色谱法制备肺炎球菌多糖及其质量评价

王瑞峰[1]，林彦彬[1]，苏晓叶[1]*，胡国伟[1,2]
（1. 北京智飞绿竹生物制药有限公司，北京 100176；2. 北京市细菌性疫苗工程技术研究中心，北京 100176）

摘要：为进一步提高生产工艺的适用性以及生产操作的安全性，该研究建立了一种无乙醇、无苯酚的色谱法，用于制备肺炎球菌多糖。以工艺控制能力（包括目标物质回收能力和杂质去除效果）和产品关键质量属性作为主要考察指标，通过研究确认的关键工艺参数如下：超滤膜包截留分子量 100 000，超滤透析倍数≥ 20，十六烷基三甲基溴化铵质量分数 1.0%（制备 23F 型肺炎球菌多糖时调整为 3.0%），流动相 pH 值 6.7 ～ 7.1。利用已建立的色谱法，按照商业化生产规模进行肺炎球菌多糖的纯化和制备，所得肺炎球菌多糖的各项质量指标均符合 ChP 2020 年版标准，并在 60 个月内展现了良好的稳定性。该方法稳定、可靠，可为肺炎球菌多糖的商业化规模生产提供技术支持。

关键词：肺炎球菌多糖；疫苗；色谱法；纯化；稳定性
中图分类号：TQ464.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)12-1535-10
引用：王瑞峰，林彦彬，苏晓叶，等．色谱法制备肺炎球菌多糖及其质量评价［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(12)：1535-1544．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.12.006

Preparation of Pneumococcal Polysaccharides by Chromatography Method and Their Quality Evaluation

WANG Ruifeng[1], LIN Yanbin[1], SU Xiaoye[1]*, HU Guowei[1,2]
(*1. Beijing Zhifei Lvzhu Biopharmaceutical Co., Ltd., BeiJing 100176; 2. Beijing Bacterial Vaccine Engineering Research Center, Beijing 100176*)

ABSTRACT: To further improve the applicability of production process and safety of production operations, this study established a chromatography method without ethanol or phenol for the preparation of pneumococcal polysaccharides. With the process control capability (including the recovery ability of the target substance and the impurity removal effect) and crucial quality attributes of the product as the main evaluation indicators, this study confirmed the crucial process parameter as follows: ultrafiltration cassettes with a molecular weight cut-off of 100 000, ultrafiltration dialysis multiples ≥ 20, hexadecyl trimethyl ammonium bromide mass fraction of 1.0 % (3.0 % for pneumococcal polysaccharide type 23F), chromatography buffer pH value of 6.7 – 7.1. In compliance with the commercial production scale, the chromatography method was used to isolate and purify pneumococcal polysaccharides. The quality of the pneumococcal polysaccharides prepared by the chromatography method is in line with the standards of ChP 2020 Edition. And the polysaccharides exhibited good stability over 60 months. It indicated that the established process were stable and reliable, providing a technical support for the commercial-scale production of pneumococcal polysaccharide.

Key Words: pneumococcal polysaccharide; vaccine; chromatography; purification; stability

肺炎链球菌是幼儿和老年人的重要致病源，在全球范围内引发脑膜炎和中耳炎等侵袭性疾病[1]。目前已知的肺炎链球菌超过 90 种血清型[2]。在这些血清型中，引起疾病的主要有 20 多个。肺炎链球菌感染的防治多采用接种疫苗的方式，其中肺炎球菌多糖疫苗和肺炎球菌多糖结合疫苗较为常用。肺炎球菌多价疫苗是从多型肺炎链球菌培养液中分别提

收稿日期：2025-09-05
作者简介：王瑞峰，中级工程师，从事细菌性疫苗研发及生产工作。
通信作者：苏晓叶，硕士，副高级工程师，从事细菌性病毒类疫苗研发及生产工作。

取、纯化荚膜多糖抗原，再以适当比例稀释、合并制成。目前，国产多价肺炎链球菌多糖疫苗已上市，所含的血清型与 WHO 建议使用和 EP 11.0 版规定的基本一致，且与默沙东公司研发上市的 23 价肺炎球菌多糖疫苗（商品名为纽莫法）的血清型存在重叠。国产疫苗中的血清型占引起肺炎球菌感染血清型的 85%，并且包括了 90%以上已报道的青霉素耐受的血清型[3—4]。然而，肺炎球菌多糖型别多、生产周期长、制备难度大，且已上市疫苗采用苯酚、乙醇等危险化学试剂制备荚膜多糖，会产生大量废弃有机溶剂，不利于人体健康和环境保护[5—7]。因此，本研究旨在建立一种适用于不同型别肺炎球菌多糖的色谱纯化方法，以缩短生产周期、减少环境污染及对工作人员的危害，从而降低不良反应风险、提高安全性，为生产高品质产品奠定基础。

1　仪器与试药

TK 系列发酵系统、TK 系列过程料液储罐、LYO-1 型药用真空冷冻干燥机均购于上海东富龙制药设备制造有限公司；Sorvall BOIS 16 型大容量离心机（美国 Thermo Fisher 公司）；CMZ CUF400A 型超滤系统（德国 Merck Millipore 公司）；AKTAprocess 型色谱系统（美国 GE 公司）。

哥伦比亚血琼脂培养基（广州市迪景微生物科技有限公司）；胰酪大豆液体培养基（TSB，德国 Merck 公司）；肺炎球菌鉴别用血清（丹麦国家血清研究院）；脱氧胆酸钠和十六烷基三甲基溴化铵（hexadecyl trimethyl ammonium bromide，CTAB）均购于美国 VWR 公司；碘化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠均购自国药集团化学试剂有限公司；羟基磷灰石填料（CHT Ⅱ型，美国 Bio-Rad 公司）；超滤膜包（截留分子量 100 000，聚醚砜材质，德国 Millipore 公司）；注射用水为本公司水系统制备所得；其他化学试剂为分析纯。

各型别肺炎链球菌来源于中国医学细菌保藏管理中心，于 －20 ℃以下的环境保存。

2　方法与结果

2.1　多糖制备

使用全自动发酵系统，采用 TSB，在 36 ～ 38 ℃、pH 6.8 ～ 7.5 条件下培养各型别肺炎链球菌；逐级放大培养不超过 5 代，第 5 代为 1 000 kg 规模发酵。于对数生长期后期或稳定期前期为发酵终点，加入脱氧胆酸钠溶液进行灭活。

首先，用乙酸将灭活后的菌液调至 pH 5.0，采用连续流离心法（8 400 r/min）去除菌体碎片，收集上清液。上清液经澄清、过滤后，使用截留分子量为 100 000 的超滤膜包，用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.9）进行超滤；超滤后，用碳酸钠溶液将料液调至 pH 7.4，加入阳离子去污剂 CTAB，使其终质量分数为 1%～ 3%，20 ℃离心（5 000×*g*）1 h，收集沉淀。沉淀物中加入氯化钠，使其终浓度为 0.25 ～ 0.35 mol/L，从而使多糖与 CTAB 解离；离心（5 000×*g*）1 h，收集上清液，加入碘化钠（可与 CTAB 形成沉淀），使其终质量分数为 0.5%，静置 1 h 后离心（14 000×*g*）1 h，收集上清液。所得上清液经澄清、过滤后，用截留分子量为 100 000 的超滤膜包、0.005 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.8±0.2）超滤，再经滤芯澄清、过滤，采用羟基磷灰石填料进一步纯化，得肺炎球菌多糖料液。

在上述肺炎球菌多糖的制备过程中，会引入脱氧胆酸钠、CTAB、碘化钠等小分子工艺杂质，这些杂质可通过超滤工艺去除。因此，在纯化过程中通过监测 206 nm 处的吸光度值，收集主流穿峰为多糖组分的料液；然后，用截留分子量为 100 000 的超滤膜包、注射用水超滤；最后，超滤液经预冻、升华干燥、解析干燥等过程，得到纯化的各型别肺炎球菌多糖冻干粉末。

2.2　多糖纯化工艺的优化

2.2.1　超滤工艺选择

超滤工艺中所用的超滤膜包孔径和透析倍数会直接影响目标物质的回收效果及杂质去除效果，需进行考察。

2.2.1.1　截留分子量

根据各型别肺炎球菌多糖的相对分子质量（180 000 ～ 1 300 000）及已有报道[6]，选用截留分子量为 100 000 的超滤膜包进行超滤。取样后通过蒽酮硫酸法检测超滤后料液中的多糖含量。该法检测的原理是：糖类在高温下可经浓硫酸脱水生成糠醛或羟甲基糠醛，然后与蒽酮脱水缩合，形成呈蓝绿色的糠醛衍生物；并且，产物颜色的深浅与糖含量

成正比，进而可换算出料液中多糖的含量和回收率。由图 1 可见，采用截留分子量为 100 000 的超滤膜包纯化 23 个型别肺炎球菌多糖时，各型别多糖的回收率均达到 85%以上，表明该法对目标物质的回收能力良好。

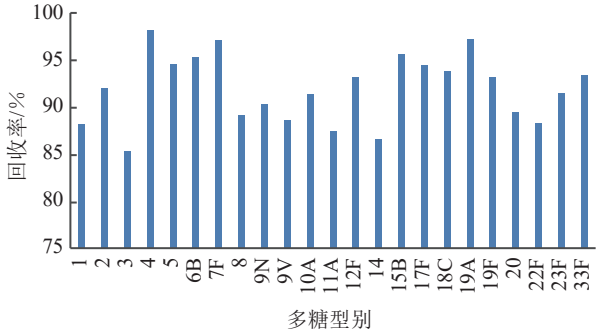


图 1 各型别肺炎球菌多糖的回收率

Fig.1 Recoveries of Different Types of Pneumococcal Polysaccharides

2.2.1.2 透析倍数

超滤透析量直接决定置换效果，从而影响杂质去除效果，因此需要进行确认。在透析液体积确定的前提下，采用恒液位透析形式，透析结束后的料液中小分子浓度较低，浓度计算公式如下。

$$c_n=c_0\times\frac{1}{e^n}$$

式中：c_n 和 c_0 为透析结束和透析初始时的小分子浓度；n 为透析液体积相对于恒液位体积的倍数。

根据上述公式计算得，当透析液倍数达到 5，$c_n=c_0\times0.67\%$，即去除率 >99%。鉴于实际生产过程中的影响因素较多，为保证透析效果，本研究采用透析液倍数≥ 20 倍的工艺参数，并对相关杂质的去除效果进行确认，各杂质的含量检测方法如下。

脱氧胆酸钠：根据 ChP 2020 年版三部《甲型肝炎灭活疫苗（人二倍体细胞）》附录 1“去氧胆酸钠残留量测定法”，检测脱氧胆酸钠含量。

碘化钠：取样品约 3 mL，置石英比色皿中，用纯化水做对照，于 226 nm 处测定吸光度（*A*）值，再计算含量。

CTAB：于试管中依次加入溴甲酚紫溶液 1.2 mL 和 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液 1.0 mL，混匀后加入待检多糖样品 7.8 mL，混匀后室温静置 4 h，以纯化水做对照，于 226 nm 处测定 *A* 值，并计算含量。

结果如图 2（脱氧胆酸钠和碘化钠含量的曲线重合）所示，在肺炎球菌多糖生产过程中，工艺杂质（脱氧胆酸钠、CTAB、碘化钠）去除率均 >99%。其中，CTAB 的去除率达到了 100%。这表明采用截留分子量为 100 000 的超滤膜包且透析倍数≥ 20 的超滤工艺，可有效去除脱氧胆酸钠、CTAB、碘化钠等工艺杂质，适用于肺炎球菌多糖的商业化规模生产。

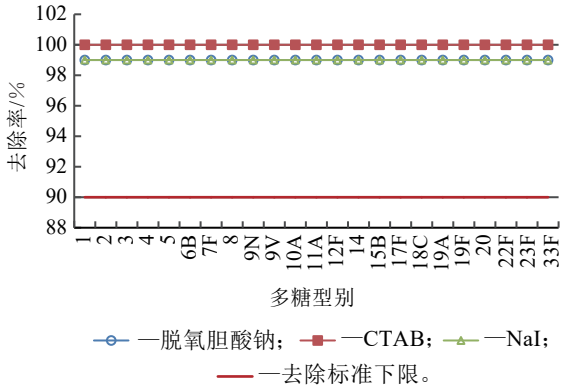


图 2 工艺杂质的去除效果

Fig.2 Removal Effects of Process Impurities

2.2.2 CTAB 质量分数的优化

设置 CTAB 质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%（制备 23F 型多糖时采用 1.0%、3.0%、5.0%），按“**2.1**”项下方法操作，检测多糖产量，并检测多糖特征基团的含量，以及蛋白质、核酸的残留量。

特征基团的含量检测：按照 ChP 2020 年版三部收载方法检定特征基团［糖醛酸（通则 3103）、氨基己糖（通则 0401）、甲基戊糖（通则 0401）、*O*-乙酰基（通则 3117）等］的含量。

蛋白质残留量检测：根据 ChP 2020 年版三部通则 0731 第二法检测

核酸残留量检测：根据 ChP 2020 年版三部通则 0401 检测。

2.2.2.1 23F 型多糖

结果如表 1 所示，CTAB 质量分数对 23F 型肺

炎球菌多糖的产量、蛋白质和核酸的残留量等有显著影响。多糖产量随 CTAB 质量分数的增加而增加，但 CTAB 质量分数为 3.0%和 5.0%时差异并不明显；而蛋白质及核酸的残留量均随 CTAB 质量分数的增加呈先降低后升高的趋势，表明在 CTAB 质量分数为 3.0%时所收获的 23F 型多糖中蛋白质及核酸的残留量最低；同时，其特征基团甲基戊糖的含量随 CTAB 质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势。

综上所述，在 CTAB 质量分数为 3.0%时，所收获的 23F 型多糖中蛋白质及核酸的残留量较低，特征基团含量较高，且多糖产量较高。因此，对于 23F 型肺炎球菌多糖，CTAB 的优化质量分数为 3.0%。

表 1　CTAB 质量分数对 23F 型肺炎球菌多糖的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Effect of CTAB Mass Fraction on Quality of Type 23F Pneumococcal Polysaccharide ($\bar{x}\pm s$, n=3)

23F 型肺炎球菌多糖的质量指标	CTAB 质量分数		
	1.0%	3.0%	5.0%
多糖产量 /g	1.31±0.20	16.35±0.38	19.34±0.45
蛋白质残留量 /%	2.81±0.03	0.64±0.07	1.18±0.06
核酸残留量 /%	0.48±0.04	0.06±0.02	0.12±0.02
甲基戊糖含量 /%	12.68±0.90	43.70±0.74	41.50±0.53

2.2.2.2　其他型多糖

结果如图 3、4 所示，对于 2、3、4、6B、7F、14 型等型别肺炎球菌多糖，随 CTAB 质量分数由 0.5%增加至 1.5%，多糖产量并无显著变化；其余型别肺炎球菌多糖产量随 CTAB 质量分数由 0.5%增加至 1.0%而显著增加，但 1.0%与 1.5%时的产量无明显差异。此外，各型别多糖中蛋白质及核酸的残留量均随着 CTAB 质量分数的增加而降低，但 1.0%与 1.5%时无显著差异。同时，各型别多糖中的特征

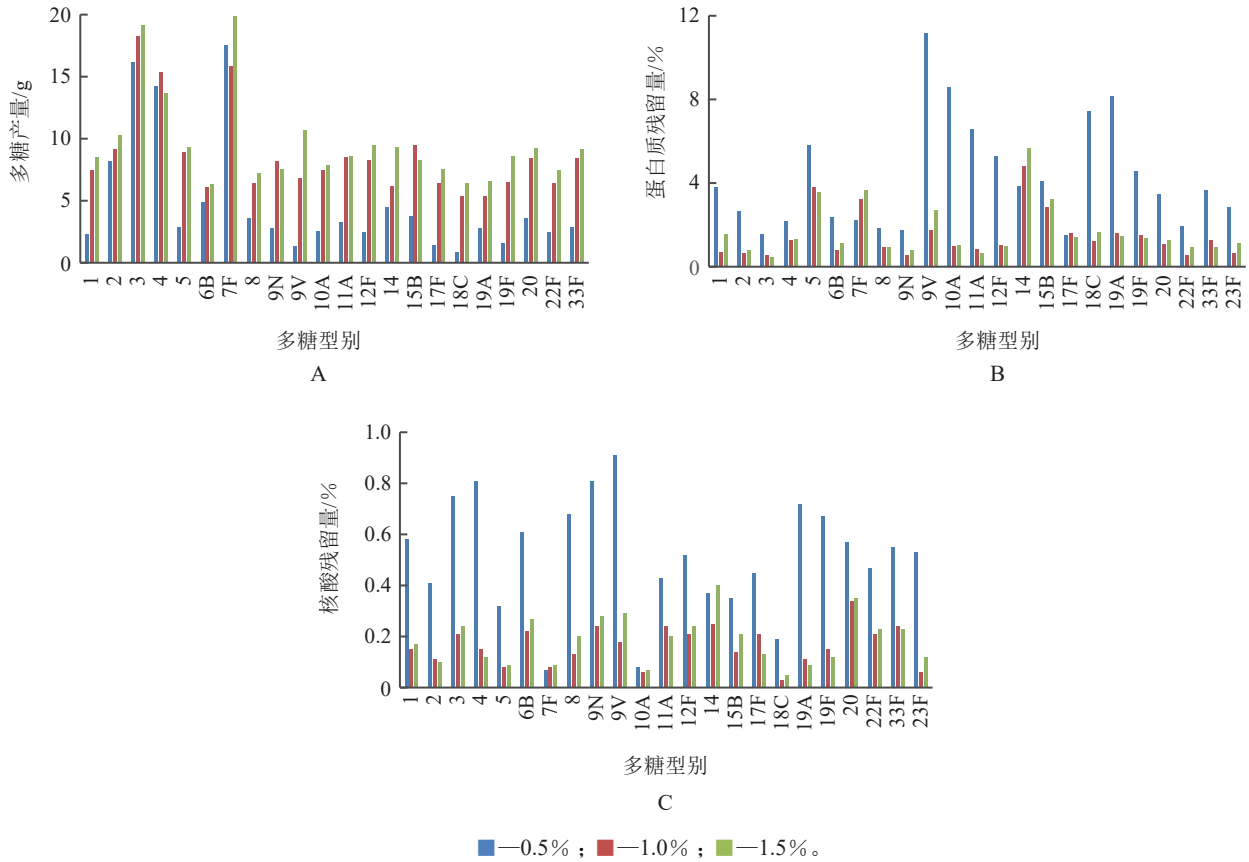


图 3　CTAB 质量分数对肺炎球菌多糖产量（A）、蛋白质残留量（B）、核酸残留量（C）的影响（n=3）

Fig.3　Effect of CTAB Mass Fraction on Yields (A), Residual Protein Contents (B), and Residual Nucleic Acid Contents (C) of Pneumococcal Polysaccharides (n=3)

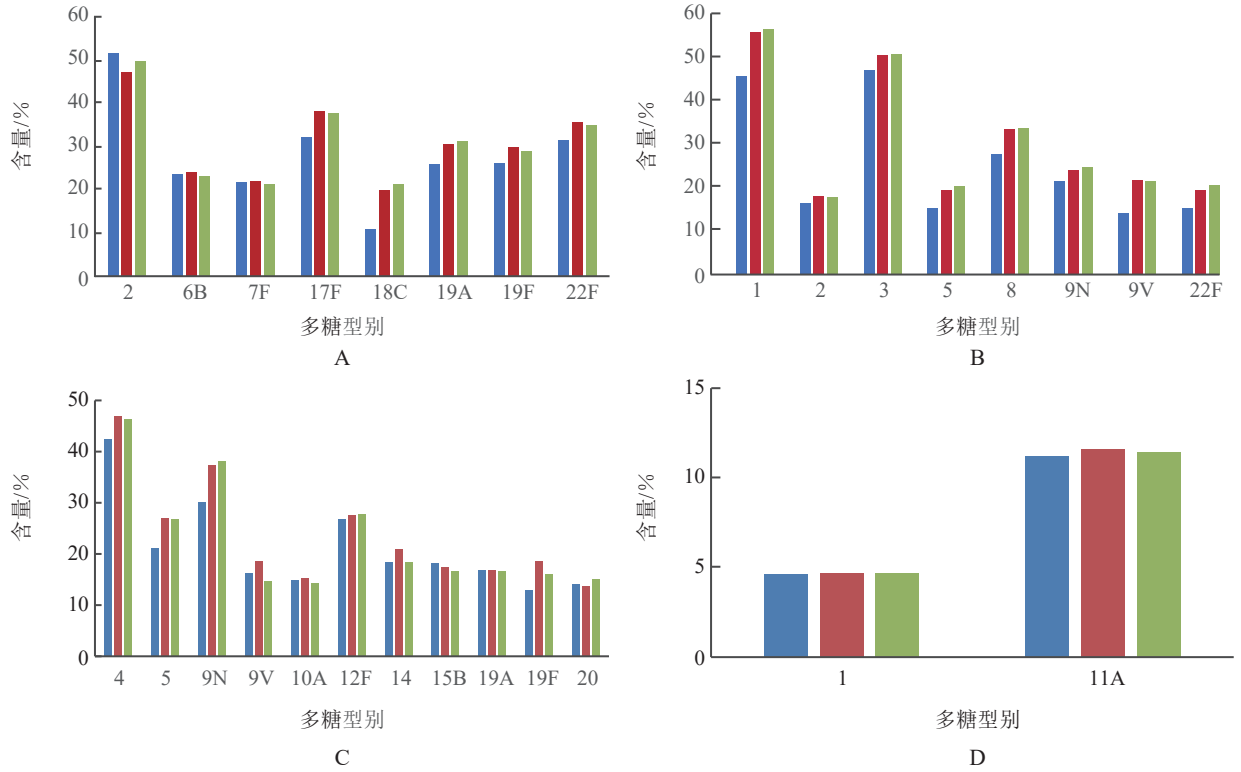


图 4 CTAB 质量分数对其他型别肺炎球菌多糖中甲基戊糖含量（A）、糖醛酸含量（B）、氨基己糖含量（C）、*O*- 乙酰基含量（D）的影响（*n*=3）

Fig.4 Effect of CTAB Mass Fraction on Methylpentose Contents (A), Uronic Acid Contents (B), Hexosamine Contents (C), *O*-Acetyl Group Contents (D) of Other Pneumococcal Polysaccharides (*n*=3)

基团含量与 CTAB 质量分数无明显关联。综上所述，在 CTAB 质量分数为 1.0%时各型别多糖的产量及其杂蛋白、核酸的去除效果较为理想，与 1.5%时无明显差异，故后续试验采用 1.0%的 CTAB。

2.2.3 色谱分离工艺的优化

羟基磷灰石对蛋白质有吸附作用，而对肺炎球菌多糖吸附作用较弱，故采用羟基磷灰石填料对肺炎球菌多糖进行色谱纯化。探索了流动相 pH 值（分别为 pH 6.5、6.7、6.9、7.1、7.3 的 0.005 mol/L 磷酸盐缓冲液）对分离效果的影响。按“**2.1**”项下方法操作，分别收集相应的分离组分，检测多糖、蛋白质、核酸含量。

结果如图 5 所示，pH 6.5 时多糖的回收率较低；pH 7.3 时蛋白质残留量相对偏高。因此，流动相 pH 值可选择 6.7 ～ 7.1。对该步骤的蛋白去除效果进行确认，结果如图 6 所示。不同型别肺炎球菌多糖经色谱纯化后，蛋白去除率均达到 80%以上，表明杂蛋白可被有效去除，有利于提高最终收获多糖

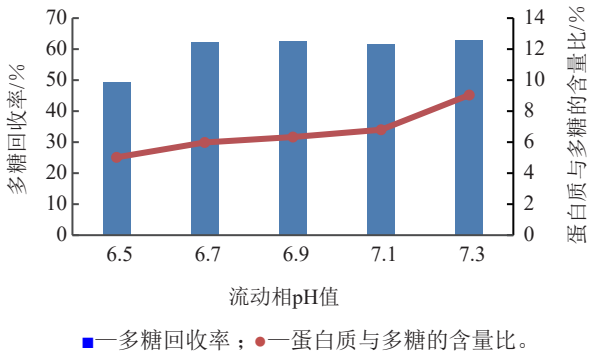


图 5 色谱工艺中流动相 pH 值对肺炎球菌多糖质量的影响（*n*=3）

Fig.5 Effect of pH Value of Mobile Phase on Quality of Pneumococcal Polysaccharides in Chromatography (*n*=3)

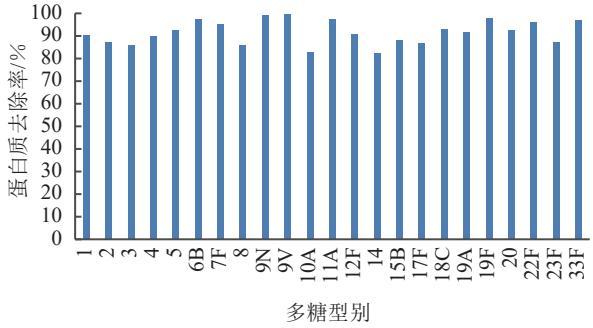


图 6　色谱纯化工艺的蛋白去除率（*n*=3）

Fig.6　Removal Rates of Proteins in Purification Process by Chromatography (*n*=3)

的安全性。

2.3　工艺验证

采用上述所得的优化参数，即超滤膜包截留分子量为 100 000，透析倍数≥ 20，CTAB 质量分数 3.0%（对于 23F 型肺炎球菌多糖采用 3.0%），流动相 pH 6.7 ～ 7.1，按“**2.1**”项下方法制备肺炎球菌多糖，并进行工艺验证。

2.3.1　多糖回收率

肺炎球菌多糖的纯化包括粗纯和色谱纯化，以菌液上清液超滤后所含的多糖总量作为初始值，计算各型别肺炎球菌多糖经粗纯及色谱纯化后的多糖回收率。结果如表 2 所示，已建立的纯化工艺对各型别多糖均可进行有效回收，且各型别多糖 3 批次间的回收率无显著差异，具有较好的批间一致性。

2.3.2　杂质去除能力

所得各型别肺炎球菌多糖中蛋白质和核酸残留量的检测结果如图 7 所示，均符合 ChP 2020 年版三部 23 价肺炎球菌多糖疫苗的合格标准。

由于纯化前期多糖中杂质含量较多，对蛋白质和核酸残留量的检测有一定程度干扰，因此部分批次氯化钠解聚上清液以及菌液上清液超滤后的样品中蛋白质和核酸的残留量偏高。这从色谱分离前样品中蛋白质和核酸残留量的检测结果也可以得到进一步证明。在色谱分离前的超滤工艺可有效去除工艺杂质，但对蛋白、核酸等大分子物质的去除并无

表 2　纯化后肺炎球菌多糖的回收率（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.2　Recoveries of Pneumococcal Polysaccharides after Purification ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

型别	粗纯	色谱纯化后	型别	粗纯	色谱纯化后
1	29.40±4.64	73.84±1.58	12F	39.16±2.57	73.60±7.27
2	78.97±2.37	81.28±4.00	14	68.42±1.61	79.98±7.39
3	85.45±4.69	64.29±3.12	15B	55.51±4.35	78.68±2.09
4	33.38±3.88	76.02±5.58	17F	83.26±4.68	79.99±0.96
5	40.90±4.35	37.53±1.18	18C	68.76±7.77	74.92±4.16
6B	52.49±2.29	82.64±7.25	19A	59.48±3.90	88.18±1.72
7F	68.49±4.96	86.05±2.89	19F	56.73±1.84	30.16±3.28
8	71.33±4.34	74.51±7.15	20	66.68±6.82	81.78±6.30
9N	56.27±2.82	35.65±0.71	22F	86.88±10.85	84.30±7.72
9V	67.41±2.99	38.70±2.45	23F	53.88±4.26	78.31±0.13
10A	38.12±6.97	88.68±4.84	33F	72.32±2.34	27.94±0.94
11A	60.90±4.99	31.25±1.43			

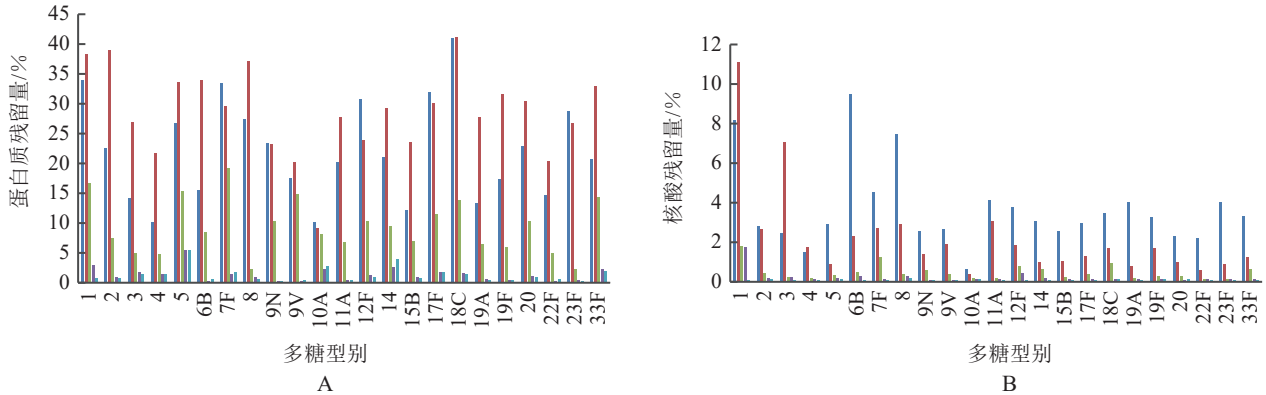


图 7　各型别肺炎球菌多糖中蛋白质（A）和核酸（B）的去除效果

Fig.7　Removal Effects of Proteins (A) and Nucleic Acids (B) from Pneumococcal Polysaccharides

明显效果，因此超滤前后的蛋白质和核酸残留量应无显著差异。然而，从实测结果来看，工艺杂质实际上会干扰蛋白质和核酸的检测。张锐等[8]也曾报道样品中存在 CTAB 或乙醇等残留物时，会影响蛋白质和核酸检测结果的准确性。本研究结果印证了这一现象。

2.4 肺炎球菌多糖的质量表征

按照 ChP 2020 年版三部通则检定冻干后的肺炎球菌多糖，包括磷含量、氮含量、分子大小［用分配系数（K_D）值表示］、特征基团（糖醛酸、氨基己糖、甲基戊糖、*O*- 乙酰基等）含量等[9]。

肺炎球菌多糖的 K_D 结果如表 3 所示，均符合 ChP 2020 年版规定的标准。

表 3 多糖的分子大小和抗原性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Molecular Size and Antigenicity of Polysaccharides（$\bar{x}\pm s$, n=3）

型别	K_D 值		抗原性	型别	K_D 值		抗原性
	标准	实测			标准	实测	
1	≤ 0.15	0.090±0.010	＋	12F	≤ 0.25	0.130±0.027	＋
2	≤ 0.15	0.061±0.017	＋	14	≤ 0.30	0.083±0.009	＋
3	≤ 0.15	0.097±0.027	＋	15B	≤ 0.55	0.346±0.010	＋
4	≤ 0.15	0.095±0.027	＋	17F	≤ 0.45	0.395±0.023	＋
5	≤ 0.60	0.474±0.023	＋	18C	≤ 0.15	0.110±0.011	＋
6B	≤ 0.50	0.420±0.026	＋	19A	≤ 0.45	0.337±0.002	＋
7F	≤ 0.20	0.075±0.021	＋	19F	≤ 0.20	0.113±0.008	＋
8	≤ 0.15	0.058±0.015	＋	20	≤ 0.60	0.375±0.021	＋
9N	≤ 0.20	0.143±0.015	＋	22F	≤ 0.55	0.419±0.003	＋
9V	≤ 0.45	0.406±0.003	＋	23F	≤ 0.15	0.094±0.007	＋
10A	≤ 0.65	0.371±0.006	＋	33F	≤ 0.50	0.425±0.012	＋
11A	≤ 0.40	0.268±0.011	＋				

注：“＋”代表具有抗原性。

肺炎球菌多糖中包含的特征基团包括氨基己糖、甲基戊糖、糖醛酸、*O*- 乙酰基、磷元素、氮元素。其中，氨基己糖为 4、5、9N、9V、10A、12F、14、15B、19A、19F、20 等 11 个型别肺炎球菌多糖的特征基团；甲基戊糖为 2、6B、7F、17F、18C、19A、19F、22F、23F 等 9 个型别肺炎球菌多糖的特征基团；糖醛酸为 1、2、3、5、8、9N、9V、22F 等 8 个型别肺炎球菌多糖的特征基团；*O*- 乙酰基为 1 和 11A 型肺炎球菌多糖的特征基团；磷元素为 6B、10A、11A、15B、17F、18C、19A、19F、20、23F 等 10 个型别肺炎球菌多糖的特有元素；氮元素为 1、4、5、7F、9N、9V、10A、12F、14、15B、19A、19F、20 等 13 个型别肺炎球菌多糖的特有元素。磷、氮、特征基团的含量测定结果如图 8 所示，各型别肺炎球菌多糖不同批次间所含特征基团的含量均无明显差异，批间一致性较好，且符合 ChP 2020 年版规定的质量标准，表明利用色谱法纯化所得的各型别多糖结构完整性较好，展现了良好的工艺稳定性。

采用免疫单扩散法对各型别肺炎球菌多糖进行抗原检测。将抗血清加至热溶解的琼脂糖凝胶内，混合均匀后倒于载玻片，凝固后在凝胶上打孔，向孔中加入待测多糖样品（约 50 μg/mL），样品扩散后可形成明显可见的沉淀环，证明所制备的各型别多糖均具有良好的抗原性（表 3）。

2.5 多糖稳定性研究

肺炎球菌多糖结构中存在磷酸二酯键、不同键型的糖苷键等连接键；磷酸二酯键容易降解，糖苷键容易受到自溶酶的影响而降解。高温、强碱等条件会加剧这些因素的影响。因此，对多糖进行全面的稳定性研究有助于评估其质量。

将各型别肺炎球菌多糖于 - 20 ℃以下贮存，分别在第 6、12、24、36、48 个月时对各型别肺炎球菌多糖的特性基团含量进行检测，在第 60 个月时对 23 个型别肺炎球菌多糖进行全项检测。

结果显示，肺炎球菌多糖于 - 20 ℃以下贮存 60 个月期间，第 6、12、24、36、48 个月时各型别多糖的特征基团含量均符合 ChP 2020 年版标准，各型别多糖在第 60 个月时的各项质量指标均符合 ChP 2020 年版标准，并且在存放过程中的含量变化趋势一致。这表明不同型别肺炎球菌多糖在贮存期间各基团并未发生脱落，依然可保持结构完整性，展现了良好的稳定性。

3 讨论

根据已有文献报道，传统的肺炎球菌荚膜多糖纯化工艺存在以下不足。①大多使用苯酚和乙醇，步骤冗长。乙醇在操作和贮存方面存在重大安全隐患。研究[10—11]利用 CTAB 替代苯酚，但依旧未避免乙醇的使用。②未进行商业化规模生产，如

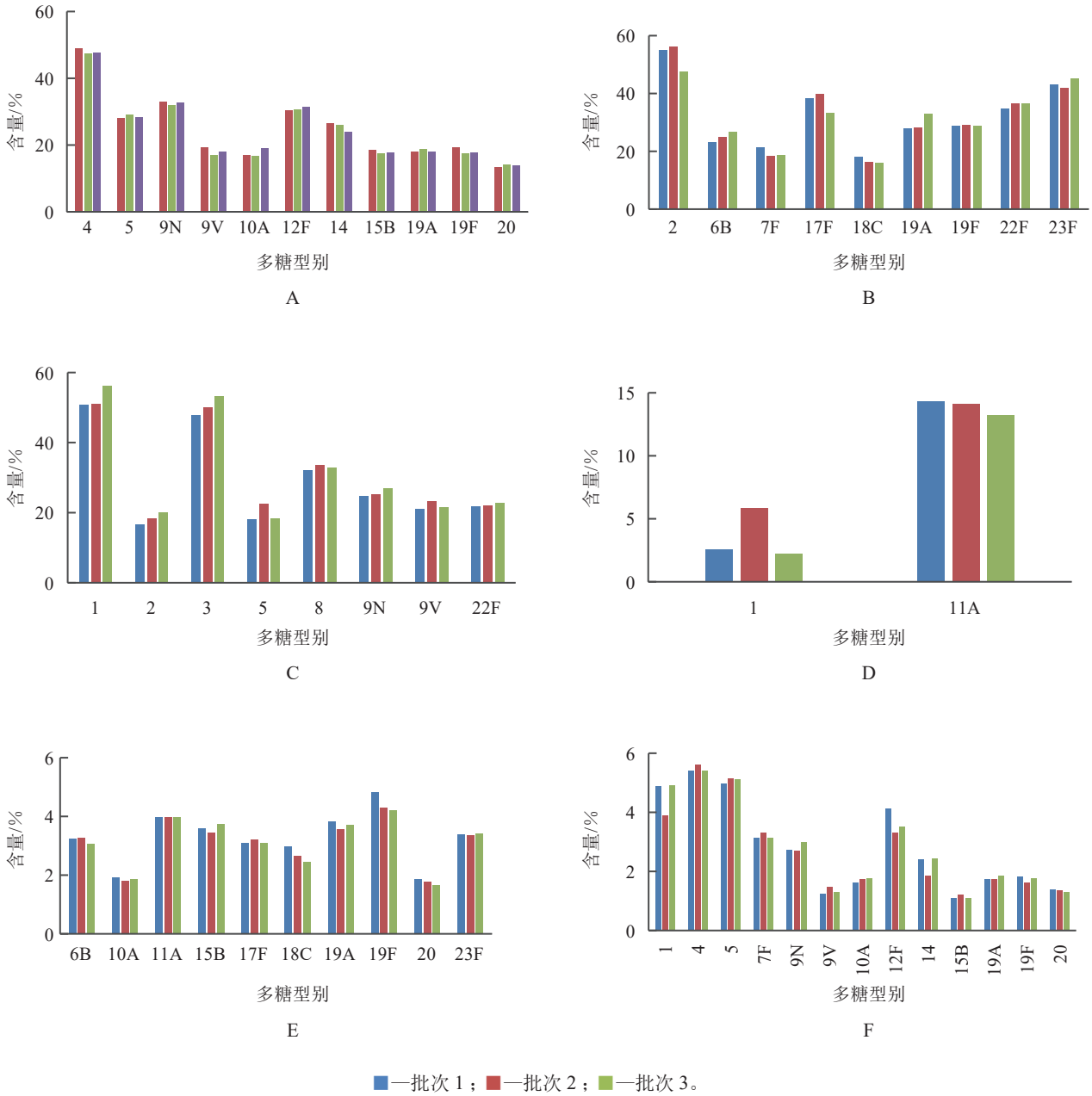


图 8　氨基己糖（A）、甲基戊糖（B）、糖醛酸（C）、*O*- 乙酰基（D）、磷（E）、氮（F）的含量

Fig.8　The Contents of Hexosamine (A), Methylpentose (B), Uronic Acid (C), *O*-Acetyl Group (D), Phosphorus (E), Nitrogen (F)

SUÁREZ 等[12] 在 14 型肺炎球菌荚膜多糖纯化工艺研究中使用亲和色谱法，但仅考察了小试规模（约 4 mg 多糖）的效果，能否规模化生产还需探索和研究。③适用范围窄。任克明等[6] 改进了纯化工艺，将发酵培养液经脱氧胆酸钠裂解后离心超滤，再用脱氧胆酸钠法去除蛋白质，离子交换色谱法去除核酸等杂质，最终建立了一套仅适用于 5 型肺炎球菌多糖的无苯酚、无乙醇纯化工艺。但该法并未推广用于其余型别多糖。随后，该研究团队继续改进工艺，采用酶解法代替离子交换色谱法去除核酸[13]，可缩短纯化工艺周期，但引入核酸酶提高了生产成本。同时，该研究并未对常见

的血清型别肺炎球菌多糖作全面报道，具有一定的血清型限制性。

本研究建立了一种以超滤、CTAB 沉淀、色谱分离为主的肺炎球菌多糖纯化工艺（图 9）。一般而言，超滤膜包材质对生物大分子浓缩效果有显著影响，对多糖纯化效果至关重要。聚醚砜材质的超滤膜包具有承压较大（0 ～ 0.69 MPa）、韧性较好、pH 值范围广（1 ～ 14）、生物相容性强、吸附能力弱、抗氧化性强、对氢氧化钠和氧化剂（如氯）的耐受性较好等优点。因此，本研究采用聚醚砜材质的超滤膜包。又由于多糖、杂蛋白以及核酸均属于大分子物质，在过滤中均会被截留在膜表面，因此采用切向流的过滤方式，流向平行于滤膜表面，只有一小部分液体透过过滤介质，截留在膜表面的颗粒可以被“扫除”，以尽可能减少浓差极化，提高过滤效果。采用 23 价肺炎球菌多糖为对象，以产品关键质量属性为考察指标优化关键工艺参数（超滤膜包截留分子量、超滤透析倍数、CTAB 质量分数以及流动相 pH 值）。验证试验显示，以优化工艺制备的 23 个型别肺炎球菌多糖的质量均符合 ChP 2020 年版标准，且在 60 个月内稳定性良好。

相较以往研究，本研究所建立的肺炎球菌多糖制备方法有以下创新性及优势。①安全性高。未使用苯酚、乙醇等有机试剂，有效规避了生产操作及贮存方面的安全隐患。②适用范围更广。以常见的 23 种血清型肺炎球菌为研究对象进行了工艺开发，可用于 23 个型别肺炎球菌多糖的制备，不易受血清型的限制。③工业化转换。按照商业化生产规模进行了工艺确认，实现了其商业化规模生产，可创造社会效益。同时，本研究存在一定的问题，如部分型别多糖产量相较偏低，会增加生产成本、影响生产效率。因此，后续还需进一步优化工艺，以提高多糖产量。

综上所述，本研究成功建立了一种可适用于不同型别肺炎球菌多糖的无乙醇、无苯酚的多糖色谱纯化工艺，可为多价肺炎结合疫苗的研究提供高质量的多糖原料，也为提高产品质量奠定了基础。

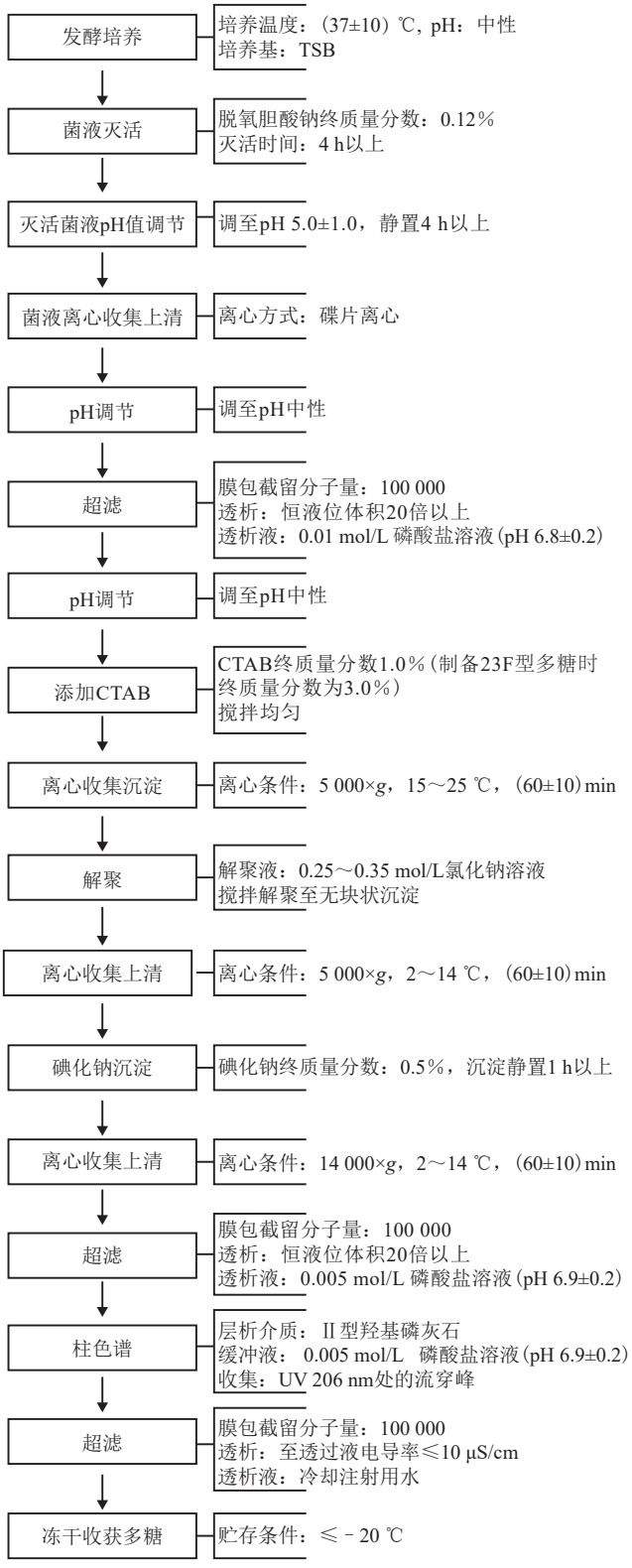


图 9 肺炎球菌多糖的生产工艺流程图

Fig.9 The Flow Chart of Pneumococcal Polysaccharide Production Process

参考文献：

[1] 姜　宁, 高占成. 肺炎链球菌流行病学特点、耐药现状及其临床诊疗的影响[J]. 中华医学杂志, 2013, **26**: 2091-2093.

[2] 柴雁菁, 左智洁, 马　波, 等. 肺炎链球菌5型发酵工艺的优化[J]. 现代生物医学进展, 2012, **12**(9): 1660-1664.

[3] Wyeth. Multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition: AU, 2007337101A1[P]. 2008-07-03.

[4] TARAHOMJOO S, TABATABAE S R, KARIMI A, *et al*. Strain selection and statistical optimization of culture conditions for 19F polysaccharide production from pneumococcus[J]. *Arch Adv Biosci*, 2019: **10**(1): 34-46.

[5] KIM S N, MIN K K, CHOI I H, *et al*. Optimization of culture conditions for production of pneumococcal capsular polysaccharide type Ⅳ[J]. *Arch Pharm Res*, 1996, **19**: 173-177.

[6] 任克明, 王　玺, 张　轶, 等. 5型肺炎球菌荚膜多糖无乙醇无苯酚纯化工艺的建立[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, **48**(1): 24-29.

[7] 赵海平, 赵志强, 谢贵林. 细菌荚膜多糖的分离纯化研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, **40**(2): 72-78.

[8] 张　锐, 李小波, 徐萌萌, 等. 肺炎球菌无动物源性成分培养工艺及纯化新工艺探索[J]. 中国新药杂志, 2012, **21**(10): 1080-1084.

[9] 张　轶, 张新庄, 王　玺, 等. 肺炎链球菌荚膜多糖分子大小及分子量分析方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, **28**(9): 947-955.

[10] CANON F J, KUO J S, QUERRY M V. Purification of pneumococcal capsular polysaccharides: US, 4242501[P]. 1980-12-30.

[11] American Cyanamid Company. Multivalent pneumococcal vaccine and preparation thereof: US, 4686102A[P]. 1987-08-11.

[12] SUÁREZ N, FRAGUAS LF, TEXEIRA E, *et al*. Production of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 and its purification by affinity chromatography[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2): 969-971.

[13] 任克明, 白贵杰, 张丽芝, 等. 新型肺炎球菌荚膜多糖纯化方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, **33**(10): 1181-1185.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封三：鲁南厚普制药有限公司

封底：中国医药工业信息中心

中彩插一：《中国医药工业杂志》介绍

中彩插二和三：《中国医药工业杂志》第十九届编辑委员会会议纪要

中彩插四：*Pharmaceutical Fronts* 介绍

1513、1590 页：公益广告