

使用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)对生物制剂中的泊洛沙姆 188 进行定量分析

作者

张婷婷，杨新磊，鲁锐
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文介绍了一种利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱系统、Agilent 1290 Infinity II ELSD 检测器和 AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm 色谱柱对生物制剂中的泊洛沙姆 188 进行定量分析的简单灵敏的方法。该方法采用乙腈和甲酸铵作为流动相，以等度方法对生物制剂中的泊洛沙姆 188 进行分析。其运行时间短、灵敏度高，且具有良好的重现性和回收率，能够以最高的性价比满足生物制药企业对辅料测定的迫切需求。

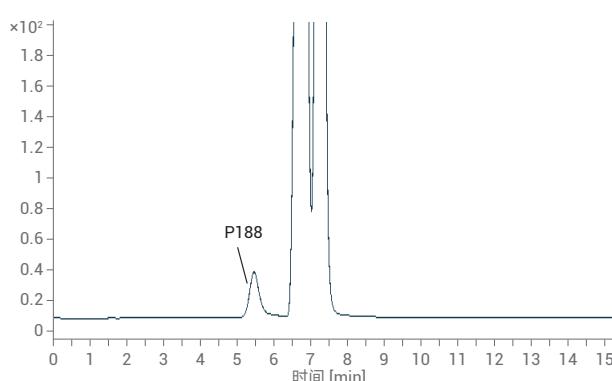


图 1. 利用 HPLC-ELSD 液相色谱系统测定实际蛋白制剂中泊洛沙姆 188 的含量

前言

近年来，随着全球生物制药领域新药研发的快速增长，以及国内新药和生物类似药研发和申报的快速推进，生物制剂中药用辅料的质量和安全性受到国家药品管理部门和生物制药企业的重点关注。

泊洛沙姆作为一类新型高分子非离子表面活性剂，是优良的药物制剂辅料。其中泊洛沙姆 188 (P188, Pluronic F68) 具有最佳的乳化性能和安全性，并且由于其在人体内性质稳定、毒性低、生物相容性较好，因此在美国药典收载的 5 种不同规格的泊洛沙姆中，P188 已在上市品种中用作静脉注射剂的乳化剂。另外，P188 目前已经作为理想的增溶剂和乳化剂被添加到生物制剂中。因此，准确测定 P188 含量是对生物制剂辅料进行质量控制的一条有效的途径，文献中提到使用反相色谱法 (RP)^[1]、体积排阻色谱法 (SEC)^[2,3] 等测定方法，但是在灵敏度、分离度和稳定性等方面还有提升的空间。

在本应用中，利用配备 Agilent 1290 Infinity II ELSD 检测器和 AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱系统对生物制剂中的泊洛沙姆 188 进行定量分析（见图 1）。

实验部分

试剂、样品与材料

含 P188 的蛋白制剂（包含蛋白、P188 和其它辅料）、不含 P188 的蛋白制剂（包含蛋白和其它辅料）和不含 P188 的制剂缓冲液（包含其它辅料）由生物制药厂家提供。泊洛沙姆 P188 购自 Merck (药用级辅料)。甲酸铵购自 DikmaPure 公司。乙腈购自 J.T.Baker 公司 (美国)。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 纯水机系统 (美国)。

泊洛沙姆 P188 的样品前处理

移取 0.5 mL 蛋白制剂溶液样品至离心管中，加入 1.5 mL 乙腈混匀，溶液出现白色絮状沉淀，高速离心 (13200 r/min, 5 min)；取上清液过 0.22 µm 有机滤膜，然后直接进样分析。

仪器和软件

采用完全生物惰性、耐压高达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。该系统由以下模块组成：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性高性能自动进样器 (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity MCT 柱温箱 (G7116A)
- Agilent 1290 Infinity II ELSD 蒸发光散射检测器 (G7102A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD WR (G7115A)

软件采用 Agilent OpenLab CDS 2.4。

色谱条件

色谱柱：	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 PL1580-3301)
流动相：	乙腈:25 mmol/L 甲酸铵 = 20:80
TCC 温度：	25 °C
进样量：	5 µL
流速：	0.25 mL/min
检测条件：	ELSD, 雾化温度 70 °C, 蒸发温度 70 °C, 气体流速 2.2 (SLM), DAD, 280 nm

线性范围、定量限和检测限的测定

标准曲线由浓度范围为 20–1000 µg/mL 的 6 个 P188 标准浓度点创建。将流动相 5 µL 作为空白进样，随后将各线性浓度样品重复进样 3 次。利用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 来计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。并通过进样分析较低线性浓度的溶液来确定定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。将信噪比 (S/N) > 3 时的最低浓度定义为 LOD，而将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。将各线性浓度下的平均峰面积对分析物浓度作图，得出 P188 校准曲线。

结果与讨论

前处理方法优化

前处理方法的选择直接影响 P188 的 HPLC 分析。对蛋白制剂溶液稀释过滤后直接进样与用有机溶剂沉淀蛋白离心后过滤进样所得到的色谱图进行比较。结果发现，由于溶液中蛋白含量比较高 (20 mg/mL)，而制剂中 P188 的含量一般为 0.02% (W/V)，甚至低至 0.01% (W/V)，因此虽然优化的 HPLC 分离条件能够将蛋白与 P188 分离，但是两个峰比较接近，高浓度蛋白直接影响 P188 的保留。综合考虑 HPLC 的流动相体系和 P188 在蛋白制剂中的浓度，最终选择用乙腈来沉淀溶液中的蛋白，经高速离心过滤后上样分析。由此可以消除 HPLC 分析时蛋白对 P188 定量分析的影响，实现 P188 的分离和准确定量测定。结果如图 2 所示。

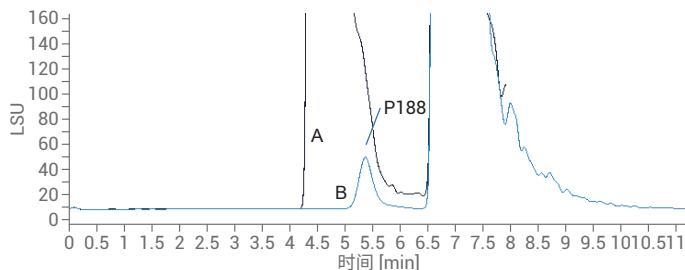


图 2. 含 P188 的蛋白药物制剂的色谱图：A) 未除蛋白直接进样得到的色谱图；B) 除蛋白后进样得到的色谱图

P188 的 SEC 分析

目前多数抗体类蛋白药物 SEC 分析时选择 $7.8 \times 300 \text{ mm}$, 300 \AA 的色谱柱，可以实现分离的目的，但是分析时间比较长（一般需要 30 min）。为提高 P188 的分离效率，我们选择 AdvanceBio SEC (300 \AA , $4.6 \times 150 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$) 色谱柱分离 P188。P188 保留时间在 6 min 左右，总体分析时间为 15 min，相比常规方法缩短了一半，可显著提高分析效率，加快研发进程（见图 3）。

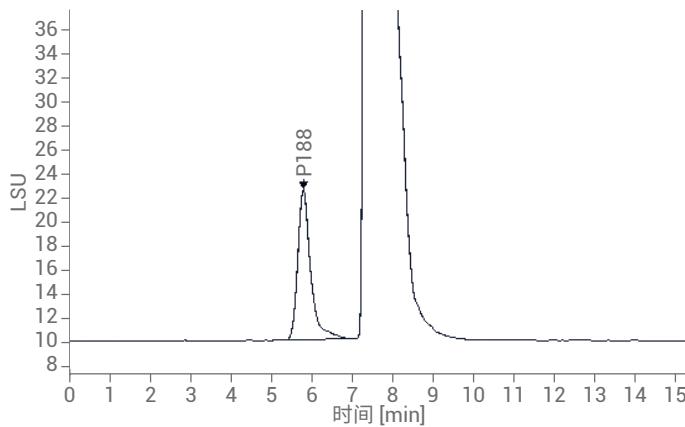


图 3. 在 AdvanceBio SEC 300 \AA , $4.6 \times 150 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱上利用乙腈/甲酸铵流动相等度分离得到的实际蛋白制剂样品中 P188 的 SEC 色谱图

P188 的 ELSD 测定

由于 P188 的化学结构不含紫外吸收基团，因此选择通用型蒸发光散射检测器 (ELSD)，并对 1290 Infinity II ELSD 的各项检测参数进行优化，其中包括雾化器温度 (Nebulizer Temperature)、蒸发器温度 (Evaporator Temperature) 和氮气流速 (Gas Flow Rate)。实验数据表明，氮气流速对基线噪音的影响比较显著，如图 4 所示。在 2.2–2.4 SLM 时，基线噪音最小，有助于提高 P188 测定的灵敏度。同时考虑到系统的稳定性，选择氮气流速 2.2 SLM 作为最佳条件。

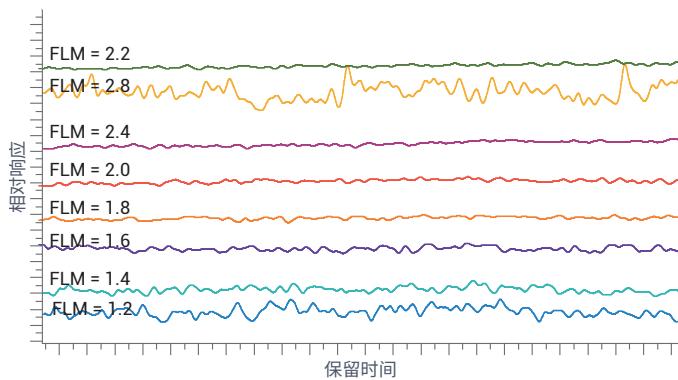


图 4. 比较 ELSD 不同氮气流速对基线噪音的影响

保留时间和峰面积的精密度

如表 1 所示，P188 重复进样 5 次得到的平均保留时间和峰面积的 RSD 值。保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.10% 和 1.06%，表明该方法具有优异的重现性和精密度。

表 1. 保留时间和峰面积的精密度 ($n = 5$)

	1	2	3	4	5	RSD
保留时间/min	5.873	5.882	5.881	5.882	5.889	0.10%
峰面积	283.546	288.278	288.01	282.071	288.515	1.06%

检测限和定量限

P188 的 LOD 和 LOQ 分别为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，如图 5 所示。当 P188 进样浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 且进样量为 $5 \mu\text{L}$ 时，S/N 为 46.4，远远高于 $S/N > 10$ 的要求。这表明采用 HPLC-ELSD 方法的灵敏度较高，可以满足客户准确定量分析蛋白制剂中 P188 的要求。

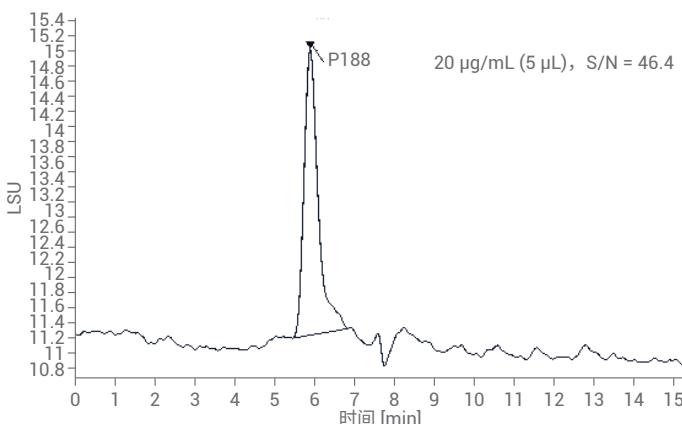


图 5. 浓度为 LOQ 的 P188 的色谱图

线性

使用峰面积与 P188 浓度创建从 LOQ 到高浓度的 P188 的双 Log 曲线。准确度结果如表 2 所示。图 6 为 20–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内 P188 的线性曲线。

表 2. P188 线性范围

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	20	50	100	200	500	1000
平均峰面积	93.4	267.44	715.58	1880.69	6618.75	15311.29

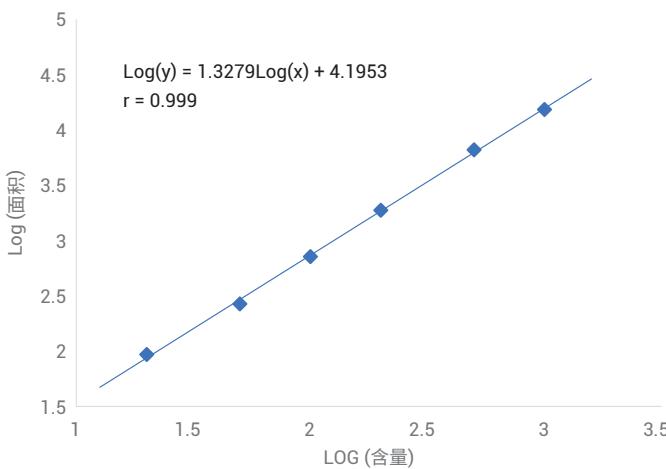


图 6. 浓度范围为 20–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 6 点标准曲线

加标回收率

以不含 P188 的蛋白制剂溶液和制剂缓冲液为空白，加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行加标回收率实验。平行测定 3 次，以评价该方法的准确度。蛋白制剂和制剂缓冲液的加标回收率分别为 105% 和 94%，符合 90%–110% 的要求。

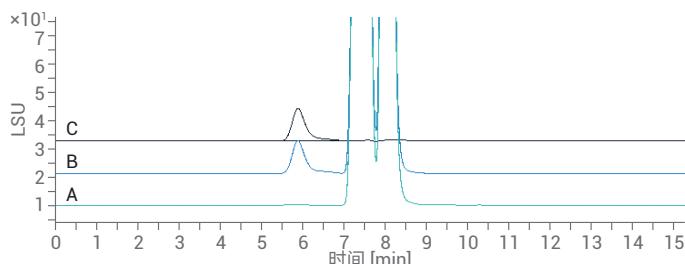


图 7. 利用 HPLC-ELSD 得到的色谱图：A) 不含 P188 的蛋白制剂，B) 加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白制剂，C) 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 P188 标准溶液

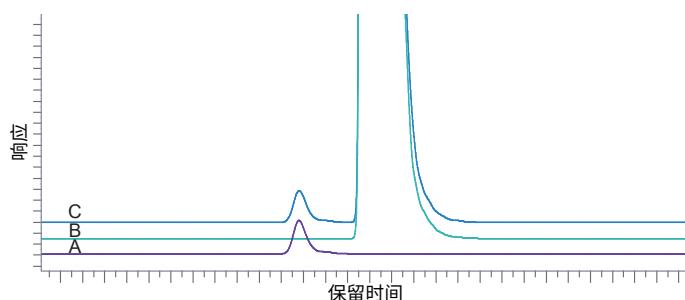


图 8. 利用 HPLC-ELSD 得到的色谱图：A) 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 P188 标准溶液，B) 不含 P188 的制剂缓冲液，C) 加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的制剂缓冲液

实际蛋白制剂中 P188 的含量测定

客户提供已知准确 P188 含量 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的蛋白溶液，测定结果为 208 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，处于标准值 90%–110% 的范围内，满足分析要求。

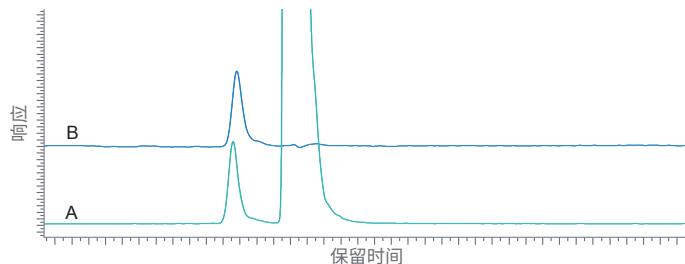


图 9. A) 含 P188 的实际蛋白制剂和 B) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P188 标准溶液的色谱图

结论

本应用基于 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元色谱系统、1290 Infinity II ELSD 检测器和AdvanceBio SEC 色谱柱开发出一种分析生物制剂中 P188 的方法，该方法快速高效，且具有高灵敏度和高稳定性。AdvanceBio SEC 色谱柱为 P188 提供了出色的分离度，1290 Infinity II ELSD 为 P188 提供了较高的检测灵敏度和稳定性。利用该方法可获得优异的峰面积与保留时间精密度，表明该方法具有出色的可靠性。浓度范围为 20–1000 µg/mL 的 6 点标准曲线表现出优异的线性，表明该方法可以实现准确定量。P188 的 LOD 和 LOQ 分别为 10 µg/mL 和 20 µg/mL，表明该方法灵敏度较高。此外，AdvanceBio SEC 色谱柱可根据峰面积百分比对实际生物制剂中的 P188 进行分离、检测和定量分析。因此，该方法可作为生物制药企业测定辅料 P188 的出色解决方案。

参考文献

1. Bing G.; Amr A.; Haofan P.; Weiwei H.; Lam Raga M.; Scott E.; Shashi P. Characterization of poloxamers by reversed-phase liquid chromatography. Analytical Methods. 2016;13: 2812-2819
2. Mao Y.; Thompson MJ.; Wang Q.; Tsai EW. Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. J Pharm Biomed Anal. 2004;35: 1127-1142
3. Linda L. Characterization of Pharmaceutical Polymers by HPLC and GPC (利用 HPLC 和 GPC 对药物聚合物进行表征) , 安捷伦科技公司应用简报，出版号 5590-8296EN, 2011

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界 |

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2020
2020年2月13日, 中国出版
5994-1795ZHCN

