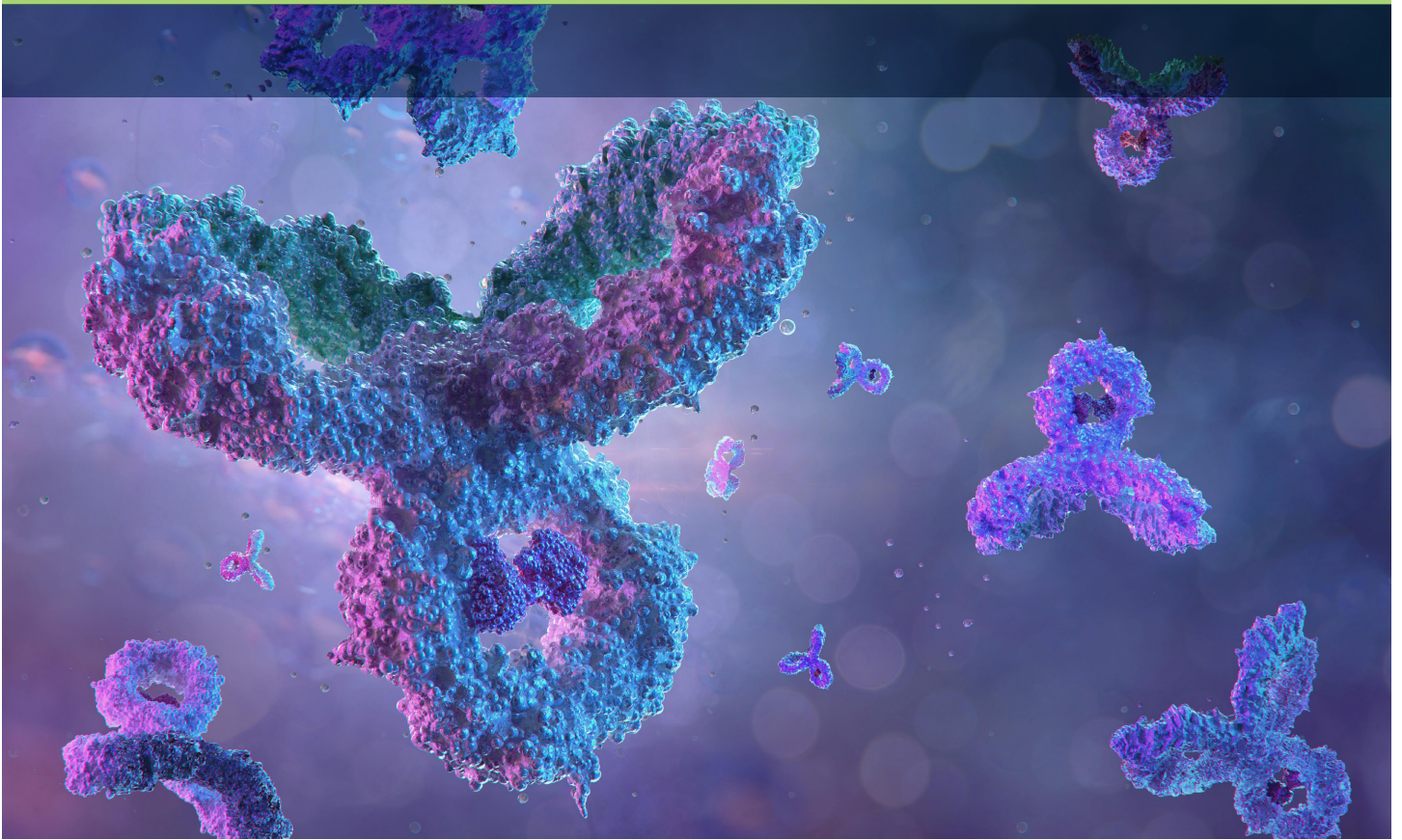


安捷伦生物制药辅料及 生产工艺残留分析解决方案

应用文集



目录

| | |
|------------------------|----------|
| 前言 | 4 |
| 仪器平台介绍 | 5 |
| 分析方法开发策略及应用案例 | 7 |
| 治疗性蛋白药物制剂中辅料和工艺残留分析 | 7 |
| 表面活性剂吐温 20 或吐温 80 分析 | 8 |
| 稳定剂泊洛沙姆分析 | 12 |
| 制剂中泊洛沙姆和吐温 80 同时分析 | 14 |
| 冻干保护剂糖类分析 | 15 |
| 制剂中氨基酸分析 | 17 |
| 生产工艺残留消泡剂分析 | 18 |
| 基因治疗药物辅料和工艺残留分析 | 19 |
| 制剂中泊洛沙姆分析 | 20 |
| 生产工艺残留吐温 20 分析 | 21 |
| 生产工艺残留 Triton X-100 分析 | 22 |
| 转染剂 PEIpro 分析 | 23 |

前言

药用辅料是药物制剂的基础材料，在大部分药品中占 90% 以上。其能够提高药品稳定性，并具有增溶、助溶、赋形、充当载体、缓控释等功能，同时直接影响药品的安全性和有效性，是药品质量控制的重要组成部分。2020 版《中国药典》中总共包含 355 种药用辅料的标准，其中新增 65 种，修订了 212 种，整体辅料标准都得到极大提升，对制药企业提出了更高的要求。

生物制药行业在 21 世纪异军突起，与传统的小分子药物生产过程不同，其一般采用生物技术制备具有生物活性的药品，生产工艺复杂且容易受到多种因素的影响。在整个生产过程中，为保证高效生产生物大分子药物并最终得到符合质量要求的产品，会加入各种外源性化合物。这些外源性化合物包括传统的吐温 80 等辅料，也包括其他新型高效无毒的辅料。它们在生物制剂成品中的含量会直接影响药物的性能，因此需要对其进行监控。

但是，这些化合物具有以下特性：1) 属于一类表面活性剂，并非具有均一结构和分子量的化合物；2) 具有长链结构，导致其疏水性较强；3) 结构中无紫外吸收基团，无法直接通过紫外检测器进行分析；4) 制剂溶液基质复杂，直接影响微量辅料的准确测定。这些特性给开发合适的辅料分析方法带来了巨大挑战。

为满足国内迅速发展的生物制药行业所提出的苛刻的分析要求，安捷伦实验室开发出一系列针对制剂中辅料的分析解决方案。本应用文集将这些应用汇总整理，重点介绍一些针对目前在生物制药领域比较热门的辅料和生产工艺过程中残留化合物分析的 HPLC 方法，同时提供用于不同类型的检测的 HPLC 系统选择建议。为客户实验室质量管理人员提供更多分析方法选择，帮助其提高分析实验室的分析方法开发效率。

Agilent InfinityLab 仪器平台介绍

Agilent InfinityLab 仪器平台包括精心设计的液相色谱仪、色谱柱和备件，可提供值得信赖的稳固质量和可靠分析结果。

其中液相色谱仪包括以下四个系列：

1220 Infinity II 液相色谱仪

一款价格合理的高品质集成系统，使您快速获得最高效率，为您的投资带来最大回报。

1260 Infinity II 液相色谱仪

目前分析实验室中应用最广泛的色谱仪。提供最广泛的仪器选择，可以配置各种分析平台，从最简单的等度分析系统到二维液相系统，从常规的不锈钢系统到生物惰性液相色谱系统。适用于生物制药行业大部分 HPLC 分析方法的开展。

1260 Infinity II Prime 液相色谱仪

通用型 HPLC，压力高达 800 bar。具有与 1260 二元系统相当的梯度和混合性能，可提供四元溶剂混合，此外还具有智能系统模拟技术 (ISET) 等功能，能够实现完美的方法转移。BlendAssist 软件使用 1290 Infinity II 全能泵技术实现自动流动相混合。适用于生物制药中的辅料分析，可提供最佳运行效率和极高的可靠性。

1290 Infinity II 液相色谱仪

一款超高效液相色谱分析平台，在以超高性能实现最高效率方面树立了新的标杆。可极大地提高辅料分析效率，代表未来液相色谱分析的发展趋势。



Agilent InfinityLab 仪器平台介绍



1260 Infinity II ELSD



1260 Infinity II RID



1260 Infinity II VWD



1260 Infinity II DAD

Agilent 1290 Infinity II 蒸发光散射检测器 (ELSD)

在制药和生物制药辅料分析领域，很多待测化合物缺乏明显的紫外吸收基团，因此通用型检测器成为必不可少的选择。1290 Infinity II ELSD 非常适合对无法通过紫外检测器进行分析的半挥发性及非挥发性化合物进行可重现的高灵敏度检测。特别地，对于缺乏紫外吸收基团且不易挥发的药用辅料，蒸发光散色检测器相比于示差折光检测器 (RID) 有其独特的优势，其不仅适合进行梯度洗脱，而且在灵敏度和稳定性方面也有出色的表现；相比于电喷雾检测器 (CAD)，ELSD 检测器具有更强的抗污染能力，同时具有较宽的动态范围。

出色的灵敏度

最新的 1290 Infinity II ELSD 检测器配置性能出众的激光光源，灵敏度比常规 ELSD 高出 10 倍，更适用于痕量分析。

低温设计，适用于易挥发性化合物分析

1290 Infinity II ELSD 将独特的帕尔帖冷却蒸发器与原始气流设计相结合，可在低至 10 °C 的温度下运行，非常适合分析在常温下挥发性较强的化合物，具有优异的灵敏度。

极佳的稳定性

经过优化的安捷伦 ELSD 检测器具有出色的稳定性，使大部分分析物获得优异的重现性，提供可靠、准确的分析结果。

在生物制药辅料及生产工艺残留分析方面，除了 1290 Infinity II 蒸发光散射检测器，安捷伦具有种类齐全的液相色谱检测器全系列产品，包括应用最广泛的 1290 Infinity II 和 1260 Infinity II 二极管阵列检测器和多波长紫外检测器，在糖分析方面具有显著优势的 1290 Infinity II 和 1260 Infinity II 示差折光检测器，以及具有较高灵敏度的 1260 Infinity II 和 1290 Infinity II 荧光检测器。在此基础上，无论是搭配灵活便捷的 1260 Infinity II 液相色谱系统，还是高效稳定的 1290 Infinity II 液相色谱系统，都可以成为生物制药客户的最佳工作搭档。

分析方法开发策略及应用案例

治疗性蛋白药物制剂中辅料和工艺残留物分析

表面活性剂吐温 80 和吐温 20 分析

吐温 20（聚山梨酯 20）和吐温 80（聚山梨酯 80）均属于非离子型表面活性剂（结构见图 1 和图 2），亲水性和化学稳定性强，对药物具有良好的助溶作用。添加到药物制剂中，可提高活性成分的溶解度，同时抑制大分子蛋白药物的自动聚合，提高蛋白药物的稳定性。

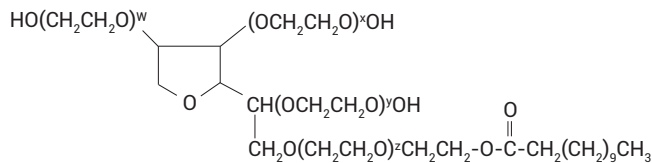


图 1. 吐温 20 结构

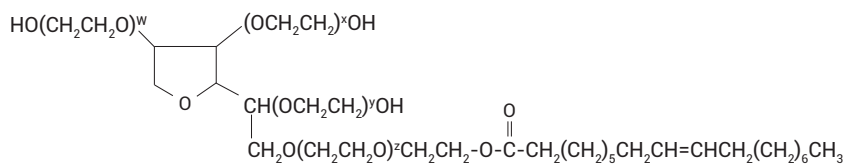


图 2. 吐温 80 结构

分析方法开发策略及应用案例一：HPLC-ELSD 分析吐温 80

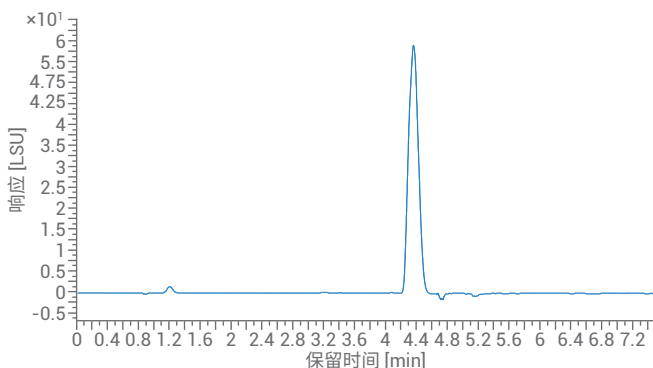


图 3. 吐温 80 标准品的色谱图（浓度 0.1 mg/mL）

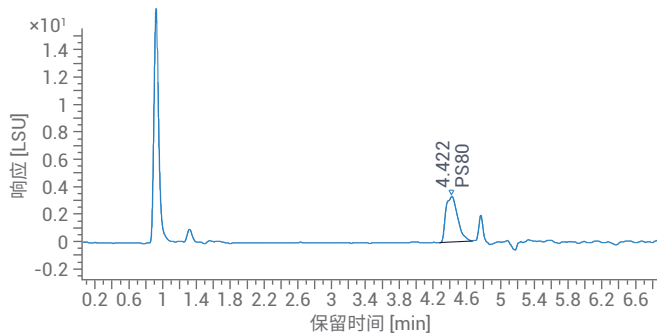


图 4. 吐温 80 的检测限 (LOD) 的色谱图（浓度 0.005 mg/mL）

吐温 80 为一类聚合物，具有较强的疏水性，且化学结构中没有紫外吸收基团，对于治疗性抗体类蛋白制剂中吐温 80 进行分析时，选择混合基质的色谱柱，采用快速异丙醇梯度变化的方法使吐温 80 以单峰的形式得到分离，同时选择 1290 Infinity II ELSD 检测器，可以对溶液中微量吐温 80 进行准确的定量分析。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | ChromCore SAA 表面活性剂专用柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm, 部件号: S014-050018-04615S |
| 流动相 | A: 2% 乙酸水溶液; B: 2% 乙酸异丙醇溶液; 梯度分析 |
| 流速 | 1.2 mL/min |
| 进样量 | 20 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 45 °C, 蒸发温度: 80 °C, 气体流速: 1.00 SLM |

表 1. 吐温 80 的 5 针重复进样 RSD 值

| 编号 | 保留时间/min | 峰面积/min*LSU |
|-------|----------|-------------|
| 1 | 4.40 | 2155.97 |
| 2 | 4.42 | 2186.24 |
| 3 | 4.41 | 2195.67 |
| 4 | 4.40 | 2231.01 |
| 5 | 4.42 | 2185.27 |
| RSD/% | 0.14 | 1.23 |

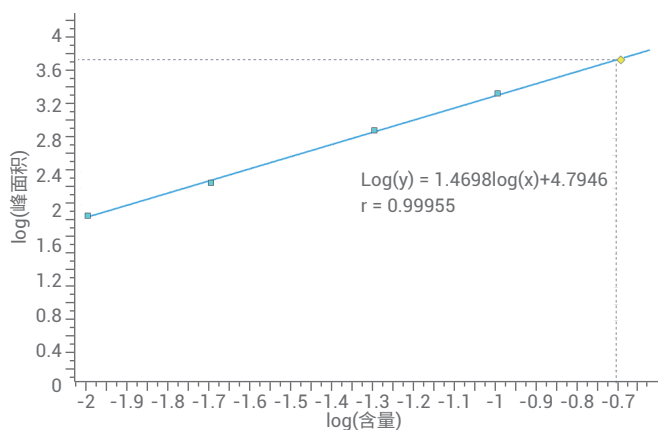


图 5. 吐温 80 的标准曲线 (浓度 0.01–0.2 mg/mL)

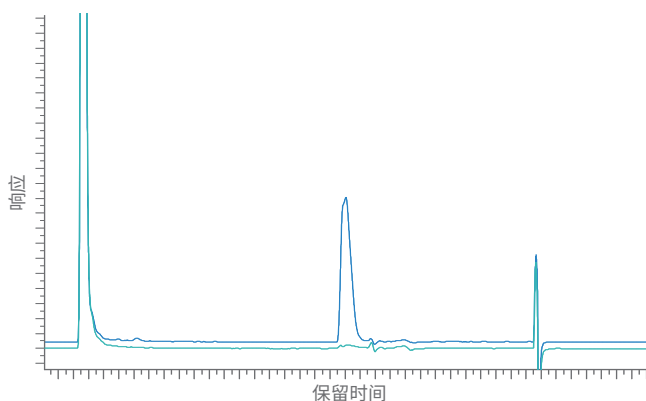


图 6. 蛋白制剂中吐温 80 的色谱图 (绿色迹线 — 空白蛋白制剂溶液; 蓝色迹线 — 含 0.080 mg/mL 吐温 80 的蛋白制剂溶液, 回收率 97.2%)

分析方法开发策略及应用案例二：RP-HPLC-ELSD 分析吐温 20

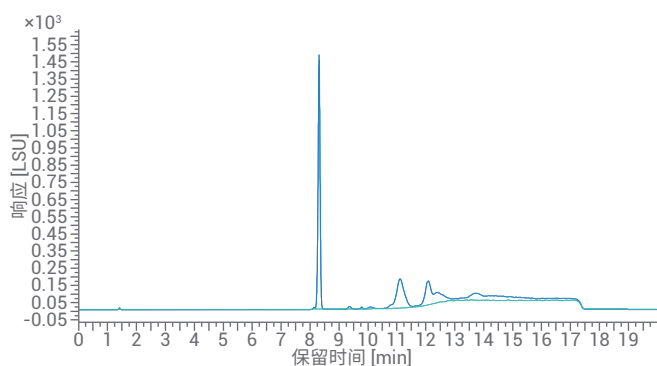


图 7. 吐温 20 标准品的液相色谱图 (浓度 0.1 mg/mL)

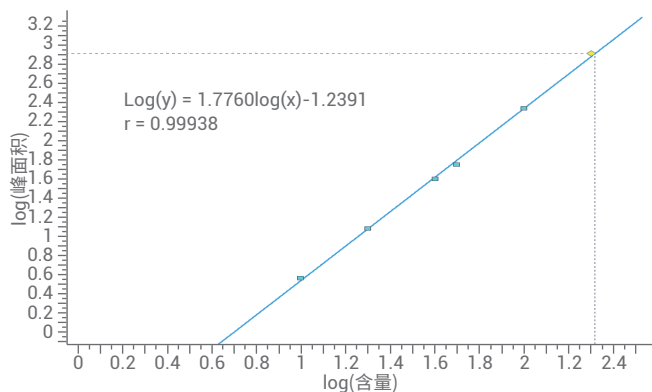


图 8. 吐温 20 标准曲线 (浓度范围 0.01–0.2 mg/mL)

虽然吐温 20 和吐温 80 性质接近, 对于 PEG 化的一类蛋白制剂, 采用第一种分析方法无法将 PEG 化的蛋白和吐温 20 分离, 因此采用 RP-HPLC-ELSD 方法, 在水和乙腈 (三氟乙酸) 梯度条件对吐温 20 进行分析。

仪器配置: 1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号: 683975-302 |
| 流动相 | A: 0.1% TFA 水溶液; B: 0.08% TFA 乙腈; 梯度分析 |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 50 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 50 °C, 蒸发温度: 60 °C, 气体流速: 1.40 SLM |

表 2. 吐温 20 的 7 针重复进样峰面积的 RSD 值

| 编号 | 峰面积/min*LSU |
|-------|-------------|
| 1 | 36.5 |
| 2 | 35.7 |
| 3 | 35.9 |
| 4 | 36.2 |
| 5 | 36.4 |
| 6 | 36.3 |
| 7 | 36.3 |
| RSD/% | 0.79 |

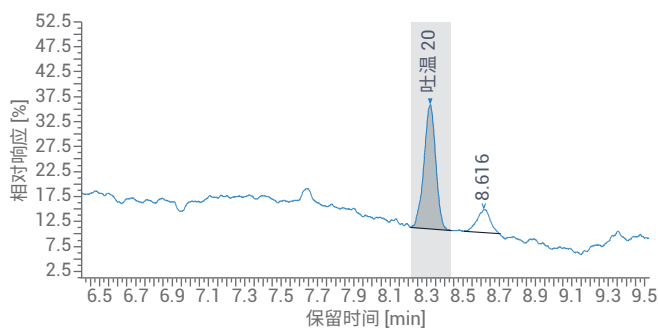


图 9. 吐温 20 最低定量限的色谱图 (浓度 0.01 mg/mL)

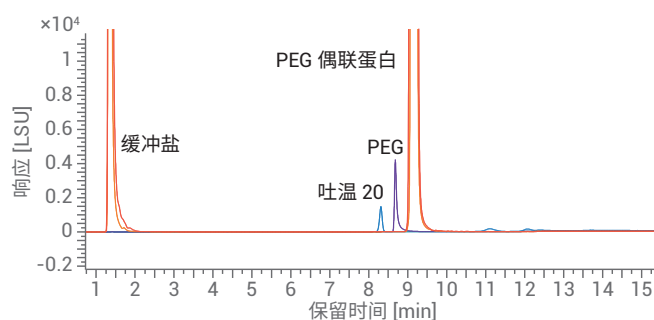


图 10. 吐温 20 与制剂中其他物质的分离色谱图

分析方法开发策略及应用案例三：在线衍生-HPLC-FLD 分析吐温 80

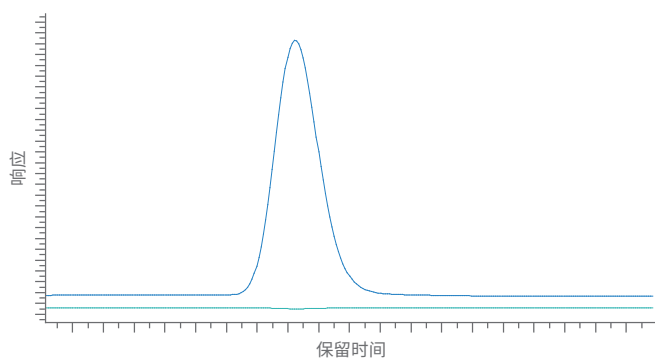


图 11. 吐温 80 在线衍生色谱图 (浓度 0.7 mg/mL)

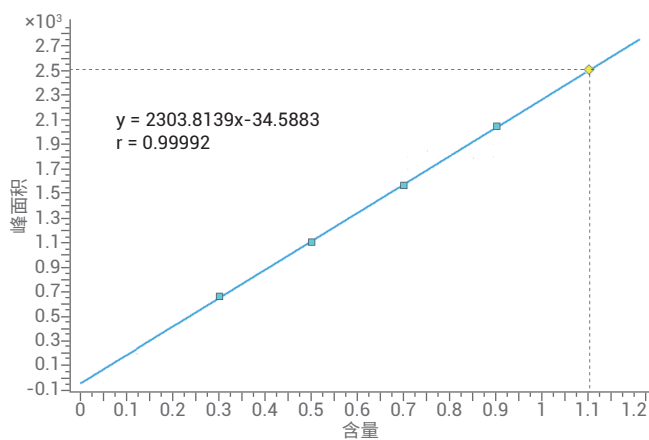


图 12. 吐温 80 标准曲线 (浓度范围 0.3–1.1 mg/mL)

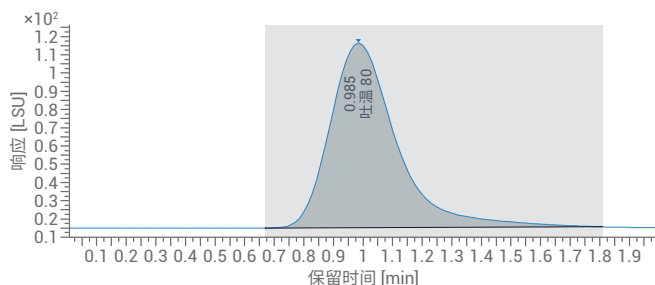


图 13. 实际蛋白样品分析的图谱 (实测浓度 0.699 mg/mL, 理论浓度 0.7 mg/mL)

对于比较复杂的蛋白制剂样品，需对样品进行不同程度的预处理，或者对色谱柱提出了较高的分离要求，一定程度会影响吐温 80 的准确测定。参考文献，选择 HPLC-FLD 液相系统内衍生反应的方法，对样品做简单前处理，整个过程简单高效，适合生物制药制剂中吐温 80 含量的准确测定。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1260 Infinity II FLD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | SUPELCO, 紧密反应器线圈 5 m × 0.50 mm, 部件号: LKAB-57405 |
| 流动相 | 0.15 mol/L 氯化钠、0.025 mol/L 硼酸钠、5.0% 乙腈、5.0 μmol/L N-苯基-1-萘胺 (NPN)、2.5 mg/L 吐温 80, 等度分析 |
| 流速 | 1.5 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 35 |
| 检测器条件 | FLD, 激发波长 350 nm, 发射波长 420 nm, 增益设为 7 |

表 3. 吐温 80 的 10 针重复进样峰面积的 RSD 值

| 编号 | 峰面积 |
|-------|---------|
| 1 | 129.345 |
| 2 | 129.284 |
| 3 | 129.497 |
| 4 | 128.892 |
| 5 | 128.693 |
| 6 | 128.847 |
| 7 | 126.383 |
| 8 | 128.077 |
| 9 | 127.651 |
| 10 | 127.575 |
| RSD/% | 0.77 |

稳定剂泊洛沙姆 (P188) 分析

泊洛沙姆是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，主要作乳化剂、稳定剂、增溶剂和分散剂。其中泊洛沙姆 188 (P188, PF68) 是泊洛沙姆系列中具有最佳乳化性能和安全性的一种，在人体内性质稳定、毒性低且生物相容性良好。因此，在美国药典中收录的 5 种不同规格的泊洛沙姆中，P188 已在上市品种中作为静脉注射剂的乳化剂使用。

分析方法开发策略及应用案例一：SEC-HPLC-ELSD

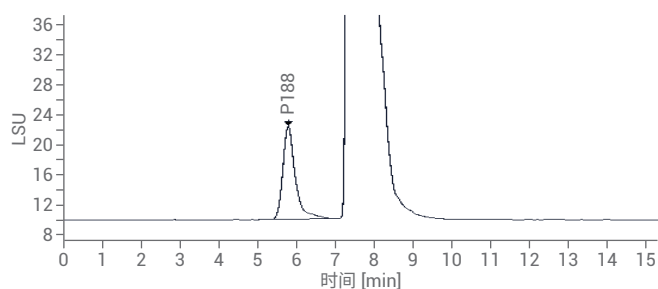


图 14. P188 标准品的色谱图 (浓度 0.05 mg/mL)

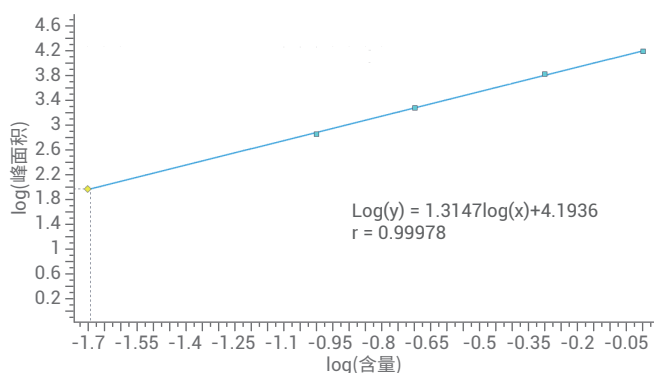


图 15. P188 的标准曲线 (浓度范围 0.02–1 mg/mL)

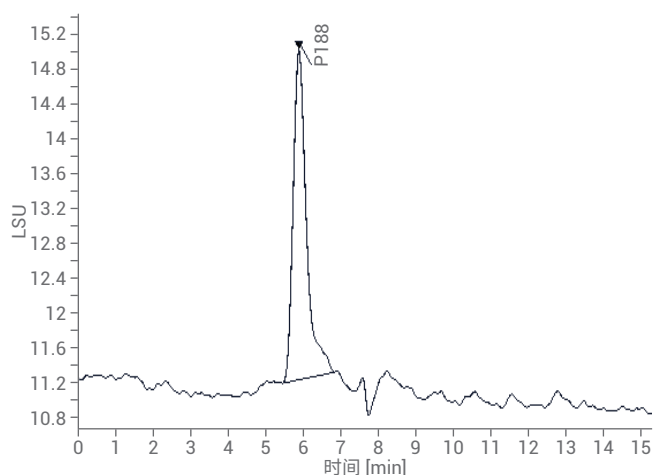


图 16. 对应于 P188 标样的定量限色谱图 (浓度 0.02 mg/mL)

考虑到 P188 分子量介于大分子蛋白和小分子缓冲盐之间，采用体积排阻色谱 (SEC) 对实际蛋白制剂中的 P188 进行分离，同时为了降低大量蛋白对分析的影响，用乙腈对制剂中的蛋白进行沉淀后离心，可以完全消除蛋白对 P188 准确定量的影响。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 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, 等度分析 |
| 流速 | 0.25 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 25 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 70 °C, 蒸发温度: 70 °C, 气体流速: 2.2 SLM |

表 4. P188 的 5 针重复进样的 RSD 值

| 编号 | 保留时间/min | 峰面积 |
|-------|----------|---------|
| 1 | 5.873 | 283.546 |
| 2 | 5.882 | 288.278 |
| 3 | 5.881 | 288.01 |
| 4 | 5.882 | 276.071 |
| 5 | 5.889 | 288.515 |
| RSD/% | 0.10 | 1.87 |

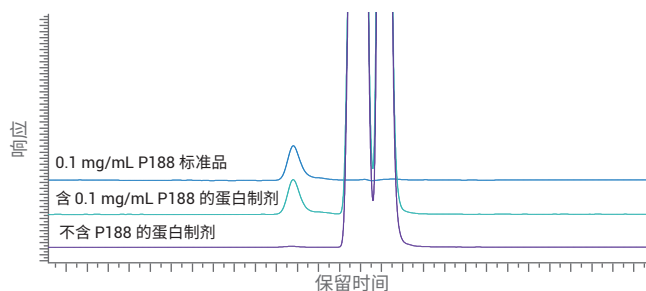


图 17. 蛋白制剂中 P188 含量测定 (理论值 0.1 mg/mL, 实测值 0.095 mg/mL)

分析方法开发策略及应用案例二：HPLC-ELSD

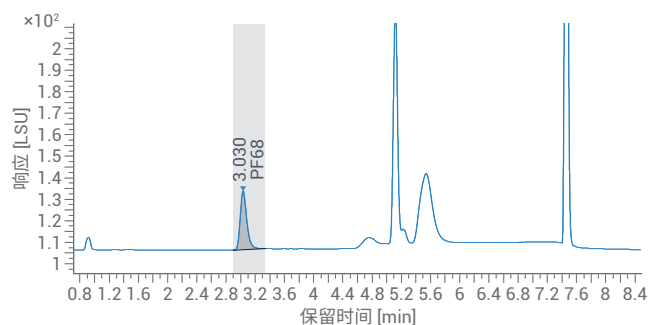


图 18. P188 标准品的色谱图 (浓度 0.05 mg/mL)

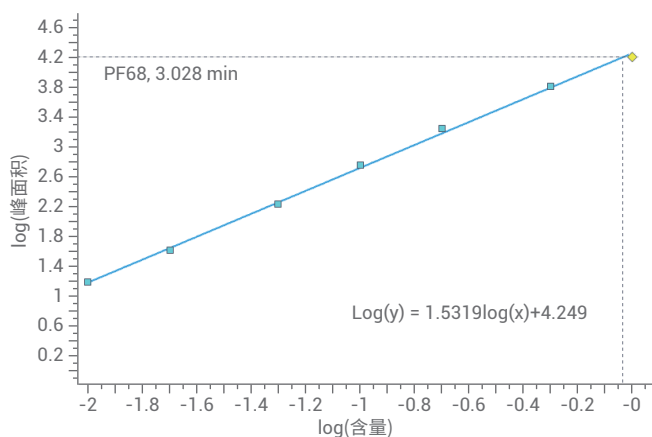


图 19. P188 的标准曲线 (浓度范围 0.01–1 mg/mL)

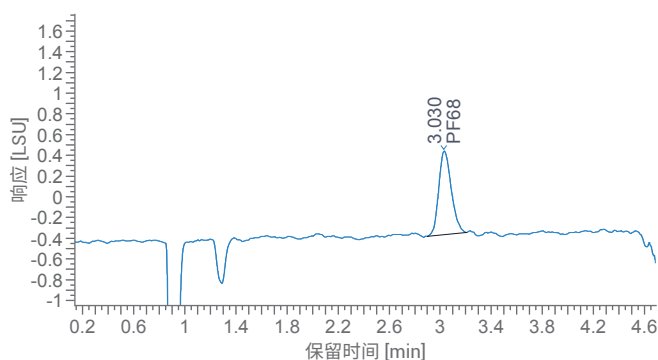


图 20. P188 对照品的检测限色谱图 (浓度 0.005 mg/mL)

考虑到 P188 是一类高分子非离子表面活性剂, 采用混合基质的色谱柱, 在水和异丙醇梯度条件下可以将 P188 和治疗性药物蛋白制剂中其他物质进行很好分离, 同时采用高灵敏的 1290 Infinity II ELSD 可以检测制剂中微量的 P188。

仪器配置: 1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | ChromCore SAA 表面活性剂专用柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm, 部件号: S014-050018-04615S |
| 流动相 | A: 2% 乙酸水溶液; B: 2% 乙酸异丙醇溶液; 梯度分析 |
| 流速 | 1.2 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 55 °C, 蒸发温度: 65 °C, 气流流速: 1.60 SLM |

表 5. P188 的 5 针重复进样的 RSD 值

| 编号 | 保留时间/min | 峰面积 |
|-------|----------|---------|
| 1 | 3.029 | 173.957 |
| 2 | 3.028 | 168.689 |
| 3 | 3.029 | 169.552 |
| 4 | 3.029 | 169.923 |
| 5 | 3.029 | 171.106 |
| RSD/% | 0.015 | 1.12 |

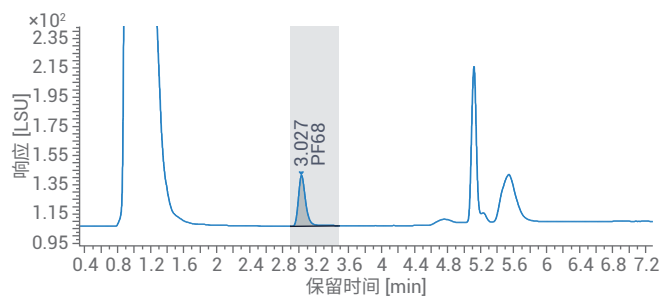


图 21. 实际蛋白制剂中 P188 的含量测定 (浓度 0.05 mg/mL)

分析方法开发策略及应用案例三：RP-HPLC-ELSD

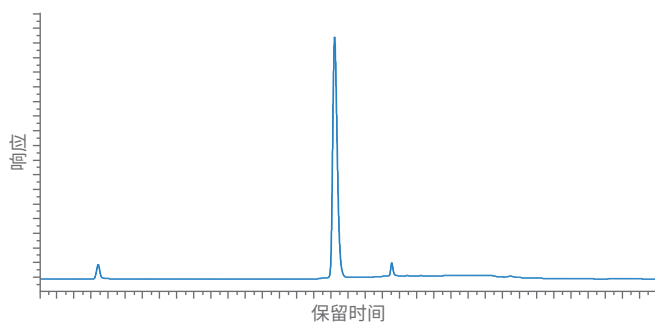


图 22. P188 标准品的色谱图 (浓度 0.1 mg/mL)

与 P188 分析方法二类似，在水、乙腈和异丙醇条件下，选择反相色谱柱也可以对 P188 进行很好分离。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号: 683975-302 |
| 流动相 | A: 超纯水; B: 乙腈; C: 异丙醇; 梯度分析 |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 45 °C, 蒸发温度: 60 °C, 气体流速: 1.40 SLM |

制剂中泊洛沙姆 188 和吐温 80 同时分析

分析方法开发策略及应用案例：HPLC-ELSD

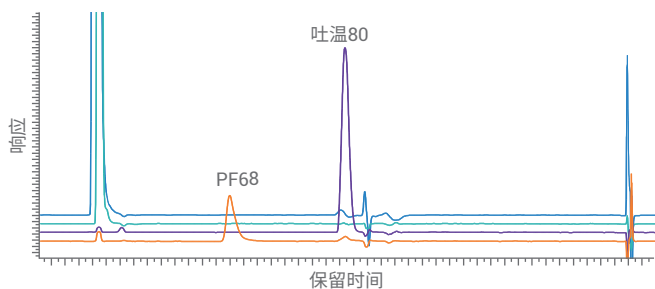


图 23. 实际蛋白制剂中 P188 和吐温 80 同时分析图谱

随着生物制药行业对制剂辅料研究的深入，几种不同辅料的混合使用可以有效提高制剂的稳定性和有效性，此时对辅料分析也提出了更高的要求。我们在专门分析表面活性剂的色谱柱 ChromCore SAA 上进行了条件优化，在两个不同的异丙醇比例的平台条件下可以同时将吐温 80 和 P188 进行很好分离，满足了客户不断提高的分析要求。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC, 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | ChromCore SAA 表面活性剂专用柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm, 部件号: S014-050018-04615S |
| 流动相 | A: 2% 乙酸水溶液; B: 2% 乙酸异丙醇溶液; 梯度分析 |
| 流速 | 1.2 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 25 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 55 °C, 蒸发温度: 65 °C, 气体流速: 1.60 SLM |

冻干保护剂糖类分析

糖类是一类得到广泛使用的药用辅料，包括蔗糖、海藻糖、半乳糖、甘露醇和山梨醇等。治疗性蛋白药物制剂中添加蔗糖，对蛋白质药物的二级结构改变、冻干处理过程及贮藏期内蛋白质多肽链的伸展和聚集具有显著的稳定作用。甘露醇和山梨醇也是蛋白多肽类药物中经常用到辅料，作为稳定剂或冻干的赋形剂，比如注射用重组人生长激素、注射用胸腺肽和一些胰岛素注射液中均含有甘露醇。

蔗糖分析方法开发策略：HILIC-LC-ELSD

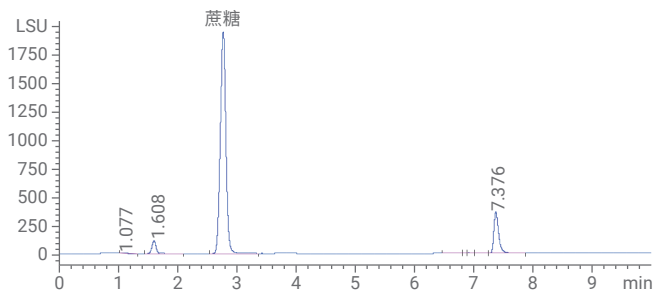


图 24. 实际蛋白制剂中蔗糖分析的色谱图

生物制剂的基质比较复杂，对于其中蔗糖的分析提出了较高的要求，这里选择 HILIC 的分离模式，采用梯度的分析条件，可以使蔗糖和制剂中其他物质得到很好的分离，同时选择 ELSD 作为检测器，可以显著提高蔗糖检测的灵敏度。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号: 685775-924 |
| 流动相 | A: 20 mmol/L 甲酸铵; B: 乙腈; 梯度分析 |
| 流速 | 0.3 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 40 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 45 °C, 蒸发温度: 75 °C, 气流流速: 1.60 SLM |

甘露醇和山梨醇分析的方法开发策略：HPLC-RID

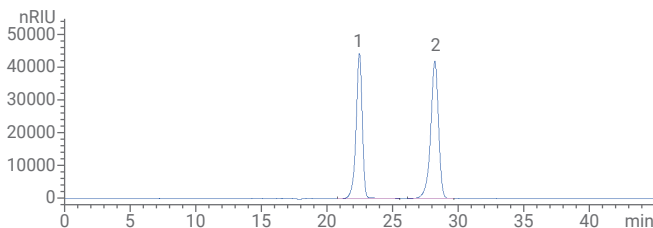


图 25. 甘露醇 (1) 和山梨醇 (2) 色谱图

安捷伦的 Hi-Plex Ca 色谱柱是分析甘露醇和山梨醇的最佳推荐色谱柱，在纯水作为流动相的条件下可以对两种醇进行很好地分离。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1260 Infinity II RID

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | Agilent Hi-Plex Ca, 7.7 × 300 mm, 8 μm, 部件号: PL1170-6810 |
| 流动相 | 超纯水 |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 进样量 | 20 μL |
| 柱温 | 80 °C |
| 检测器条件 | 示差折光检测器 |

蔗糖和乳糖分析的方法开发策略：HPLC-RID

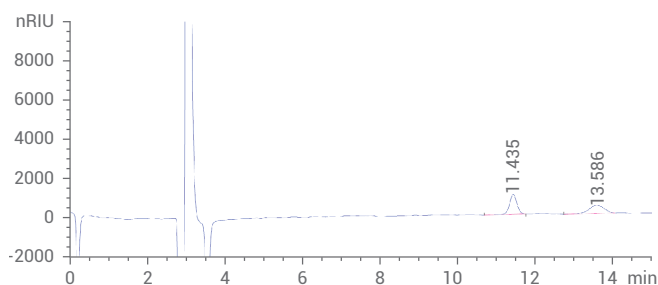


图 26. 蔗糖 (11.435 min) 和乳糖 (13.586 min) 色谱图

选择 Agilent Zorbax NH2 色谱柱可以对蔗糖和乳糖进行很好地分离，且一般制剂中两种糖的含量比较高，Agilent 1260 Infinity II RID 示差折光检测器能够满足日常的分析要求。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1260 Infinity II RID

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | Agilent Zorbax NH2, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 部件号: 880952-708 |
| 流动相 | 乙腈:超纯水 = 7:3 |
| 流速 | 1.0 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 45 °C |
| 检测器条件 | 示差折光检测器, 温度 35 °C |

氨基酸分析

氨基酸（如组氨酸和甘氨酸等）可以单独用作药物辅料或与其他辅料并用，通过优先排除机制稳定蛋白质药物。在缓冲液中，这些氨基酸能够在不同程度上抑制蛋白质药物的聚集，甚至可以抑制蛋白质药物的化学降解。

分析方法开发策略：在线衍生-HPLC-UV

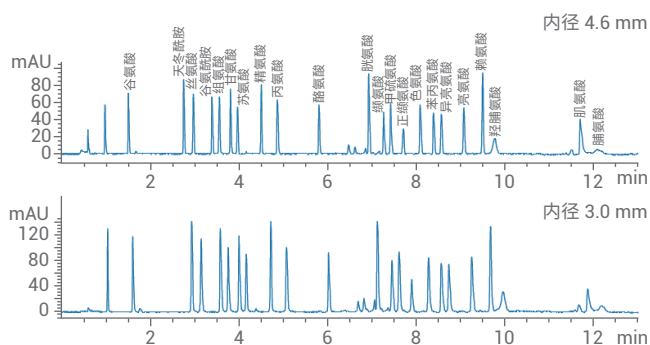


图 27. 在不同规格色谱柱上得到的氨基酸分析色谱图

安捷伦依据 1200 Infinity II 系列自动进样器具有多功能自动编程的功能，将本来繁琐的氨基酸离线衍生的工作转移到液相色谱仪上，开发出高效、高灵敏度的自动化在线衍生方法，可以快速分析作为辅料添加至药物制剂中的各种氨基酸，大大提高分析效率。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC

液相色谱分析方法

| 色谱柱 | Agilent AdvancedBio AAA C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号: 695975-322 或 Agilent AdvancedBio AAA C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm, 部件号: 655950-802 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--|----------|-----|-----|-----|----|---|------|----|---|------|----|----|------|---|-----|------|---|-----|------|----|---|----|----|---|
| 流动相 | A: 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 和 10 mmol/L Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8.2; B: 乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v:v) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 梯度条件 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>A/%</th> <th>B/%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>0.35</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>13.4</td><td>43</td><td>57</td></tr> <tr><td>13.5</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>15.7</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>15.8</td><td>98</td><td>2</td></tr> <tr><td>18</td><td>98</td><td>2</td></tr> </tbody> </table> | 时间 (min) | A/% | B/% | 0.0 | 98 | 2 | 0.35 | 98 | 2 | 13.4 | 43 | 57 | 13.5 | 0 | 100 | 15.7 | 0 | 100 | 15.8 | 98 | 2 | 18 | 98 | 2 |
| 时间 (min) | A/% | B/% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.0 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.35 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13.4 | 43 | 57 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13.5 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15.7 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15.8 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | 98 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 | 0.62 mL/min 适合 3 mm 内径色谱柱, 1.50 mL/min 适合 4.6 mm 内径色谱柱 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样量 | 自动在线衍生程序 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温 | 40 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 检测器条件 | UV: 338 nm, 262 nm; FLD: 0–5.52 min, 激发波长 340 nm, 发射波长 450 nm; 5.53–18 min, 激发波长 260 nm, 发射波长 325 nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

生产工艺残留消泡剂分析

在生物制剂生产过程中，由于培养基成分复杂，且产物中包含丰富的蛋白质等生物大分子，因此会产生大量泡沫。这些泡沫可能对生物制剂具有许多不利影响，增加染菌的机会，并引起代谢异常或菌体自溶等现象。如果不及时抑制和去除，会造成原料浪费，延长反应周期，并影响成品品质。

生物制药中常用的消泡剂包括聚醚类和有机硅消泡剂。其中有机硅消泡剂性能更出色，可以在生产过程发挥抑泡作用，防止泡沫给生物发酵带来不利影响。但是消泡剂的加入可能给后续生产过程引入新的杂质。鉴于国家对生物制药工艺（尤其是原辅料和工艺控制过程）的监管越来越严格，我们开发出一种二甲基硅油残留分析方法。

分析方法开发策略：HPLC-ELSD

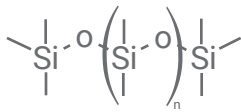


图 28. 二甲基硅油结构

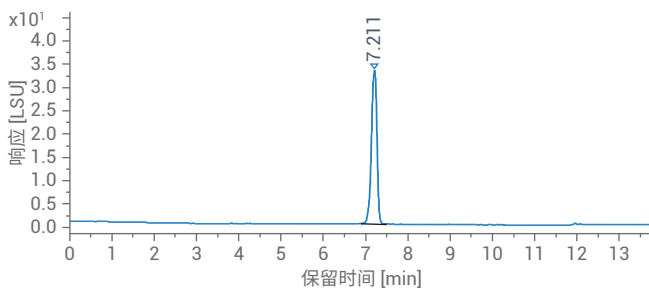


图 29. 二甲基硅油对照品色谱图（浓度 0.05 mg/mL）

二甲基硅油消泡剂具有极强的疏水性，且本身没有紫外吸收的官能团，同时考虑到实际制剂中含有大分子蛋白，选择大孔径的反相色谱柱（Agilent PLRP-S 或者 Poroshell StableBond 300 C3），配合四氢呋喃作为洗脱的流动相，可以使二甲基硅油和其他物质得到很好分离，后面选择 ELSD 作为检测器，可以对溶液中微量残留的二甲基硅油进行有效监控。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | Agilent PLRP-S, 2.1 mm × 50 mm, 5 μm, 1000 Å, 部件号: PL1912-1502; 或 Agilent Poroshell StableBond 300 C3, 2.1 mm × 75 mm, 5 μm, 300 Å, 部件号: 660750-909 |
| 流动相 | A = 水; B = 乙腈; C = 四氢呋喃; 梯度分析 |
| 流速 | 0.4 mL/min, 1.0 mL/min |
| 进样量 | 5 μL |
| 柱温 | 50 °C, 80 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 70 °C, 蒸发温度: 40 °C, 气体流速: 1.40 SLM |

分析方法开发策略及应用案例

基因治疗药物辅料和工艺残留分析

制剂中泊洛沙姆分析

基因治疗 (gene therapy) 是随着 DNA 重组、基因克隆等技术的成熟而发展起来的最具革命性的医疗技术之一，在此过程中，为了保证基因治疗药物的稳定性、安全性和有效性，会添加药物制剂辅料，P188 是一类性能优越的药用辅料，已经添加到越来越多的生物制品中。不仅包括前面提到的抗体类蛋白大分子制剂类药物，基因治疗领域也有成功的应用案例，由于其在制剂中含量比较低，没有紫外吸收的化学结构，因此用常规的液相色谱方法无法进行测定。在此我们建立了泊洛沙姆的分析方法，为这个新兴领域的客户提供有效的解决方案。

分析方法和图谱参考前面泊洛沙姆分析一节。

生产工艺残留吐温 20 分析

在基因治疗过程中，需要使用裂解剂对病毒进行裂解。这些裂解剂包括表面活性剂、去污剂以及有机溶剂，其中吐温是一类常用的病毒裂解剂，可以破坏病毒的脂膜或类脂，使其上蛋白质或包裹的蛋白质溶解，并经过纯化后使用。这些裂解剂的大量使用会对环境造成污染，而且试剂残留可能给后续的生产工艺产生影响，尤其对于制成供人体直接使用的生物制品，即使有微量的残留也将对使用者产生潜在的危害。因此安捷伦针对基因治疗生产过程中的吐温 20 进行准确定量分析，保证这些生物制品的用药安全性、稳定性和有效性。

分析方法开发策略及应用案例：HPLC-ELSD

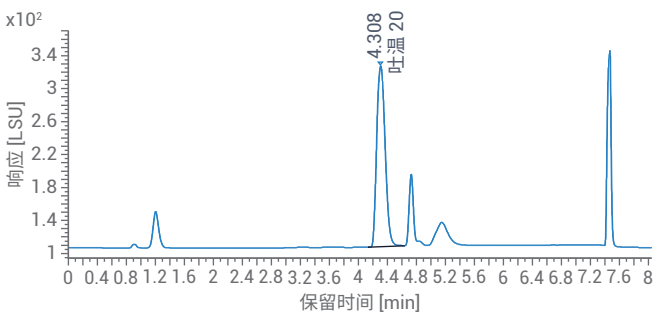


图 30. 吐温 20 标准品色谱图 (浓度 0.1 mg/mL)

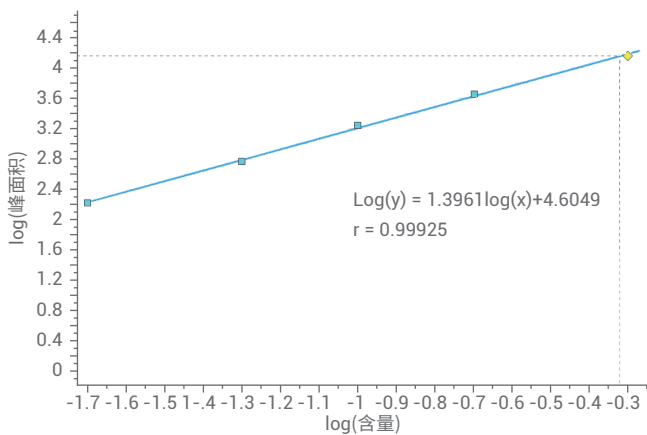


图 31. 吐温 20 的标准曲线 (浓度范围 0.02–0.5 mg/mL)

对于生产工艺的微量残留的吐温 20，选择类似前文吐温 80 的分析方法。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|---|
| 色谱柱 | ChromCore SAA 表面活性剂专用柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm, 部件号: S014-050018-04615S |
| 流动相 | A: 2% 乙酸水溶液; B: 2% 乙酸异丙醇溶液; 梯度分析 |
| 流速 | 1.2 mL/min |
| 进样量 | 20 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 45 °C, 蒸发温度: 80 °C, 气体流速: 1.00 SLM |

表 6. 吐温 20 的 5 针重复进样 RSD 值

| 编号 | 保留时间/min | 峰面积 |
|-------|----------|--------|
| 1 | 4.311 | 610.96 |
| 2 | 4.310 | 611.18 |
| 3 | 4.312 | 622.46 |
| 4 | 4.311 | 630.10 |
| 5 | 4.308 | 635.53 |
| RSD/% | 0.035 | 1.77 |

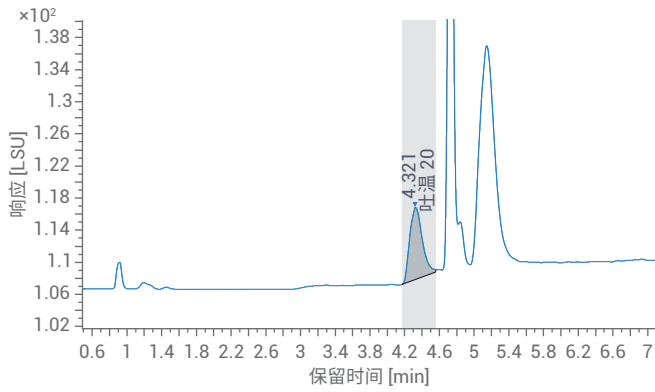


图 32. 吐温 20 对照品最低检测限的谱图 (浓度 0.010 mg/mL)

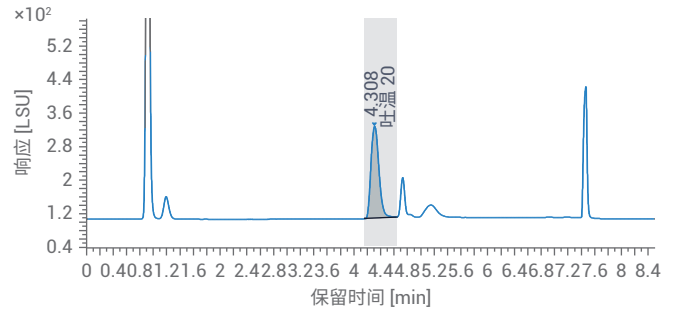


图 33. 实际样品溶液中吐温 20 的色谱图 (浓度 0.2 mg/mL)

生产工艺残留 Triton X-100 分析

曲拉通 X-100 (Triton X-100) 的化学名称为聚乙二醇辛基苯基醚，是一种优异的表面活性剂、润湿和洗涤剂。在生物制药领域，不同浓度的 Triton X-100 溶液有不同的效果，低浓度 Triton X-100 溶液常作为添加剂使蛋白质（尤其是膜蛋白）保持稳定。在免疫标记中，常用含 Triton X-100 的缓冲盐体系来提高真核细胞细胞膜的通透性。一定浓度的 Triton X-100 也可以用于裂解细胞。因此，准确测定生物样品溶液中的 Triton X-100 含量至关重要。

分析方法开发策略：RP-HPLC

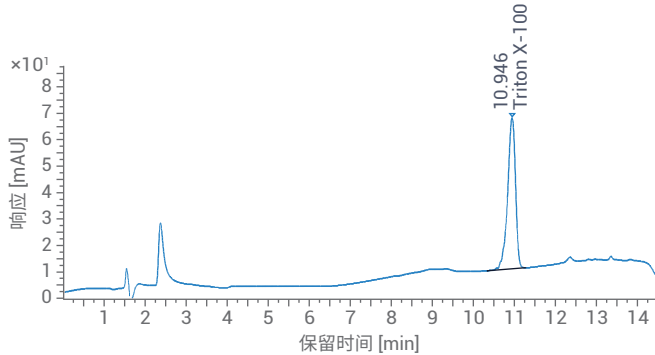


图 34. Triton X-100 标准品色谱图 (浓度 0.01 mg/mL)

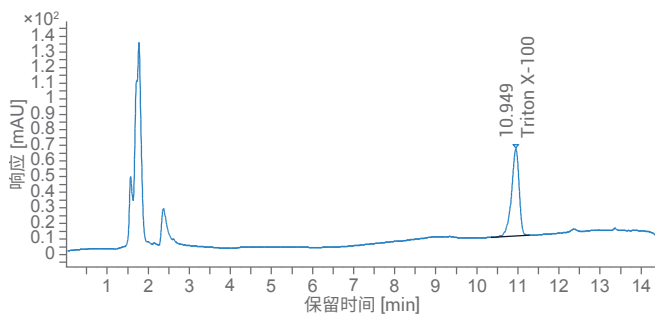


图 35. 实际样品溶液中 Triton X-100 含量测定 (浓度 0.012 mg/mL)

Triton X-100 是一类聚合物，为了能够准确定量其残留量，我们采用反相色谱柱，在较高的有机相条件下将其压缩成一个色谱峰，在紫外条件下即有较高的灵敏度，可以作为 Triton X-100 分析的参考方法。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号: 683975-302 或者 ZORBAX StableBond 300 C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm, 部件号: 863974-302 |
| 流动相 | A: 超纯水; B: 甲醇; 梯度分析 |
| 流速 | 0.4 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | UV, 230 nm |

表 7. Triton X-100 的 5 针重复进样的 RSD 值

| 编号 | 保留时间/min | 峰面积/min*mAU |
|-------|----------|-------------|
| 1 | 10.948 | 1862.265 |
| 2 | 10.949 | 1855.678 |
| 3 | 10.949 | 1855.270 |
| 4 | 10.945 | 1850.178 |
| 5 | 10.949 | 1844.837 |
| RSD/% | 0.02 | 0.35 |

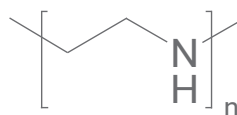


图 37. 线性聚乙烯亚胺的结构

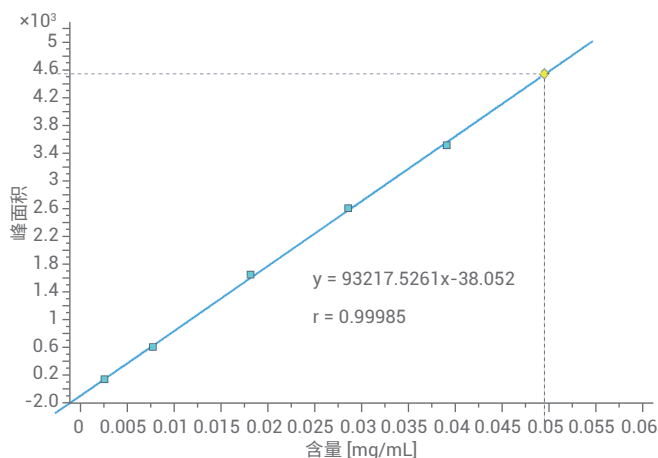


图 36. Triton X-100 标准曲线 (浓度范围 0.005–0.05 mg/mL)

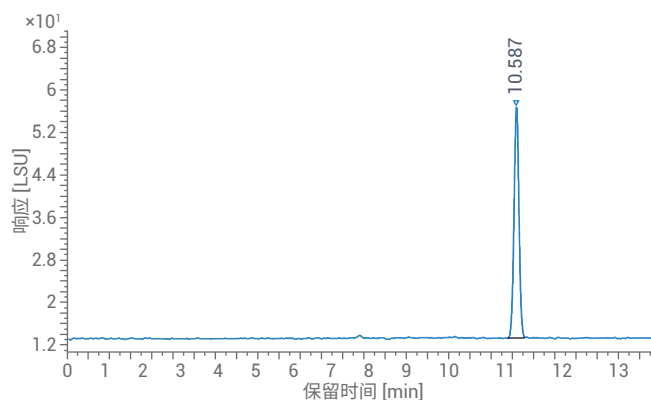


图 38. PEIpro 标准品色谱图 (浓度 0.1 mg/mL)

转染剂 PEIpro 分析

聚乙烯亚胺 (PEIpro) 是一种聚合物转染试剂，能够使 DNA 缩合为带正电荷的微粒。这些微粒可以黏合到带负电荷的细胞表面残基，通过胞吞作用进入细胞；然后 PEIpro 与 DNA 形成的复合物经过渗透膨胀进入细胞质；在复合物裂解后，DNA 即可自由地融合到细胞核中。因此，PEIpro 在基因治疗药物的开发与生产中，可通过瞬时基因表达生产重组蛋白质。PEIpro 还可以在血清培养基中培养的贴壁细胞系用于病毒载体生产（慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等）。但是，PEIpro 具有很强的细胞毒性，可能破坏细胞膜而导致细胞死亡，或在胞吞后破坏线粒体膜而导致细胞凋亡。因此，随着基因治疗药物的快速发展，准确测定溶液中转染剂 PEIpro 的含量具有重要意义。我们建立了简单高效的 HPLC 方法测定 PEIpro 的含量，可以解决生物制药质量控制方面的后顾之忧。

分析方法开发策略：SEC-HPLC-ELSD

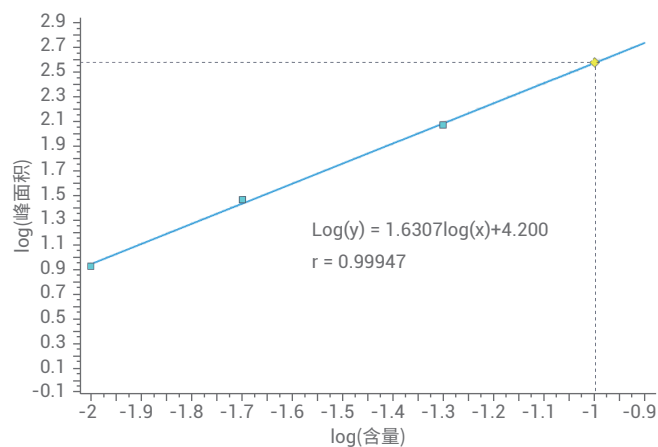


图 39. PEIpro 标准曲线 (浓度范围 0.01–0.1 mg/mL)

PEIpro 带有较强的正电荷，考虑用体积排阻色谱法 (SEC) 将其进行分离，同时 PEIpro 没有紫外吸收的化学结构，柱后选择 ELSD 作为检测器对其进行准确测定。

仪器配置：1260 Infinity II Prime LC 和 1290 Infinity II ELSD

液相色谱分析方法

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | ChromCore PEI 色谱柱, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 部件号: S007-050012-04625S |
| 流动相 | 50 mmol/L 乙酸铵, pH = 5.0 |
| 流速 | 0.4 mL/min |
| 进样量 | 10 μL |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测器条件 | ELSD, 雾化温度: 55 °C, 蒸发温度: 65 °C, 气体流速: 1.40 SLM |

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

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，2021
2021年6月18日，中国出版
5994-3710ZHCN

