

1 附件 1

2 多糖结合疫苗核磁共振研究的技术考虑

3 (征求意见稿)

4

5 一、概述

6 多糖结合疫苗为荚膜多糖与载体蛋白共价结合形成的复合物，该复合物可
7 提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性，如 b 型流感嗜血杆菌多糖结合疫苗、脑膜
8 炎球菌多糖结合疫苗和肺炎球菌多糖结合疫苗等。

9 核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 技术系多糖结合疫苗研发有
10 力的分析技术手段之一，该方法一般不对样品做破坏性的化学处理，具有专属
11 性高、准确性好、一次实验可检测多项指标的优势，可应用于多糖结合疫苗的
12 工艺表征、质量特性研究、质量控制等，以评价多糖结合疫苗不同生产阶段中
13 间产物的结构特性、多糖抗原表位的潜在变化及批间一致性。但 NMR 技术存在
14 较高的分析难度，需根据不同的研究目的 (糖链的解析、修饰基团的确证、杂
15 质的分析等)，选用不同的样品预处理方式、测定方式 (溶液浓度调整、内标
16 物添加等) 和谱图类型 (一维谱、二维谱等)，同时可能涉及到复杂的谱图解
17 析工作。

18 随着 NMR 技术在多糖结合疫苗研发过程和上市产品中的广泛应用，出现了
19 在检测样品处理、分析方法、检测报告、检测仪器参数性能等方面的诸多共性
20 问题和方法学挑战，如合适的 NMR 设备选择及设备验证、产品预处理方法评估
21 及选择、不同阶段产物特性对分析操作及结果解析的影响等。此外，不同企业
22 对该方法的理解和使用存在较大差异，如，NMR 技术进行杂质分析及结构确证
23 可实现程度及结果精准度、核磁谱图标注信息及对于谱图解析存在较大差异等。

24 药品审评中心针对上述共性问题 and 常见问题，结合现有产业及分析机构经
25 验，形成 NMR 技术在多糖结合疫苗研究中基本原则和关键操作步骤的技术要点，
26 以期进行方法学的规范和细化，建立规范的标准以推动该技术的落地、应用和
27 实施。

28 本文所指的多糖特指细菌荚膜多糖。对于含脂多糖的多糖结合疫苗，可根
29 据产品特性及其适用性予以参考本技术要点。

30 二、常见问题及建议

31 1.核磁共振技术在多糖结合疫苗质量研究中的应用

32 NMR 技术可用于从精制多糖到多糖蛋白结合物原液的全过程产物的表征和
33 分析，包括结构解析、鉴别试验、多糖和特异基团定量、杂质检测和修饰度检
34 测等。表 1 总结了核磁共振技术在多糖结合疫苗不同生产阶段中的应用。通常
35 采用一维氢核磁共振 (^1H NMR) 即可满足多数检测需求，但对于结构确证和个
36 别杂质含量分析，需结合其他方法（如二维谱图等）进行综合评估。

37 NMR 技术系通过多糖分子中特定原子的化学位移实现结构确证，既可进行
38 定性研究，也可用于定量研究，如，利用特征原子的化学位移、耦合裂分和谱
39 峰积分数值可进行多糖鉴别；利用特征原子谱峰的积分数值进行定量分析。对
40 于定性研究，应明确特征信号的化学位移、耦合裂分和积分数值。对于定量研
41 究，则应明确原子的特征化学位移及其专属性，根据其积分数值与内标的比较
42 进行定量，首选单一峰进行定量积分，若单一峰无法满足定量分析方法要求，
43 应进行充分论证，可根据谱峰的指认结果和分析方法验证要求选择多个峰予以
44 定量计分。如果研究对象化学位移难以指认，或受其它因素干扰，则可采取其
45 他方式予以辅助解决。

46 多糖结合疫苗以多糖为主要抗原成分，多糖结构是确保其抗原性、抗体特
47 异性及功能性杀菌抗体生产的物质基础，应对其多糖结构进行充分的结构解析。
48 由于细菌多糖抗原的生物合成受到基因调控、代谢调节和细胞信号传导等多个
49 因素的影响，应对精制多糖 NMR 谱图中所有可分析的化学位移进行归属分析，
50 “应解尽解”，并以此作为后续中间品鉴别和含量分析的依据。对于活化多糖、
51 衍生多糖、多糖蛋白结合物的 NMR 研究，则重点关注全工艺过程不同工艺步骤
52 对多糖分子特异糖单元或基团的影响。

53 尽管多糖蛋白结合物中因载体蛋白的引入降低了多糖的核磁分辨率，同时
54 样品前处理可能使部分定量分析结果与多糖蛋白结合物实际情况存在差异，但
55 随着设备和分析方法等技术进步，采用现有 NMR 技术对多糖蛋白结合物的多糖

56 抗原和杂质等进行定量研究具有可行性，建议结合产品特性、检测需求等，优
 57 化试验条件以尽可能将 NMR 技术应用于多糖蛋白结合物的关键质量特性分析。

58 此外，多糖结合疫苗部分质量特性研究及质量标准可通过 NMR 法或非
 59 NMR 法等多种方法检测，如涉及，建议对不同方法所测结果进行比对分析。同
 60 一样品采用 NMR 法的定量结果，可能与化学显色法和离子色谱法等有一定差异，
 61 应对分析方法进行评估，确定方法适用性。

62 表 1 核磁共振技术在多糖结合疫苗中的参考应用范围

样品 检测项目	精制多糖和 降解多糖	活化多糖	衍生多糖	多糖蛋白结合物
结构确证	+	/	/	/
鉴别试验（特异糖单元 或基团的定性分析）	+	+	+	+
多糖定量	+	+	+	+/-
特异糖单元或基团定量	+	+	+	+/-
产品杂质鉴别	+	+	+	+
产品杂质定量	+	+	+	+/-
工艺相关杂质鉴别	+	+	+	+
工艺相关杂质定量	+	+	+	+/-
多糖修饰度	/	+	+	/

63 注：+：适用；/：不适用；+/-：如适用则开展
 64 所有定量试验必须有特征性化学位移，且该位移信号可用于定量积分
 65 “多糖修饰度”不适用于精制多糖、降解多糖、多糖蛋白结合物

66

67 2.核磁共振技术在多糖结合疫苗质量研究中的关注点

68 2.1 多糖结构确证及解析

69 细菌多糖抗原的生物合成受到基因调控、代谢调节等多因素影响，应采用
 70 NMR 技术对精制多糖开展充分的结构解析，归属多糖端基区、环质子区和甲基
 71 质子区等可明确分辨的谱峰化学位移。

72 多糖结合疫苗生产工艺较为复杂、且存在破坏多糖抗原免疫表位的潜在可
 73 能，需要加强中间产物多糖抗原化学结构的监测，重点关注不同工艺阶段中间
 74 产物（降解多糖、活化多糖、衍生多糖、多糖蛋白结合物）各谱峰的化学位移
 75 等变化，以及对可能出现的新特征性原子谱峰予以归属。

76 利用 NMR 技术开展多糖的结构解析时，原则上，建议综合应用一维核磁谱
77 图（如氢谱、碳谱、磷谱）、二维核磁谱图（如 ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^1H TOCSY、
78 ^1H - ^1H NOESY、 ^1H - ^{13}C HSQC、 ^1H - ^{13}C HMBC 等），整合分析各谱峰的化学位
79 移、积分数值、耦合裂分等信息，实现糖链谱图的谱峰指认和结构确认。但鉴
80 于多糖结合疫苗研发与生产中所用多糖抗原通常为已知结构物质，对于谱峰较
81 为分散的多糖，建议可结合文献报道核磁谱图，通过一维核磁谱图对比，实现
82 多糖结构与预期结构一致性的评价；对于一维核磁谱图各谱峰较为拥挤、重叠
83 的多糖，需根据多糖结构特点，采用合适的二维核磁谱图，实现糖链结构的完
84 整解析。

85 2.2 鉴别试验

86 NMR 技术可用于多糖及其降解物、活化多糖、衍生多糖等特异基团定性分
87 析的鉴别试验。可根据 ^1H NMR 中特征信号的化学位移、耦合裂分和积分数值
88 判断多糖结构特征，相关试验须明确特征性质子多糖化学结构中的归属、相
89 对数量及其化学位移的范围。精制多糖的鉴别试验还应该关注特征质子区是否
90 有杂峰，并尽可能分析杂峰的归属。

91 多糖 NMR 鉴别试验除上述对各种产物的型特异性鉴别外，还可用于生产用
92 菌株鉴定，可通过对多糖产物进行结构鉴别以辅助菌株鉴定。尤其是采用新来
93 源生产用菌株时，可采用 NMR 分析对多糖产物进行鉴别，以对生产用菌株的适
94 用性予以确认。

95 2.3 多糖含量检测

96 通常可采用 ^1H qNMR（quantitative NMR，定量 NMR）进行多糖含量分析。
97 进行含量检测时，应选择化学位移受其它信号干扰较小的质子，一般首选端基
98 质子，如端基质子不可用，则可以考虑其它含量稳定的、专属性强的特征性质
99 子。如多糖含有不完全修饰残基（如部分 O-乙酰化）则应该分别对多糖链和残
100 基定量，计算得出总多糖含量。

101 2.4 特异糖单元或特异基团含量检测

102 在化学位移明确且不受干扰的前提下，多糖常见的特异基团或特异糖含量
103 均可采用 ^1H qNMR 法定量，包括唾液酸、O-乙酰基、糖醛酸、氨基己糖、甲基
104 戊糖、核糖醇、丙酮酸等，具体情况需结合多糖结构进行分析。

105 部分特异基团分析可能存在挑战，如甘油特征谱峰与多糖谱峰信号重叠，
106 导致 NMR 法难以利用独立定量峰对甘油进行定量。鼓励利用氢谱中特征信号区
107 域的氢归属和积分数值，开展相关特异基团的定量，并提供合理性依据。

108 **2.5 多糖修饰度检测**

109 对于活化多糖和衍生多糖，应该关注经修饰后多糖的特异基团含量。通常
110 情况下，如果活化、衍生位点所含的氢质子信号满足用于积分定量的前提要求，
111 则可使用该积分定量对活化率、衍生率进行定量分析。

112 **2.6 产品相关杂质鉴别和定量**

113 NMR 技术可用于检测产品相关杂质，其更多应用于精制多糖产品相关杂质
114 研究。由于精制多糖多提取自细菌发酵产物，而细菌细胞壁含有多种形式的多
115 糖，部分杂质多糖可能残留在产品中，应根据风险评估结果进行定量分析，尽
116 可能对杂质多糖特征谱峰进行归属分析。

117 如 C 多糖为肺炎球菌的细胞壁多糖，由于其分子大小与荚膜多糖类似，在
118 纯化过程中存在挑战，而残留的 C 多糖对多糖结合疫苗免疫原性存在潜在影响。
119 C 多糖特征性原子化学位移明确，可采用 ^1H qNMR 等进行定量分析，但需对该
120 方法的灵敏度予以重点关注。

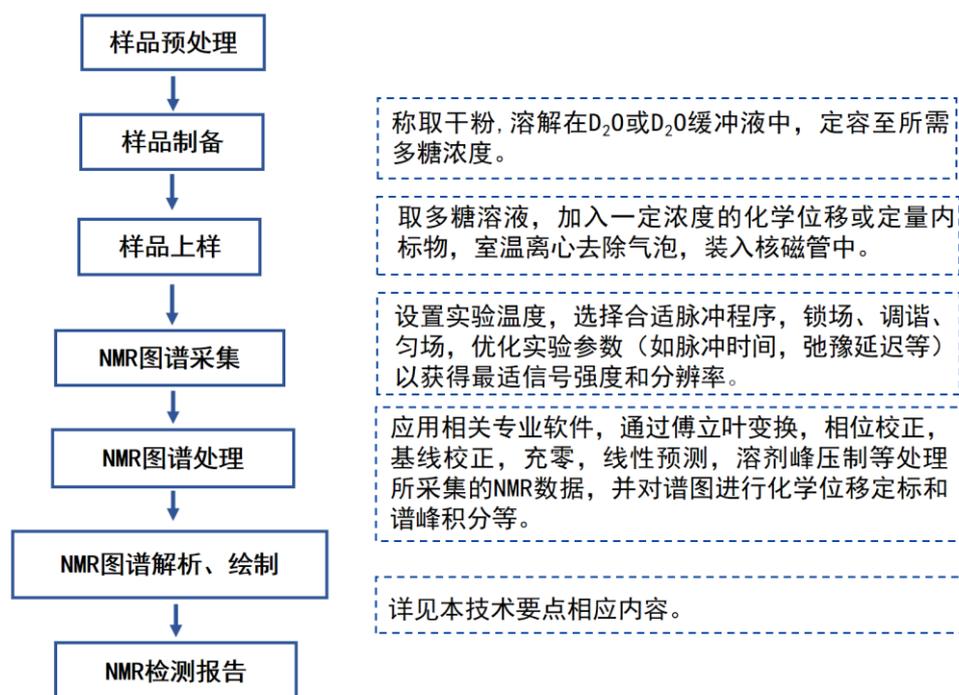
121 **2.7 工艺相关杂质鉴别和定量**

122 多糖纯化过程中引入的试剂，如十六烷基三甲基溴化铵（Hexadecyl
123 trimethyl ammonium bromide, CTAB）、乙醇等，可能在 ^1H NMR 谱图上呈明显
124 的谱峰，这些物质在一定含量范围可被检测。衍生过程中添加的连接子，在结
125 合和游离状态下的特征化学位移若有差异，可利用 NMR 测定游离态连接子残留
126 量。对于不能采用一维 NMR 检测的杂质，鼓励采用二维 NMR 法。

127

128 **3.核磁共振技术方法学**

129 一般流程：



130

131

3.1 仪器设备及参数设定

132

应根据检测目的选择和优化检测参数, 其中核磁共振波谱仪的场强是重要的影响参数, 越高的场强意味着更高的灵敏度, 有助于减少采集时间。对于定量分析试验, 一般建议 600 MHz 以上, 同时可通过增加浓度、增加定量 NMR 法的扫描次数等方法增强信号。

136

不同多糖及同一多糖不同中间产物的化学结构、溶解性质均存在较大差异, 将对 NMR 信号强度产生影响。因此, 需要对各种不同性质的多糖抗原开展具有针对性的核磁实验参数优化, 以获得最佳的 NMR 谱图采集效果。通常可对检测弛豫延迟时间、温度、扫描次数等参数开展优化。另外, 对于黏度较高的多糖, 可提高检测温度以降低样品黏度。

141

核磁共振波谱仪应定期进行仪器性能确认, 确认内容包括检测温度校正、线性、分辨率以及信噪比等。

143

3.2 内标物的选择依据

144

内标是核磁共振谱图分析的重要依据。在进行定量核磁共振实验时, 通常将称定的样品溶于含内标的溶液中, 通过比较样品和内标特征峰的积分面积完成定量, 因此内标的选择会对结果准确性产生很大的影响。在选定内标时, 需要注意以下几点: 1.内标应当易于称量、易溶于所选用的氘代试剂, 化学性质

145

146

147

148 稳定且不与待测物发生反应；2.内标应结构简单，在核磁氢谱中最好具有单一
149 谱峰，且该谱峰应具有较高强度、适宜的峰宽；3.内标谱峰和待测物质谱峰基
150 线分离；4.内标物质量值应可溯源。

151 3.3 核磁共振技术样品及样品关注点

152 对于多糖抗原的结构解析和鉴别试验，制备样品时将一定质量充分干燥的
153 多糖溶解于氘代试剂（一般为重水或重水配置的缓冲液）中即可，要注意该检
154 测液中应包含化学位移定标的参考物质（如 TSP-d4 或 DSS-d6）。

155 多糖普遍具有较好的水溶性，NMR 样品检测液的溶剂通常选用同位素氘纯
156 度大于 99%的重水，而不同多糖的溶解性存在差异，为了提高 NMR 谱图信号的
157 强度，需尽可能提高多糖检测液的浓度。但随着多糖浓度提高，检测液黏度也
158 随之提高，不仅增加了样品配制的操作难度，还将降低谱图的分辨率，导致各
159 个谱峰的积分值存在较大误差，尤其对于定量核磁实验的开展造成不利影响。
160 多糖核磁检测液推荐浓度范围通常为 1-5 mg/mL，加入核磁管中检测液量约为
161 0.6mL。实际检测中，需结合不同多糖抗原在水中的溶解度，进一步确认最适
162 的多糖核磁检测液浓度，兼顾核磁信号强度和分辨率。此外，由于多糖水溶液
163 黏度相对较大，制样中易产生气泡影响谱图质量，样品在加入核磁管前可通过
164 适宜手段，如室温短时间离心、超声等手段去除核磁管内溶液中的气泡，以提
165 高核磁谱图质量。

166 对于多糖抗原含量的定量分析，应称定待检多糖，并精密量取含一定浓度
167 内标物的氘代试剂溶解多糖，给予充分溶解时间以保证多糖的完全溶解。多糖
168 的水分含量对谱图质量及定量准确性存在潜在影响，称量过程中应尽可能保持
169 环境干燥，防止多糖吸潮。为保证称量准确性，一次称量多糖的重量建议不低
170 于 10mg，多糖溶液浓度具体视多糖结构、溶解度和多糖溶液黏度而定。

171 除上述不同分析目的中对样品处理方式的关注点外，还需关注不同预处理
172 方式对产物分析结果可能产生的影响，具体如下：

173 精制多糖、降解多糖、活化多糖、衍生多糖、多糖蛋白结合物均应采用冻
174 干产物进行检测，但冻干过程可能会去除易挥发杂质，应采用适宜的方法对冻
175 干前后杂质的残留情况予以确认。

176 对于活化多糖、衍生多糖及多糖蛋白结合物的分析方法适用性，应综合目
177 标检测物取样的可行性、冻干的可行性、溶解性和溶解后的稳定性予以评估。
178 结合物原液检测前如需进行浓缩、脱盐或在特殊溶液中检测，还应考虑上述步
179 骤及情况是否改变结合物分子的溶解性和关键质量属性，并判断所造成的变化
180 是否对定性和定量分析结果产生影响。

181 3.4 核磁共振谱图处理和分析建议

182 待测样品经预处理、制样、上样和核磁共振谱图采集后，需对各谱图进行
183 相应处理，包括傅立叶变换、相位校正和基线校正等步骤，可根据测试目的
184 （定性或定量分析）设置其它相关参数，以内标物的谱峰为参考峰确定待测物
185 谱峰的化学位移。在谱图处理中需根据谱图质量（如灵敏度和分辨率）和实验
186 目的（如定性和定量分析）调整优化相关参数。对于一维谱图，根据需要调整
187 参数 LB（line broadening）；对于二维谱图，根据需要调整充零（ZF, zero
188 filling）和线性预测（LP, linear prediction）参数。

189 一维氢谱的分析应至少包括谱峰的指认、谱峰的定性和（或）定量。对已
190 有文献谱图可供参考的多糖，其谱峰指认一般参考文献结果完成，对谱图进行
191 标峰或积分处理，可进行多糖定性或定量检测。

192 对于一维氢谱较为复杂且暂无可参考文献的多糖，需结合二维谱图或其它
193 检测方法进行解析和谱峰的指认。谱图解析可优先指认氢（ ^1H ）化学位移，通
194 常结合一维 ^1H 谱和二维 ^1H - ^1H COSY、TOCSY、NOESY 谱图获得较完全的指
195 认；对于碳（ ^{13}C ）化学位移，一般可通过一维 ^{13}C 和二维 ^1H - ^{13}C HSQC、HMBC
196 进行指认；对于磷（ ^{31}P ）化学位移，通常通过一维 ^{31}P 和二维 ^1H - ^{31}P 谱图进行
197 指认。

198 3.5 质量标准的制定与方法验证要求

199 鼓励将 NMR 分析方法纳入放行质量标准，质量标准的制定可参照《中华人
200 民共和国药典》、ICH Q6B 和国内外相关指导原则等，根据产品特点对生产工
201 艺、各阶段质量研究数据、批次放行检测结果及稳定性研究结果进行综合考虑。

202 对于 NMR 用于不同检测项目标准限度的设定，应依据分析目的及工艺性能
203 等进行不同的侧重考虑。对于多糖鉴别试验，可根据特征质子的化学位移、耦
204 合裂分和积分数值等进行定性判断。对于特异糖单元和特异基团含量检测的质

205 量标准，应根据分析方法、产品特性及检测项目实测值进行设定。对于修饰度，
206 除实测值外，应综合工艺目的考虑设定。对于杂质应根据残留限度和工艺性能
207 等设定。

208 对于放行检测的核磁分析应参考现行版《中华人民共和国药典》中“分析
209 方法验证指导原则”要求开展相应的验证。对于结构确认等定性分析方法，应
210 当进行专属性和耐用性验证，专属性应考虑特征性原子化学位移的指认；对于
211 定量分析，应当进行专属性、线性、准确度、精密度、耐用性等方面的验证，
212 并具有可接受的信噪比；对于杂质等残留量测定类方法，除上述定量分析所需
213 的验证外，还需增加定量限和检出限的考察。在专属性方面，除了考虑特征性
214 原子化学位移的指认，还应该考察该化学位移是否受其它信号的干扰。

215

216 4.检测报告

217 核磁共振检测报告应符合检测报告的一般要求，需能体现完整的谱图分析
218 过程。对于定量分析，应提供完整的计算过程。包含但不限于以下几个方面
219 内容：

220 (1) 设备信息：应包括核磁共振波谱仪的型号、场强、探头型号等信息。

221 (2) 测试参数：应包括脉冲程序、脉冲角度、扫描次数、弛豫时间、谱宽、
222 采集点数、检测温度等。

223 (3) 供试品配制：应提供氘代试剂及内标物质的名称、纯度、批号，内标
224 和样品称量、样品溶解及稀释过程。

225 (4) 结果分析：应针对谱图分析制定标准化流程和参数，以避免人为随机
226 操作带来的误差。

227 对于定性分析，测试结果部分应至少包含氢谱，鼓励提供二维谱图，对于
228 含磷多糖鼓励提供磷谱；应标注多糖特征谱峰化学位移，并提供对各个特征谱
229 峰的归属、特征谱峰与规定化学位移或参比谱图一致的说明。参比谱图应采用
230 经验证的方法、代表性批次产品得出。

231 对于定量分析，测试结果部分应至少包括定量内标浓度、用于定量的内标
232 特征谱峰归属及原子数、用于定量原子的特征谱峰的归属及该谱峰对应原子数、
233 积分范围及积分面积、用于定量的特征谱峰的信噪比。应提供标注有定量特征

234 峰化学位移及积分面积、内标积分面积的原始谱图。结果计算部分，应提供明
235 确的计算公式及根据公式得出结果的计算过程。

236

237 三、参考文献

238 1. 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》（2020年版）. 2020.

239 2. CDE. 多糖结合疫苗药学研究及评价技术指导原则. 2024.

240 3. WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (51st
241 WHO TRS N 897 (A1): 2000) Recommendations for the production and control of
242 *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines.

243 4. WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (57th
244 report: WHO TRS N 962 (A2): 2006) Recommendations to assure the quality, safety
245 and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines.

246 5. WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (55th
247 report: WHO TRS N 924 (A2): 2004) Recommendations for the production and control
248 of meningococcal group C conjugate vaccines.

249 6. WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION (60th
250 report: WHO TRS N 927 (A2): 2009) Recommendations to assure the quality, safety
251 and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines.

252 7. The United States Pharmacopeial Convention. 《Vaccines for human use-
253 Polysaccharide and glycoconjugate vaccines》. 2017.