

Vanquish Core结合CAD检测器同时测定腺相关病毒载体制剂中的泊洛沙姆188和吐温80

崔宇 曹建明 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

Vanquish Core, CAD检测器, 泊洛沙姆188, 吐温80

摘要

本文通过赛默飞全新的Vanquish Core高效液相色谱仪结合质量通用型检测器-电雾式检测器（CAD）建立一种简单高效的HPLC方法，可以满足腺相关病毒（AAV）载体制剂中泊洛沙姆188和吐温80同时测定的需求，本方法稳定性好、灵敏度高，较宽的线性范围适用于不同浓度样品的测定，可作为泊洛沙姆188和吐温80此类药物辅料残留控制的有效手段。

1. 引言

近些年来，随着基因治疗的蓬勃发展，FDA已先后批准3款基因治疗产品，它们均是以腺相关病毒（AAV）为载体，标志着我们对疾病的治疗真正迈入了基因时代。

泊洛沙姆188是一种聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物，属于一类新型的高分子非离子表面活性剂，通常作为AAV制剂中的一种添加剂，避免聚体的产生，以保证长期低温保存和运输的稳定性。吐温80的化学成分是聚山梨醇酯80，它是一种非离子型表面活性剂，常作为助溶剂、乳化剂和稳定剂，在AAV纯化工艺中去除特定病毒，但吐温80具有溶血副作用，因此，吐温80作为药用辅料，应严格按照国家标准，控制吐温80的用量^[1]。

泊洛沙姆188和吐温80均无紫外吸收，目前常用测定制剂中泊洛沙姆188的方法，主要是采用体积排阻法搭配示差或蒸发光散射检测器。其中示差检测器受环境条件影响大，无法兼容梯度洗脱，灵敏度低；而蒸发光散射检测器线性范围窄，虽然灵敏度在测定泊洛沙姆188相较于示差检测器有一定程度的提高，但仍很难满足低浓度泊洛沙姆188残留的检测需求^[2]。而目前测定吐温80的蒸发光散射检测器的方法，存在和测定泊洛沙姆188同样的问题^[3]。

电雾式检测器（CAD）作为一款通用型的质量检测器，具有高灵敏度和宽线性范围的特点，在测定泊洛沙姆188和吐温80等无紫外吸收辅料时，具有其独特的优势。本文建立了一种HPLC-CAD法，可同时完成泊洛沙姆188和吐温80的测定，方法快速高效，重复性好，灵敏度高，可作为其残留质控的可靠手段。

2. 实验部分

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱仪

泵：Vanquish Binary Pump（VC-P10-A-01）（150μL混合器）

自动进样器：Vanquish sampler CT（VC-A12-A-02, 100μL定量环）

柱温箱：Column Compartment C（VC-C10-A）

检测器：Vanquish Charged Aerosol Detector H（VH-D20-A）

色谱软件：变色龙Chromeleon 7.3。

2.2 试剂与标准品

2.2.1 试剂：异丙醇（色谱级，Fisher Chemical），乙酸（质谱级，Fisher Chemical），去离子水（Thermo纯水机）。

2.2.2 标准溶液及样品：泊洛沙姆188溶液（浓度：100mg/mL），吐温80溶液（浓度：100mg/mL），腺相关病毒载体制剂样品均来自客户企业。

2.3 标准品溶液制备

由泊洛沙姆188溶液和吐温80溶液混合，用水稀释得到1000、500、250、100、50、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准工作溶液。

2.4 样品前处理

客户提供样品直接上机测试。

2.5 色谱条件

色谱柱: ChromCore SAA柱, 5 μm , 4.6 \times 150mm
(P/NS014-050018-04615S; S/N:S8536-S01018)

流动相: A: 2%乙酸水溶液, B: 2%乙酸异丙醇

流速: 0.9 mL/min, 梯度程序见表1:

进样量: 5 μL

柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$

检测器: CAD, 雾化温度50 $^{\circ}\text{C}$, 采集频率: 5 Hz, 过滤常数 : 3.6s

表1. 梯度洗脱程序

Time, min	A, %	B, %
0	80	20
0.9	80	20
1.0	66	34
2.8	66	34
2.9	0	100
6.5	0	100
6.6	80	20
11	80	20

3. 实验结果与讨论

3.1 标准品溶液分析测定结果

3.1.1 色谱图扣除空白

使用CAD检测器对泊洛沙姆188和吐温80进行分析时，由于梯度变化快，即使进溶剂空白也会出现系统峰，梯度变化导致的系统峰在吐温80出峰位置有干扰（如图1所示），故需要通过扣除空白方式消除梯度带来的空白溶剂峰影响，本方法中如无特别说明，均是扣除稀释液空白后的谱图，经处理后，吐温80色谱峰形符合含量测定要求（如图2所示）。

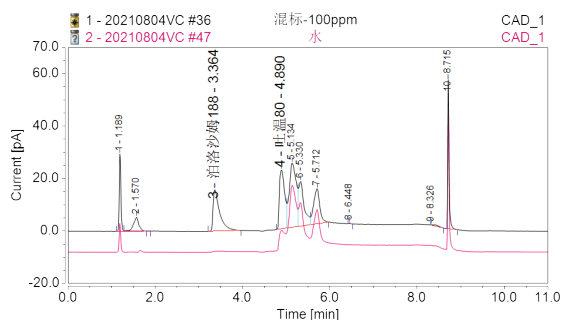


图1. 空白水溶剂（下）和混标溶液（上）色谱图（未扣除空白）

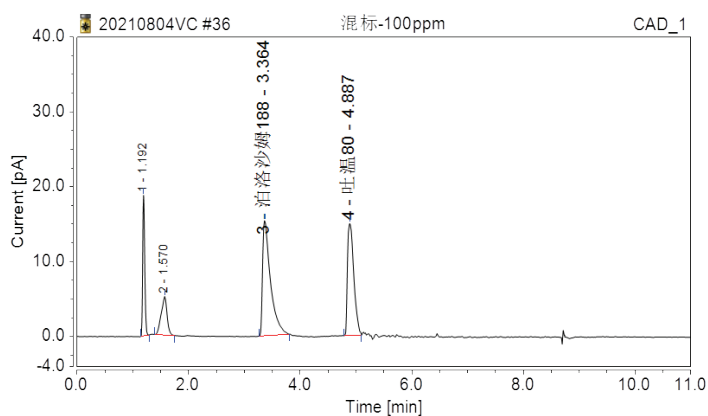


图2. 混合标准溶液色谱图（扣除空白后）

3.1.2 校正曲线测定结果

线性色谱图见图3，校正曲线结果见图4和图5，从结果可知，泊洛沙姆188和吐温80在25-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内通过二次线性拟合，结果良好，相关系数R2大于0.999。

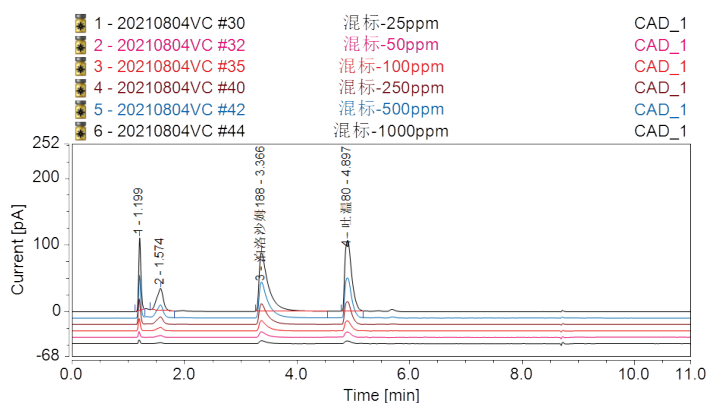


图3. 泊洛沙姆188和吐温80混标叠加色谱图

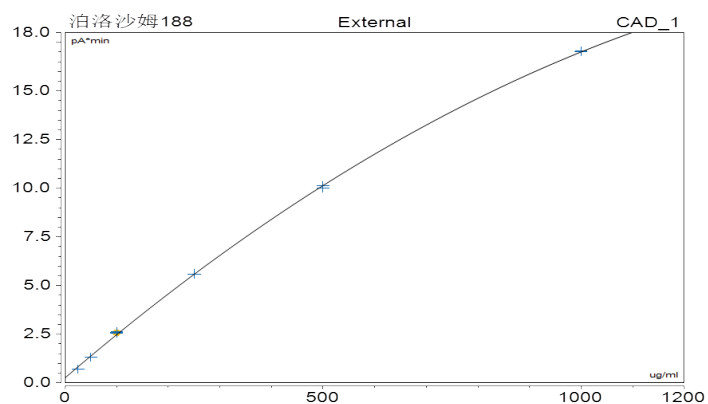


图4. 泊洛沙姆188校正曲线

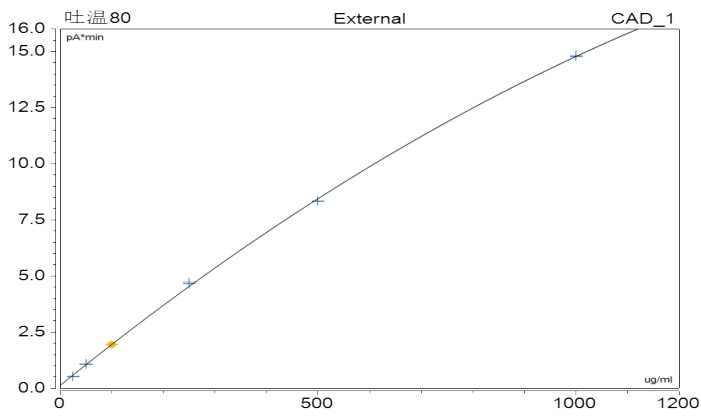


图5. 吐温80校正曲线

3.1.3 重现性测定结果

对浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$ 泊洛沙姆188和吐温80对照溶液连续重复进样6针，考察仪器系统的稳定性情况。连续6针重复进样色谱图见图6，重复性数据结果见表2和表3。从结果中可以看到，连续6针重复进样，保留时间RSD在0.10%范围内。峰面积RSD在1.10%范围内。

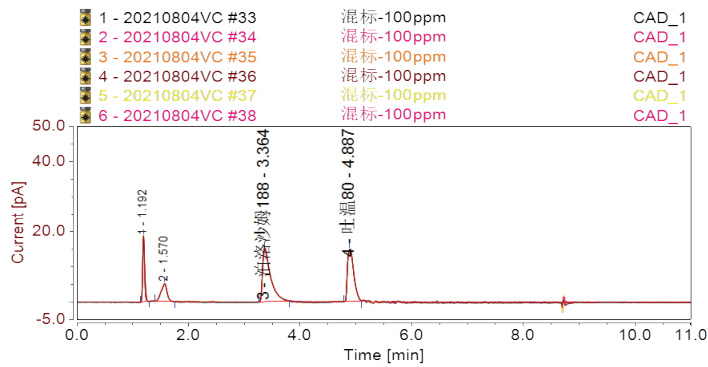


图6. 连续6针重复进样色谱图（浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ ）

表2. 连续6针重复进样结果（泊洛沙姆188）

泊洛沙姆188	峰面积(pA*min)	保留时间 (min)
100 $\mu\text{g/mL}$ 连续进样6针	2.5734	3.363
	2.5517	3.365
	2.5834	3.367
	2.5370	3.364
	2.5812	3.363
	2.6089	3.360
RSD(%)	0.99	0.06

表3. 连续6针重复进样结果（吐温80）

吐温80	峰面积(pA*min)	保留时间 (min)
100 $\mu\text{g/mL}$ 连续进样6针	1.9471	4.896
	1.9242	4.890
	1.9257	4.892
	1.9756	4.887
	1.9292	4.899
	1.9190	4.888
RSD(%)	1.10	0.10

3.1.4 定量限测定结果

泊洛沙姆188和吐温80在CAD检测器上的定量限（LOQ）均可达2 $\mu\text{g/mL}$ ，色谱图见图7和图8，数据结果见表4。

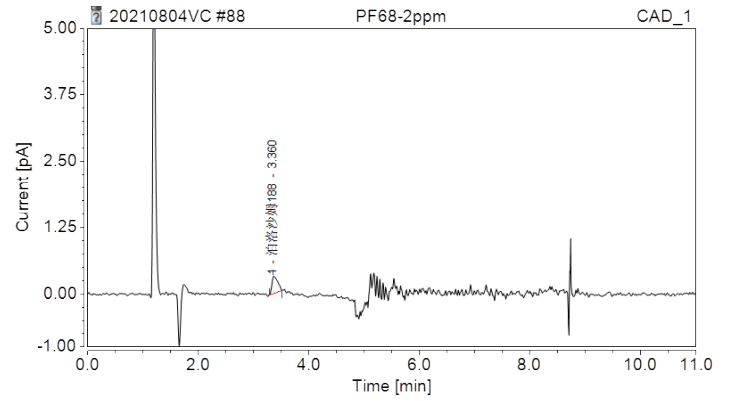


图7. 泊洛沙姆188色谱图（2 $\mu\text{g/mL}$ ）

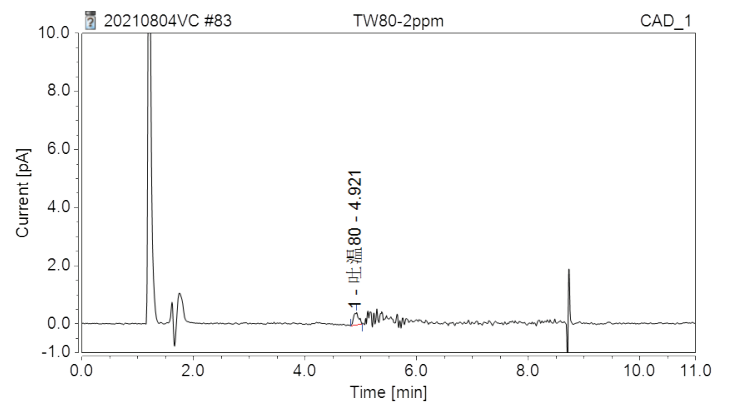


图8. 吐温80色谱图（2 $\mu\text{g/mL}$ ）

表4. 定量限测定结果

LOQ	标准品浓度	进样量	S/N
泊洛沙姆188	2 $\mu\text{g/mL}$	10 μl	9.9
吐温80	2 $\mu\text{g/mL}$	20 μl	15.1

3.2 实际样品分析测定结果

运用本文方法对AAV载体制剂样品进行上机分析，测定结果图谱见图9，采用3.1.2中校正曲线直接线性定量，测得样品中泊洛沙姆188浓度为23.3 $\mu\text{g/mL}$ ，吐温80未检出。

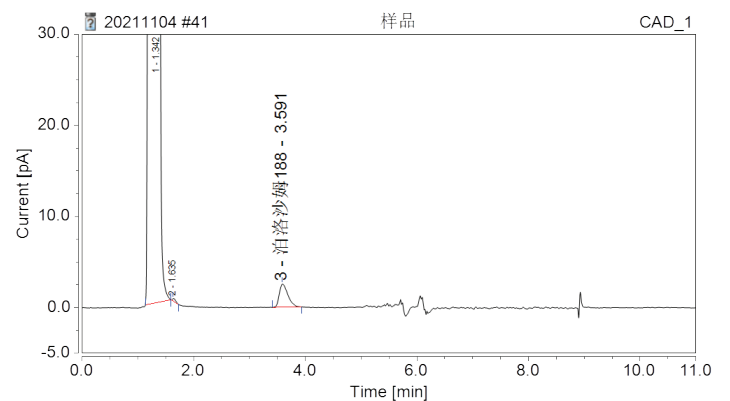


图9. AAV制剂中泊洛沙姆188和吐温80测定结果

结论

本文基于赛默飞全新的Vanquish Core高效液相色谱仪结合CAD检测器，建立了腺相关病毒（AAV）载体制剂中泊洛沙姆188和吐温80同时测定的方法。本方法重复性良好，灵敏度高，泊洛沙姆188和吐温80定量限均可至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，泊洛沙姆188和吐温80在CAD检测器上呈现出宽广的动态响应范围，在浓度25-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内呈现良好线性且 $R^2 > 0.999$ 。本方法简单、高效，稳定性好，适合于腺相关病毒（AAV）载体制剂中泊洛沙姆188和吐温80的残留分析和质量控制。

参考文献

- ^[1] 中国药典2020版第四部. 泊洛沙姆188，聚山梨醇80.
- ^[2] 徐佳茗, 夏学军, 刘玉玲. 凝胶色谱-蒸发光散射检测法测定紫杉醇脂肪乳注射液中泊洛沙姆188的含量(J). 药物分析杂志, 2014, 34(7): 2137-2140.
- ^[3] 尹立辉, 范可青, 朱俐, 刘伟, 金少鸿, 李敏. 凝胶色谱-蒸发光散射检测法检测中药注射剂中吐温80的含量(J). 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1686-1693.



赛默飞
官方微信

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