

# 采用 Agilent 1290 Infinity II ELSD 分析 检测细胞基因治疗慢病毒产品中的 转染试剂 PEI 残留

## 作者

殷承华，张婷婷，鲁锐  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本文介绍了一种利用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统、Agilent 1290 Infinity II ELSD 检测器和 Poroshell 120 CS-C18 色谱柱 (3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm) 检测细胞基因治疗慢病毒原液中转染试剂聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 残留的定量分析方法。该方法采用含 0.5% 三氟乙酸的水和乙腈溶液作为流动相，对慢病毒原液中的 PEI 进行分离，同时考察了慢病毒纯化工艺中不同阶段和环节的基质干扰情况。该方法操作方便、分离度高、灵敏度出色，且具有良好的线性、精密度和准确度，为细胞基因治疗行业企业测定基因治疗病毒原液中 PEI 残留含量的检测提供了一种优异的解决方案。

前言

聚乙烯亚胺是一种多电荷阳离子聚合物（结构如图 1 所示），非常容易与带负电荷的核酸分子结合形成复合物而进入细胞中。凭借这一特点，PEI 被广泛应用于基因治疗及其他生物大分子药物的研发和生产环节中。但 PEI 作为高分子聚合物在生物体内不易降解，具有一定的细胞毒性。因此，高效且准确地测定相关产品中转染试剂 PEI 的含量具有十分重要的意义<sup>[1]</sup>。

在先前发表的安捷伦应用简报 5994-5429ZHCN 中我们介绍了使用 ELSD 分析检测腺相关病毒 (Adeno-associated Virus, AAV) 基因治疗病毒原液中转染试剂 PEI 残留的案例。与 AAV 相比，慢病毒 (Lentivirus) 的病毒外壳含有包膜蛋白，包装容量更大，结构也更加复杂<sup>[2]</sup>。本文基于安捷伦丰富的 PEI 分析经验，建立了一种快速、高效地检测 PEI 残留的 HPLC-ELSD 分析方法。该方法灵敏度高、基质干扰影响小且准确度和精密度出色，适用于测定慢病毒产品中转染试剂 PEI 的残留量。

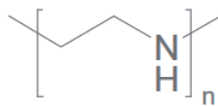


图 1. 线性聚乙烯亚胺结构

实验部分

试剂和样品

三氟乙酸为 HPLC 级，购自上海安谱实验科技股份有限公司；乙腈为 HPLC 级，购自 J.T. Baker 公司（美国）；高纯水来自 Milli-Q 纯水系统（美国）现制备；聚乙烯亚胺（线性聚乙烯亚胺，分子量为 25000）及病毒原液样品均由生物制药公司提供。

仪器和设备

采用最高耐压达 800 bar 的 Agilent 1260 Infinity Prime 四元液相色谱系统，配备以下安捷伦模块：

- Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump 四元梯度泵（部件号 G7104C）
- Agilent 1260 Infinity II Multisampler 自动进样器（部件号 G7167A）
- 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 软件进行仪器控制和数据分析。

HPLC-ELSD 色谱条件

- 色谱柱：Agilent Poroshell 120 CS-C18, 3.0 mm × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-342)
- 柱温：45 °C
- 进样量：20 μL
- 流速：0.5 mL/min
- 检测器：ELSD
- 雾化温度：75 °C
- 蒸发温度：65 °C
- 气体流速：1.30 SLM
- 流动相 A：0.5% 三氟乙酸水溶液
- 流动相 B：0.5% 三氟乙酸乙腈溶液

梯度程序如下表所示：

| 时间 (min) | B (%) |
|----------|-------|
| 0.0      | 5     |
| 4.0      | 10    |
| 4.1      | 40    |
| 6.0      | 60    |
| 6.1      | 90    |
| 8.0      | 90    |
| 8.1      | 5     |
| 10.0     | 5     |
| 11.0     | 60    |
| 12.0     | 90    |
| 13.5     | 90    |
| 13.6     | 5     |
| 18.0     | 5     |

校准曲线绘制

标准储备液 (200 mg/L)：准确称取聚乙烯亚胺 10.0 mg，置于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀后备用。

标准工作溶液：吸取适量 PEI 标准储备液 (200 mg/L)，用 0.5% 三氟乙酸乙腈-水 (v/v = 1:3) 稀释得到一系列标准工作溶液，浓度分别为 20.0 μg/mL、10.0 μg/mL、5.0 μg/mL、2.0 μg/mL 和 1.0 μg/mL，用于绘制校准曲线。

样品前处理

量取样品溶液 200 μL（包括含有 buffer 病毒原液终产品以及纯化过程中不同环节的病毒样品）于 1.0 mL 离心管中；加入 200 μL 稀释剂（10% 三氟乙酸的乙腈-水溶液，v/v = 1:3），并涡旋振荡 30 s；静置一段时间后，高速 (12000 r/min) 离心 10 min；取上清液直接进样分析。

结果与讨论

在应用简报 5994-5429ZHCN 中，我们根据 PEI 的化学结构和样品基质的特点，考察并讨论了色谱柱、流动相体系的选择以及样品前处理试剂的筛选，本文对此不再赘述。除加标实验以外，本文还将对慢病毒载体下游生产工艺中不同环节的样品基质干扰情况进行分析和讨论。

保留时间和峰面积的精密度

表 1 列出了 PEI 标准品 (5.0 ppm) 重复进样 5 次所得到的平均保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值。从表中可以看出，保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.18% 和 2.67%，表现出良好的重现性，表明该方法具有出色的精密度。

表 1. PEI 标准品的保留时间和峰面积的精密度 (n = 5)

| 化合物 | 项目          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | RSD% |
|-----|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| PEI | 峰面积 (LSU*S) | 54.83 | 52.62 | 55.12 | 51.84 | 53.02 | 2.67 |
|     | 保留时间 (min)  | 6.884 | 6.871 | 6.853 | 6.855 | 6.863 | 0.18 |

检出限和定量限

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低浓度定义为检出限 (LOD)，将 S/N > 10 时的最低浓度定义为定量限 (LOQ)。由此计算出该方法对 PEI 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.25 μg/mL 和 0.5 μg/mL。当 PEI 进样浓度为 1.0 μg/mL 且进样体积为 20 μL 时，S/N 达到 39.0（如图 2 所示），远远高于 S/N > 10 的要求。这表明所开发的 HPLC-ELSD 方法具有出色的灵敏度，能够满足生物制药客户定量分析相关产品中 PEI 残留量为 1.0 μg/mL 的检出限值要求。

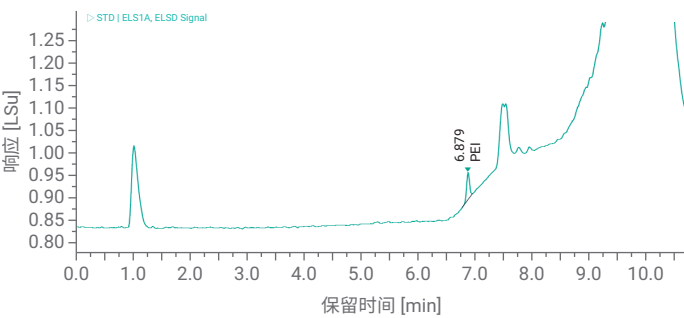


图 2. 浓度为 1.0 μg/mL (LOQ) 的 PEI 的色谱图

线性

使用峰面积的对数与 PEI 浓度的对数绘制校准曲线，结果如图 3 所示。在 1.0–20.0 μg/mL 的浓度范围内，标准曲线方程为  $\text{Log}(y) = 1.8989\text{Log}(x) + 0.4036$ ，相关系数 (r) 为 0.9986，表明该方法在此浓度范围内具有良好的线性。

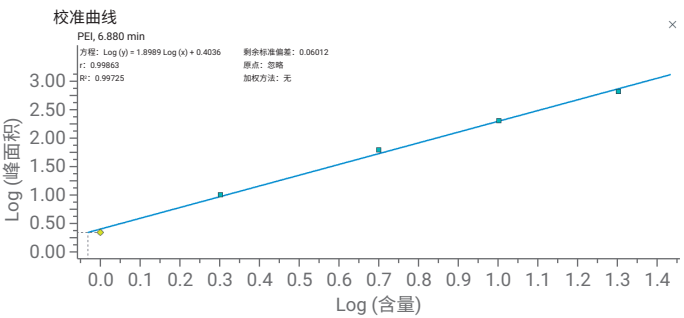


图 3. PEI 的标准曲线（浓度范围 1.0–20.0 μg/mL）

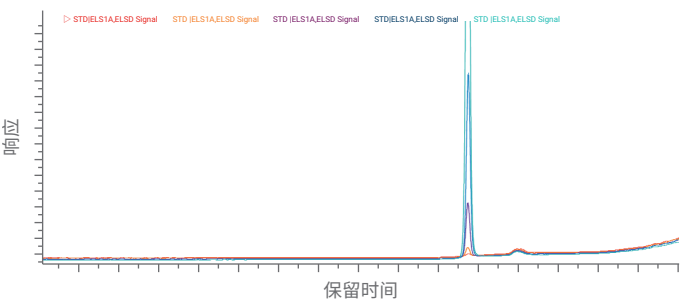


图 4. 标准曲线中不同浓度标准品色谱叠加图（样品峰面积由大到小，进样浓度依次为 20.0 μg/mL、10.0 μg/mL、5.0 μg/mL、2.0 μg/mL 和 1.0 μg/mL）

慢病毒纯化不同工艺环节中的样品基质干扰

利用构建的表达产生功能性病毒颗粒所需成分的细胞完成病毒生产后，需要将裂解的细胞移至下游，以进行病毒纯化操作。不同种类病毒的工艺开发过程有其特别之处，但共同目的是将病毒与其工艺残留和产品相关杂质分离，以得到高滴度病毒。病毒纯化工艺流程因病毒大小和类型的不同而不同（示意图见图 5）。本文对用户不同的慢病毒样品及其不同工艺环节的样品基质干扰进行了专门考察。



图 5. 病毒载体生产工艺流程

在样品前处理试剂的筛选中，考虑到病毒样品基质较为复杂，一方面高浓度样品基质溶液容易污染色谱柱和 ELSD 检测器，另一方面在直接进行样品加标时回收率较差。为消除基质干扰并提高样品中转染试剂 PEI 的回收率，对样品进行了稀释。在应用简报 5994-5429ZHCN 所述的样品前处理稀释剂的基础上进行进一步优化，使用酸性有机试剂加水混合溶液（10% TFA 水/乙腈溶液 = 1/1）作为样品前处理试剂。结果发现，样品基质干扰得以有效消除，且 PEI 回收率也大大提高<sup>[2]</sup>。

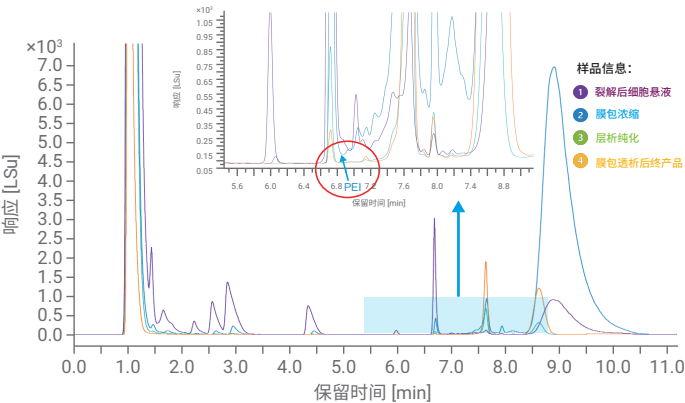


图 6. 生物制药公司 A 不同工艺阶段的样品谱图

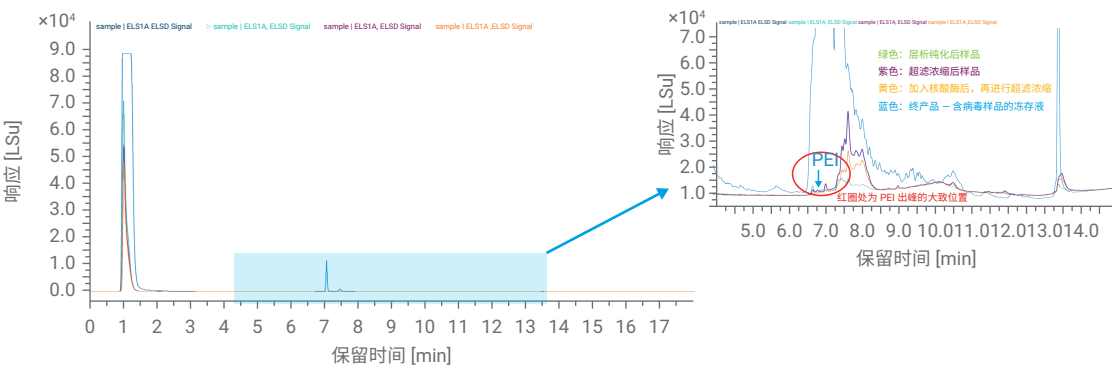


图 7. 生物制药公司 B 不同工艺阶段的样品谱图

图 6 显示了生物制药公司 A 不同工艺阶段的样品谱图。从中可以看出，裂解后的细胞悬液样品（紫色）和膜包浓缩（蓝色）阶段后的样品基质最为复杂，尤其是在 PEI 的出峰位置有大量未知干扰峰（红圈处）。相对而言，层析纯化（绿色）及纯化后膜包透析后的最终样品（黄色）基质干扰较小，可作为 PEI 残留的工艺过程监测样品。因此，针对生物制药公司 A 的产品，本文最终选取纯化后膜包透析的最终样品作为加标测试样品。

图 7 显示了生物制药公司 B 不同工艺阶段的样品谱图。从中可以看出，终产品（蓝色）的谱图中基质干扰最明显，而层析纯化和超滤浓缩阶段的样品相对干净。最终考虑到 PEI 的出峰位置（红圈处）周围无样品基质干扰，选择超滤浓缩后的样品（紫色）作为最终 PEI 残留的加标测试样品。

实际样品与加标样品分析

在实际样品分析中，生物制药企业一般要求慢病毒产品中 PEI 残留不超过 1 ppm 或 2 ppm。图 8 显示了制药公司 A 慢病毒终产品（未加标）以及加标浓度为 2 ppm 的样品的叠加色谱图。加标回收率测定结果为 119.4%，满足用户分析和检测要求。其中样品前处理过程如实验部分所述。加标样品的具体制备步骤为：取慢病毒终产品溶液 198  $\mu$ L 于 1.0 mL 离心管中；加入 2  $\mu$ L PEI 标准品 (200 ppm)，振荡混匀；再加入 200  $\mu$ L 稀释剂（10% 三氟乙酸的乙腈-水溶液，v/v = 1:1），涡旋振荡 30 s；静置一段时间后高速 (12000 r/min) 离心 10 min；取上清液直接进样分析。

图 9 显示了制药公司 B 慢病毒终产品（未加标）以及加标浓度为 1 ppm 和 2 ppm 的样品的叠加色谱图。1 ppm 加标样品的回收率测定结果为 104%，对应 2 ppm 加标样品的回收率结果为 108%，其加标样品制备过程与前一个样品类似，也满足常规分析和检测要求。

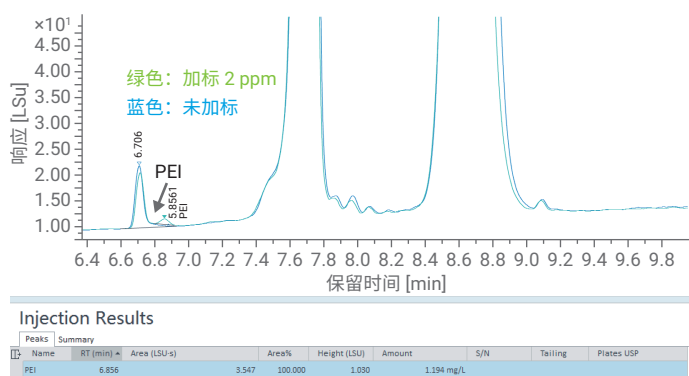


图 8. 制药公司 A 慢病毒终产品和加标 2 ppm 样品的叠加色谱图

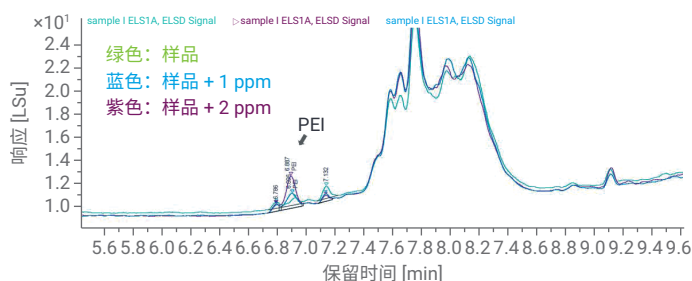


图 9. 制药公司 B 慢病毒终产品和加标 1 ppm 及 2 ppm 样品的叠加色谱图

## 结论

本研究采用 Agilent 1260 Infinity II Prime 四元液相色谱系统和 1290 Infinity II ELSD 检测器开发出一种测定细胞基因治疗慢病毒原液中转染试剂 PEI 残留的方法。该方法具有出色的保留时间和峰面积精密度；方法 LOD 和 LOQ 分别为 0.5 µg/mL 和 1.0 µg/mL，表现出较高的灵敏度；该方法在 1.0–20.0 µg/mL 的浓度范围内具有良好的线性；且实际样品加标回收率可控制在 90%–120% 范围内，具有出色的准确度。该方法适用于定量分析细胞基因治疗慢病毒产品中的转染试剂 PEI 残留，可以为生物制药企业的相关基因治疗和生物大分子产品提供一条新的分析思路。

## 参考文献

1. 安捷伦生物制药辅料及生产工艺残留分析解决方案, 安捷伦科技公司应用文集, 出版号 5994-3710ZHCN, 2021
2. 殷承华, 张婷婷, 鲁锐. 采用 Agilent 1290 Infinity II ELSD 分析检测 AAV 基因治疗病毒原液中转染试剂 PEI 残留, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-5429ZHCN, 2023

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE68718165

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，2023

2023 年 8 月 2 日，中国出版

5994-6594ZHCN



**Agilent**

Trusted Answers