

核磁共振氢谱法定量测定肺炎球菌荚膜多糖中 C-多糖杂质含量

扶晖¹, 马庆华², 王丽娟¹, 张秀¹, 朱向国², 郑佳²

(1.北京大学分析测试中心, 北京 100871; 2.北京智飞绿竹生物制药有限公司, 北京 100176)

摘要: **目的** 建立核磁共振氢谱法定量测定肺炎球菌荚膜多糖中 C-多糖杂质的分析方法。**方法** 以 6A、6B 和 10A 三种血清型肺炎球菌荚膜多糖为样品, 二甲基亚砜为内标物, 建立绝对定量方法测定 C-多糖含量 **结果** C-多糖质量百分含量在 0.04 %~3.3% 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.999$), 检测方法的最低定量限可达 0.04 %; 加标回收率在 102 %~109 % 之间; 重复性相对标准偏差 (RSD) 均小于 3 %, 5 天内稳定性 RSD 均小于 1 %。**结论** 核磁共振氢谱定量方法操作简单, 重复性和耐用性良好, 不受其他实验因素的影响, 为肺炎球菌荚膜多糖的质量控制提供了新的手段。

关键词: 核磁共振氢谱法; 肺炎球菌荚膜多糖; 定量; C-多糖; 疫苗

Determination of C-Polysaccharide content in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides by quantitative nuclear magnetic resonance

Fu Hui^{1*}, Ma Qinghua², Wang Lijuan¹, Zhang Xiu¹, Zhu Xiangguo², Zheng Jia²

(1.College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Analytical Instrumentation Center, Peking University, Beijing 100871, China; 2.Beijing Zhifei lvzhu Biopharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: A quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method to analyze the content of residual C-polysaccharide (C-Ps) in the *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide was developed. Using pneumococcal serotypes 6A, 6B and 10A capsular polysaccharids as model samples, dimethyl sulfoxide as internal standard, the ¹H qNMR quantitation method was established and validated. The linear ranges for C-Ps was 0.04%~3.3% ($R^2 > 0.999$), the limit of quantification of this detection method could reach 0.04%, and the spiked recoveries were 102%~109%. The RSD of repeatability and the RSD of 5 day stability of this method are lower than 3% and 1%, respectively. The ¹H qNMR method established in this study can be successfully used to determine the absolute C-Ps contents of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. It has advantages of simple operation, good repeatability and robustness and can

be easily adopted for the quality control of pneumoniae capsular polysaccharides during the manufacture and distribution stages

Keywords:Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance; Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide; C polysaccharide; quality control; Vaccine

1 引言

肺炎球菌是引起全球不同年龄人群，尤其是幼儿和老年人的肺炎、中耳炎、支气管炎、脑膜炎和败血症等严重疾病的重要病原菌，其中侵袭性肺炎球菌疾病具有很高的致死率^[1,2]。肺炎球菌荚膜多糖是肺炎球菌细胞壁外荚膜的主要组成成分，具有免疫原性，可在人体内诱导产生特异性抗体阻止肺炎球菌的感染。目前接种以肺炎球菌荚膜多糖为主要抗原成分的疫苗是肺炎球菌性疾病预防的有效措施^[3]。肺炎球菌根据其荚膜多糖组成结构的不同，已鉴别出 96 种不同的血清型。目前针对成人使用的 23 价肺炎球菌荚膜多糖疫苗，是由常见的致病率高的 23 种血清型肺炎球菌荚膜多糖组成。

肺炎球菌荚膜多糖目前主要通过不同肺炎球菌菌株进行发酵生产、纯化后得到。C-多糖 (C-Ps) 是所有肺炎球菌细胞壁的组成成分，由重复的五糖单元组成，经由核糖醇磷酸二酯键与荚膜多糖及细胞壁肽聚糖相连，其分子结构和分子大小与肺炎球菌荚膜多糖类似。因此在肺炎球菌荚膜多糖的生产和纯化过程中无法将 C-Ps 完全去除^[1]，甚至可能会含有大量的 C-Ps。C-Ps 具有高度的免疫原性，但是抗 C-Ps 抗体并不具有保护性^[4]。此外，当使用蒽酮硫酸这类显色方法对肺炎荚膜多糖进行含量测定时，并不能区分肺炎球菌荚膜多糖和 C-Ps，给准确评价有效抗原含量带来困难。C-Ps 在肺炎球菌荚膜多糖疫苗生产中被当做杂质项看待，世界卫生组织 (WHO) 目前也将 C-Ps 列为肺炎球菌荚膜多糖疫苗的杂质。因此，C-Ps 杂质的定性和定量检测在肺炎荚膜多糖疫苗研发和生产过程具有重要的意义。

肺炎球菌荚膜多糖的质控主要使用传统的湿法化学、离子色谱法和免疫学方法。其中 HPAEC-PAD 离子色谱法，利用 C-Ps 中存在的核糖醇片段，用酸对 C-Ps 进行多次水解，然后检测水解产物中核糖醇的量，间接计算 C-Ps 的含量。这个方法前处理复杂，而且 6A、6B 和 10A 这三种血清型肺炎球菌荚膜多糖本身结构中含有核糖醇片段，无法使用该方法检测 C-Ps 含量^[8,9]。此外还有使用 C-Ps 单克隆抗体 (单抗)，利用速度比浊法检测 C-Ps 含量^[10]。或者酶联免疫 (elisa) 法，利用抗体抗原的特异性结合来检测 C-Ps 含量。这两种生物学的方法都存在流程长、试剂贵、专一性差，重复性不好等问题。

组成 C-Ps 的单糖残基上含有磷酸胆碱取代基，它的三甲基铵基上有三个化学等价的氮