

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 polysaccharides 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

甲基, 共九个 ^1H , 信号峰非常强, 且远离样品中大多数的信号峰, 非常利于使用核磁 ^1H 谱进行定量分析。本研究用核磁共振氢谱法, 以 6A、6B 和 10A 三种血清型肺炎球菌荚膜多糖为样品, 进行了 C-Ps 杂质的绝对定量测定, 并对本方法的线性、准确性、重现性等进行评估和验证, 为肺炎荚膜多糖的质量控制提供一种快捷准确的新方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AVANCE NEO 600MHz 超导核磁共振波谱仪 (配备超低温探头 CP BBO, 德国 Bruker 公司);

AVANCE III 500MHz 超导核磁共振波谱仪 (配备 BBO 探头, 德国 Bruker 公司);

电子天平 ($d=0.01\text{mg}$, XS105, 瑞士 Mettler Toledo 公司);

Mini 点动漩涡仪 (MFI-36, 杭州海沛仪器有限公司)。

重水 (D_2O , 99.9 %D, 安耐吉); 二甲基亚砜 (DMSO, 纯度 99.8 %, 阿拉丁); 2,2,3,3-D₄-3- (三甲基硅基) 氘代丙酸钠 (TMSP- d_4 , 98 %, 美国 CIL), 甘油磷酸胆碱 (98 %, 上海麦克林生化科技股份有限公司)。

6A 型 (批号: Y20200403T6A)、6B 型 (批号: Y20190303T6B)、10A 型 (批号: Y20191001T10A、Y20191002T10A、Y20191103T10A) 肺炎链球菌荚膜多糖原液冻干粉 (-30°C 保存) 由北京智飞绿竹生物制药有限公司提供。

2.2 溶液的配制

2.2.1 标准溶液的制备

选取 TMSP- d_4 作为化学位移参照物, 用重水配置成 0.01 % TMSP- d_4 的溶液。精确称量 20 mg DMSO 试剂, 用 5 mL 0.01 % TMSP- d_4 重水溶液溶解, 作为内标储备液。用 0.01 % TMSP- d_4 的重水溶液将内标储备液稀释成浓度为 0.05 mg/mL 的内标工作液。称取甘油磷酸胆碱, 配制并稀释成 0.48 mg/mL 的溶液。

2.2.2 多糖储备液的制备

分别精密称取一定量的 6A、6B 和 10A 血清型的肺炎球菌荚膜多糖原液冻干粉, 溶于重水中, 涡旋使冻干粉充分溶解, 过夜后用 0.22 μm 水系滤膜过滤, 得到浓度为 10 mg/mL 的各血清型的多糖储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取多糖储备液（10 mg/mL）300 μL，内标工作液 100 μL，重水 100 μL，涡旋混匀，所得溶液作为供试品溶液。将该溶液全部转移至 5 mm 核磁管中，待测。

2.3 实验方法

2.3.1 定量 ¹H NMR 采集参数

定量 ¹H NMR 谱图采集所用仪器参数设置见表 1。

表 1 定量 ¹H NMR 采样参数设置

谱仪	脉冲序 列	TE	SW	O1P	TD	NS	D1	RG	DS
600 MHz	zg	298 K	7200 Hz	2880 Hz	64 k	32	40 s	16	2
600 MHz	zg30	298 K	7200 Hz	2880 Hz	64 k	64	20 s	32	2
500 MHz	zg	298 K	6000 Hz	2400 Hz	64 k	32	40 s	101	2

注：TE 为实验温度；SW 为谱宽；O1P 为中心频率；TD 为采样点数；NS 为采样次数；D1 为弛豫延迟时间；RG 为增益；DS 为空扫次数。

2.3.2 谱图处理

采用 Bruker TopSpin 4.0.9 版软件处理数据，数据经傅里叶变换后得到谱图。冲零（SI）点数为 64 k，窗函数设为 0.3 Hz，经相位调整和基线校正后对选定的特征峰进行积分，所有数据采用同一个积分文件，消除手动积分误差。

2.3.3 计算

在合适的检测条件下，核磁共振波谱中的谱峰面积或信号强度直接与引起该信号的原子核个数成正比。绝对定量法是采用已知纯度的化合物作为参比标准，通过待测物特征峰与参比物特征峰的峰面积，依据 NMR 定量公式计算待测物的含量。依据定量 ¹H-NMR 的基本原理，供试品中 C-Ps 的绝对定量按下公式计算^[11]：

$$w = \frac{A_x}{A_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_x} \times \frac{M_x}{M_{std}} \times \frac{m_{std}}{m_x} \times 100\%。$$
 (1)

式（1）中，w 为样品中待测组分质量百分比含量，单位为 %；A 为信号的响应强度，即峰面积；N 为产生信号的核的数目；M 为摩尔质量；m_{std} 为待测样品中含内标物的质量，mg；m_x 为待测样品中含供试品的质量，mg。

3 结果与讨论

3.1 定量特征峰的选择

文献报道 C-Ps 杂质重复单元中磷酸胆碱取代基的氮甲基信号峰位于 $\delta_{\text{H}} 3.24^{[12,13]}$ 。以 10A 血清型多糖溶液（含 C-Ps）为样品，通过检测 ^1H - ^{15}N HMBC 二维核磁共振谱，得 $\delta_{\text{H}} 3.24$ 的氢与 $\delta_{\text{N}} 48.0$ 氮有相关，确认了 $\delta_{\text{H}} 3.24$ 信号来源于 C-Ps 重复单元中磷酸胆碱氮甲基。

C-Ps 重复单元的胆碱氮甲基的核磁 ^1H 谱位置固定，基本不随着血清型肺炎荚膜多糖类型的变化而改变。图 1 为 6A、6B 和 10A 血清型多糖供试品溶液及 DMSO 溶液的 ^1H -NMR 对比图，在三种血清型多糖中，C-Ps 重复单元的胆碱氮甲基氢信号均位于 $\delta_{\text{H}} 3.24$ ，峰型尖锐。此外该谱峰与 6A、6B 和 10A 血清型多糖的峰及 C-Ps 其他峰均无重叠，非常适合作为定量特征峰。DMSO 具有化学性质稳定、不与溶剂和样品发生反应、纯度高优点，常被选为内标物，且 DMSO 在重水溶剂中氢信号位于 $\delta_{\text{H}} 2.73$ ，为一尖锐单峰，与供试品溶液的信号均无相互干扰，因此选择 DMSO 作为定量分析的内标物。

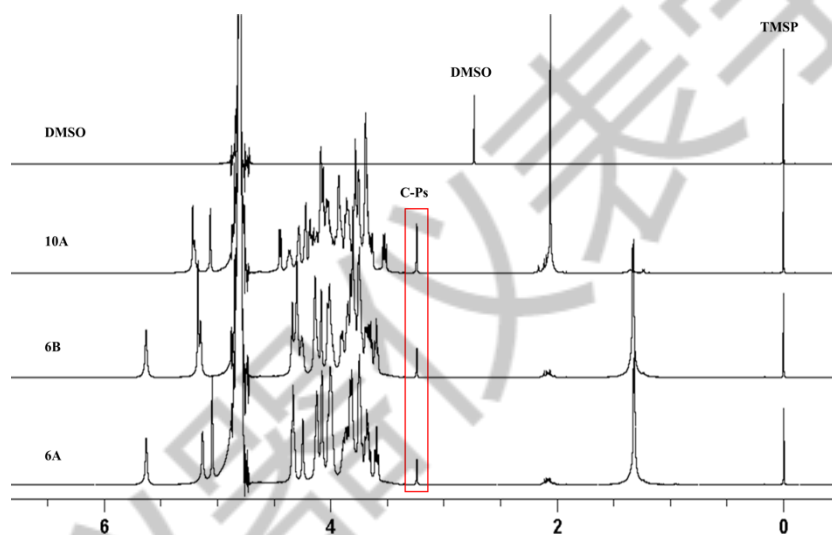


图 1 DMSO 溶液和 6A、6B、10A 血清型肺炎荚膜多糖的 ^1H -NMR 叠加图

3.2 弛豫延迟时间（D1）的设定

在定量实验中，弛豫延迟时间 D1 的设置直接关系到定量原子核是否完全弛豫，决定定量结果的准确性，一般 D1 需要大于 $5T_1$ 。 T_1 为纵向弛豫时间，通常情况下小分子的 T_1 比大分子的长，因此 D1 的设置以 T_1 长的小分子为依据。通过反转恢复法测得 DMSO 位于 $\delta_{\text{H}} 2.73$ 特征峰 T_1 为 5.1 s，C-Ps 位于 $\delta_{\text{H}} 3.24$ 的特征峰 T_1 为 0.79 s。为了保证自旋核的充分弛豫，确保定量检测结果准确，在采用 zg 脉冲序列时将 D1 设为 40 s；在采用 zg30 脉冲序列时将 D1 设为 20 s。

3.3 线性和定量限

分别取 10A 血清型的多糖储备液 5 μL 、10 μL 、25 μL 、50 μL 、100 μL 、150 μL 、300 μL 、400 μL ，各加内标工作液 100 μL ，用重水补至 500 μL ，混匀，用于考察方法的线性。

以 10A 多糖中 C-Ps 百分含量为横坐标，C-Ps 定量峰与 DMSO 定量峰积分面积的比值为纵坐标，作线性回归方程。线性回归方程为 $y=1.06366x+0.00108$ ， $R^2=0.99998$ ，C-Ps 在 0.04 %~3.3 %范围内线性良好(图 2)。利用布鲁克谱仪自带软件计算 C-Ps 定量峰的信噪比，C-Ps 绝对含量在 0.04 %时信噪比为 11.9。中国药典四部通则(2020 版)中以信噪比 $S/N=10$ 时对应的检测浓度为定量限(LOQ)，因此本检测方法定量限可达到 0.04 %。

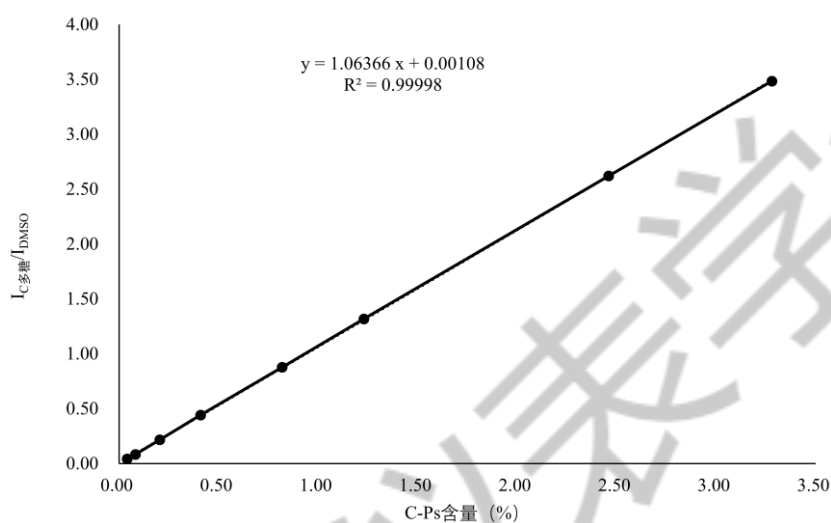


图 2 C-多糖含量测定标准曲线

3.4 准确度

C-Ps 上磷酸胆碱取代基有两种取代方式：一种是仅在一个单糖残基上的单取代；另一种是在两个不同单糖残基上的双取代。通过仔细分析和观察 ^1H NMR 谱图在 δ_{H} 3.24 处的谱峰(图 3A)，可以推断本次测试所有肺炎荚膜多糖所含的 C-Ps 主要为双取代。其特征是 δ_{H} 3.24 处的谱峰是接近等高的双峰，双峰分别来自两个不同单糖残基上磷酸胆碱氮甲基。它们的化学位移非常接近，基本重叠在一起，从外观上看类似一对双峰。从 ^{31}P 谱上也能看到双取代对应的三组 ^{31}P 谱峰。通过比对文献报道，可对该三组峰进行指认^[7](图 3B)。通过相应 ^{31}P 谱峰的积分值，判断所检测的肺炎荚膜多糖样品所含 C-Ps 主要为磷酸胆碱双取代。

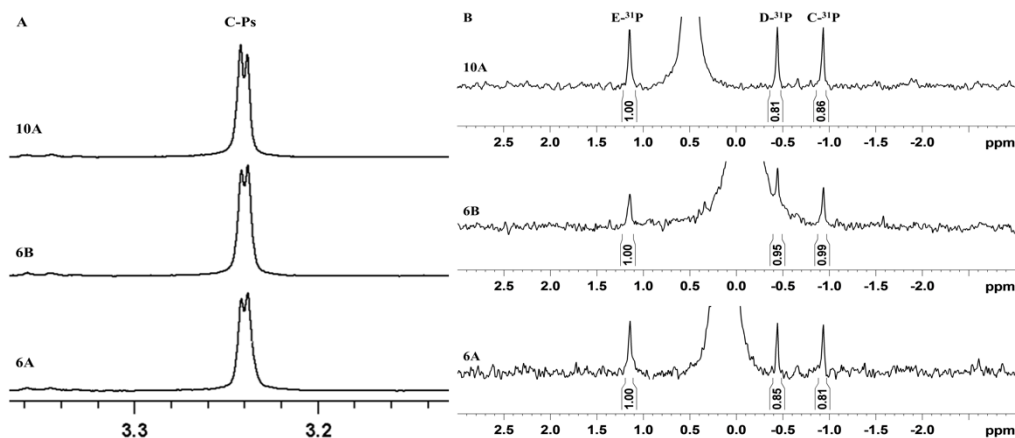


图3 6A、6B、10A 血清型肺炎荚膜多糖谱图对比：A. ^1H 谱 3.1–3.4 化学位移区间段放大图；B. ^{31}P 谱图

C-Ps 的标准物不易获得，价格非常昂贵。此外，即使是花重金购得 C-Ps 的标准物，极有可能是单取代，而不是双取代的。甘油磷酸胆碱的结构见图 4，其分子中的磷酸胆碱片段所处化学环境类似 C-Ps 中的磷酸胆碱。在 ^1H NMR 谱图上，甘油磷酸胆碱氮甲基的 δ_{H} 3.23，基本与 C-Ps 磷酸胆碱氮甲基重叠。甘油磷酸胆碱为小分子，其 ^1H 谱峰较大分子的 C-Ps 尖细，对 C-Ps 中的氮甲基进行积分时，能将甘油磷酸胆碱的氮甲基峰完全包含。因此选用甘油磷酸胆碱作为 C-Ps 标准物的替代品进行加标回收率的测试。

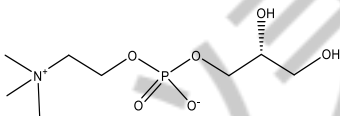


图4 甘油磷酸胆碱结构式

分别取 0.48 mg/mL 甘油磷酸胆碱溶液 0 μL 、10 μL 、40 μL 、100 μL ，各加入 6B 血清型的多糖储备液 300 μL ，内标工作液 100 μL ，用重水补至 500 μL ，混匀，每个浓度平行制备 3 份，用于考察方法的准确度。

10 μL 、40 μL 及 100 μL 甘油磷酸胆碱的加标回收率分别为 109 %、102 %、102 %，表明该方法准确度良好。详见表 2。

表2 加标回收率

加标量 (μL)	10	40	100
回收率 %	107, 112, 107	103, 102, 102	103, 102, 102
平均值 %	109	102	102
RSD %	2.39	0.67	0.29

3.5 重复性、稳定性

按照 1.2.3 制备 6A、6B 和 10A 三种血清型供试品溶液，每种平行制备 6 份，考察重复性、稳定性及耐用性。

6A、6B 和 10A 供试品溶液重复性测定的 C-Ps 含量的 RSD 分别为 1.16 %、0.96 %和 2.85 %，表明该方法重复性良好。6A、6B 和 10A 供试品溶液在 0 天、1 天、5 天测试结果的 RSD 分别为 0.53 %、0.34 %和 0.35 %，表明该供试品溶液稳定性良好。详见表 3。

表 3 重复性、稳定性试验结果（%）

编号	6A			6B			10A		
	0 天	1 天	5 天	0 天	1 天	5 天	0 天	1 天	5 天
1	1.51	1.52	1.50	1.61	1.58	1.56	2.36	2.37	2.36
2	1.51	1.51	1.49	1.58	1.59	1.58	2.52	2.52	2.48
3	1.52	1.54	1.49	1.58	1.59	1.58	2.55	2.55	2.51
4	1.54	1.54	1.54	1.59	1.58	1.59	2.43	2.45	2.44
5	1.49	1.50	1.48	1.59	1.58	1.60	2.45	2.48	2.46
6	1.52	1.52	1.51	1.56	1.56	1.55	2.43	2.43	2.44
平均值	1.51	1.52	1.50	1.59	1.58	1.57	2.46	2.47	2.45
RSD%	1.16	1.01	1.43	0.96	0.80	1.22	2.85	2.50	2.14
不同天 RSD%	0.58			0.34			0.35		

3.6 耐用性

氢谱测试中，最常采用激发脉冲的宽度（pulse width, P1）为 30°或 90°，即对应布鲁克谱仪 zg30 和 zg 脉冲序列。与常温探头相比，超低温探头能有效降低谱图噪音，提升检测灵敏度。

分别使用 zg 和 zg30 脉冲序列、以及在不同谱仪（600 MHz 超低温探头、500 MHz 常温探头）上的测试结果见表 4。不同脉冲序列，D1 值设定合理，所得结果均满足要求。不同谱仪测试结果无明显差异，即 500 M 常温探头谱仪能满足 C-Ps 该含量的测定，方法的普适性强，易于推广。

表 4 不同脉冲、不同仪器下定量结果对比

编号	6A	6B	10A
----	----	----	-----

	600 兆	600 兆	500 兆	600 兆	600 兆	500 兆	600 兆	600 兆	500 兆
	zg	zg30	zg	zg	zg30	zg	zg	zg30	zg
平均值 %	1.51	1.52	1.52	1.59	1.58	1.55	2.46	2.46	2.46
RSD %	1.16	1.42	1.23	0.96	0.66	1.57	2.85	2.65	2.59

4 结论

本实验以 6A、6B 和 10A 型三种肺炎链球菌荚膜多糖为样品，利用内标法，建立和验证了肺炎链球菌荚膜多糖中 C-Ps 杂质含量的核磁氢谱定量方法。该方法前处理简便，特异性强，精密度高，重现性好。本方法为 C-Ps 的绝对定量提供了新技术，为肺炎疫苗的质量控制研究提供了依据。

甘油磷酸胆碱分子中的磷酸胆碱片段所处化学环境类似 C-Ps 中的磷酸胆碱。在 ^1H NMR 谱图上，甘油磷酸胆碱氮甲基为尖锐单峰，与 C-Ps 磷酸胆碱氮甲基峰基本重叠。对 C-Ps 中的氮甲基进行积分时，能将甘油磷酸胆碱的氮甲基峰完全包含。因此甘油磷酸胆碱不仅可用于验证内标定量方法的准确性，还可作为 C-Ps 标准品的替代品，开展核磁共振外标法定量的相关工作。

参考文献:

[1] Talaga P, Bellamy L, Moreau M. Quantitative determination of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Vaccine*, 2001, 19(20/21/22): 2987-2994.

[2] Yao K H, Yang Y H. *Streptococcus pneumoniae* diseases in Chinese children: Past, present and future[J]. *Vaccine*, 2008, 26(35): 4425-4433.

[3] Stanek R J, Norton N B, Mufson M A. A 32-year study of the effect of pneumococcal vaccines on invasive *Streptococcus pneumonia* disease[J]. *Am J Med Sci*, 2016, 352(6): 563-573.

[4] 吴元元, 沈荣. 肺炎链球菌C多糖的研究现状[J]. *微生物学免疫学进展*, 2011, 39(01): 66-70.

[5] Karlsson C, Jansson P E, Skov Sorensen U B. The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms. Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine[J]. *European J. Biochem*, 1999, 265: 1091-1097.

- [6] Xu Q W, Abeygunawardana C, Ng A S, *et al.* Characterization and quantification of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide preparations[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 336(2): 262-272.
- [7] Garrido R, Baró B, Soubal J P, *et al.* Quantitative assessment of C-polysaccharide in capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* by ^{31}P NMR[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 192: 113670.
- [8] Ip C C, Manam V, Hepler R, *et al.* Carbohydrate composition analysis of bacterial polysaccharides: optimized acid hydrolysis conditions for HPAEC-PAD analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, 201(2): 343-349.
- [9] Talaga P, Bellamy L, Moreau M. Quantitative determination of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Vaccine*, 2001, 19(20): 2987-2994.
- [10] 吴元元,李雄雄,沈荣,等. 肺炎链球菌C多糖含量检测方法的建立[J]. *微生物学免疫学进展*, 2019, 47(02): 22-28.
- [11] 中华人民共和国药典(2020年版)四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [12] Fischer W, Behr T, Hartmann R, *et al.* Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide) [J]. *European J. Biochem*, 1993, 215: 851-857.
- [13] Abeygunawardana C, Williams T C, Sumner J S, *et al.* Development and Validation of an NMR-Based Identity Assay for Bacterial Polysaccharides[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 279: 226 -240.
- [14] 宗克强,罗树权,谭小梅. 肺炎链球菌荚膜多糖纯化及质量控制方法的研究现状[J]. *微生物学免疫学进展*, 2021, 49(3), 82-87.
- [15] 王玺,李阿妮,张轶,等. 核磁共振氢谱分析法在肺炎球菌荚膜多糖疫苗质量控制中的应用[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(23): 2681-2686.
- [16] 许美凤,陈琼,李茂光,等. 定量 ^1H -NMR法测定6B,10A,17F,19A,19F及20型肺炎链球菌荚膜多糖含量[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(21): 2481-2485.
- [17] 许美凤,毛琦琦,赵丹,等. b型流感嗜血杆菌荚膜多糖定量 ^1H -NMR法的建立及验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(09): 1010-1014+1019.

中国仪器仪表学会