


液相色谱法

电雾式检测器



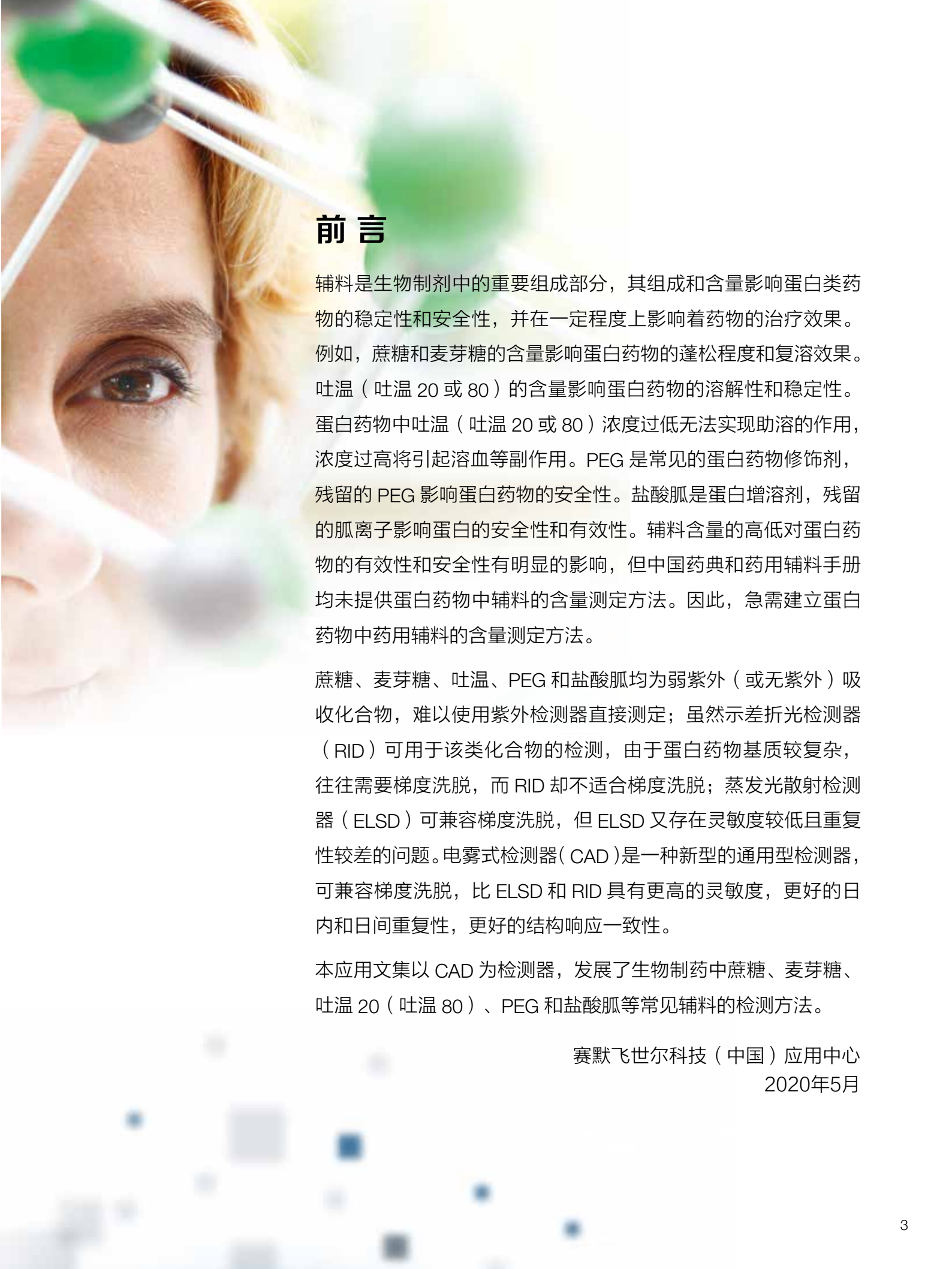
生物制药辅料应用文集

ThermoFisher
SCIENTIFIC



目录

1. 前言	
2. CAD 设计原理与特点	
3. 生物制药常用辅料质量评价	
3.1 脂肪酸.....	6
3.2 脱氧胆酸.....	7
3.3 吐温, Triton-X100.....	7
3.4 PEG.....	8
3.5 泊洛沙姆 P 188.....	9
3.6 乳糖.....	10
3.7 硬脂酸镁.....	11
3.8 磷脂.....	13
4. 生物制药成品中辅料检测	
4.1 蛋白及单抗药物辅料分析.....	15
4.1.1 蛋白药物中 PEG 残留分析.....	15
4.1.2 PEG 修饰药物中 PEG 的残留分析.....	16
4.1.3 蛋白药物中吐温 20 的检测.....	18
4.1.4 蛋白药物中吐温 80 的含量测定.....	21
4.1.5 蛋白药物中盐酸胍残留分析.....	23
4.2 疫苗辅料分析解决方案.....	25
4.2.1 疫苗中蔗糖的含量测定.....	25
4.2.2 疫苗辅料中胆固醇、磷脂和皂苷的含量测定.....	28
4.3 其它.....	30
4.3.1 生物制药中硬脂酸和棕榈酸的检测.....	30
5. 前景与展望	



前言

辅料是生物制剂中的重要组成部分，其组成和含量影响蛋白类药物的稳定性和安全性，并在一定程度上影响着药物的治疗效果。例如，蔗糖和麦芽糖的含量影响蛋白药物的蓬松程度和复溶效果。吐温（吐温 20 或 80）的含量影响蛋白药物的溶解性和稳定性。蛋白药物中吐温（吐温 20 或 80）浓度过低无法实现助溶的作用，浓度过高将引起溶血等副作用。PEG 是常见的蛋白药物修饰剂，残留的 PEG 影响蛋白药物的安全性。盐酸胍是蛋白增溶剂，残留的胍离子影响蛋白的安全性和有效性。辅料含量的高低对蛋白药物的有效性和安全性有明显的影响，但中国药典和药用辅料手册均未提供蛋白药物中辅料的含量测定方法。因此，急需建立蛋白药物中药用辅料的含量测定方法。

蔗糖、麦芽糖、吐温、PEG 和盐酸胍均为弱紫外（或无紫外）吸收化合物，难以使用紫外检测器直接测定；虽然示差折光检测器（RID）可用于该类化合物的检测，由于蛋白药物基质较复杂，往往需要梯度洗脱，而 RID 却不适合梯度洗脱；蒸发光散射检测器（ELSD）可兼容梯度洗脱，但 ELSD 又存在灵敏度较低且重复性较差的问题。电雾式检测器（CAD）是一种新型的通用型检测器，可兼容梯度洗脱，比 ELSD 和 RID 具有更高的灵敏度，更好的日内和日间重复性，更好的结构响应一致性。

本应用文集以 CAD 为检测器，发展了生物制药中蔗糖、麦芽糖、吐温 20（吐温 80）、PEG 和盐酸胍等常见辅料的检测方法。

赛默飞世尔科技（中国）应用中心
2020年5月

CAD 设计原理与特点

CAD 是一款设计独特、技术先进、灵敏度高、且重现性较好的通用型检测器，用于非挥发和半挥发性的化合物定量或半定量分析。图 1 所示是两款 CAD 检测器。CAD 的工作过程（见图 2 所示）：HPLC 洗脱液经与雾化器中氮气流碰撞作用而雾化，其中较大的液滴经废液管流出，较小的溶质（分析物）液滴在雾化温度下干燥，形成溶质纳米颗粒。同时，分流的第二路氮气流经过电晕式放电装置（含高压铂金丝电极）形成带正电荷的氮气粒子，与溶质颗粒反向相遇时经碰撞使溶质颗粒带上正电。为了消除由带有过多正电荷的氮气所引起的背景电流，在含溶质颗粒的气流流入静电检测计之前，通过一种称之为离子阱的装置（带有低负电压）使迁移率较大的颗粒（即带正电荷的氮气粒子）的电荷中和，而迁移率小的带电颗粒把它们的电荷转移给一个颗粒收集器，最后用一个高灵敏度的静电检测计测出带电溶质的信号电流，由此产生的信号电流与溶质（分析物质）的含量成正比。



图 1. 电雾式检测器 CAD 外观

左：Corona Veo 系列 CAD 右：Vanquish 系列 CAD

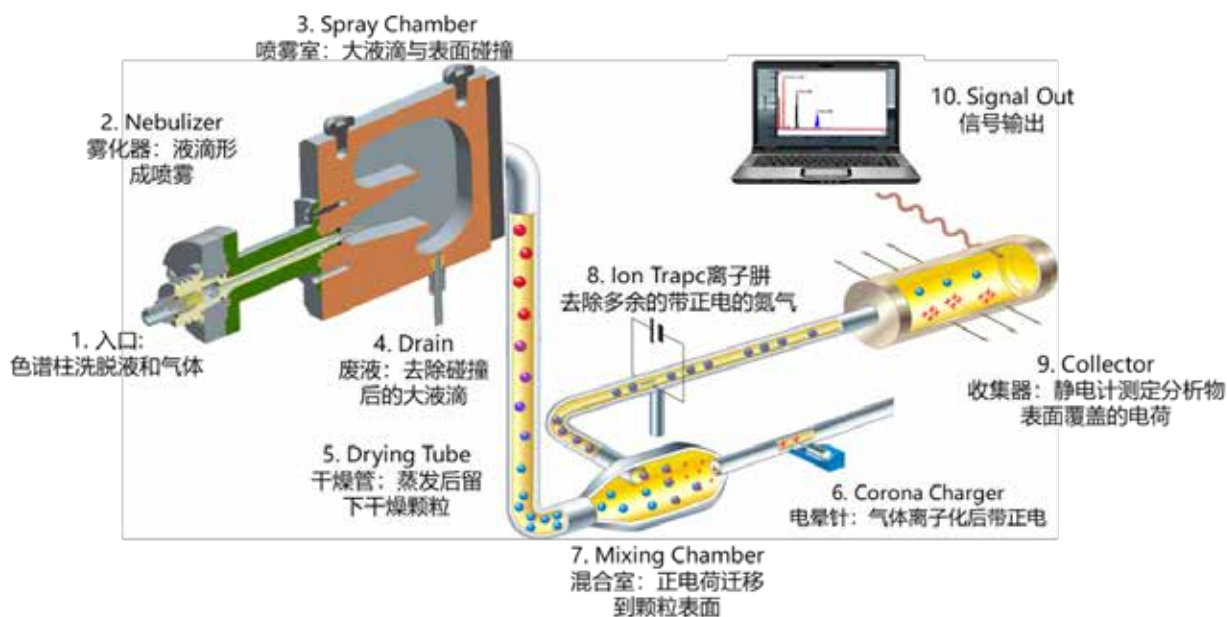


图 2. 电雾式检测器的构造及工作示意图

CAD 的分析步骤如下：

第一步：雾化与干燥

HPLC 洗脱液进入 CAD 雾化室，在氮气流作用下，进行雾化去溶剂，使洗脱液中的目标化合物变成颗粒，颗粒量的多少与进入雾化室的目标化合物质量有关。没有雾化完的大液滴直接进入废液管，雾化的超细小液滴进入干燥管，因其粒径较小，所含溶剂在此被迅速蒸发，干燥后的目标化合物颗粒随气流直接进入混合腔。因此，和大多数基于雾化原理的检测器一样，CAD 雾化效率也受流动相中有机相含量的影响显著，当有机相比例逐渐增加时，雾化效率增加，响应值也随之增加，当有机相比例达到 80% 时，雾化效率趋于稳定。

第二步：使目标颗粒物带电

另一路氮气经过高压电晕放电针，变成带正电的氮气，在碰撞室与干燥的目标化合物颗粒迎面碰撞对流混合后，电荷随之被转移到目标化合物颗粒表面。扩散带电的过程对颗粒材料的依赖性很小。如果颗粒物越大，球面积也越大，大致上带电量也就越多，实际上在很宽的粒径范围单极扩散带电正比于 d (粒径) 1.133。经过碰撞后，带电颗粒和多余的带电氮气离开碰撞室，其中，速度较快的带电氮气在迁移途中被低压离子阱捕集移除，而迁移速度较慢的多电荷目标化合物颗粒则通过后端的离子捕集阱，并撞向一个颗粒物过滤网。

第三步：检测带电目标化合物

颗粒物撞击收集器后，把电荷转移到过滤网上，由此产生的电流将被高灵敏度的静电计探测到，并被放大输出至到检测器，最终产生的信号强度与目标化合物的量成比例。离子阱可以捕集多余带电氮气，从而降低背景电流，因此，即使很少的电荷也能被检测器检测到，使得 CAD 的检出限较低，灵敏度较高。同时，由于 CAD 的响应不依赖于化合物的结构，其对大部分的化合物的响应因子也基本一致。蒸发光散射检测器由于其散射受到化合物的空间结构的影响，即使是同分异构体，同样的浓度其响应值也会出现较大的差异。

CAD 的主要特点：

- 1) 基于设计原理与结构，该检测器灵敏度高，如在分析葡萄糖、蔗糖和乳糖时，能检测到 0.5 ng 的柱上样量；
- 2) 响应因子一致，不依赖于化合物结构，重现性非常好，如对 24 种化合物在相同色谱条件下分别直接进样 $1 \mu\text{g}$ (不接色谱柱) 测定，其响应的峰面积的 RSD 值小于 10%；
- 3) 动态检测范围宽，达 3-4 个数量级；
- 4) 应用较广泛，能分析小分子、大分子化合物，如氨基酸、蛋白、聚合物等；
- 5) 使用操作直观简单，维护十分简便，工作流速 0.2-2.0 mL/min，完全兼容 UHPLC 超快速分析。

CAD 使用注意事项：

CAD 由于需要对流动相进行雾化，所以当需要使用酸或盐来调节流动相时要使用挥发性的酸和盐，如甲酸、乙酸和三氟乙酸等，有机盐建议使用铵盐；推荐 pH 值范围 2-7.5，更高的 pH 值可能会增加背景和噪音值。

脂肪酸

1. 方法简介

混合脂肪酸是一种常见药用辅料，作为栓剂等制剂的载体，其应用符合医药“低毒、高效”的基本发展原则和民众医疗保健的意愿，近年来发展较快。脂肪酸紫外吸收弱，用传统 UV 方法无法检测，本实验采用 HPLC-CAD 方法检测辅料中的常见脂肪酸取得了较好的分析结果。

2. 分析条件

色谱柱	PRP-1, 4.1 × 250mm, 7μm (Hamilton, P/N: 79422)
流动相	乙腈 - 四氢呋喃 - 60mM 醋酸溶液 =60:5:35, 15min 内变化到 90:10:0
流速	1.0 mL/min
柱温	45°C
进样量	25 μL
检测器	CAD, 雾化温度 15°C

3. 谱图结果

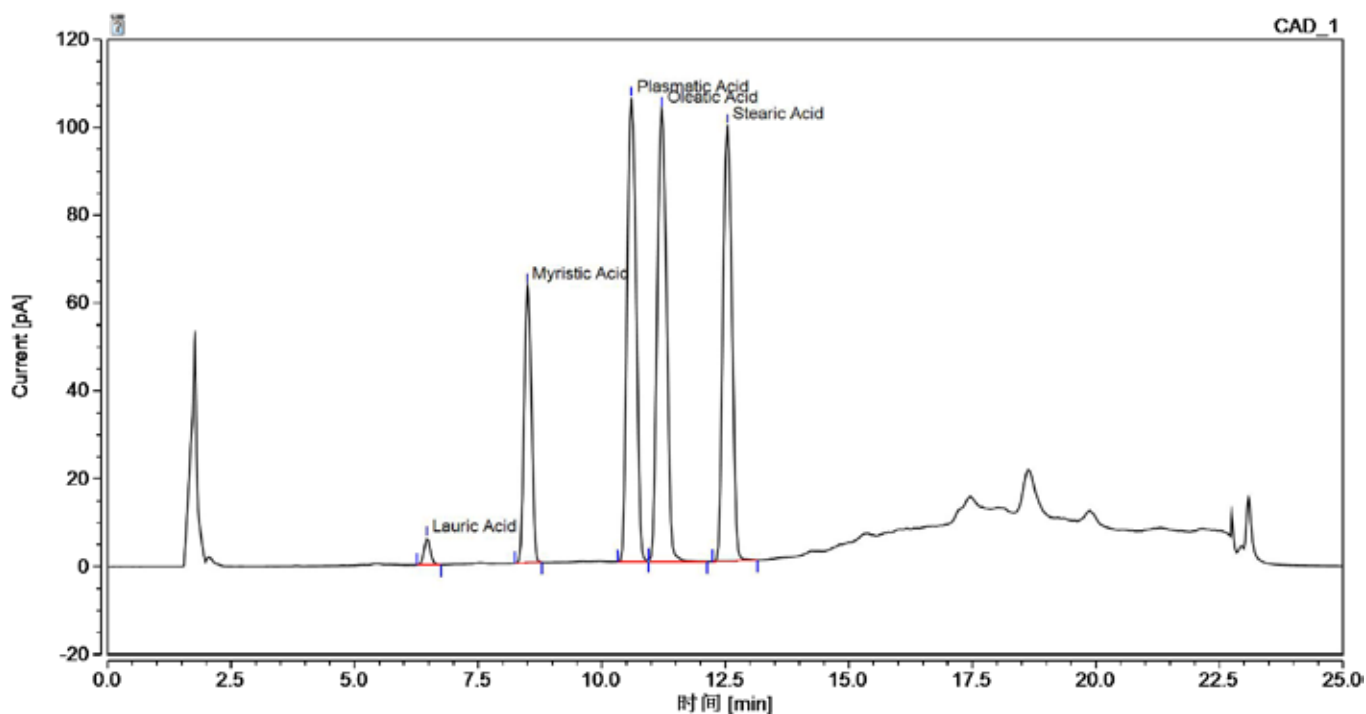


图 1. 辅料中脂肪酸分析图谱

表 1. 辅料中脂肪酸分析结果

供试品中组分名称		保留时间 min	峰面积 pA*min	塔板数 Plates	分离度 Resolution	拖尾因子 USP Tf
月桂酸	Lauric Acid	min	峰面积	13070	8.11	1.11
肉豆蔻酸	Myristic Acid	pA*min	塔板数	15153	6.86	1.06
棕榈酸	Palmitic Acid	Plates	分离度	15989	1.81	1.09
油酸	Oleic Acid	Resolution	拖尾因子	16794	3.91	1.07
硬脂酸	Stearic Acid	USP Tf	20.818	22488	n.a.	1.05

4. 结论与建议

本方法使用 CAD 检测器结合 Hamilton 的一款色谱柱，对多种脂肪酸同时进行分析，分离度高，色谱峰形好，有较高实用价值。

参考文献来源：感谢 USP 中国研发中心提供谱图。

脱氧胆酸

1. 方法简介

脱氧胆酸及其盐为表面活性剂，为化妆品和药剂中安全有效的乳化剂，有抗真菌和抗炎作用，可用于治疗牙根疾患。脱氧胆酸通常来源于合成或动物，FDA 不允许动物来源的脱氧胆酸作为药物基质。本实验检测合成样品中脱氧胆酸的含量以及杂质检测。

2. 分析条件

色谱柱 Acclaim C18 4.6 × 150 mm, 3 μm

A: 0.1% 甲酸水溶液; B: 0.1% 甲酸乙腈溶液;

表 1. 脱氧胆酸检测条件

Time (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0.0	75.0	25.0
2.0	55.0	45.0
14.0	42.0	58.0
24.0	0.0	100.0
35.0	0.0	100.0
35.0	75.0	25.0
38.0	75.0	25.0

流速 1.0 mL/min

柱温 30°C

进样量 25 μL

检测器 CAD, 雾化温度 50°C, Filter: 5.0 s, PF: 1.2

3. 分析结果

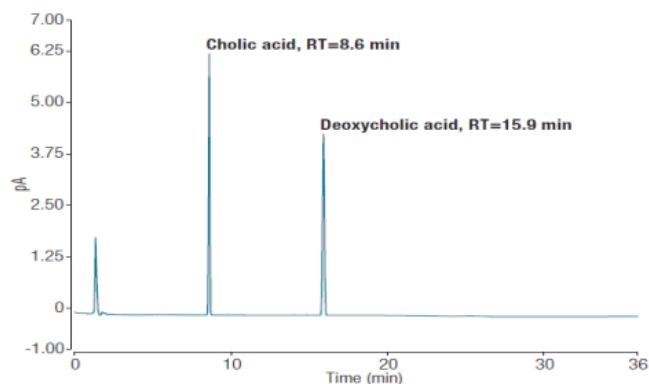


图 1. 脱氧胆酸分析图谱

4. 结论与建议:

杂质检测，即使在杂质较低水平时也能实现。

参考文献来源: USP 40-NF 35, Monographs/Desoxycholic 8259, AN-72600-LC-CAD-Method-Transfer-Deoxycholic-Acid (内部资料)

吐温, Triton-X100

1. 方法简介

吐温 20 (聚山梨醇酯 20)、吐温 80 (聚山梨醇酯 80) 和 Triton X100 作为非离子表面活性剂，具有低毒性和高表面活性，在药物制剂领域有广泛应用。这些表面活性剂没有生色团，紫外吸收弱，对于它们的测定，传统方法为比色法和薄层色谱法，但准确性较差。本方法利用通用型的质量型检测器 CAD 来测定，具有很好的可行性和推广意义。

2. 分析条件

分析柱	MD150, 3.2 x 150 mm, 3 μm
柱温	室温
检测器	CAD, N2 压力 35 psi, 输出范围: 500pA
流动相	65% 水 : 35% 甲醇
流速	0.5 mL/min
进样量	10 μL

3. 实验结果

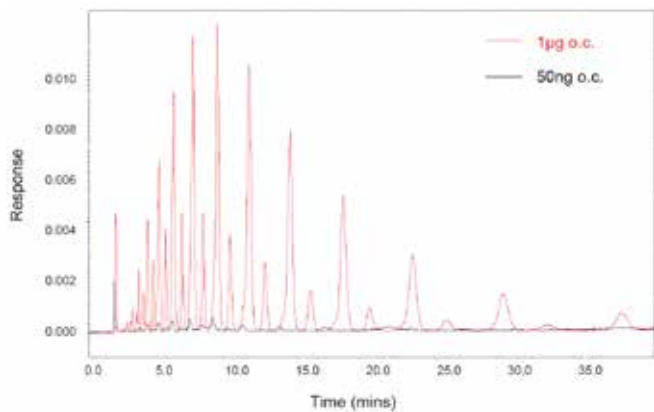


图 1. 聚山梨醇酯 20

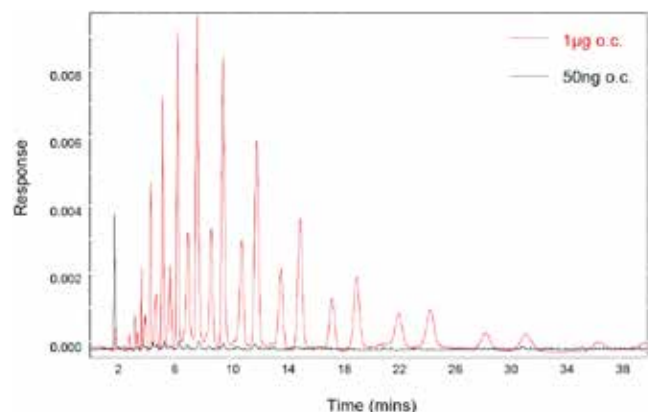


图 2. 聚山梨醇酯 80

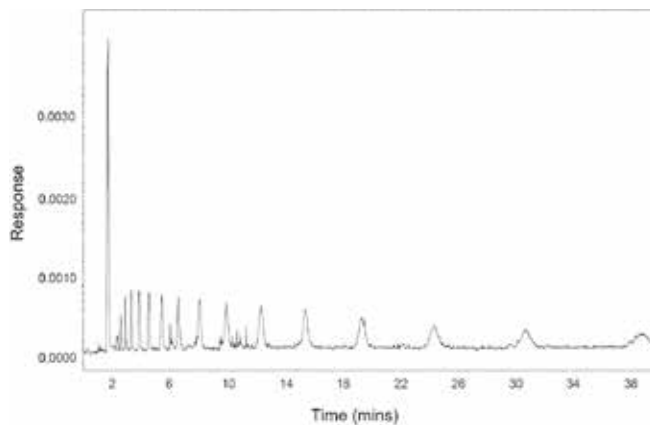


图 3. Triton X100

4. 结论与建议

本实验建立了药物及制剂中吐温 20、吐温 80 和 Triton X100 的含量测定方法，取得了较理想的结果，可推广应用于含有该类辅料的药物检测。

参考文献来源：AN 70-6809 Non-Ionic_Surfactants-Polysorbate_20,_Polysorbate_80（内部资料）

PEG

1. 方法简介

PEG 具有良好的水溶性，并与许多有机物组份有良好的相容性。它们具有优良的润滑性、保湿性、分散性，用作粘接剂、抗静电剂及柔软剂等，在化妆品、制药、化纤、橡胶、塑料、造纸、油漆、电镀、农药、金属加工 生物工程及食品加工等行业中均有着极为广泛的应用。本实验比较超临界系统分析条件下 CAD 与 ELSD 色谱法定量 PEG 的性能。

2. 分析条件

色谱柱	SFCpak SIL-5 silica gel column, 4.1 × 250 mm, 5 µm
流动相	超临界二氧化碳与 90% 甲醇水混合溶液, 二氧化碳流速为 2ml/min
流速	1.0 mL/min
柱温	50°C
进样量	25 µL
检测器温度	CAD, 雾化温度 15°C

3. 谱图结果

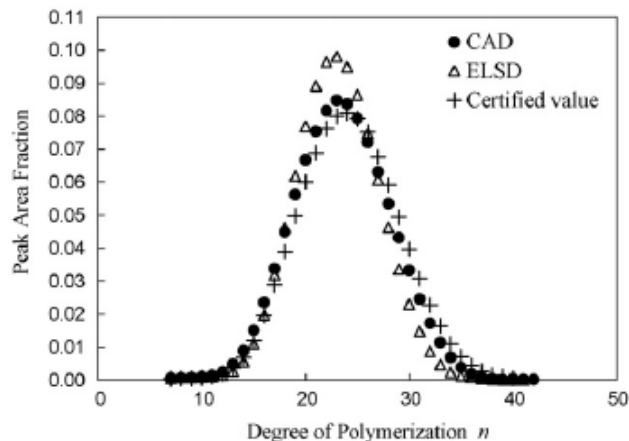


图 1. CAD、ELSD 条件下 PEG 聚合化程度

4. 结论与建议

在测定 PEG 系列实验中，CAD 测定 PEG 分子量分布与实际值更接近，同时 CAD 具有更好的重复性、信噪比与灵敏度。

参考文献来源：Kayori Takahashi,etc, Quantitative comparison of a CAD and ELSD for polymer. JCA.

泊洛沙姆 P 188

1. 方法简介

P 188 是聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物，用作发酵液中的辅料，也可用作增溶剂和乳化剂。

2. 分析条件

分析柱	TSKgel G3000PWXL (7.8 × 300 mm, 7m, 250Å) (P/N 0008021)
柱温	30°C
检测器	CAD Veo RS, 雾化温度 50°C, 采样频率: 5 Hz, 过滤常数: 3.6 s
流动相	流动相A: 100 mM 甲酸铵水溶液 流动相B: 乙腈 A: B = 85 : 15; 流速: 0.5 mL/min
流速	0.5 mL/min
进样量	25 μL

3. 谱图结果

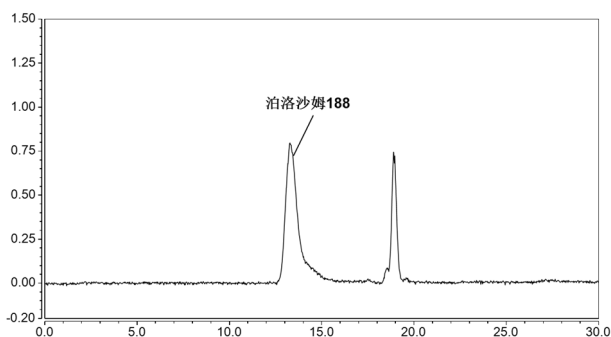


图 1. P188标准工作溶液色谱图

4. 结论与建议

建立了发酵液和注射剂类样品中泊洛沙姆188含量检测的SEC-CAD方法，通过优化流动相组成、CAD检测器参数等条件，实现了P188与样品中其它成分的良好分离，方法专属性较强。同时经过线性、精密度、加标回收等方法学考察，本方法表现出较高的准确度，较好的精密度和重现性，在5~50 μg/mL浓度范围内线性良好，方法灵敏度高，定量限可达5 μg/mL，可以推广到其它蛋白制剂或者注射剂中P188残留检测。

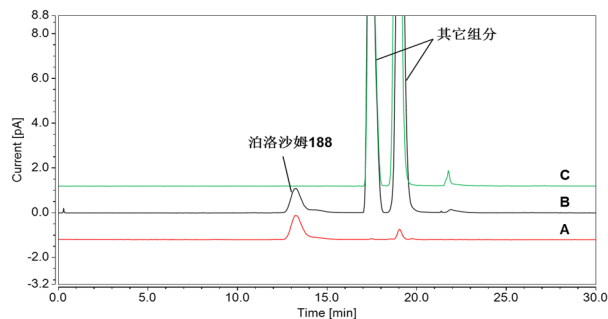


图 2 空白基质样品加标谱图

A. P188标准溶液; B. 空白样品加标; C. 空白样品

经考察，在 5 - 50 μg/mL 浓度范围内，P188 的峰面积与浓度之间的线性关系良好，线性方程为 $Y=0.0320x-0.0455$ ， $r^2=0.9994$ 。

对某单抗发酵液样品（蛋白浓度约为20 mg/mL）和某注射剂样品（蛋白浓度约为40 mg/mL）各一份分别进行测定，结果两种样品中均未检测到P188。

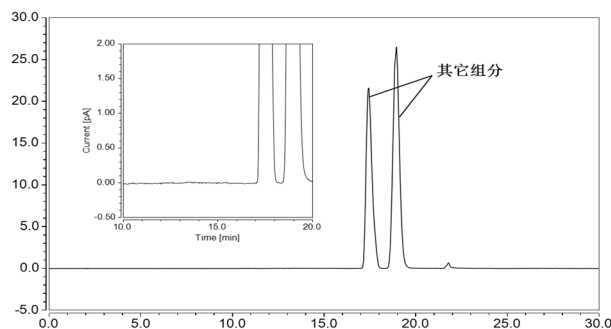


图 3 单抗发酵液样品测试谱图

乳糖

1. 方法简介

乳糖 (lactose) 是一种二糖 $C_{12}H_{22}O_{11}$ ，是哺乳动物乳汁中特有的一种还原糖。在食品行业中，乳糖主要用于婴幼儿食品、炼乳品、糖果和人造奶油等。在医药行业中，用作药用辅料，主要是作为填充剂或稀释剂用于片剂和胶囊的生产，也可用于冻干产品和吸附剂等。此外，还可作细菌培养基。本实验建立 HPLC-CAD 法测定原辅料及制剂中乳糖百分含量。

2. 分析条件

色谱柱	聚合物氨基柱, Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	35°C
流动相	乙腈 - 水 (70:30)
流速	1.0 mL/min
进样体积	25 μL
检测器	CAD, 雾化温度: 30 °C, 采样频率: 10 Hz, 过滤常数: 3.6 s, 幂率: 1.20;

3. 谱图结果

表 1. 样品分析结果

样品名称	保留时间 /min	峰面积 /fA*min	峰高 /fA	含量 /%	理论塔板数 (EP)
S1	9.588	722.96	2615.9	99.65	8204
S2	9.594	735.95	2671.9	100.79	8250
S3	9.592	731.25	2652.6	100.75	8059
平均值	9.592	730.05	2648.8	100.39	8117
RSD/%	0.056	0.90	1.07	0.65	0.83

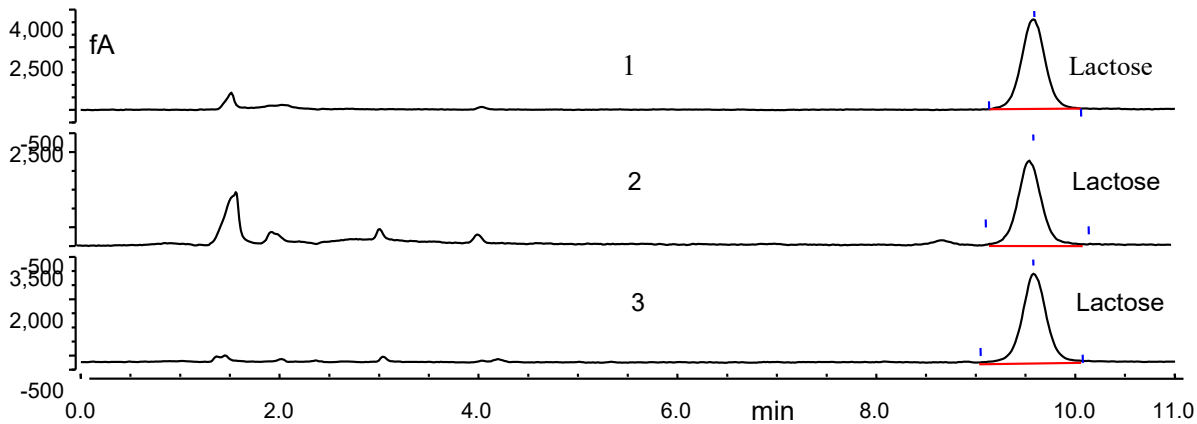


图 1. 制剂样品色谱图

4. 结论与建议

本实验建立 HPLC-CAD 法测定注射用乳糖辅料及其相关制剂中乳糖含量。经过精密度、重复性、线性等方法学考察，表明本方法准确度高，精密度、重现性较好，在 1.0 ~ 100 μg/mL 范围内，线性相关较好 ($r^2=0.9998$)，定量限达 0.5 μg/mL，可作为原辅料及制剂中乳糖的含量测定方法。CAD 作为质量型检测器，当需要检测更低浓度样品，可以通过适当增大进样体积，或进行柱后有机相补偿，提高化合物的响应，降低定量检出限。同时，由于该检测器响应因子一致，可以通过乳糖的浓度同步对其它糖类药物进行初步半定量分析。总体而言，该方法设计巧妙，原理新颖，操作使用方便，取得了较理想的结果，因此具有较好的推广与借鉴意义。

硬脂酸镁

1. 方法简介

硬脂酸镁为白色无砂性的细粉；微有特臭；在直接压片中用作助流剂，还可作为助滤剂、澄清剂和滴泡剂，以及液体制剂的助悬剂、增稠剂。由于紫外吸收极弱，无法用紫外吸收检测器检测。本文采用电雾式检测器（CAD）开发了片剂中PEG4000 和硬脂酸镁的检测方法。

2. 分析条件

色谱柱	Acclaim C8, 3.0 x 150 mm, 3 μm, PN: 068970												
柱温	30℃												
流动相	A: 乙腈 B: 0.05% TFA 水溶液												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time, min</th> <th>A, %</th> <th>B, %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time, min	A, %	B, %	0	20	80	20	100	0	25	100	0
	Time, min	A, %	B, %										
0	20	80											
20	100	0											
25	100	0											
流速	0.7 mL/min												
进样体积	10 μL												
检测器	CAD Corona Veo RS, 采集频率: 10 Hz, 雾化温度: 35 ℃; Filter: 5												

3. 谱图结果

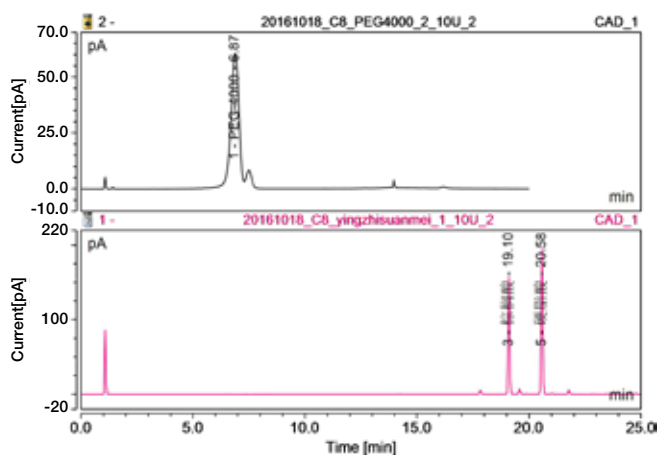


图 1. PEG4000 和硬脂酸镁对照品分析
(上: PEG4000, 下: 硬脂酸镁)

- 硬脂酸镁辅料是棕榈酸和硬脂酸镁的混合物，因此可以检测到两个色谱峰。

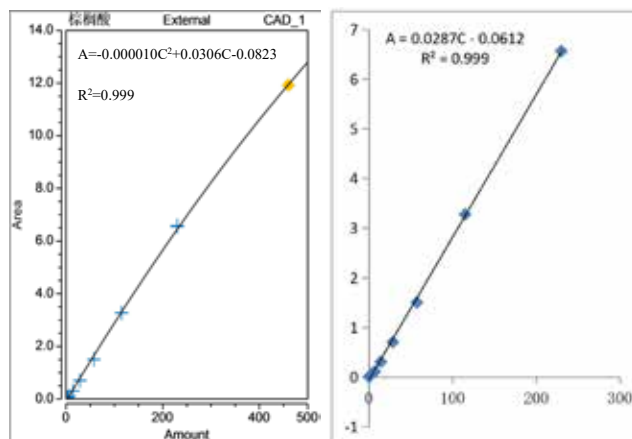


图 2. 棕榈酸二次拟合曲线（左）和线性回归（右）

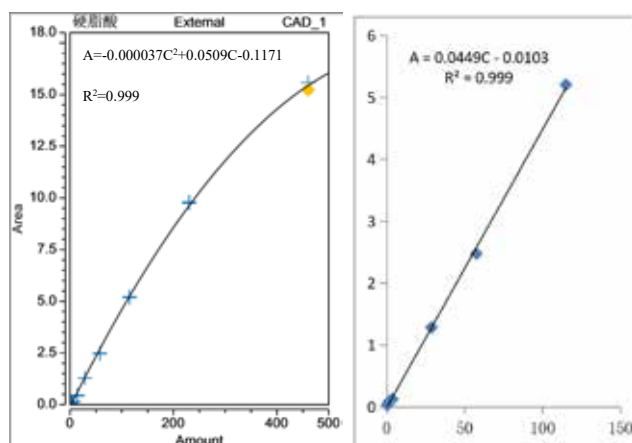


图 3. 硬脂酸二次拟合曲线（左）和线性回归（右）

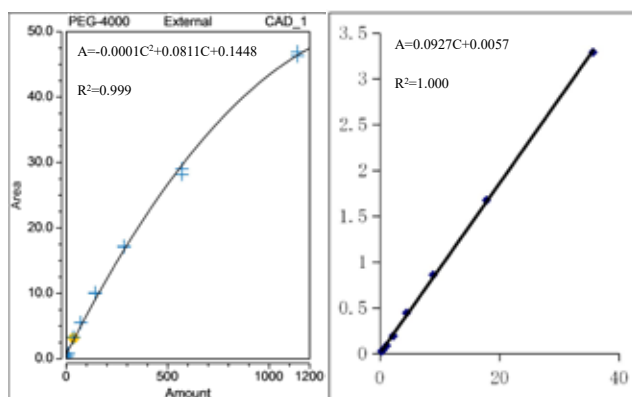


图 4. PEG4000 二次拟合曲线（左）和线性回归（右）

- 由于没有棕榈酸和硬脂酸的单标。以硬脂酸镁的浓度做棕榈酸和硬脂酸镁的浓度。
- 棕榈酸：二次曲线拟合，浓度范围：0.449-460 ppm，相关系数 0.999；一次方程拟合，浓度范围：0.449-230 ppm，相关系数 0.999；LOQ：0.449 ppm。
- 硬脂酸：二次曲线拟合，浓度范围：0.449-460 ppm，相关系数 0.999；一次方程拟合，浓度范围：0.449-115 ppm 范围内，相关系数 0.999。LOQ：0.449 ppm。
- PEG4000：二次曲线拟合，浓度范围：0.278 ppm-285 ppm，相关系数 0.999；一次方程拟合，浓度范围：0.278-35.6 ppm，相关系数 1.000。LOQ：0.278 ppm。

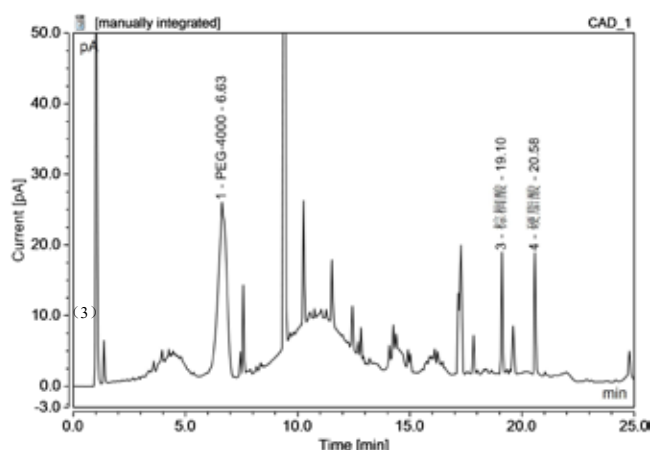


图 5. 酸乙腈提取物分析

4. 结论与建议

- 棕榈酸和硬脂酸的分离检测不受其他化合物的干扰，故该方法可用于药片中硬脂酸镁的测定。以棕榈酸组分计算，药片中硬脂酸镁的含量为 0.216 mg；以硬脂酸组分计算，药片中硬脂酸镁的含量为 0.127 mg，药片中理论的硬脂酸镁含量为 0.8 mg。因此，总棕榈酸镁提取率为 27%，硬脂酸提取率为 15.8%。需要再次优化药片中这两种化合物的提取方法。
- 该方法用于酸乙腈提取物中 PEG4000 的检测，不受其它化合物干扰，可实现其含量测定。用二次曲线方程计算测得药片中羟丙甲纤维素的含量为 0.342 mg（二次方程和一次方程计算结果近似），药片中 PEG4000 的理论含量为 0.4 mg，提取率 85.5%。

磷脂

1. 方法简介

HPLC-CAD 测定小牛肺注射液中的磷脂酰胆碱 (PC) 和溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 含量。

2. 分析条件

色谱柱	Phenomenex Luna silica (2), 4.6*250 mm, 5 μm, SN:576860-1	
柱温	40°C	
流动相	A: 甲醇 - 水 - 冰醋酸 - 三乙胺 (85: 15: 0.45: 0.05),	
	B: 正己烷 - 异丙醇 - 流动相 A (20: 48: 32)	
流动相	时间 (min)	流动相 A
	0	10
	20	30
	35	95
	36	10
41	10	
流速	1.0 mL/min	
进样体积	20 μL	
检测器	CAD, 雾化温度: 30°C; N2 压力 35 psi	

3. 谱图结果

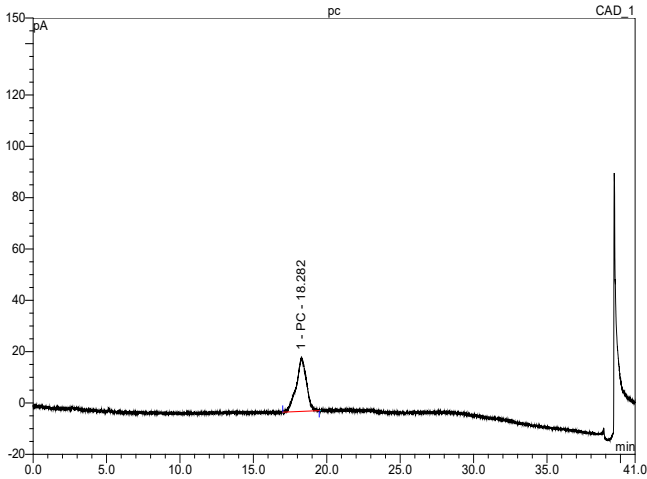


图 1. PC 定量测定谱图 (0.7788 mg/mL, 进样 1μL)

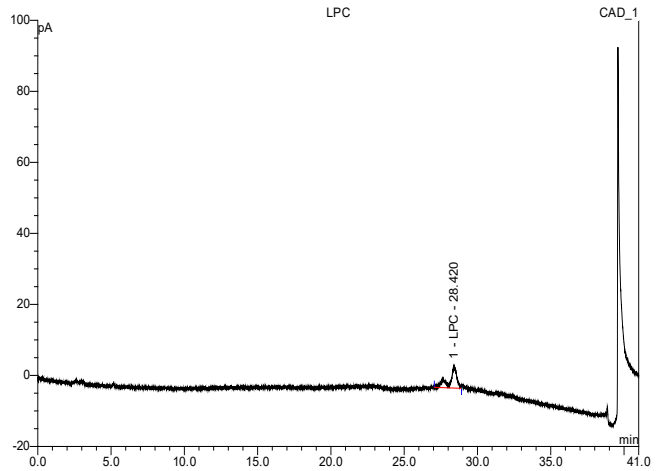


图 2. LPC 定量测定谱图 (0.0954mg/mL, 进样 2μL)

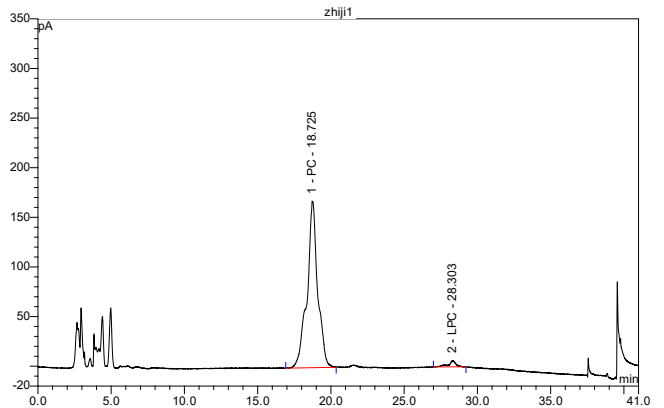


图 3. 制剂供试品溶液测定谱图

表 1. 检出限与定量限

		S/N	浓度 mg/mL	进样体积 μL	进样质量 μg
PC	检出限	3.0	0.779	0.3	0.234
	定量限	11.7	0.779	1	0.779
LPC	检出限	4.8	0.0954	1	0.095
	定量限	8.7	0.0954	2	0.191

表 2. 重复性实验结果

	1	2	3	4	5	RSD%
PC Area	73.570	73.707	73.952	74.589	74.262	0.560
LPC Area	7.186	7.401	7.168	7.373	7.175	1.597

表 3. 样品 PC 和 LPC 含量测定结果

	PC 峰面积	PC 平均含量 %	相当标示量 %	LPC 峰面积	LPC 平均含量 %	相当标示量 %
制剂 1	141.1925	45.54	64.45	5.6007	0.96	1.36
制剂 2	139.2847	44.69		5.5859	0.95	
原料 1	159.2194	69.91	67.97	10.997	2.49	2.49
原料 2	158.2829	66.03		10.9991	2.49	

表 4. 破坏性试验结果

项目	进样体积 (μL)	PC 峰面积	PC 含量 (mg/支)	PC 变化率 %
氧化	10	96.8867	27.08	-39.98
酸	10	74.6179	18.88	-58.15
碱	10	48.588	10.44	-76.86
光	10	78.0049	20.07	-55.51
高温	10	25.9529	4.39	-90.26

4. 结论与建议

本实验采用 Dionex U3000 系列液相色谱仪和 CAD 电喷雾式检测器联用测定小牛肺注射液中的磷脂酰胆碱 (PC) 和溶血磷脂酰胆碱 (LPC)，比之前其质量标准的薄层扫描法准确度和重现性都有很大提高，而且灵敏度比 ELSD 检测器有所提高，LPC 的线性也较 ELSD 更好。该注射液为小牛肺表面活性物质的灌洗液，其磷脂酰胆碱中的脂肪酸脂肪链长短不一致，较从大豆等植物中提取的 PC 组成结构更为复杂，导致 PC 的峰形较难看，而 LPC 还存在异构现象导致其呈现出色谱峰不能完全分开的状态，一般计算 LPC 的含量都是将峰积分到一块计算。破坏性试验显示各强制降解条件下 PC 的含量都有不同比例的下降，这就要求药品在运输、贮存和使用过程中，要避免上述影响因素，防止药物主成分的降解和一些有害或无益身体的成分的生成，合理安全用药。

蛋白及单抗药物辅料分析

蛋白药物中 PEG 残留分析

1. 方法简介

PEG 是一种药用辅料，也是某些蛋白药物合成的原料药。在原料药的质量控制中，需要对残留的 PEG 做定量分析。PEG 紫外吸收极弱，无法用 UV 检测器检测。

2. 分析条件

色谱柱	Jupiter C4, 4.6 x 250 mm, 5 μm, PN: 00G-4167-E0																					
柱温	25°C																					
流动相	A: 0.1% TFA 水 B: 0.1%TFA 溶于 ACN: 异丙醇 (1:2, V:V)																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>流动相 A</th> <th>流动相 B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	流动相 A	流动相 B	0	10	10	10	90	10	25	0	100	35	0	100	40	90	10	50	90	10
时间 (min)	流动相 A	流动相 B																				
0	10	10																				
10	90	10																				
25	0	100																				
35	0	100																				
40	90	10																				
50	90	10																				
流速	0.8 mL/min																					
进样体积	50 μL																					
检测器	CAD, 蒸发温度: 35°C, filter: 5.0, 采集频率: 10 Hz																					

3. 谱图结果

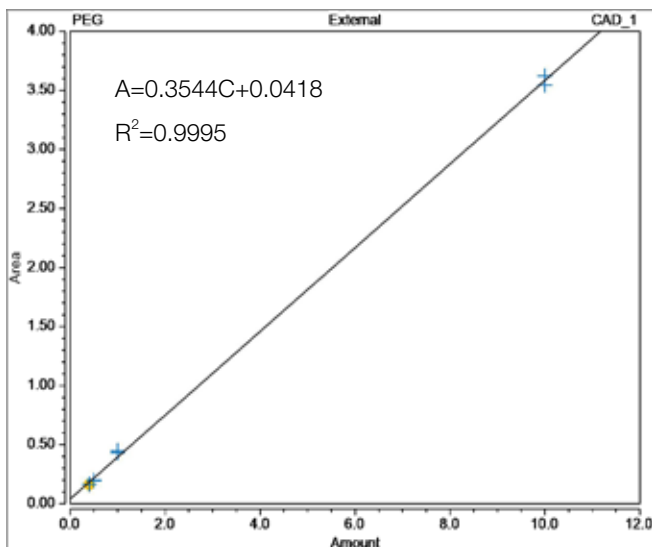


图 1. PEG 线性曲线

表 1. 各浓度点 PEG 的峰面积

浓度 ppm	峰面积 pA*min 第一次分析	峰面积 pA*min 第二次分析	两次分析峰面积 RSD
0	未检出	未检出	未检出
0.4	0.1638	0.1643	0.21%
0.5	0.1989	0.1953	1.29%
1	0.4472	0.4328	2.32%
10	3.6210	3.5460	1.48%

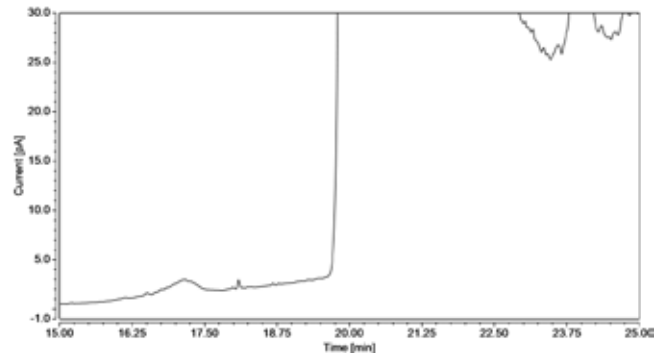


图 2. 蛋白药物测试图

4. 结论与建议

各浓度峰面积 RSD% 小于 2.5%，满足该项目各浓度峰面积 RSD% 小于 5% 的要求

PEG 在 0.4-10 mg/L 范围内具有良好的线性响应 ($R^2 > 0.999$) 在蛋白样品中，18.27 min 附近 (PEG 出峰位置) 无明显色谱峰，故判断该样品无 PEG 检出。

PEG 修饰药物中 PEG 的残留分析

1. 方法简介

将 PEG 聚合物通过共价键接到小分子、大分子药物，以及脂质体、聚合物表面等的化学修饰是延长蛋白质药物半衰期的有效途径之一，例如 PEG 修饰能降低外源蛋白质的免疫原性，改善可溶性和生物学利用度，增加抗蛋白水解作用等。但残留的游离 PEG 具有一定毒性，需严格控制药物成品中 PEG 的残留量。PEG 紫外吸收较弱，无法用紫外检测器获得高灵敏度检测。ELSD 可实现弱（无）紫外吸收化合物的检测，但 ELSD 灵敏度较低，且重复性较差。如 PEG 修饰的蛋白药物样品 XX9 中 PEG 的残留检测，以 ELSD 为检测器，检测限只能到 1%，而国家标准的要求是 0.1%。大量的研究表明，CAD 作为一种新型的通用性检测器具有比 ELSD 更高的检测灵敏度和重复性。本文以 CAD 为检测器，发展 PEG 修饰药物样品 XX9 中残留 PEG 的检测。

2. 样品配制

分别称取 10 mg 样品 XX9 和 PEG 样品，用乙腈定容至 10 mL，然后用乙腈分别将其稀释 100、1000 和 10000 倍，得到含量分别为 1%、0.1% 和 0.01% 的样品，上机测试。

3. 分析条件

色谱柱	CAPCELL PAK C18 SG300 4.6 * 250 mm, 5 μm, P/N: F12523
柱温	35°C

A: 0.1% 甲酸乙腈 B: 0.1% 甲酸水溶液

时间	流动相 A	流动相 B
0.00	30	70
5.00	30	70
15.00	50	50
25.00	90	10
45.00	90	10
45.01	30	70
50.00	30	70

流速	0.8 mL/min
进样体积	10 μL
检测器	CAD, 蒸发温度: 30°C, filter: 5.0, 采集频率: 5 Hz

4. 谱图结果

1) 含量为 1% 的样品 XX9 和 PEG 样

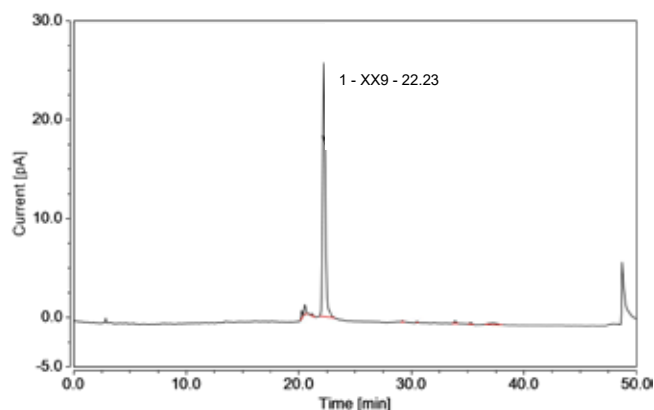


图 1. 含量为 1% 的样品 XX9 样品测试结果

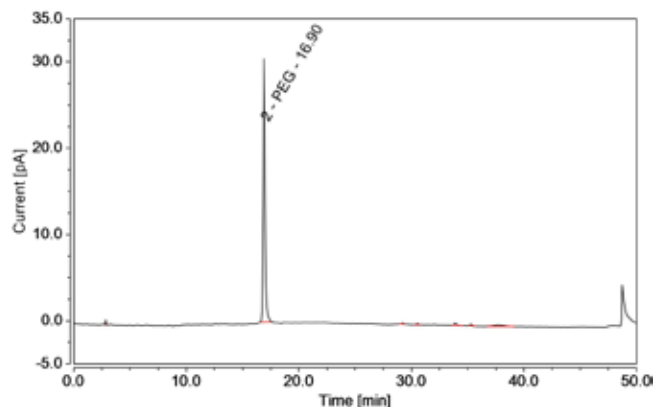


图 2. 含量为 1% 的 PEG 样品测试结果

对含量为 1% 的样品 XX9 和 PEG 进行测试，其信噪比分别为 170.5 和 230.1。

2) 含量为 0.1% 的样品 XX9 和 PEG 样品测试结果

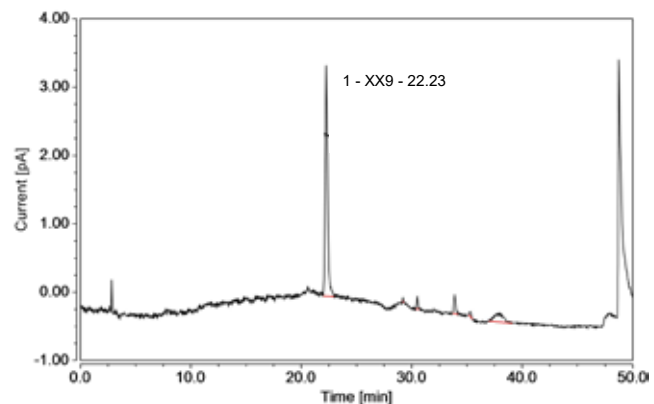


图 3. 含量为 0.1% 的样品 XX9 样品测试结果

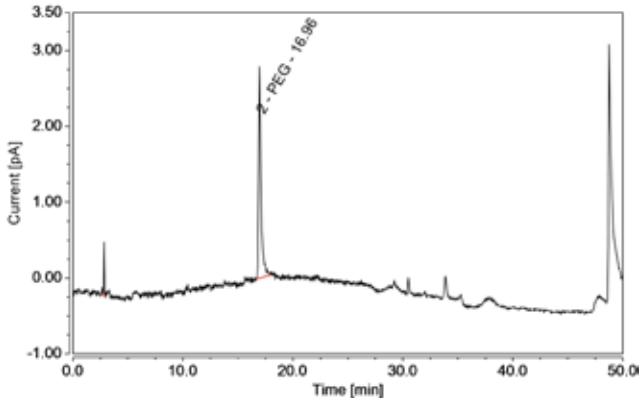


图 4. 含量为 0.1% 的 PEG 样品测试结果

对含量为 0.1% 的样品 XX9 和 PEG 进行测试，其信噪比分别为 38.6 和 40.1。

3) 量为 0.01% 的样品 XX9 和 PEG 样品测试结果

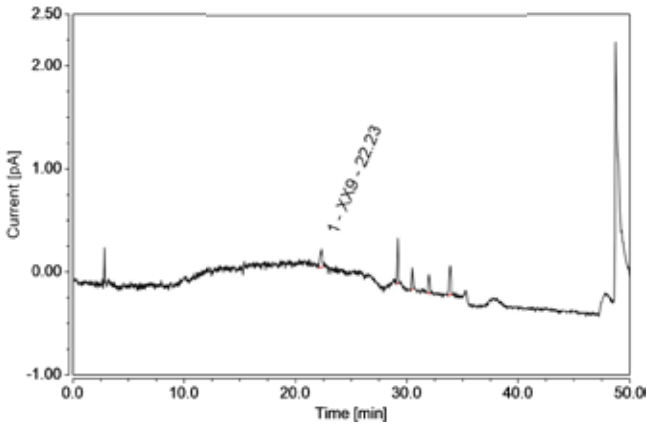


图 5. 含量为 0.01% 的样品 XX9 样品测试结果

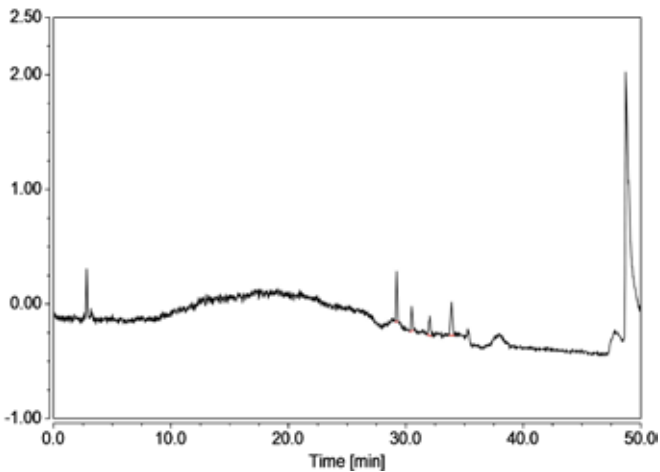


图 6. 含量为 0.01% 的 PEG 样品测试结果

对含量为 0.01% 的样品 XX9 信噪比为 3.9，含量为 0.01% 的 PEG 进行测试未检出。

4) 不同储藏时间对样品 XX9 和 PEG 样品测试结果的影响

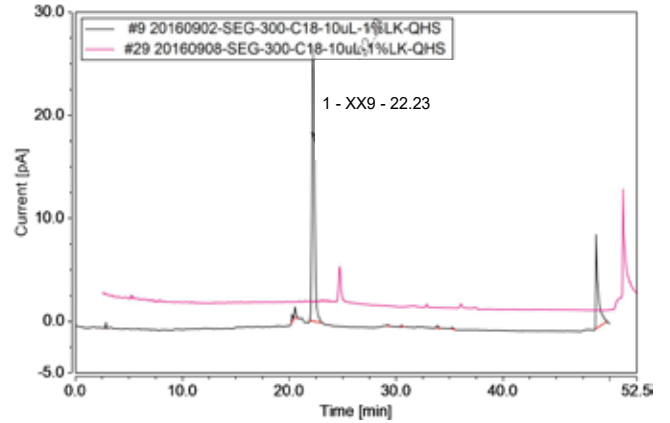


图 7. 不同储藏时间 1% 样品 XX9 样品叠加谱图

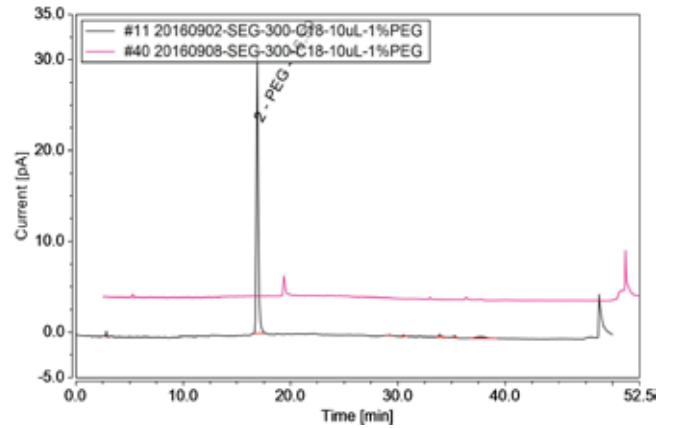


图 8. 不同储藏时间 1% PEG 样品叠加谱图

从图 7 和图 8 结果得出，样品 XX9 和 PEG 的随着储藏时间的增加响应值变低。

5. 结论与建议

利用 U3000 系统和 CAPCELL PAK C18 SG300 色谱柱，能够将样品 XX9 和 PEG 进行分离，峰形对称，分离度好，能够满足测试的需求。

测试结果表明，CAD 检测器不仅能够顺利检出样品 XX9 和 PEG，而且样品 XX9 检出限能够达到 10mg/mL 的 0.01%，PEG 的检出限能够达到 10mg/mL 的 0.1%，远远优于 ELSD 的检出限 10mg/mL 的 1%。

蛋白药物中吐温 20 的检测

1. 方法简介

吐温 20 (Tween 20)，即聚山梨醇酯 20 (Polysorbate 20)，是一种非离子型表面活性剂，在生物制药行业中，常用作蛋白乳化剂。吐温 20 含有较多的亲水性基团，但没有强生色官能团，不适合用常规反相液相色谱 - 紫外检测器进行检测。蒸发光散射检测器虽然可以检测吐温 20，但该检测器灵敏度低，重现性差。而电雾式检测器 (CAD) 作为一款通用型的质量检测器，适用于非挥发性物质和部分半挥发性物质的检测，具有高灵敏度和宽线性范围，是一款检测吐温 20 较为理想的检测器。

吐温 20 是一类强亲水性化合物，参考相关研究和实验报道，采用 Oasis MAX 色谱柱结合 CAD 检测器对其蛋白药物产品中吐温 20 含量进行测定。

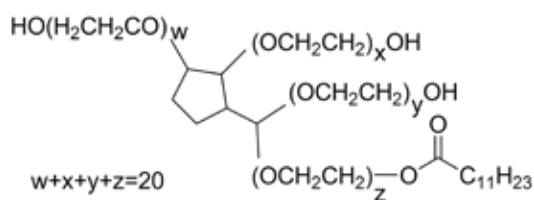


图 1. 吐温 20 结构图

2. 样品制备

吐温 20 标准品：精密称取一定量吐温 20 纯品，用水溶解定容至 10 mg/mL，作为储备液待用。用 2% 甲酸水溶液作为稀释液，逐级稀释上述储备液，分别得到 1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 和 0.005 mg/mL 工作溶液。

吐温 20 产品：蛋白混悬产品，组成包括 API、无机盐和吐温 20，其中混悬物质为 API，API 不溶于水，能够溶解于 50% 乙腈。将该混悬液通过 0.45 μm 水相滤膜过滤后，直接进样分析。

3. 色谱条件

色谱柱	Oasis MAX, 30 μm, 2.1 × 20 mm
柱温	30°C

A: 2% 甲酸水溶液; B: 2% 甲酸异丙醇溶液;

Time, min	A, %	B, %
0	90	10
1	80	20
3.4	80	20
3.5	0	100
4.5	0	100
4.6	90	10
10	90	10

流速	1.0 mL/min
进样体积	30 μL
检测器	CAD Corona VEO RS, 蒸发温度 50°C, 采集频率 5 Hz, filter 3.6 s

4. 谱图结果

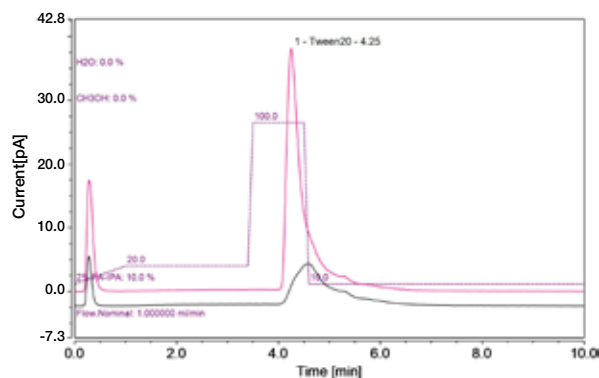


图 2. 空白 (黑色) 和 0.1 mg/mL Tween20 标品 (红色) 色谱图比较

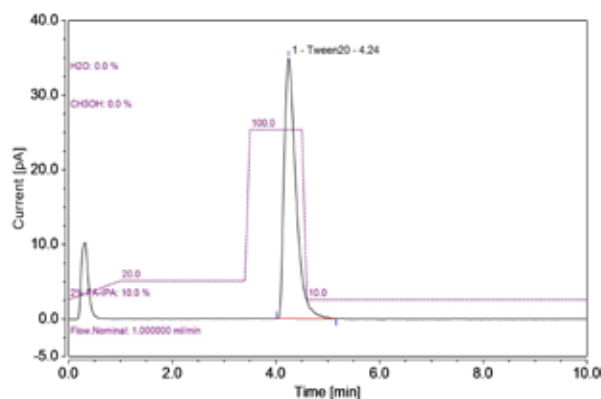


图 3. 扣除空白后 0.1 mg/mL Tween20 标品色谱图

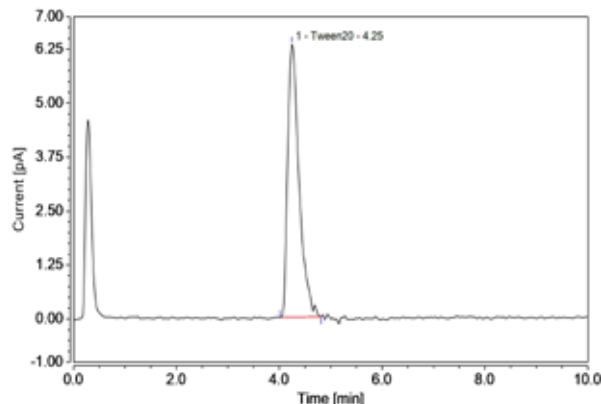


图 4. 低浓度 (0.02 mg/mL) Tween20 标品色谱图

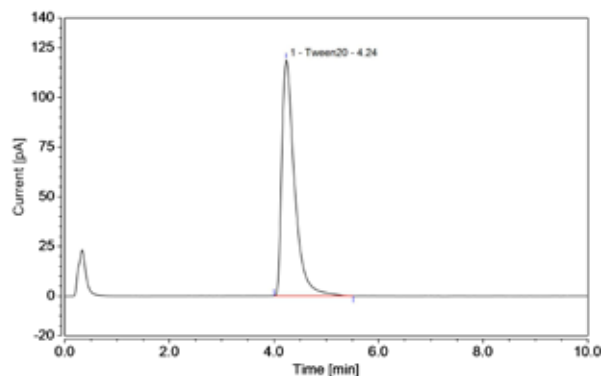


图 5. 高浓度 (0.5 mg/mL) Tween20 标品色谱图

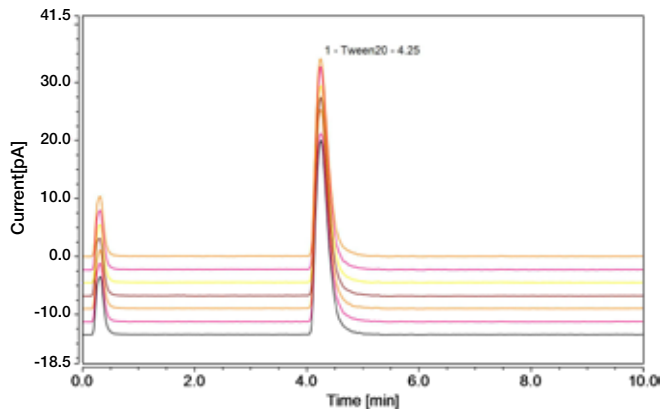


图 6. Tween20 标品浓度 - 响应色谱图 (0.01~100 mg/mL)

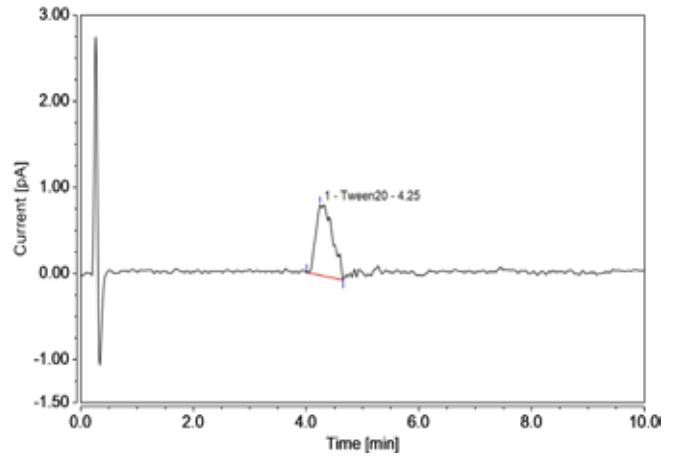


图 8. Tween20 标品检测限谱图 (0.005 mg/mL 水平)

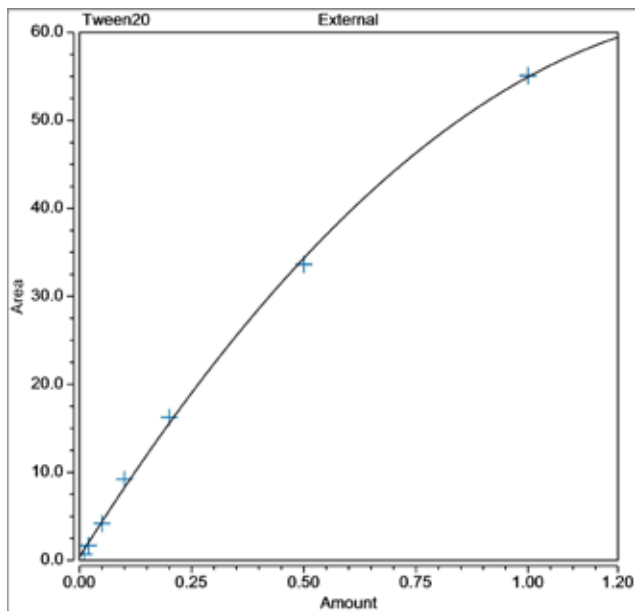


图 7. Tween20 标品二项式拟合标准曲线 (0.01~100 mg/mL)

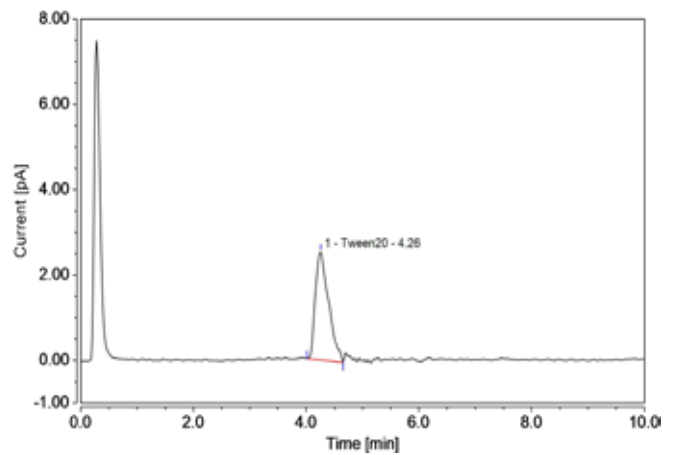


图 9. Tween20 标品定量限谱图 (0.01 mg/mL 水平)

表 1. Tween20 标品二项式拟合曲线、检测限和定量限检测结果

Compound	Linear Range, mg/mL	C0 (Offset)	C1 (Slope)	C2 (Curve)	R ²	LOD, mg/mL	S/N	LOQ, mg/mL	S/N
Tween20	0.01~1.0	0.3978	81.22	-26.68	0.9991	0.005	6.5	0.01	13.5

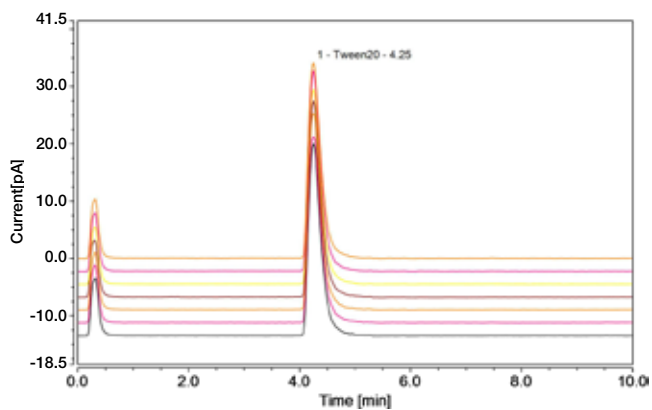


图 10. 0.1 mg/mL Tween20 标品分析重复性谱图 (n=7)

表 2. 0.1 mg/mL Tween20 标品分析重复性 (n=7)

Tween200, (1 mg/mL)	Ret. Time, min	Area, pA*min	Height, pA
1	4.237	8.95	33.75
2	4.257	8.96	33.27
3	4.246	9.24	34.40
4	4.247	9.16	34.77
5	4.260	9.15	34.40
6	4.247	9.25	35.36
7	4.250	9.20	34.65
RSD %	0.18	1.37	1.99

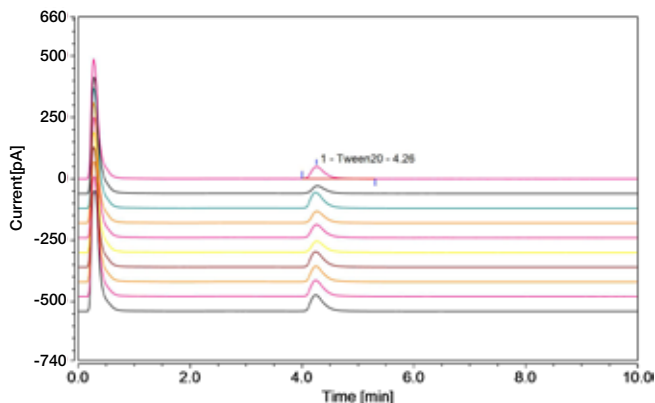


图 11. 1~10 号 (棕色瓶装) Tween20 产品检测谱图比较

表 3. 1~10 号 (棕色瓶装) Tween20 产品含量测定结果

No.	Ret.Time, min	Amount, mg/ml	Area, pA*min	Height, pA
1	4.243	0.234	17.97	66.48
2	4.254	0.236	18.07	66.08
3	4.243	0.227	17.43	64.26
4	4.237	0.222	17.12	62.95
5	4.267	0.156	12.39	45.63
6	4.257	0.186	14.57	53.5
7	4.274	0.161	12.82	47.43
8	4.230	0.227	17.46	65.17
9	4.267	0.103	8.500	30.53
10	4.254	0.170	13.44	50.11

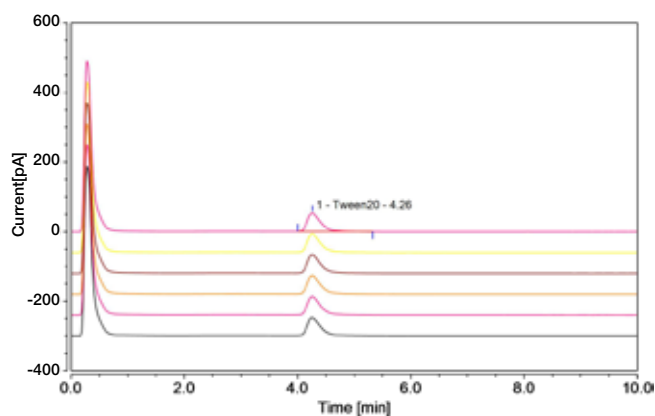


图 12. 6 号 Tween20 产品含量测定重复性谱图 (n=6)

表 4. 6 号 Tween20 产品含量测定重复性 (n=6)

6 号 Tween20 产品	Ret.Time, min	Amount, mg/ml	Area, pA*min	Height, pA
1	4.244	0.1833	14.39	53.1
2	4.257	0.1859	14.57	53.5
3	4.263	0.1862	14.59	53.55
4	4.250	0.1864	14.61	53.55
5	4.250	0.1850	14.51	53.22
6	4.264	0.1841	14.44	53.73
RSD%	0.19	0.67	0.61	0.44

5. 结果讨论

- 1) 在进空白样时发现在 Tween20 出峰位置有干扰 (图 2), 导致进 Tween20 标品时峰形拖尾严重, 通过扣除空白, 峰形得到改善 (图 3), 因此, 本实验中所有谱图在没有特殊说明情况下均为扣除空白后谱图;
- 2) 由于 CAD 在较宽浓度范围内是非线性响应, 故将 Tween20 的峰面积与含量的关系用二项式回归进行拟合分析, 回归方程为 $Y=0.3978+81.22x-26.68x^2$ (图 7), 相关系数 (R^2) 为 0.9991, 线性范围为 0.01~100 mg/mL (表 1); 方法检测限为 0.005 mg/mL (信噪比 $S/N=6.5$), 定量限为 0.01 mg/mL (信噪比 $S/N=13.5$);
- 3) 0.1 mg/mL Tween20 标品的保留时间和峰面积 RSD 值分别为 0.18% 和 1.37% (图 10 和表 2); 6 号 Tween20 产品的保留时间和峰面积 RSD 值分别为 0.19% 和 0.61% (图 12 和表 4), 方法重复性良好; 根据二项式回归拟合曲线计算 1~10 号产品中 Tween20 的实际含量, 结果见图 11 和表 3, 含量基本在 0.10~0.24 mg/mL 之间, 在估值范围内。

6. 结论与建议

利用 CAD 对 Tween20 进行检测, 方法准确度高, 重复性好, 通过二项式回归分析, 相关性良好, 检测限较低, 说明 CAD 检测器可以很好地满足检测需求, 是检测 Tween 类样品较为理想的一种检测器; Oasis MAX 在分离产品中蛋白类物质和 Tween20 时表现出较好的分离性能, 在酸性流动相条件下, 使得蛋白和其它赋形剂可以在死时间出峰, 避免对 Tween20 出峰形成干扰, 同时使用异丙醇作为有机相, 可以将 Tween20 洗脱成一个单峰, 有利于定量。

蛋白药物中吐温 80 的含量测定

1. 方法简介

聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯，简称吐温 80，是一种非离子型表面活性剂及乳化剂，由山梨聚糖和油酸通过乙氧基化制得，对于非肠道给药的药剂而言，吐温 80 可以作为一种赋形剂，如加拿大和一些欧洲国家生产的流感疫苗，它也可以在一些药物的生产过程中用作乳化剂，如常见的抗心律失常药物胺碘酮。参考相关研究和实验报道，采用 Oasis MAX 色谱柱结合 CAD 检测器对其蛋白药物产品中吐温 80 含量进行了测定。

2. 样品制备

对照品溶液配制及测试：精密称取适量吐温 80 对照品，用水稀释定容，浓度为 1.14 mg/mL；后用水稀释配制标准工作溶液浓度分别为：10 µg/mL、20 µg/mL、30 µg/mL、40 µg/mL、50 µg/mL、60 µg/mL、70 µg/mL、80 µg/mL、90 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL。

供试溶液配制及定量测试：缓冲样品不稀释，1 号样品稀释 10 倍，2 号样品稀释 50 倍，调整前样品稀释 10 倍，调整后样品稀释 20 倍，进行测试、定量。

3. 色谱条件

色谱柱	Oasis MAX, 2.1 × 20 mm, 30 µm, PN: 186002052		
柱温	30°C		
流动相	A: 2% 甲酸水溶液; B: 2% 甲酸异丙醇溶液;		
	Time, min	A, %	B, %
	0	90	10
	1	80	20
	3.4	80	20
	3.5	0	100
	4.5	0	100
	4.6	90	10
	10	90	10
流速	1.0 mL/min		
进样体积	30 µL		
检测器	CAD Corona VEO RS, 蒸发温度 30°C, 采集频率 5 Hz, Filter 5.0 s		

4. 谱图结果

1) 对照品扣除试剂空白后的测试谱图

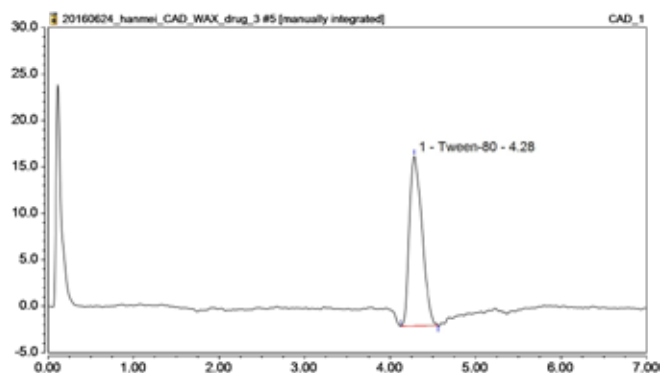


图 1. 20 µg/mL 吐温 80 对照品扣除试剂空白色谱图

2) 标准曲线及其相关系数

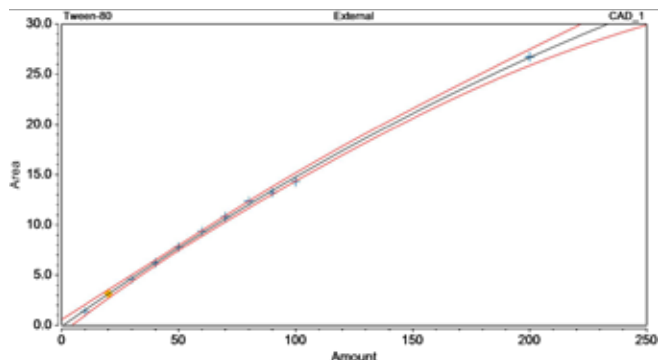


图 2. 对照品工作曲线 ($Y = -0.0001x^2 + 0.1634x - 0.0919$, $R^2 = 0.9990$)

按照峰面积（两针样品的峰面积平均值）与浓度计算 Quad, WithOffset, Avg 标准曲线（图 2）。

3) 样品测试

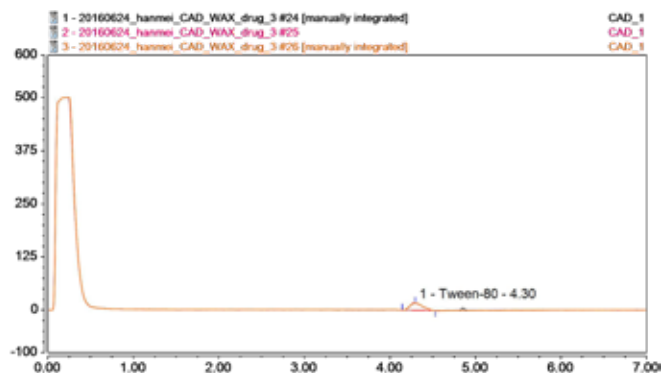


图 3. 缓冲样品测试色谱图

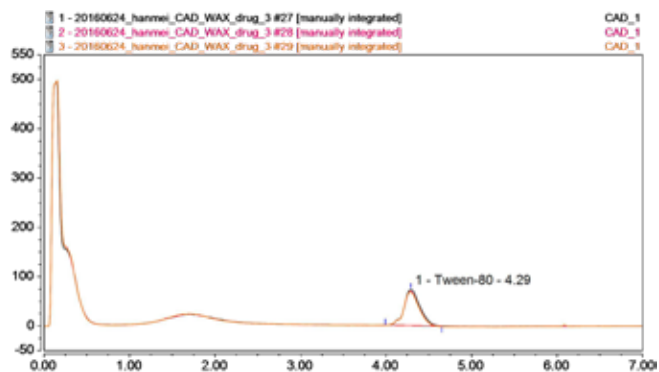


图 4. 1 号样品稀释测试色谱图

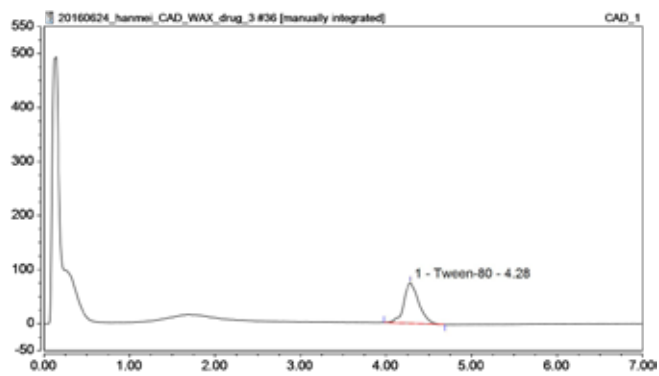


图 7. 调整后样品稀释测试色谱图

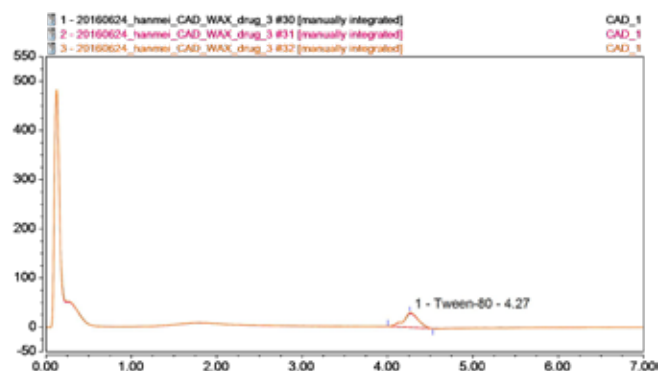


图 5. 2 号样品稀释测试色谱图

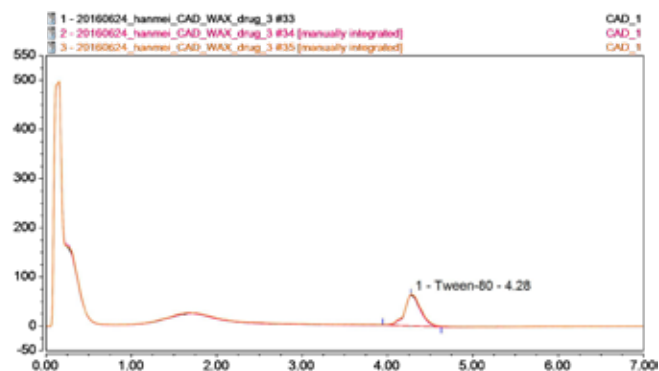


图 6. 调整前样品稀释测试色谱图

表 1. 5 个样品中吐温 80 的含量

样品名称	缓冲样品	1 号	2 号	调整前	调整后
吐温 80 含量 (mg/mL)	0.019	1.00	1.91	0.90	2.05

根据要求将未分离物质计入吐温 80 的含量。如表 1 所示缓冲样品中吐温 80 含量为 0.019 mg/mL，1 号样品中吐温 80 含量为 1.00 mg/mL，2 号样品中吐温 80 含量为 1.91 mg/mL，调整前样品中吐温 80 含量为 0.90 mg/mL，调整后样品中吐温 80 含量为 2.05 mg/mL。

5. 结论

本实验使用 CAD 检测器分析药物制剂中的吐温 80，吐温 80 在色谱柱上的保留效果较好，能够满足检测需求。

10 µg/mL 的吐温 80 对照品可以检出，信噪比可达 20；同时 10 µg/mL-200 µg/mL 共计 7 个点的标准曲线（标准曲线范围过宽，建议选择利用 Quad, WithOffset, Avg 标准曲线来计算结果） R^2 大于 0.999，能够满足检测需求。

缓冲样品中吐温 80 含量为 0.019 mg/mL，1 号样品中吐温 80 含量为 1.00 mg/mL，2 号样品中吐温 80 含量为 1.91 mg/mL，调整前样品中吐温 80 含量为 0.90 mg/mL，调整后样品中吐温 80 含量为 2.05 mg/mL。

蛋白药物中盐酸胍残留分析

1. 方法简介

盐酸胍是生物制药中的常用试剂，但在制药工艺最后环节需对胍和氯离子加以去除，并采用适宜方法检测残留的胍和氯离子含量，本方法采用 CAD 对蛋白药物中盐酸胍的残留量进行了分析。

2. 样品制备

盐酸胍对照品 (0.0045, 0.009, 0.018, 0.039, 0.078, 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 和 5 mg/mL) 和样品 1, 2, 3 溶液。

3. 分析条件

色谱柱	Trinity P1, 3.0 x 100 mm, 3 μ m, PN: 071387
柱温	30 $^{\circ}$ C
流动相	乙腈 :100 mM NH ₄ Ac (pH 5.3) 水 : (30: 14: 56, v:v:v)
流速	1.0 mL/min
进样体积	10 μ L
检测器	CAD, 蒸发温度 35 $^{\circ}$ C, 采集频率 10 Hz, Filter 5.0 s

4. 谱图结果

1) 胍和氯离子线性曲线

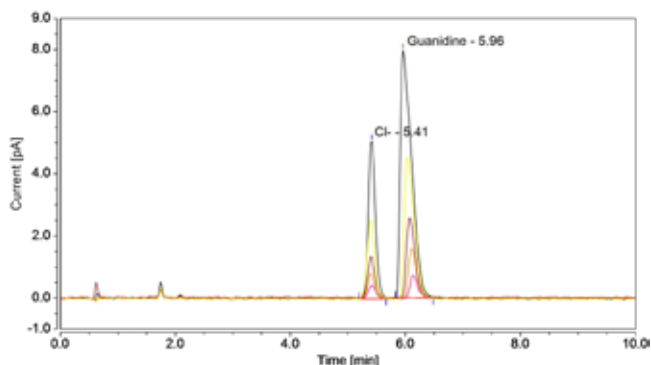
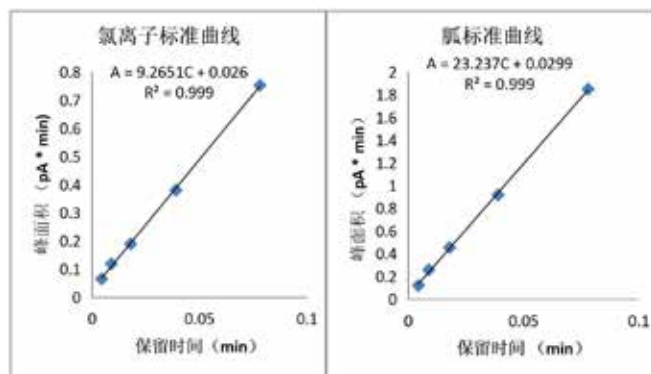


图 1. 不同浓度胍和氯离子样品

从低到高，样品浓度依次为 0.0045, 0.009, 0.018, 0.039, 0.078 mg/mL。



- 在 0.0045-0.078 mg/mL 范围内，取 power function 值为 1.0，氯离子和胍都具有很好的线性。氯离子线性方程： $A = 9.2651C + 0.026$, $R^2 = 0.999$ ；胍线性方程： $A = 23.237C + 0.030$, $R^2 = 0.999$ 。A：峰面积，单位 pA * min；C：样品浓度（进样体积为 10 μ L），mg/mL。
- 在 0.0045-0.3125 mg/mL 范围内，取 power function 值为 1.3，氯离子和胍都具有很好的线性。氯离子线性方程： $A = 12.4822C - 0.0318$, $R^2 = 0.999$ ；胍线性方程： $A = 33.1371C - 0.0261$, $R^2 = 0.999$ 。A：峰面积，单位 pA * min；C：样品浓度（进样体积为 10 μ L），mg/mL。
- 当样品浓度超过 0.3125 mg/mL（进样体积为 10 μ L），色谱峰展宽严重，无法实现两个组分的分离和定量。减少进样体积可以实现更高浓度样品的线性分析，但更关注的是低浓度区域的样品浓度，因此不需要做减少进样体积后的线性曲线。

2) 1, 2, 3 号样品分析

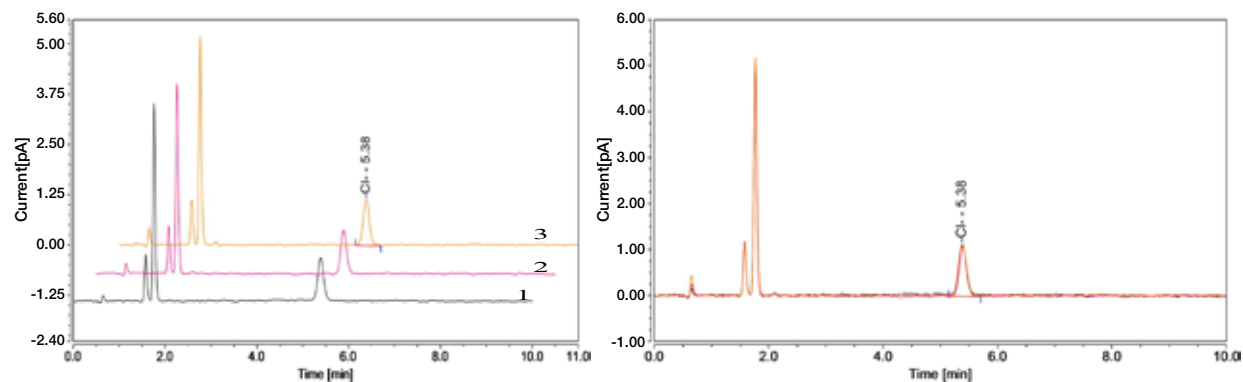


图 2. 1,2,3 号样品分析

样品：1,2,3 号样品稀释 1000 倍后，进样 10 μL 。

- 三个样品均没有胍检出，但氯离子出峰位置处有很强的响应。
- 原样浓度过高，超出了线性范围。将原样稀释 1000 倍，进样 10 μL ，每个样品进样三次。如果 5.38 min 出峰的化合物为氯离子，通过线性曲线计算，得到样品 1,2,3 中氯离子浓度如下表所示。
- 三个样品的浓度没有明显差异。

表 1. 样品 1,2,3 中氯离子浓度

样品编号	峰面积 (pA*min)	稀释 1000 倍样品浓度 (mg/mL)	样品浓度 (mg/mL)
1	0.165	0.0150	14.956
2	0.162	0.0147	14.690
3	0.177	0.0163	16.294

5. 结论与建议

- 该方法可以为氯离子和胍提供较好的分离度，较高的检测灵敏度和较宽的线性。
- 三个样品中均没有胍检出。在氯离子出峰处，有较强的响应。如果该色谱峰为氯离子，三个样品氯离子浓度没有显著差异，都在 14.5-16.5 mg/mL 范围内。
- 用衬管装样品，进样前需要注意衬管中（尤其是衬管尖底部分）是否有气泡。如果有气泡需要用移液枪将气泡赶出，并将样品混合均匀。
- 样品浓度过高时，如超过 0.1 mg/mL，需要将样品稀释后进样分析。如本实验中，样品浓度过高，即使进 1 μL ，仍然超出线性范围。稀释 1000 倍后进 10 μL ，峰面积很好的出现在线性范围之内。

疫苗辅料分析解决方案

疫苗中蔗糖的含量测定

1. 方法简介

蔗糖作为低端而廉价的冻干保护剂广泛用于疫苗制品中。冻干保护剂的组成对疫苗质量有重大影响，因为保护剂不仅关系到冻干疫苗的稳定性和影响疫苗复溶后的效价、渗透压等于疫苗质量息息相关的因素，因此对冻干疫苗中蔗糖组分进行定量分析对疫苗的质量控制具有重要意义。——杨焯等，中国生物制品学杂志，2015，411。

2. 样品制备

- **线性、LOQ、LOD:** 用 1 mg/mL 蔗糖对照品溶液用 75% 乙腈水稀释成以下浓度: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.49, 0.146 $\mu\text{g/mL}$ 。
- **供试品溶液和重复性:**
 1. **脱糖起始液:** 取脱糖起始液 300 μL ，加乙腈 2700 μL ，涡旋 1 min 后，用 10000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜，透过液用 75% 乙腈水稀释 100 倍（相当于原溶液稀释了 1000 倍），进样分析。取其中一批（BV-1603-005）分析 6 次。
 2. **脱糖终止液:** 取脱糖终止液 300 μL ，加乙腈 2700 μL ，涡旋 1 min 后，用 10000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜，透过液用 75% 乙腈水稀释 10 倍（相当于原溶液稀释了 100 倍），进样分析。
 3. **原液:** 取原液 300 μL ，加乙腈 2700 μL ，涡旋 1 min 后，用 10000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜，进样分析。
- **准确度:**
 - 1) **稀释液:** 原液 1 mL，加乙腈 9 mL，涡旋 1 min 后，用 10000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜，作为稀释液。
 - 2) **样品溶液:** 取浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ ，250 $\mu\text{g/mL}$ ，62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的蔗糖溶液各 100 μL ，用稀释液分别稀释到 1 mL。
 - 3) **对照溶液:** 取浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ ，250 $\mu\text{g/mL}$ ，62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的蔗糖溶液各 100 μL ，用 75% 乙腈水分别稀释到 1 mL。

4) 回收率计算: (样品溶液中蔗糖峰面积 - 稀释液中蔗糖峰面积) 除以对照溶液中蔗糖峰面积, 再乘以 100%。

- **专属性:** 取空白溶液 300 μL ，加乙腈 2700 μL ，涡旋 1 min 后，用 10000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜，进样分析。

3. 分析条件

色谱柱	Shodex NH2 (4.6 x 250 mm, 5 μm); PN: F7630001; SN:N1610109
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
流动相	乙腈:水 (75:25,V:V)
流速	1.0 mL/min
进样体积	20 μL
检测器	CAD, 蒸发温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 采集频率 10 Hz, Filter 5.0 s

4. 谱图结果

1) 蔗糖工作曲线、LOQ 和 LOD

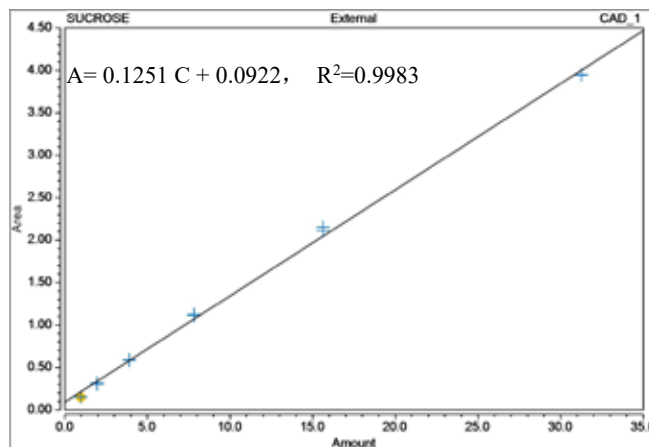


图 1. 以 $A=aC + b$ 拟合，得蔗糖工作曲线

样品浓度从高到低: 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.976 $\mu\text{g/mL}$

- 浓度为 0.488 $\mu\text{g/mL}$ 的样品进样 20 μL , S/N 为 12 ; 根据定量限应该高于 10 倍 S/N 的规定, 0.488 $\mu\text{g/mL}$ 为该方法的定量限。
- 浓度为 0.146 $\mu\text{g/mL}$ 时, S/N 为 4.0; 根据检出限应该高于 3 倍 S/N 的规定, 0.146 $\mu\text{g/mL}$ 为该方法的检出限。
- 在 0.976-31.25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 进样量与峰面积之间呈现很好的线性关系, 满足 R^2 不小于 0.998 的要求。
- 6 针重复进样, 峰面积 RSD% 为 1.88%, 满足 RSD% 不高于 10% 的要求。

2) 方法重复性

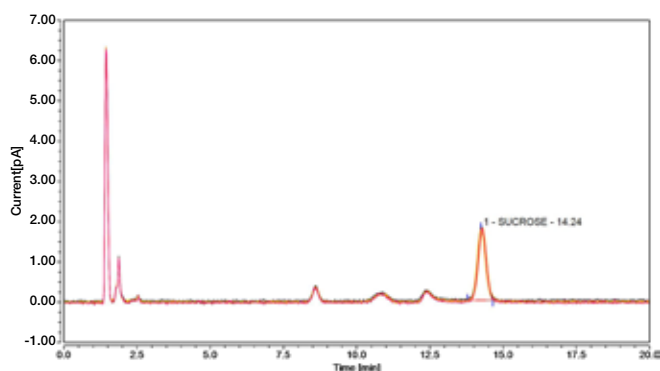


图 2. 样品 1 稀释 1000 倍后进样分析 6 次

3) 回收率

a) 加标 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 的蔗糖回收率 98.9%

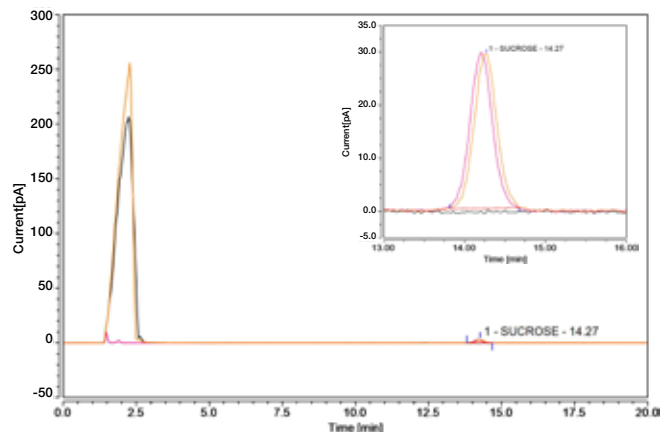


图 3. 回收率测定 1

b) 加标 25 $\mu\text{g/mL}$ 的蔗糖回收率 97.6%

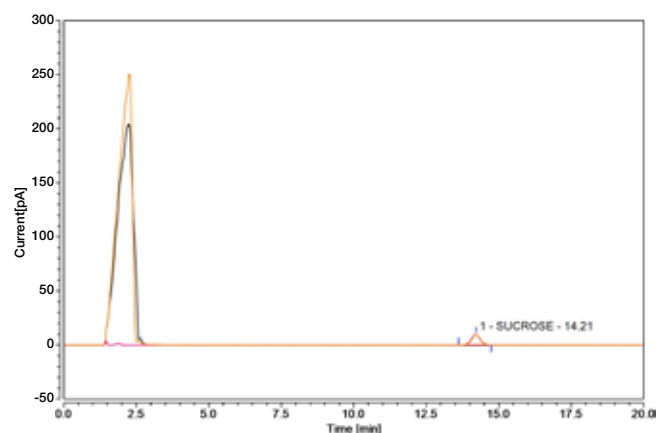


图 4. 回收率测定 2

c) 加标 100 $\mu\text{g/mL}$ 的蔗糖回收率 100.5%

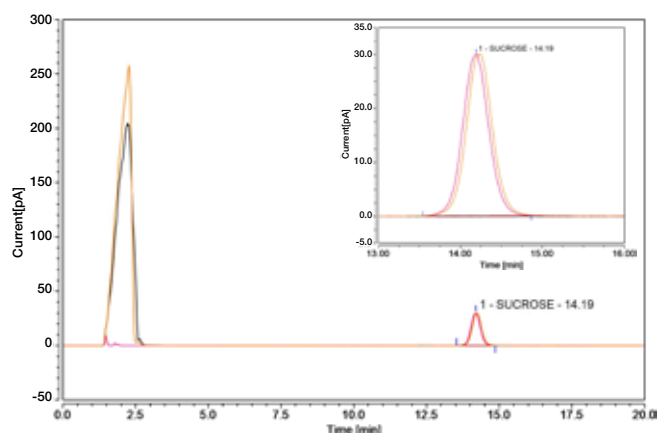


图 5. 回收率测定 3

4) 专属性

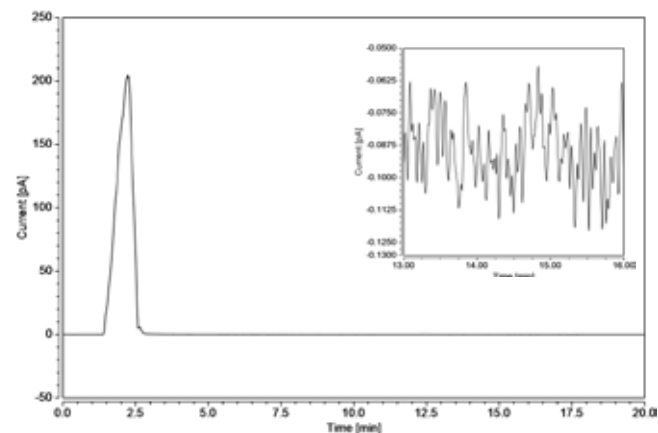


图 6. 用乙醇沉淀后的空白溶液 (相当于稀释 10 倍)

- 在稀释 10 倍后的空白溶液中, 无蔗糖检出。

5) 样品测定

a) 原液

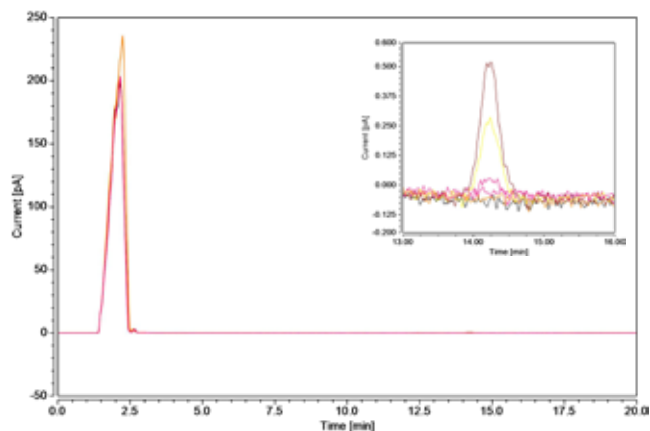


图 7. 原液样品 1/2/3/4/5/6 分析

- 样品 4 和样品 5 在蔗糖出峰的位置有响应，含量分别为 0.92 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.103 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 其它批次的原液中没有蔗糖检出。

b) 脱糖起始液

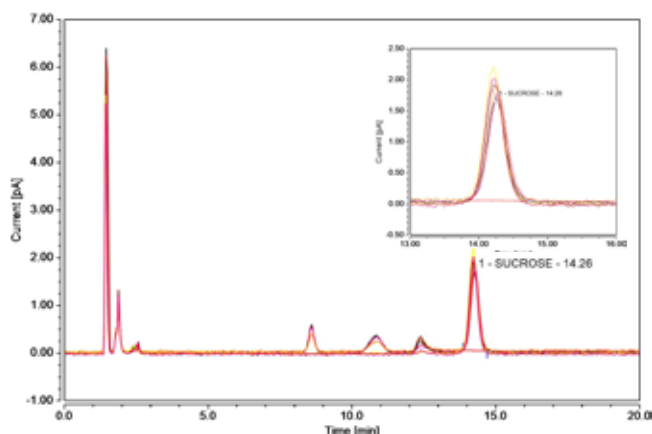


图 8. 脱糖起始液样品 1/2/3/4/5/6/2 分析

- 脱糖起始液（稀释 1000 倍后）样品 1/2/3/4/5/6 的蔗糖浓度依次为 3.531 $\mu\text{g/mL}$, 3.6929 $\mu\text{g/mL}$, 3.794 $\mu\text{g/mL}$, 4.283 $\mu\text{g/mL}$, 4.712 $\mu\text{g/mL}$, 4.459 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 所有脱糖起始液中蔗糖浓度都大于 30% 的浓度。

c) 脱糖终止液

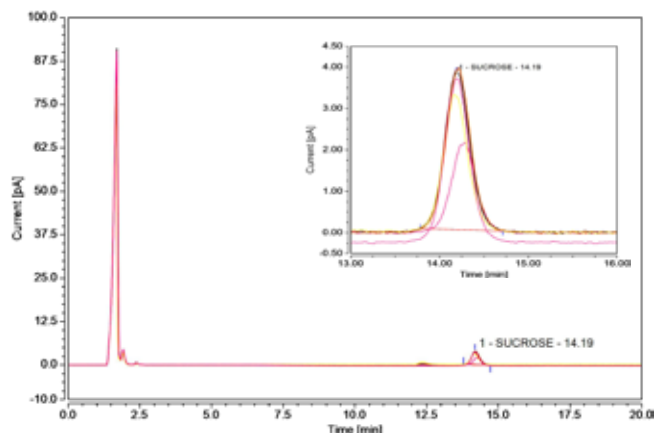


图 9. 脱糖终止液样品 1/2/3/4/5/6 分析

- 脱糖终止液（稀释 1000 倍后）样品 1/2/3/4/5/6 的蔗糖浓度依次为 9.341 $\mu\text{g/mL}$, 4.974 $\mu\text{g/mL}$, 9.147 $\mu\text{g/mL}$, 9.996 $\mu\text{g/mL}$, 7.872 $\mu\text{g/mL}$, 9.742 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 所有批次的终止液都满足或者接近蔗糖浓度不超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 的要求。

5. 结论与建议

- 本方法具有较宽的线性范围和较高的灵敏度，线性曲线满足 $R^2 > 0.998$ 的要求；
- 方法具有较好的准确度，满足峰面积 RSD 值小于 10% 的要求；
- 该方法具有较好的回收率，三个待测浓度的回收率均满足在 80-120% 的要求；
- 空白溶液中无蔗糖检出，满足没有蔗糖检出的预期；
- 原液有两个批次有蔗糖检出，其余批次无蔗糖检出。
- 脱糖起始液的蔗糖浓度在 3.5-5 g/L 的范围内。
- 蔗糖终止液的蔗糖浓度在 40 mg/L-100 mg/L 的浓度范围，满足会接近脱糖终止液蔗糖浓度不高于 100 mg/L 的要求。

疫苗辅料中胆固醇、磷脂和皂苷的含量测定

1. 方法简介

与化药一样，为了增强疫苗的效果、延长免疫记忆、调整体液和细胞反应，疫苗的生产过程中往往需要加入一定量的辅料。在疫苗辅料中存在大量无（弱）紫外吸收的化合物，如胆固醇、磷脂和皂苷。本文以 CAD 为检测器，发展了疫苗辅料中胆固醇、DPPC、Lyso-PC 和皂苷的定量方法，并用于疫苗辅料 AbISCO 中这些成分的含量测定。并将该方法与 UV 210 nm 检测做对比。

2. 样品制备

a) 单标的配制

样品溶剂：将 30 mL 乙醇与 70 mL 超纯水混合。将 20 mg 皂苷混合物溶于 10 mL 样品溶液中，配成 2 mg/mL。通常皂苷混合标准品中皂苷含量在 20-35%，仅用于估计辅料中皂苷含量。称取 20 mg DPPC 和 Lyso-PC 溶于 10 mL 样品溶液中，配成 2 mg/mL。称取 20 mg 胆固醇溶于 10 mL 样品溶液中，配成 2 mg/mL。配制好的标准品溶液在 4-8℃ 下可存放一个月。

b) 标准品混合溶液

取 1 mL 皂苷、DPPC 和胆固醇溶液和 0.25 mL Lyso-PC 溶液，用样品溶液稀释到 5 mL。

c) 工作曲线

用对照品混合溶液配制浓度为 400, 200, 160, 80, 40, 20, 10, 3 和 1.5 μg/mL。

d) 样品溶液

取 100 μL AbISCO-100 溶液，加入 400 μL 超纯水后混合均匀。

3. 分析条件

色谱柱	Hypersil GOLD PFP 1.9 μm column, 2.1 x 100 mm		
柱温	45°C		
流动相	A: 0.1% 甲酸水; B: 甲酸: 乙腈: 乙醇 (1:100:900, v/v/v)		
	Time, min	A, %	B, %
	-5	65	35
	0	65	35
	8	10	90
	13	10	90
流速	0.5 mL/min		
进样体积	2 μL (样品室温度 8°C)		
检测器	CAD, 蒸发温度 50°C, 采集频率 20 Hz, Filter 5.0 s DAD, 210nm, 采集频率 20 Hz		

4. 谱图结果

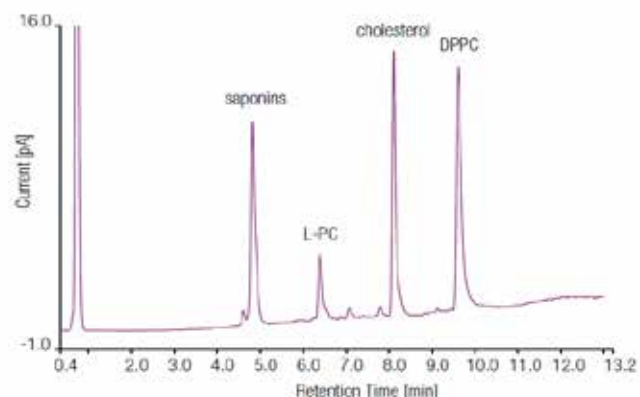


图 1. CAD 检测对照品混合溶液

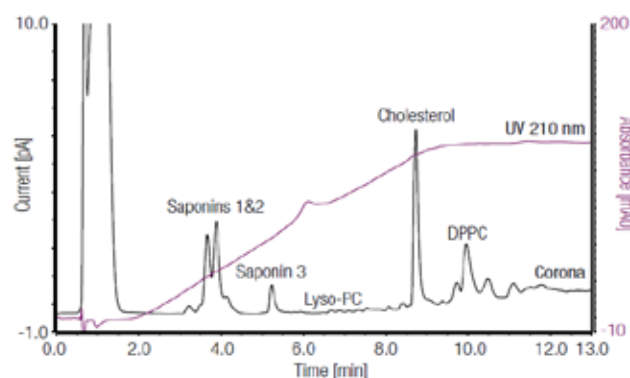


图 2. CAD (黑) 和紫外 (紫) 检测 AbISCO 溶液

表 1. 日内重复性考察 (n=10)

分析物名称	保留时间 (min)	浓度 (µg/mL)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
皂苷类	4.8	74.1	0.05	1.5
Lyso-PC	6.4	61.3	0.05	0.87
胆固醇	8.1	75.7	0.02	1.1
DPPC	9.6	76.5	0.02	0.67

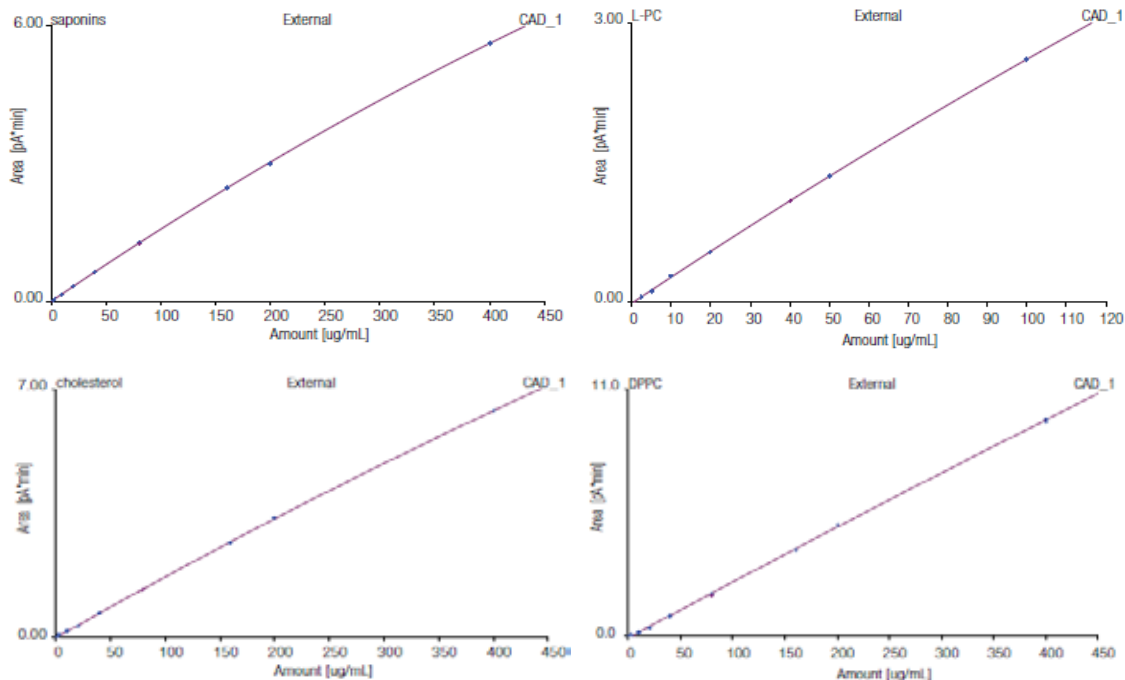


图 3. 皂苷 (左上)、Lyso-PC (右上)、胆固醇 (左下) 和 DPPC (右下) 工作曲线

表 2. 工作曲线

分析物名称	保留时间 (min)	浓度 (µg/mL)	R ²
皂苷类	4.8	1.5-400	0.9999
Lyso-PC	6.4	0.38-100	0.9998
胆固醇	8.1	1.5-400	0.9999
DPPC	9.6	1.5-400	0.9996

5. 结论与建议

- 与紫外检测器相比, CAD 检测皂苷、胆固醇、DPPC 和 Lyso-PC 具有更高的灵敏度;
- CAD 方法具有较宽的线性范围和较好的重复性, 可用于疫苗辅料样品 AbISCO 中各辅料成分的定量分析。

生物制药中硬脂酸和棕榈酸的检测

1. 方法简介

某生物药生产过程中使用过棕榈酸和硬脂酸，需要对成品中棕榈酸和硬脂酸的残留量加以控制。由于脂肪酸类物质近紫外区吸收较弱，紫外检测器不能满足低浓度样品分析的要求，而 CAD 是一款通用型检测器，适用于不挥发或半挥发样品的检测（灵敏度优于 ELSD），可使用梯度洗脱分离复杂样品（优于 RI），非常适于该原料药的检测。

2. 样品制备

空白溶液：60% 乙腈。

混合对照溶液：取棕榈酸、硬脂酸适量，精密称定，以 60% 乙腈溶解制成含棕榈酸 10 ug/mL、硬脂酸 4 ug/mL 的混合对照溶液。

供试品溶液：取待用适量，精密称定，以 60% 乙腈溶解制成浓度为 5mg/mL 的溶液。

3. 方法条件

色谱柱	Accucore C18, 2.1 × 50mm, 2.6μm, PN: 17126-052130		
柱温	30℃		
	A: 水 B: 乙腈		
流动相	Time, min	A, %	B, %
	0	30	70
	8	10	90
	8.5	10	90
	8.6	30	70
12	30	70	
流速	0.5 mL/min		
进样体积	10 μL		
检测器	CAD Veo RS, 蒸发温度 30℃, Filter 5.0 s		

4. 谱图结果

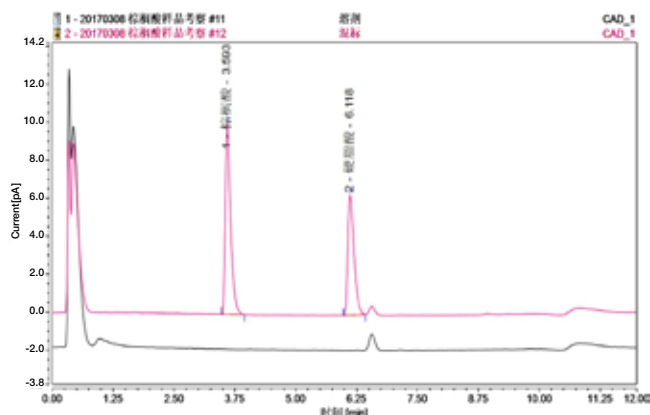


图 1. 空白及混标测试结果（黑：空白溶剂 红：混标）

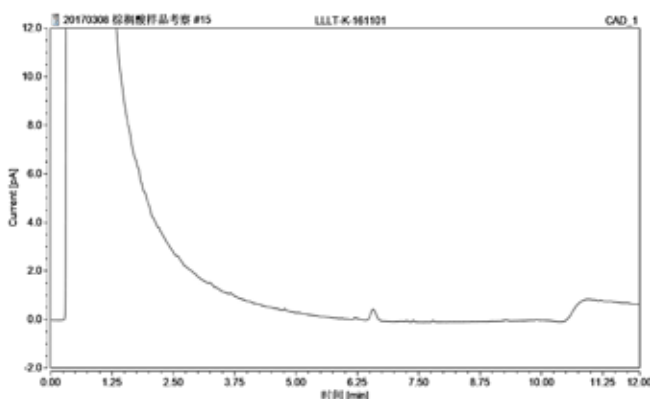


图 2. 样品 1 测试结果

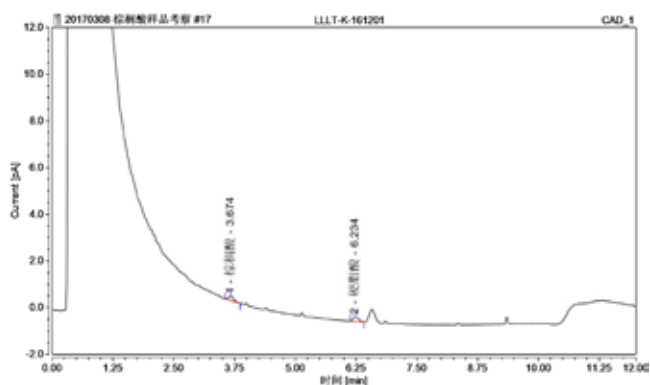


图 3. 样品 2 测试结果

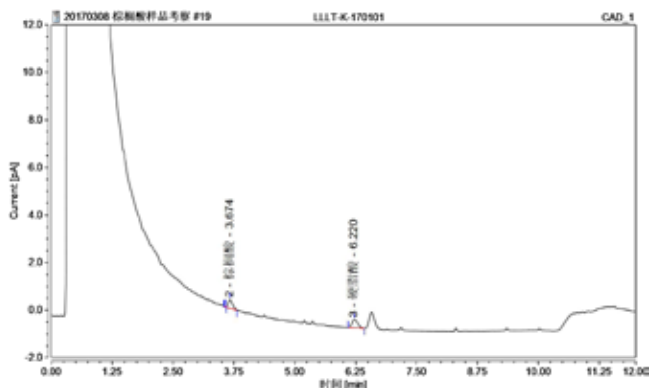


图 4. 样品 3 测试结果

1、混标考察结果 (图 1) :

	保留时间	平均峰面积	信噪比	峰面积 RSD %
棕榈酸	3.59	1.29	734	0.80
硬脂酸	6.11	0.92	461	0.32

2、样品考察结果 (图 2~ 图 4)

	保留时间	平均峰面积
样品 1	未检出	未检出
样品 2	0.18 ug/ml	0.12 ug/ml
样品 3	0.27 ug/ml	0.21 ug/ml

由于 CAD 通常使用多点校正法以提高测定结果的准确度，以上结果仅供参考。

5. 结论与建议

1. 方法灵敏度分析：按照样品浓度 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 计算，使用 CAD 检测器实际检出棕榈酸和硬脂酸的残留量在主成分含量 0.01% 以下，完全满足该产品日常质控要求。
2. 方法重现性分析：混标考查两种成分峰面积的 RSD 在 1.0% 以下，说明 CAD 检测的方法重现性较好。
3. 相比原条件（乙酸 - 乙腈 - 四氢呋喃体系，总分析时间为 30min，色谱柱为 xselect CSH C18 (4.6 \times 150mm, 3.5 μm)，进样量为 50 μL ，测试过程发现该条件的基线噪音过大（见下图），推测可能是由于该色谱柱流失和流动相中非挥发性杂质带来的影响），本方法具有显著优势（Accucore C18 (2.1 \times 50mm, 2.6 μm)，并使用乙腈 - 水系统后，基线情况明显得到改善，且分析时间缩短为 12min，效率提高约 60%)。

前景与展望

为了提高生物制剂的有效性，各种新型的辅料成分被不断的开发并引入到生物制药领域，发挥着举足轻重的作用，如提高药物利用度，防止变性或聚集，延长免疫记忆持续时间，调节相关的体液和细胞反应等等；但同时该行业也亟需各种新技术、新方法解决生物药物质量控制中不断出现的新问题，确保药物的安全性。

针对大多数药物辅料没有紫外吸收这一行业共性问题，赛默飞世尔科技推出了电雾式检测器（CAD）解决方案，结合赛默飞先进的色谱柱技术，自动化的数据处理系统，相信可以帮助更多的生物制药客户建立更可靠的分析方法和更完善的质控体系。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021-61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 +86 10 8794 6888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
与质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC