination of sialic acid-method validation and applicability analysis of optimized resorcinol chromogenic assay

REN Jing*, CHEN Yali, JiangShan, JIANG Baoqin, ZhaoYihuan, ZhouHuiguo, ZhangLijun

* Quality Check Department of Lanzhou Institute of Biological Products Co., Ltd., Lanzhou, 730046, Gansu Province, China

Abstract: Through the improvement of the best boiling water bath heating time and the ice bath time after heating in the resorcinol chromogenic assay were optimized, and the linear, specific and precision of the optimized method was verified. The best boiling water bath heating time is 12 minutes and the ice bath time after the boiling water bath for 8 minutes; the results show that the optimized method has a good linear range, $r^2=0.9994$; when detecting group A and C meningococcal polysaccharide vaccines, The difference between the two groups (Group1 and Group2) was not statistically significant ($t=0.3244$, $P=0.7619$, $P>0.05$), indicating that this method has good repeatability; the experiment has good precision, and the difference between the two groupssamples were tested, and the coefficient of variation (CV) was 2.98% and 2.70%; and there was no statistically significant difference between the two groups ($t=0.09348$, $P=0.9300$, $P>0.05$). After optimization, the detection result of resorcinol chromogenic assay is stable and reliable, with good linearity, repeatability and applicability.

Keywords: Resorcinol chromogenic assay; Sialic acid; Precision; Analysis of statistical; Group A Group C meningococcal polysaccharide vaccine

流行性脑脊髓膜炎是由脑膜炎奈瑟菌引起的急性呼吸道传染病, 该病发病急、病情重、病死率高, 即使患者幸存, 仍有 10%~20% 的患者有严重后遗症, 如智能缺陷、耳聋、癫痫或其他精神障碍, 因而其成为全球高度关注的公共卫生安全问题之一^[1-4]。采取主动的脑膜炎球菌疫苗接种策略是实现人体预防此类疾病的最有效方法^[5]。脑膜炎球菌疫苗目前主要有两大类: 脑膜炎球菌多糖疫苗 (MPV) 和脑膜炎球菌多糖结合疫苗 (MCV)。其中, MPV 是以单价、二价或四价形式的多糖为基础的疫苗, MCV 则将脑膜炎球菌多糖与蛋白质载体连接构成的结合物, 大幅提高免疫效力^[6-7]。唾液酸成分则是脑膜炎球菌荚膜多糖重复单位的重要组成成分, 是二价和四价 MPV 的重要质量控制点, 也是结合疫苗制备过程中的原料多糖、多糖衍生物和结合物原液的多糖含量的定量依据^[8]。目前, 唾液酸含量检测有间苯二酚法, 酶法和高效液相色谱法等, 这三种检测方法各有优缺点^[9]。《中华人民共和国药典》2025 版 (三部) 中明确规定了使用间苯二酚法检测唾液酸含量^[10], 因此该方法的准确性对于评估多糖类疫苗质量非常重要。由于间苯二酚法的实验步骤以及各种化学试剂和多糖纯化过程中其它有机物, 如单糖及二糖、载体蛋白质和不同缓冲液等, 这些外源物质及不同的实验条件均会对唾液酸含量测定结果有一定的影响^[8]。因此, 本文通过优化的间苯二酚显色方法, 对目前已知唾液酸含量测定结果进行分析, 确定较优的检测条件, 并加以验证。

1 材料与方法

1.1 样品 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗均由兰州生物制品研究所有限责任公司提供 (已去除保护剂等成分)。样品批号分组, 1 组: 201810145、201810146、201810147; 2 组: 201901001、201901002、

201901003; 最佳加热样品组: 201808131, 201808136, 201808143; 沸水浴后样品组: 201808132, 201808138, 201808153。

1.2 主要试剂及仪器 N-乙酰神经氨酸(唾液酸标准品)购自 Sigma 公司。硫酸铜、间苯二酚、正丁醇、乙酸丁酯、盐酸等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。UV-2450 型紫外-可见分光光度计购自岛津公司; Allegra64R 型离心机购自 Beckman 公司; AB204-N 型电子分析天平购自梅特勒公司; SHH·W21·600 型水浴箱购自北京市永光明医疗仪器有限公司。

1.3 试剂配制 ①将硫酸铜溶液配制为 0.1 mol/L、间苯二酚溶液配制为 4%、N-乙酰神经氨酸(标准品)配制为 400 µg/mL。②待检样品配制: 待检 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗疫苗样品取 1 mL, 补纯化水 1 mL, 作为待检样品溶液; ③显色剂配制: 取 0.1 mol/L 硫酸铜溶液 0.25 mL 和 4%间苯二酚溶液 2.50 mL, 浓盐酸 40 mL, 最后补纯化水至 50 mL(试剂临用现配); ④有机相配制: 量取正丁醇 15 mL, 加乙酸丁酯至 100 mL。

1.4 间苯二酚显色法的优化

1.4.1 最佳加热时间的优化 分别取 3 个批次样品(201808131, 201808136, 201808143), 同一批次样品连续取 4 份。实验中选取加热时间点分别为 8、10、12、14 min, 对每组 3 个样品进行检测, 并计算变异系数(coefficient of variation, CV), 选取 CV 最小值为最佳加热时间。

1.4.2 沸水浴后冰浴时间的优化 分别取 3 个批次样品(201808132, 201808138, 201808153), 同一批次样品连续取 4 份。实验中加热时间选取 1.4.1 中最优加热时间, 沸水浴后冰浴放置时间分别为 4、6、8、10 min, 然后对每组 3 个样品进行检测, 并计算 CV, 选取 CV 最小值为沸浴后放置最佳时间。

1.5 方法的验证

1.5.1 线性 用移液器精确量取标准品(80 µg/mL) 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mL, 分别置于试管中, 补加纯化水至 2.00 mL 为标准曲线各点, 唾液酸含量分别为 8、16、32、64、128 µg。取纯化水 2.00 mL 为空白对照。见表 1。空白对照和标准品各管中加入 2 mL 显色剂, 摇匀, 沸水浴 12 min 后室温放置 8 min, 每管加 4 mL 有机相充分摇匀后转移至 15 mL 离心管中, 室温放置 8 min, 然后在室温下, 以 7.5 cm 离心半径、转速 1 000 r/min、离心 1 min 后, 取上层有机相部分。以空白对照为零点, 在波长 $A_{585\text{ nm}}$ 下测定吸光值。以浓度为 x 轴, 吸光值为 y 轴, 绘制标准曲线, 并进行线性回归分析, 计算标准曲线相关系数, 相关系数应 $R^2 > 0.99$ 。

表 1 唾液酸标准品工作液梯度稀释配方

Tab.1 Formulation of sialic acid standard dilution

唾液酸标准品/mL	纯化水/mL	唾液酸含量/µg
0.0	2.0	0
0.1	1.9	8
0.2	1.8	16
0.4	1.6	32
0.8	1.2	64
1.6	0.4	128

注: 唾液酸含量 0 为空白对照。

1.5.2 重复性 对待检 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗疫苗样品取样, 共取两组, 每组 3 个样品, 并进行唾液酸含量检测。将制备好的待检样品摇匀, 沸水浴 12 min 后冰浴放置 8 min, 每管加 4 mL 有机相充分摇匀后转移至 15 mL 离心管中放置 8 min。通过吸光值利用回归方程计算含量, 最终计算得到每剂含量, 每剂含量应在 37.5~48.8 µg/剂范围内。计算每组数据 CV, CV 值应 <5%, 且 P 值 > 0.05。最后对两组数据间差异进行统计学分析。

1.5.3 精密度 使用优化后的方法进行唾液酸检测, 平行检测 6 次, 且进行一次重复, 计算每个样品的含量。试验后对每组数据进行 SD 值和 CV 值计算。

1.6 唾液酸含量计算方法 以 N-乙酰神经氨酸标准品系列浓度对其相应的 $A_{585\text{nm}}$ 值作直线回归,然后将待检样品溶液的 $A_{585\text{nm}}$ 值带入直线回归方程,求出其相应含量 $c(\mu\text{g})$; 待检样品唾液酸含量 $(\mu\text{g}/\text{mL}) = c \times x$ (x : 待检样品的体积 mL), 因 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗供试品截留液 1 mL 为 2 剂的量 (成品每剂复溶后为 0.5 mL), 则待检样品唾液酸含量 $(\mu\text{g}/\text{剂}) = \text{待检样品唾液酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) \div 2$, 最终计算唾液酸含量应在 37.5~48.8 $\mu\text{g}/\text{剂}$ 范围内。

1.7 统计学分析 所有实验数据均使用 Excel 2016 软件记录,对每一组检测样品结果进行 CV 计算,即: $CV = (SD/\text{mean}) \times 100\%$, 且应 $CV < 3\%$ 。除此之外对组间差异比较使用 GraphPad Prism 分析软件,计算 t 值并统计学分析, $P > 0.05$ 为差异无统计学意义, $P < 0.05$ 则为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 优化结果的确定

2.1.1 最佳加热时间的确定 不同加热时间测得样品唾液酸含量, 测得 CV 分别为: 3.15%、2.85%、1.35%、2.45%。其中加热 12 min 时, CV 最小, 为 1.35%。见表 2。

表 2 不同加热时间样品唾液酸含量的检测

Tab.2 Detection of sialic acid content in samples with different heating time

加热时间/min	样品批次	唾液酸含量/ μg	$CV/\%$
8 min	201808131	44.9	3.15
	201808136	46.7	
	201808143	48.5	
10 min	201808131	45.2	2.85
	201808136	48.4	
	201808143	46.3	
12 min	201808131	46.8	1.35
	201808136	46.3	
	201808143	45.3	
14 min	201808131	45.5	2.45
	201808136	48.3	
	201808143	47.2	

2.1.2 沸水浴后冰浴放置时间的确定 不同沸水浴后冰浴放置时间样品测得唾液酸含量,测得 CV 值分别为: 3.30%、2.70%、1.00%、3.01%。其中沸水浴后放置时间在 10 min 时, CV 为 1.00%。见表 3。

表 3 不同沸水浴后冰浴放置时间样品唾液酸含量检测

Tab.3 Detection of sialic acid content in samples after placing time in different boiling water baths

沸水浴后冰浴放置时间/min	样品批次	唾液酸含量/ μg	$CV/\%$
4 min	201808132	48.8	3.30
	201808138	47.8	
	201808153	45.1	
6 min	201808132	48.4	2.70
	201808138	46.9	
	201808153	45.3	
8 min	201808132	45.8	1.00
	201808138	46.1	
	201808153	46.9	
10 min	201808132	45.4	3.01
	201808138	47.8	
	201808153	48.8	

2.2 方法的验证结果

2.2.1 线性 不同浓度标准品工作液在波长 $A_{585\text{ nm}}$ 下的吸光值，见表 4。

表 4 不同浓度唾液酸标准品对应吸光值
Tab.4 Corresponding absorbance values of different concentrations of sialic acid standards

唾液酸标准品/mL	唾液酸含量/ μg	$A_{585\text{ nm}}$
0.1	8	0.054
0.2	16	0.110
0.4	32	0.230
0.8	64	0.440
1.6	128	0.850

通过实验数据得，标准曲线回归方程为： $y=0.006614x+0.008750$ ，相关系数 $R^2=0.9994$ ，该方法建立的标准曲线线性良好，见图 1。

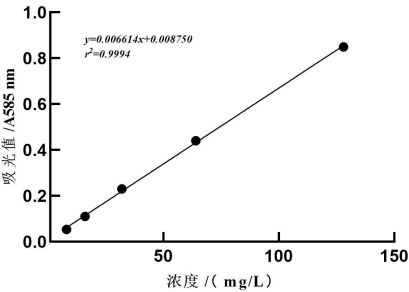


图 1 唾液酸标准品线性回归

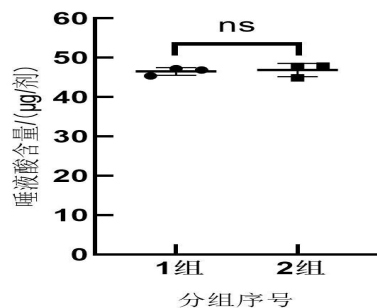
Fig.1 The sialic acid reference linear regression

2.2.2 重复性 结果显示，1 组，2 组样品唾液酸含量检测 CV 分别为 1.69%和 2.97%，均 $<3\%$ ，见表 5。

表 5 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗疫苗两组样品重复性检测
Tab.5 A group, C group MPV two sets of sample repeatability detection

组别	样品批号	唾液酸含量/ μg	$CV/\%$
1 组	201810145	47.2	1.69
	201810146	45.4	
	201810147	46.9	
2 组	201901001	47.8	2.97
	201901002	47.9	
	201901003	44.9	

对表 5 中两组数据进行统计学分析，结果显示，两组间差异无统计学意义 ($t=0.3244$ 、 $P=0.7619$ ， $P>0.05$) 表明此方法在检测唾液酸含量时稳定性及重复性好，见图 2。



注：ns 表示没有显著性差异。

图2 A群C群脑膜炎球菌多糖疫苗疫苗两组间显著性差异
Fig.2 Significance analysis between groups 1 and 2

2.2.3 精密度 结果显示，两组样品检测结果的 CV 分别为 2.98%和 2.70%，均 $<3\%$ ，见表 6。

表6 A群C群脑膜炎球菌多糖疫苗疫苗两组样品精密度检测结果
Table 6 The precision test results of the two groups of samples of group A and group C of MPV

分组	平行次数	唾液酸含量/ μg	SD	$RSD\%$	$CV\%$
1	1	46.7	1.115	2.47	2.98
	2	43.5			
	3	44.5			
	4	44.6			
	5	45.8			
	6	45.2			
2	1	43.8	1.023	2.25	2.70
	2	45.0			
	3	46.7			
	4	45.6			
	5	45.4			
	6	46.3			

对表 6 中两组数据进行统计学分析，结果显示两组数据间差异无统计学意义（ $t=0.09348$ 、 $P=0.9300$ ， $P>0.05$ ），再次证明该方法在检测中重复性好，精密度高。

3 讨论

间苯二酚法作为唾液酸含量检测的主要方法，其实验原理是在一定的酸性条件下将结合状态的唾液酸转变为游离状态，游离状态的唾液酸与间苯二酚反应生成蓝紫色络合物，再用有机溶剂萃取后测定唾液酸含量。整个过程涉及的试剂、时间点和步骤较多，制约检测的准确度和稳定性。使用原方法进行唾液酸含量检测，通过检测结果可知 CV 值均 $>3\%$ ^[11]，因此此方法的准确度和稳定性还需要进一步提高。且原方法在实验过程中的关键步骤，没有明确要求，所以对此方法的优化十分有**必要**。本文深入分析已发表文章数据^[10-11]，通过对影响间苯二酚法的各种实验条件进行比对和分析，实验结果显示实验步骤中的沸水浴加热时间和沸水浴后放置时间及放置方式是对检测影响最大的两个因素^[8]。随着沸水浴加热时间增长，检测的吸光值也会明显增高，且 5 min 内吸光值增加 35%。而随着沸水浴后放置时间的延长最终检测的吸光值会减小，且 30 min 内吸光值减少 6%。因此确定最优时间对实验极为重要。通过实验结果分析得到，沸水浴加热时间在短时间内对检测结果影响很大，所以沸水浴加热时间确定为 10 min -12 min 之间，以 12 min 为宜， >12 min 吸光值将会大幅度升高，对实验**结果**影响**显著**。沸水浴后放置时间对检测的准确度和稳定性影响也较明显，**因此**沸水浴后冰浴放置时间确定为 8 min -10 min 之间，以 8 min 为宜，时间 >10 min 吸光值会有明显降低，

并且在有机相加入后,采用静置加离心的方法可以更好的进行分离,检测结果更加稳定。而以上重要的时间点和操作方法在2025版《中国药典》(三部)中的间苯二酚法检测唾液酸含量方法中并未提及。

本文使用优化后的间苯二酚法,首先进行相关样品的检测,对优化后的间苯二酚法加以验证,并对其稳定性和适用性进行分析。分别对A群C群脑膜炎球菌多糖疫苗样品唾液酸含量、CV及组间显著性差异进行分析,可知每个样品唾液酸含量均在37.5~48.8 μg/剂范围内,每组CV均<3%,且组间差异无统计学意义($P>0.05$)。与2025版《中国药典》(三部)中的间苯二酚法检测唾液酸含量方法检测样品数据的CV值进行比较,优化后方法的CV值明显减小。且与《中国药典》中的方法相比,优化后的方法对关键时间点及操作方法的精确掌握,能够有效降低实验体系对检测带来的误差,因此经验证得到了一个更加稳定、准确的间苯二酚检测方法,适用性更强,精确度更高。可以有效的避免实验方法及操作对唾液酸检测带来的影响。

参考文献

- [1] 王海蓉,廖征,张艳霞,等. 脑膜炎球菌疫苗的免疫策略探讨[J]. 职业与健康, 2016, 32(19):2729-2732.
- [2] Organization W H. Meningococcal Vaccines: WHO Position Paper, November 2011[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2011.
- [3] E. McIntosh, M. Safadi. Epidemiology and prevention of meningococcal disease: a critical appraisal of vaccine policies[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2012.
- [4] Sáfaci, Marco Aurélio, Bettinger J A, Maturana G M, et al. Evolving meningococcal immunization strategies[J]. Expert Review of Vaccines, 2015, 14(4): 505-17.
- [5] Jessica Presa, et al. Epidemiologic Trends, Global Shifts in meningococcal vaccination guidelines, and data supporting the Use of MenA C W Y-TT vaccine: A review[J]. Infect Dis Ther, 2019, 8:307-333.
- [6] 王晓娟,曹琰,赵勇,等. 脑膜炎球菌疫苗及相关问题探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 3(2): 235-237.
- [7] 张营营,李智华,徐维明. 脑膜炎球菌多糖蛋白结合疫苗研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(12): 1143-1149.
- [8] 孔素娟,于旭博,袁菲,等. 间苯二酚显色法测定唾液酸含量的影响因素[J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 44(5): 15-20.
- [9] 秦湫红,朱爱华. HPLC法·酶法和间苯二酚法检测生物制品中唾液酸含量方法学比较[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(20): 162-163.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 通则 3102.
- [11] 冯满,赵新华,傅元欣,等. 两种用于测定A/C群脑膜炎球菌多糖疫苗中乳糖含量方法的比较分析[J]. 微生物学免疫学进展, 2010, 38(04): 32-38.