

电雾式检测器用于聚乙二醇重组蛋白药物制剂中游离聚乙二醇测定

柴瑞平 曹建明 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

电雾式检测器，聚乙二醇20000，多肽药物

摘要

近年来，电雾式检测器（CAD）在生物制药领域应用不断铺开，国内外知名药企将HPLC-CAD法纳入企业标准，比如Moderna公司的mRNA疫苗脂质体各个组分均指定使用CAD进行质量控制^[1]。蛋白药物辅料种类多样，检测难度大，本方法基于赛默飞CAD检测器用于聚乙二醇重组蛋白药物制剂中游离聚乙二醇测定，优势明显，最低检测限达0.01 μ g(进样10 μ L)，可以用于该产品质量控制，同时丰富了蛋白物质控的新应用。

1. 引言

聚乙二醇及其衍生物是目前为数不多的通过美国FDA认证的可用于生物医药产品的聚合物。官能化聚乙二醇在药物聚乙二醇化、生物医学技术、纳米技术、聚合物工程等领域具有广泛应用，其中在药物聚乙二醇化方面的应用尤为重要。聚乙二醇（ALD-PEG-20000，简写：PEG20K）为环氧乙烷水解产物的聚合物，平均分子量在20000左右，是一种非离子型的水溶性聚合物，具有毒性低、刺激性低、一定生理惰性等优势，故常用于修饰并改善小分子药物水溶性差、毒性大及蛋白质多肽类药物稳定性差、免疫原性缺陷等制剂开发。

由于PEG没有紫外吸收，选择一个高灵敏度、高重复性的通用型检测器用于多肽药物中游离PEG质量控制尤为重要。电雾式检测器（CAD）在多种不同分子量PEG均有成功的检测案例^[3]，本文首次尝试20000分子量的PEG检测，与ELSD检测性能^[2]做初步比较。

2. 实验部分

2.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000高效液相色谱仪

泵：DGP-3600RS Pump（S/N：8105493）

自动进样器：WPS-3000RS（S/N：8075877）

柱温箱：TCC-3000RS（S/N：8082117）

检测器：Corona VEO RS（S/N：8169085）

色谱软件：变色龙Chromeleon 7.3

2.2 试剂与供试品

2.2.1 试剂：乙腈、三氟乙酸（色谱级，ThermoFisher公司），超纯水（18.2 M Ω ，ThermoFisher公司纯水机）

2.2.2 PEG20K：纯水直接溶解，配制成1mg/mL储备液，稀释成系列浓度后待用。

2.2.3 聚乙二醇重组蛋白药物制剂：不做处理，直接进样。

2.3 色谱方法

色谱柱：Hypersil GOLD C8, 250 \times 4.6mm, 5 μ m, PN 25205-254630

流动相及比例：A：0.1%TFA-水；

B：0.1%TFA-乙腈，0~25min，85%A~25%A

流速：1.2mL/min

柱温：55℃

进样体积：10μL

检测器及其参数：CAD: Corona VEO RS, 5 Hz, filter 3.6 s, 50℃

3. 实验结果与讨论

3.1 色谱条件优化

实验测试发现，柱温的选择对于PEG20K色谱峰形影响很大，由于C8色谱柱耐温上限为60℃，兼顾柱效，综合考虑后最终选择55℃柱温进行实验，方法较为稳定。关于色谱柱，可以选择碳载量更低

的C4色谱柱或者耐温限度更高的色谱柱进行继续优化。

经资料调研发现，PEG作为一种聚合物，随着分子量的上升（200~20000），其熔点也不断上升（-50~62±2℃），其中PEG20K的熔点在62±2℃，且分子量分散程度较高，由此推测：在低于熔点的温度（如：25℃）下，该聚合物对固定相的吸附保留作用不同，容易导致峰展宽、峰形异常的现象；在高于熔点的温度（如：90℃）下，即使分子量存在差异，其物理特性可以保持均一稳定，从而影响其保留行为。故，采用更高柱温测试大分子量PEG具有一定的理论可行性，可以供客户参考。

图2中显示的是客户提供的3批次样品的测试结果，在PEG20K保留时间处无色谱峰出现，与标品的典型色谱图叠加可以看出，无干扰，可实现基线分离，而本次实验样品中均未检出游离PEG20K。

3.2 测定谱图

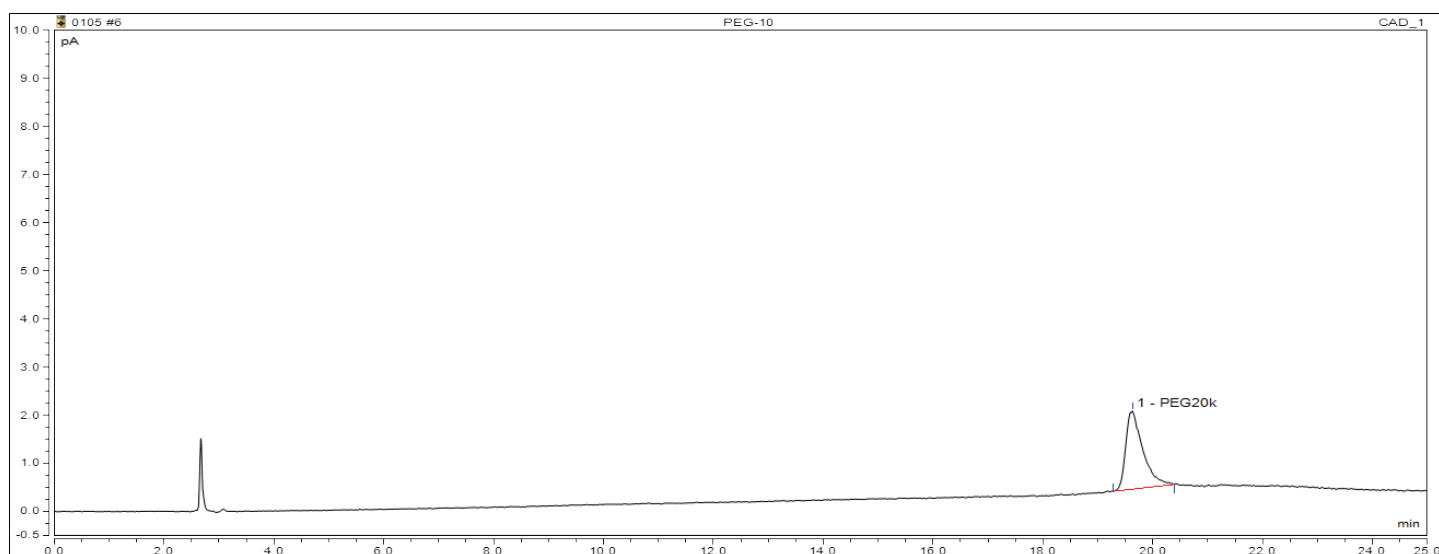


图1. PEK20K (10μg/mL) CAD典型色谱图

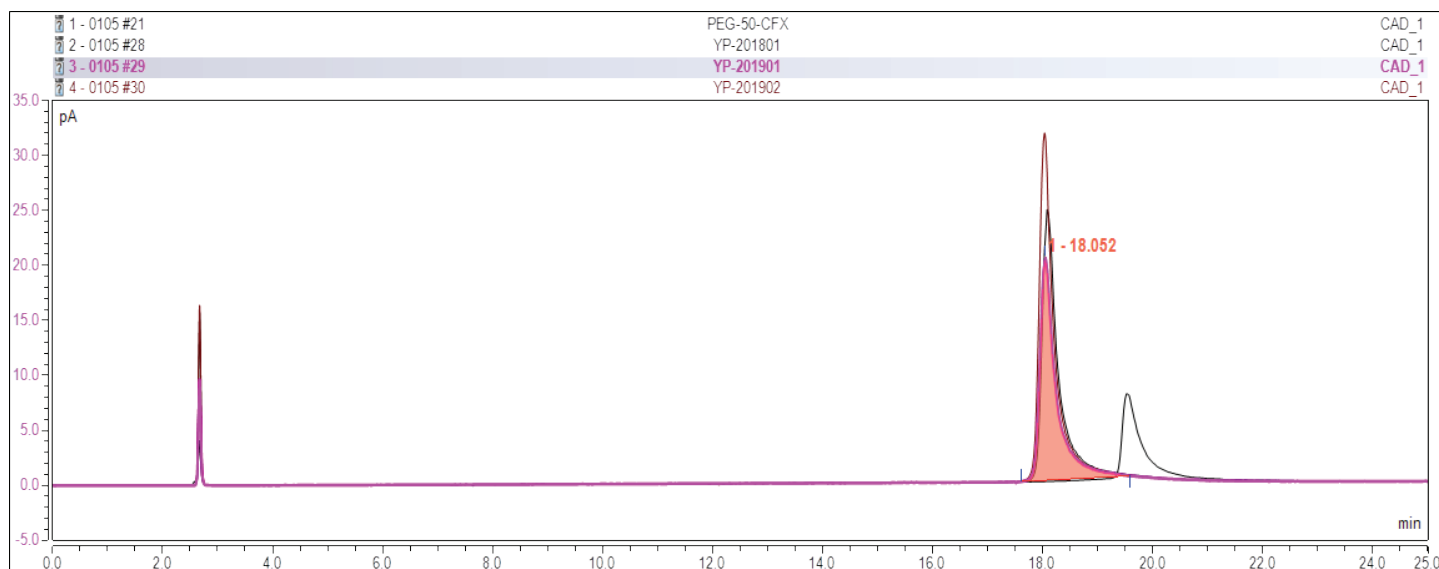


图2. 三批次样品与PEG20K的CAD叠加色谱图（选中色谱峰：聚乙二醇修饰的重组蛋白药物制剂）

3.4 方法线性范围

将PEG20K储备液（1mg/mL）稀释成10、20、30、40、50、75、100、200、250、500 μ g/mL，分别进样10 μ L，经CAD测试，结果由变色龙软件处理，可以看出PEG20K在10~500 μ g/mL范围内CAD响应值-浓度（二次）良好，结果如下。

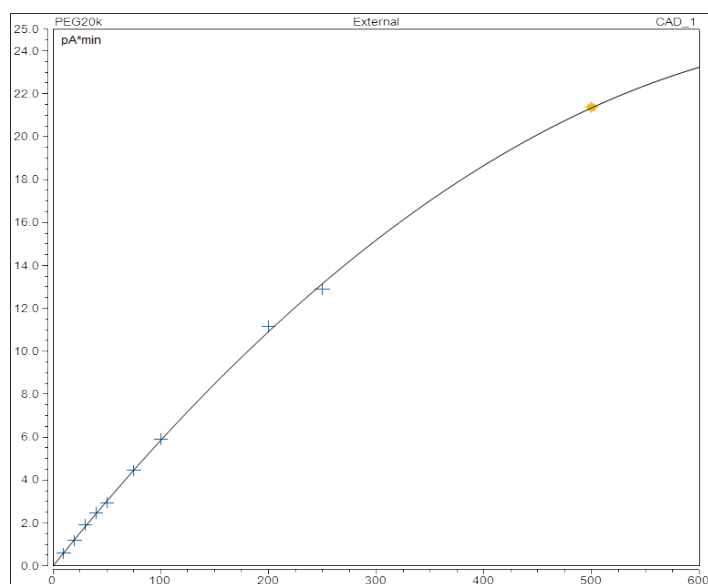


图3. PEG20K响应-浓度测试色谱图

表1 PEK20K响应-浓度测试结果

Peak No.	Peak Name	Cal.Type	Eval.Type	Number of Points	Rel.Std.Dev. %	Coeff.of Determination	C0 (Offset)	C1 (Slope)	C2 (Curve)
1	PEG20k	Quad, WithOffset	Area	10	2.2298	0.99963	0.0008	0.0625	-0.000040
Maximum					2.2298	0.99963			
Minimum					2.2298	0.99963			

ELSD方法（客户）：聚乙二醇溶液进行适当稀释后进样ELSD分析，直至聚乙二醇峰的响应值为基线噪音的3倍左右，根据该溶液中的聚乙二醇的浓度，得出其最低检测限约为2 μ g。

CAD方法（实验室）：将稀释成1 μ g/mL PEG20K进样10 μ L，经CAD测试，计算得出CAD最低检测限约为0.01 μ g（S/N=3.9），远远小于ELSD最低检测限。

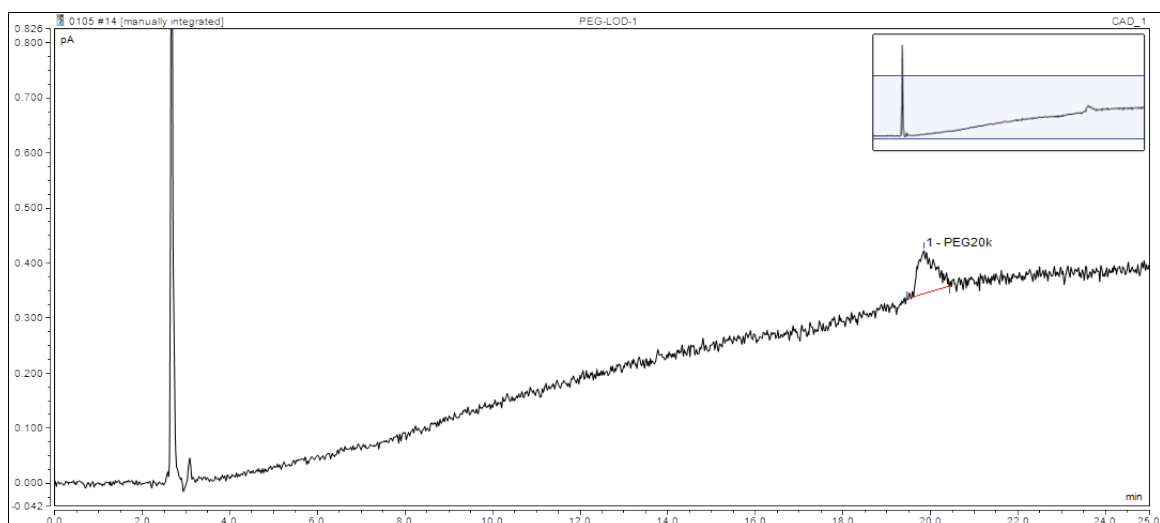


图4. PEK20K（1 μ g/mL，S/N=3.9）最低检测限测试色谱图

表2. PEG20K (1 μ g/mL, S/N=3.9) 最低检测限测试结果

Peak No.	Peak Name	Amount	Rel.Area %	Area μ A*min	Height μ A	Type	Width (50% min	Asym. EP	Resol. EP	Plates EP	S/N
1	PEG20k	0.5546	100.00	0.0355	0.08	BMB*	0.444	1.73	n.a.	11084	3.9
	Maximum	0.5546	100.00	0.0355	0.08		0.444	1.73	0.00	11084	
	Minimum	0.5546	100.00	0.0355	0.08		0.444	1.73	0.00	11084	
	Sum	0.5546	100.00	0.0355	0.08						

3.5 重复性考察

ELSD方法 (客户): 1mg/mL PEG20K, 平行进样5次, 峰面积RSD为1.42%。

CAD方法 (实验室): 50 μ g/mL PEG20K, 平行进样5次, 保留时间RSD为0.05%, 峰面积RSD为1.19%。

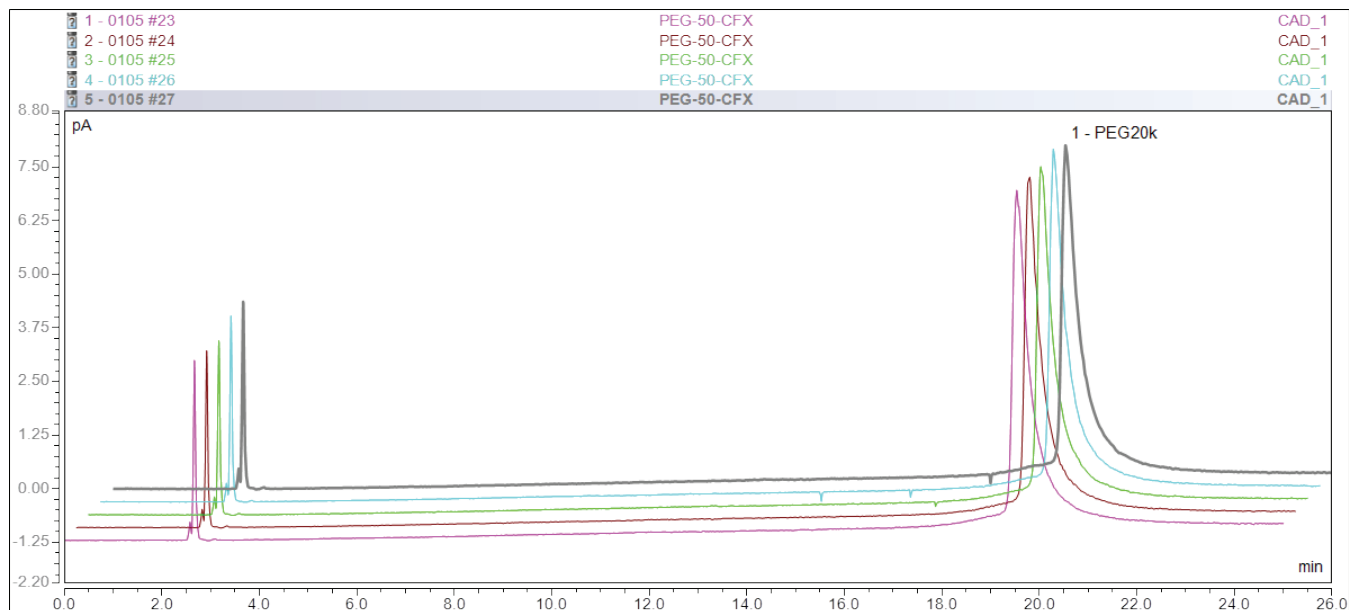


图3 PEG20K (50 μ g/mL) 重复性色谱图

表1 PEG20K (50 μ g/mL) 重复性测试结果

序号	保留时间/min	峰面积/ μ A*min
1	19.535	3.1242
2	19.552	3.2000
3	19.528	3.1108
4	19.535	3.1673
5	19.535	3.1782
RSD	0.05%	1.19%

结论

本方法基于赛默飞CAD检测器用于聚乙二醇重组蛋白药物制剂中游离聚乙二醇测定, 检测限、重复性、线性均明显优于ELSD, 辅料与主成分检出无影响, 建议用于该产品的质量控制在。

参考文献

- ^[1] EMEA/H/C/005791/0000, COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside-modified) [S] .The Netherlands: European Medicines Agency, 2021.
- ^[2] 李永红, 李响, 韩春梅,等. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定聚乙二醇干扰素 α -2a注射液中游离聚乙二醇的含量^[J]. 药物生物技术, 2014(4):353-354.
- ^[3] Kurmi M, Suryavanshi V, Panduranga NS, Jayaraman K, Bajpai L, Fish W, Hu Y, Bhutani H. Development of HPLC-CAD stability indicating assay method for polyethylene glycol-conjugated phospholipid (DMPE-PEG 2000) and identification of its degradation products. J Pharm Biomed Anal. 2021 May 10;198:113967. doi: 10.1016/j.jpba.2021.113967. Epub 2021 Feb 12. PMID: 33662758.



赛默飞
官方微信

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

Thermo Fisher
SCIENTIFIC