

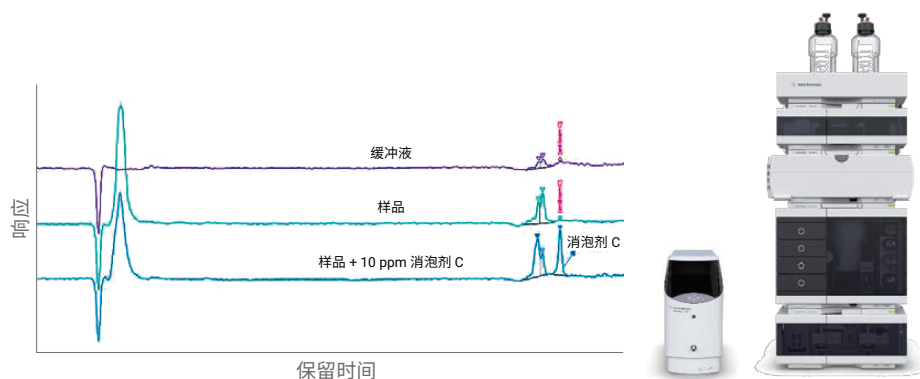
使用高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 对生物制剂中的二甲硅油消泡剂 C 残留进行分析

作者

刘彬, 孟颖
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 二元液相色谱系统、Agilent 1290 Infinity II ELSD 检测器和 Poroshell SB C18 (3.0 × 100 mm, 2.7 μm) 色谱柱对生物制剂中的消泡剂 C 残留进行分析的简单灵敏的方法。该方法运行时间短、灵敏度高, 且具有良好的重现性和回收率, 能够以高性价比满足生物制药企业测定消泡剂残留的迫切需求。



前言

近年来，随着全球生物制药领域新药研发的快速增长，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。在微生物发酵生产过程中，由于通气、搅拌以及培养基中糖和蛋白质的存在、细胞及代谢产物的积累等原因，会产生大量的泡沫。因此在发酵生产中需要加入消泡剂消泡，而消泡剂残留会带来安全性问题，日益引起生物制药企业的重视。

常用消泡剂主要包括聚醚类消泡剂和有机硅类消泡剂。硅基消泡剂，如消泡剂 C (Sigma Aldrich)，是一种含 30% 聚二甲基硅氧烷的精矿水乳状液。在 CHO 细胞培养中，消泡剂 C 以其有效性和高效率而得到广泛使用。鉴于国家对生物制药工艺的监管越来越严格，企业有必要对消泡剂残留检测进行深入研究。目前常用的检测方法包括 GPC-HPLC-ELSD 法和 LCMS 等，但是在样品前处理方法、灵敏度、分离度和稳定性等方面存在各种问题。

在本应用中，利用配备 Agilent 1290 Infinity II ELSD 检测器和 Poroshell SB C18 色谱柱 (3.0 × 100 mm, 2.7 μm) 的 Agilent 1260 Infinity II 二元液相色谱系统对生物制剂中的消泡剂 C 残留进行分析。

实验部分

试剂和样品

氯仿和四氢呋喃购自 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；实验用水为来自 Milli-Q 纯水机系统 (美国) 的高纯水；蛋白制剂 (包含蛋白质和各种辅料)、制剂缓冲液 (包含其他辅料) 和消泡剂 C 原液由生物制药厂家提供。

仪器和设备

采用耐压 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity II 二元液相色谱系统，配备如下安捷伦模块：

- Agilent 1260 Infinity II 二元液相色谱泵 (部件号 G7112B)
- Agilent 1260 Infinity II 自动进样器 (部件号 G7129A)
- Agilent 1260 Infinity MCT 柱温箱 (部件号 G7116A)
- Agilent 1290 Infinity II ELSD 蒸发光散射检测器 (部件号 G7102A)

利用 Agilent OpenLab CDS 2.6 进行仪器控制和数据分析。

样品前处理

取适量消泡剂 C 原液，溶于氯仿 (含 0.2% 盐酸) 中，配制成 200 ppm 储备液，然后稀释得到 100、50、20、10、5、2 ppm 标样，将其进样分析。

取样品和氯仿按体积 1:1 混合 10 分钟，然后以 12000 r/min 离心 5 min，取下层溶液直接进样分析。

色谱条件

色谱柱：	Agilent Poroshell SB C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-302)
流动相 A：	50% 乙腈/水
流动相 B：	四氢呋喃
柱温：	50 °C
进样量：	20 μL
流速：	0.4 mL/min
检测条件：	ELSD, 雾化温度 50 °C, 蒸发温度 70 °C, 气体流速 1.6 SLM

线性范围、定量限和检测限的测定

标准曲线由浓度范围为 5–200 μg/mL 的 6 个消泡剂 C 标准浓度点进行创建。取 20 μL 氯仿作为空白进样分析，随后将各线性浓度样品重复进样 3 次。利用各浓度标样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浓度的标样来确定定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。将信噪比 (S/N) > 3 时的最低浓度定义为 LOD，并将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。将各浓度标样的平均峰面积对分析物浓度作图，得出消泡剂 C 校准曲线。

结果与讨论

样品前处理

样品前处理方法的选择直接影响消泡剂 C 的分析。消泡剂 C 是一种 30% 聚二甲基硅氧烷精矿水乳状液，不溶于水，溶于二氯甲烷、氯仿及四氢呋喃等。本实验采用氯仿萃取法进行样品前处理。为尽量避免塑料制品 (离心管、注射器和枪头等) 溶出所带来的污染，选用聚四氟乙烯 (PTFE) 进样瓶瓶盖 (PL 5182-0723) 和 PTFE 枪头以消除干扰。

消泡剂 C 的 RP-ELSD 分析

目前消泡剂的残留分析方法包括 GPC-HPLC 和 LC/MS，但 GPC 方法的灵敏度无法满足检测残留量的需要，而 LC/MS 方法不成熟且成本较高。本研究采用反相色谱法，同时配合高灵敏度 1290 ELSD 检测器，开发出一种高灵敏度消泡剂检测方法。用该方法得到的消泡剂 C 标准品的色谱图如图 1 所示。消泡剂 C 的保留时间在 9 分钟左右，考虑到色谱柱后平衡时间，单次分析的总分析时间为 14 分钟（未显示），分析效率和灵敏度均有效提高（见图 1A）。本实验条件下空白溶剂存在基线漂移，因此在后续方法验证时，在积分方法中设置空白对照扣除（见图 1B）。

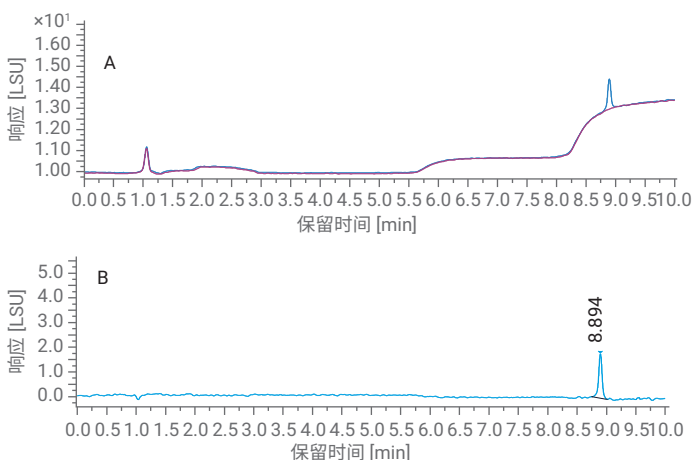


图 1. 在 SB C18 色谱柱上分离得到的消泡剂 C 标准品的色谱图: A) 蓝色迹线为浓度 10 µg/mL 的消泡剂 C 标准溶液; 紫色迹线为氯仿空白溶剂; B) 扣除空白后的消泡剂 C 谱图

保留时间和峰面积精密度

表 1 列出了浓度为 20 µg/mL 的消泡剂 C 重复进样 6 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 0.05% 和 2.9%，表明该方法具有优异的精密度。

表 1. 保留时间和峰面积的精密性 (n = 6)

	1	2	3	4	5	6	RSD
保留时间/min	8.899	8.891	8.899	8.893	8.903	8.897	0.05%
峰面积	16.613	17.134	16.658	16.429	15.842	15.967	2.9%

检测限和定量限

如图 2 和图 3 所示，消泡剂 C 的 LOD 和 LOQ 分别为 2 µg/mL 和 5 µg/mL。当消泡剂 C 进样浓度为 2 µg/mL 且进样量为 20 µL 时，S/N 为 15.9，远高于 S/N > 3 的要求。这表明 HPLC-ELSD 方法具有良好的灵敏度，可以满足检测蛋白制剂中消泡剂 C 残留的要求。

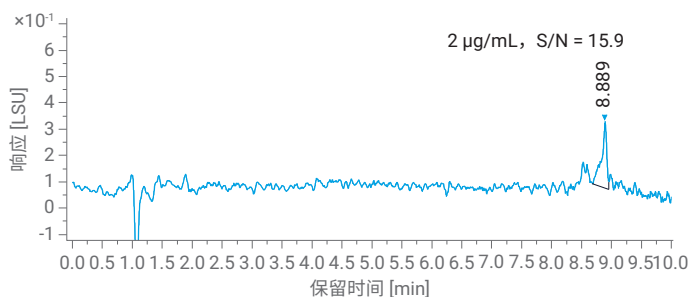


图 2. 浓度为 LOD (2 µg/mL) 的消泡剂 C 标样的色谱图

线性

使用峰面积与消泡剂 C 浓度创建 5 µg/mL 至 200 µg/mL 范围内的双对数曲线，结果如图 3 所示，线性拟合良好，可应用于此范围内消泡剂 C 的准确定量。

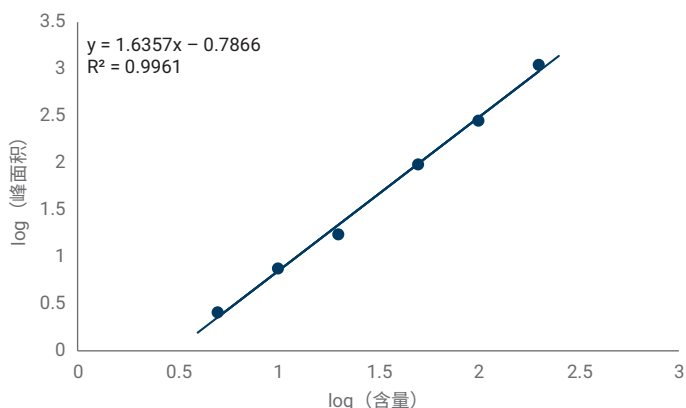


图 3. 浓度范围为 5–200 µg/mL 的 6 点标准曲线

加标回收率

以实际蛋白制剂溶液为基质，向其中加入 10 µg/mL 消泡剂 C 标准品进行加标回收率实验。将加标样品平行测定 3 次，以评价分析方法的准确度。结果如图 4 所示。加标样品中消泡剂 C 的实测浓度为 9.04 µg/mL，因此蛋白制剂中的加标回收率为 90.4%，符合 2020 年版药典 9101 分析方法验证指导原则规定的 80%–115% 的要求，表明该方法具有良好的准确度。

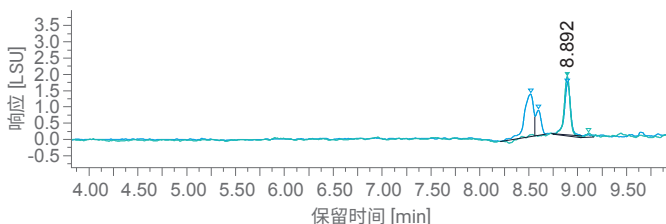


图 4. 利用 HPLC-ELSD 得到的色谱图: 浅蓝色迹线为浓度 10 µg/mL 的消泡剂 C 标准溶液; 深蓝色迹线为加标浓度 10 µg/mL 的蛋白制剂样品

实际蛋白质制剂中消泡剂残留的测定

针对消泡剂 C 残留量未知的某实际蛋白质制剂样品，以不含消泡剂 C 的制剂缓冲液为空白，对该样品进行检测；并在样品中加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 消泡剂 C 标准品作为对照。结果如图 5 所示。从图中可以看出，在实际蛋白质制剂样品中未检出消泡剂 C 残留，且样品中其他组分对消泡剂 C 的检测无干扰。

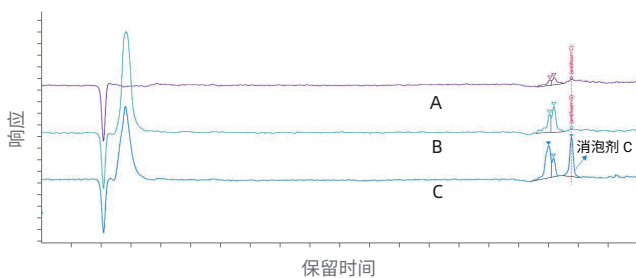


图 5. A) 空白制剂; B) 实际蛋白质制剂; C) 实际蛋白质制剂加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 消泡剂 C 标准品的色谱图

结论

本应用基于 Agilent 1260 Infinity II 二元色谱系统、1290 Infinity II ELSD 检测器和表面多孔反相色谱柱 Poroshell SB C18，开发出一种分析生物制剂中二甲基硅油消泡剂 C 残留量的方法。Poroshell SB C18 色谱柱能够使二甲基硅油消泡剂 C 与其他物质得到很好的分离，且 1290 Infinity II ELSD 对消泡剂 C 具有较高的检测灵敏度和稳定性。该方法在 5–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内表现出优异的线性；消泡剂 C 的 LOD 和 LOQ 分别为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；且该方法具有良好的准确度和精密度，适合用作测定生物制药工艺中残留的二甲基硅油消泡剂含量的优选解决方案。

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

DE38564247

仅供科研使用，不用于临床诊断用途。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023

2023年5月15日，中国出版

5994-6138ZHCN

