

电雾式检测器 (CAD) 用于聚乙二醇 (PEG) 相关衍生物的测定

崔宇 冉良骥

赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司

关键词: PEG衍生物, PEG化药物, 疫苗, CAD检测器

摘要

本文通过赛默飞Vanquish Flex超高效液相色谱仪结合质量通用型检测器-电雾式检测器 (CAD), 完成了不同类型PEG衍生物的CAD检测方法学开发, 结果表明本方法稳定性好、灵敏度高, 较宽的线性范围适用于不同浓度样品的测定, 本方法可用于疫苗、脂质纳米颗粒载药系统、PEG结合型药物等生物药中PEG相关衍生物的监测质控。

1. 引言

聚乙二醇 (PEG) 及其衍生物由于具有被蛋白和细胞吸收水平低, 对人体无毒无害无刺激等优势, 其已经从大分子蛋白质药物修饰扩展到小分子修饰给药, 又扩展到mRNA疫苗, 横跨肽、蛋白、酶、小分子、RNA 等多个领域, 极大地推动了精准治疗事业的发展。PEG衍生物是一种带有官能团的PEG, 常见类型为支链PEG、叉状PEG和多臂PEG, 以及在此基础上链接其他活性基团的PEG衍生物等, 实现多种共轭可能性, 可大大增加了载药量。目前主要应用为修饰PEG化蛋白药物、PEG化肽链型化合物、PEG化小分子药物和PEG化脂质体等方面。经PEG化修饰后的药物, 会改变药物的物理化学性质, 包括构象、静电结合、疏水性等。这些物理和化学变化可改善药物水溶性, 增加了药物的体内保留时间, 提高药物在体内的半衰期, 延长吸收时间, 还能影响药物与细胞受体的结合亲和力, 降低免疫原性, 改善肿瘤靶向性。药物经PEG修饰后可减少给药次数、提高疗效、改善耐受性、降低严重程度和不良事件发生率。同时PEG还可以增加蛋白质的溶解度和稳定性, 也有利于药物的生产和储存。因此PEG常被用作药物传递和药物修饰技术, 可以直接与药物偶联, 或附着在药物表面一起封装于纳米材料里。

PEG修饰化的药物, 脂质纳米颗粒载药系统中与脂质共轭结合的PEG载体, 疫苗等, 其中游离的PEG或相关PEG衍生物需要进行质控监测, 而且其中PEG结合药物及相关物质的浓度实时变化对于PEG化药物的药效学和毒理学研究也有着非常重要的实际意义。

2. 实验部分

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Flex超高效液相色谱仪

泵: Vanquish Binary Pump (VF-P10-A-01)

自动进样器: Vanquish Sampler FT (VF-A10-A-02)

柱温箱: Column Compartment H (VH-C10-A-03)

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: 乙腈 (色谱级, Fisher Chemical), 三氟乙酸 (色谱级, CNW), 去离子水 (Thermo纯水机)。

2.2.2 标准品及样品: 八臂聚乙二醇马来酰亚胺 (8ARM-MAL-40K, 98.5%), U型聚乙二醇NHS酯 (MPEG2-NHS-40K, 99.6%), Y型聚乙二醇NHS酯 (Y-NHS-40K, 100%), 四臂聚乙二醇 (4ARM-PEG-20K, ≥99%); 重组蛋白疫苗样品来自客户企业。

2.3 标准品溶液制备

准确称取8ARM-MAL-40K标准品, 用水溶解混匀, 稀释得到1460、730、365、146、73μg/mL 标准工作溶液;

准确称取MPEG2-NHS-40K标准品, 用水溶解混匀, 稀释得到366、244、122、61、24.4、12.2μg/mL标准工作溶液;

准确称取Y-NHS-40K标准品, 用水溶解混匀, 稀释得到212、106、53、21.2、10.6、5.3μg/mL 标准工作溶液;

准确称取4ARM-PEG-20K标准品, 用水溶解混匀, 稀释得到594、396、198、99、39.6、19.8μg/mL 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: MabPac RP柱, 4 μ m, 2.1 \times 100mm (P/N: 088647)

流动相: A: 0.1%三氟乙酸水溶液, B: 0.1%三氟乙酸乙腈,

流速: 0.3 mL/min, 梯度程序见表1:

表1. 梯度洗脱程序

| Time, min | A, % | B, % |
|-----------|------|------|
| 0 | 67 | 33 |
| 2.0 | 67 | 33 |
| 10.0 | 0 | 100 |
| 10.1 | 67 | 33 |
| 15.0 | 67 | 33 |

进样量: 1 μ L

柱温: 60 $^{\circ}$ C, 配主动预热

检测器: CAD, 雾化温度50 $^{\circ}$ C, 采集频率: 10 Hz,

过滤常数: 3.6s

3. 实验结果与讨论

3.1 标准品溶液分析测定结果

3.1.1 校正曲线测定结果

各PEG衍生物的线性色谱叠加图及校正曲线结果见图1-图8, 从结果可知, 8ARM-MAL-40K在73-1460 μ g/mL浓度范围内, MPEG2-NHS-40K在12.2-366 μ g/mL浓度范围内, Y-NHS-40K在25-1000 μ g/mL浓度范围内, 4ARM-PEG-20K在19.8-594 μ g/mL浓度范围内, 通过二次线性拟合, 结果均良好, 相关系数 R^2 均大于0.999。

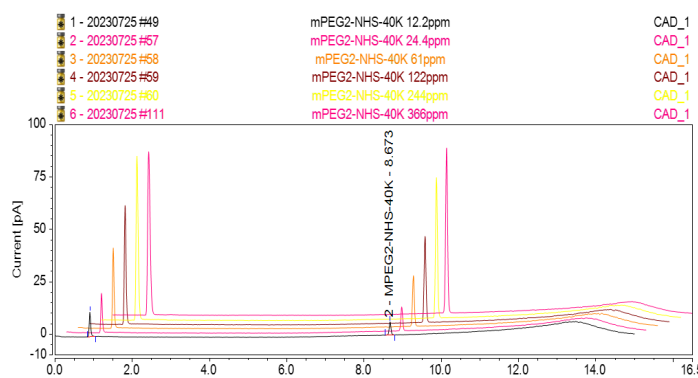


图1. MPEG2-NHS-40K混标叠加色谱图

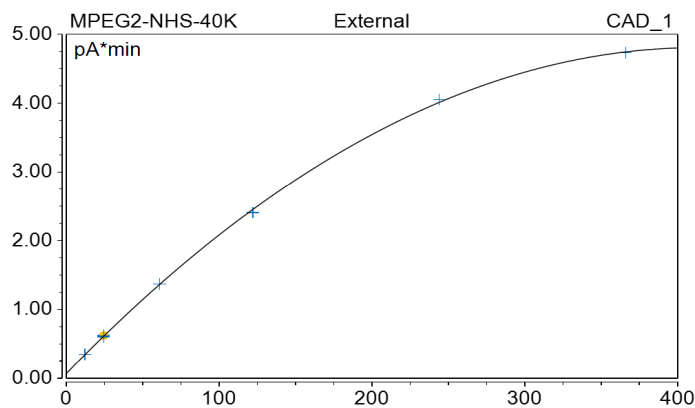


图2. MPEG2-NHS-40K校正曲线

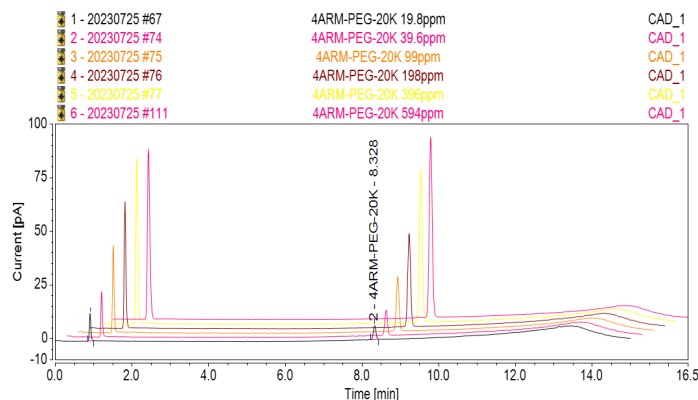


图3. 4ARM-PEG-20K混标叠加色谱图

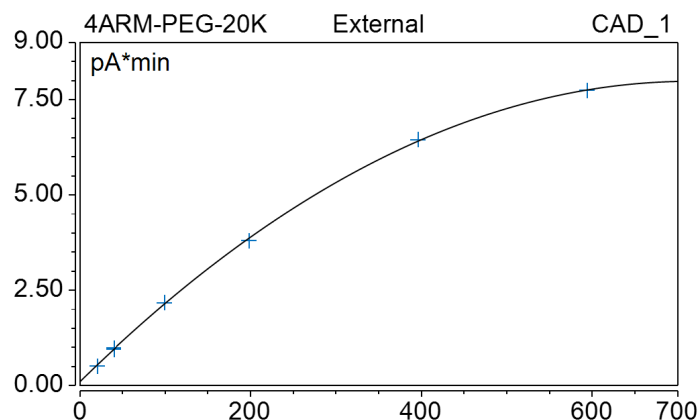


图4. 4ARM-PEG-20K校正曲线

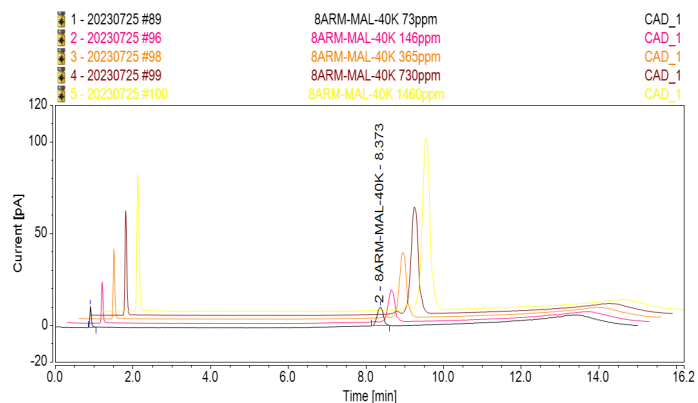


图5. 8ARM-MAL-40K混标叠加色谱图

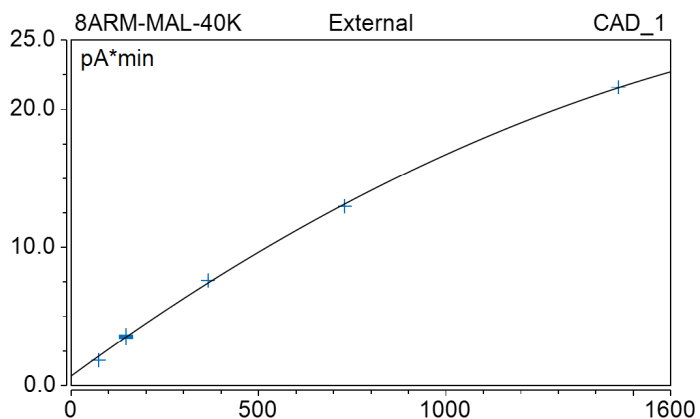


图6. 8ARM-MAL-40K校正曲线

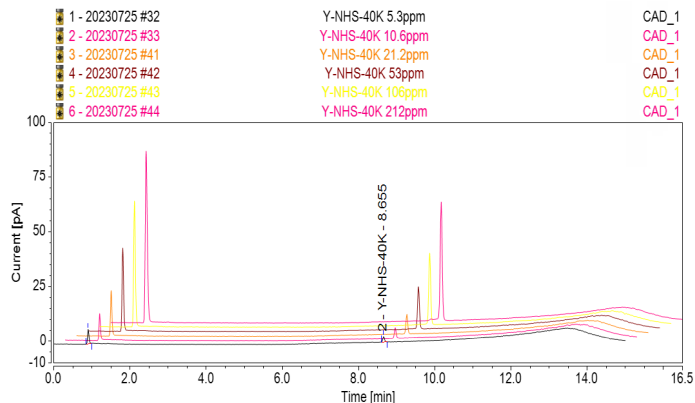


图7. Y-NHS-40K混标叠加色谱图

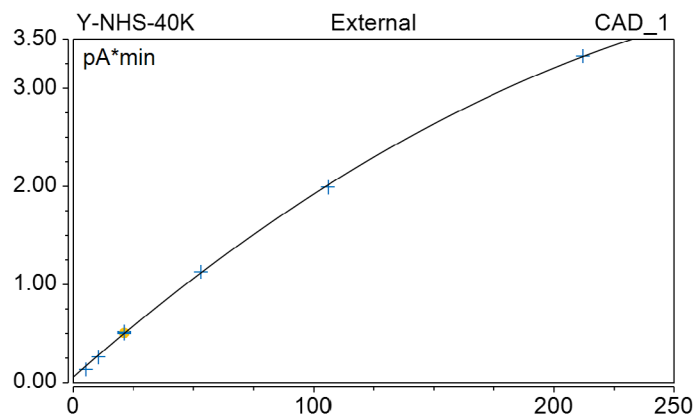


图8. Y-NHS-40K校正曲线

3.1.2 重现性测定结果

分别对浓度为24.4 $\mu\text{g/mL}$ 的MPEG2-NHS-40K, 浓度为39.6 $\mu\text{g/mL}$ 的4ARM-PEG-20K, 浓度为146 $\mu\text{g/mL}$ 的8ARM-MAL-40K, 浓度为21.2 $\mu\text{g/mL}$ 的Y-NHS-40K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9-图12, 重复性数据结果见表2-表5。从结果中可以看到, 连续6针重复进样, 保留时间RSD在0.14%范围内。峰面积RSD在1.78%范围内。

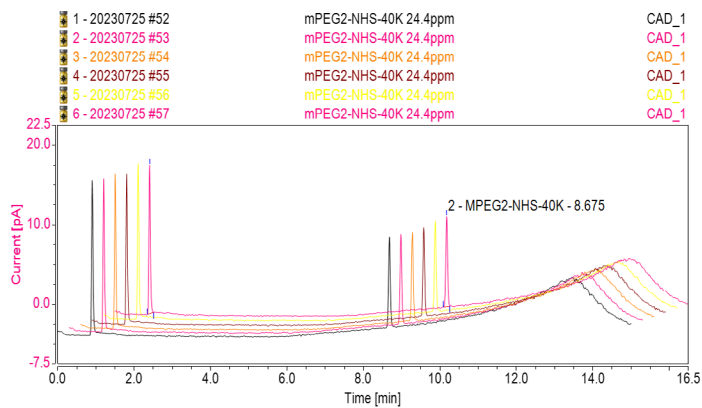


图9. 连续6针重复进样色谱图 (MPEG2-NHS-40K, 24.4 $\mu\text{g/mL}$)

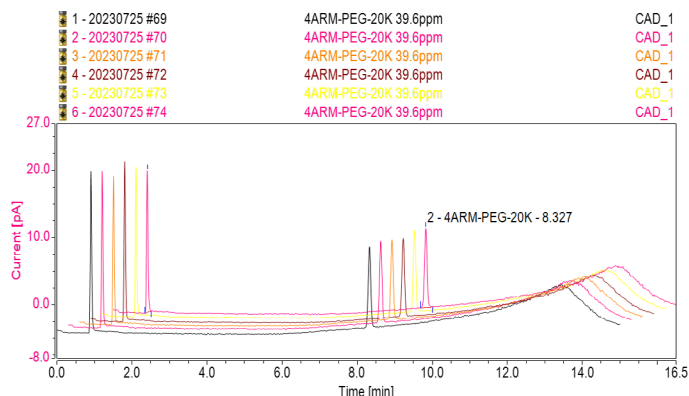


图10. 连续6针重复进样色谱图 (4ARM-PEG-20K, 39.6 $\mu\text{g/mL}$)

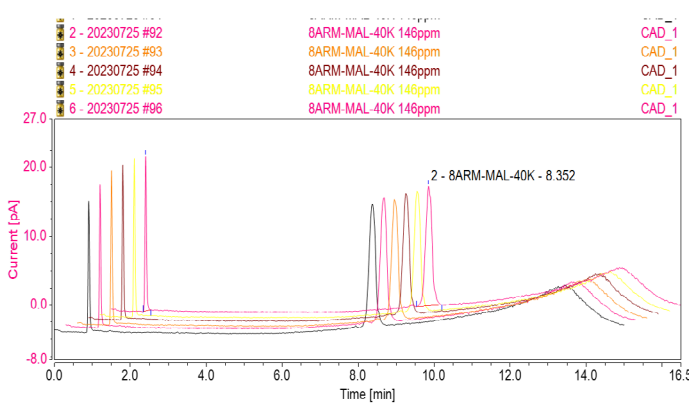


图11. 连续6针重复进样色谱图 (8ARM-MAL-40K, 146 $\mu\text{g/mL}$)

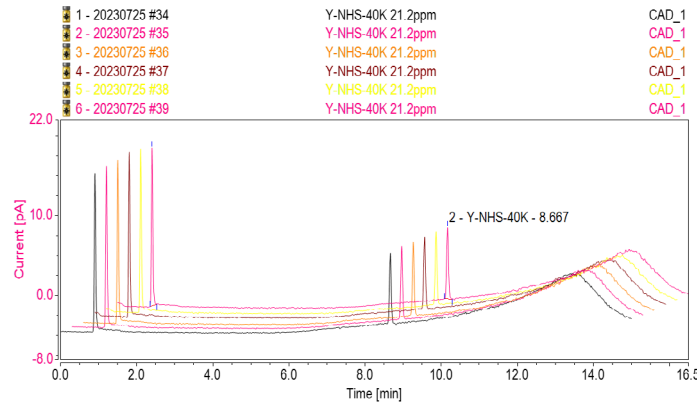


图12. 连续6针重复进样色谱图 (Y-NHS-40K, 21.2 $\mu\text{g/mL}$)

表2. 连续6针重复进样结果 (MPEG2-NHS-40K)

| MPEG2-NHS-40K | 峰面积(pA*min) | 保留时间 (min) |
|------------------|-------------|------------|
| 24.4 µg/mL连续进样6针 | 0.6235 | 8.677 |
| | 0.6174 | 8.678 |
| | 0.6202 | 8.678 |
| | 0.6017 | 8.675 |
| | 0.6151 | 8.675 |
| | 0.6182 | 8.675 |
| RSD(%) | 1.22 | 0.02 |

表3. 连续6针重复进样结果 (4ARM-PEG-20K)

| 4ARM-PEG-20K | 峰面积(pA*min) | 保留时间 (min) |
|------------------|-------------|------------|
| 39.6 µg/mL连续进样6针 | 0.9635 | 8.327 |
| | 0.9798 | 8.325 |
| | 0.9583 | 8.325 |
| | 0.9744 | 8.325 |
| | 0.9665 | 8.327 |
| | 0.9583 | 8.327 |
| RSD(%) | 0.90 | 0.01 |

表4. 连续6针重复进样结果 (8ARM-MAL-40K)

| 8ARM-MAL-40K | 峰面积(pA*min) | 保留时间 (min) |
|-----------------|-------------|------------|
| 146 µg/mL连续进样6针 | 3.5858 | 8.377 |
| | 3.6365 | 8.377 |
| | 3.4837 | 8.352 |
| | 3.5106 | 8.357 |
| | 3.5387 | 8.355 |
| | 3.4740 | 8.352 |
| RSD(%) | 1.78 | 0.14 |

表5. 连续6针重复进样结果 (Y-NHS-40K)

| Y-NHS-40K | 峰面积(pA*min) | 保留时间 (min) |
|------------------|-------------|------------|
| 21.2 µg/mL连续进样6针 | 0.5092 | 8.665 |
| | 0.5157 | 8.662 |
| | 0.5211 | 8.667 |
| | 0.5069 | 8.663 |
| | 0.5109 | 8.667 |
| | 0.5058 | 8.667 |
| RSD(%) | 1.14 | 0.02 |

3.1.3 定量限测定结果

MPEG2-NHS-40K、4ARM-PEG-20K、8ARM-MAL-40K和Y-NHS-40K在CAD检测器上的定量限 (LOQ) 为6.625-14.6µg/mL, 色谱图见图13-图16, 数据结果见表4。

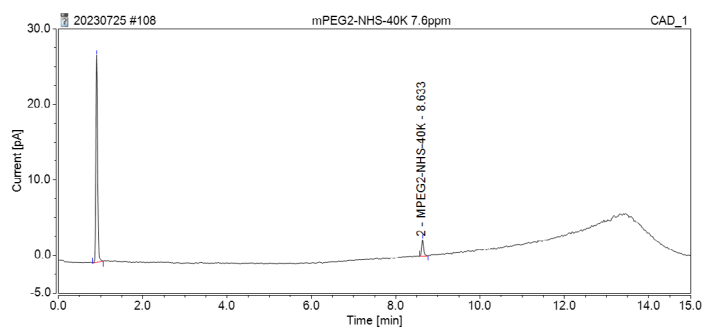


图13. MPEG2-NHS-40K色谱图 (7.6µg/mL)

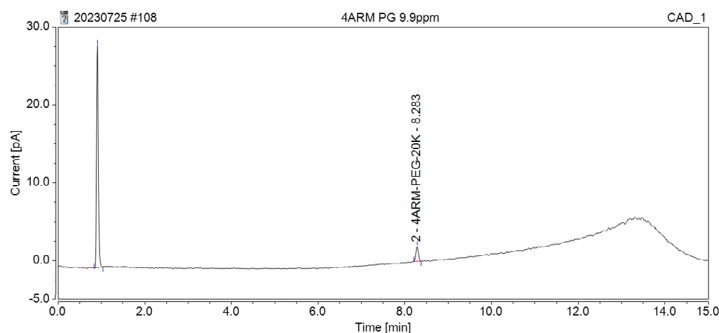


图14. 4ARM-PEG-20K色谱图 (9.9µg/mL)

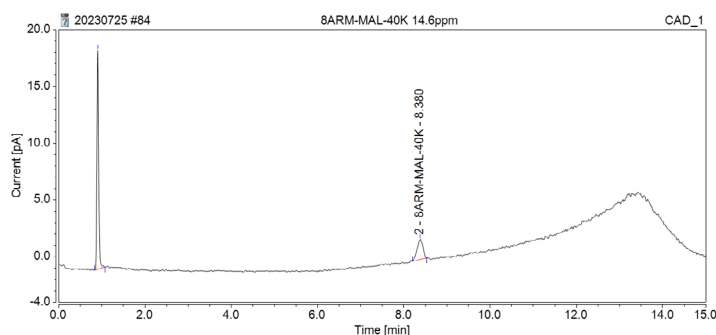


图15. 8ARM-MAL-40K色谱图 (14.6µg/mL)

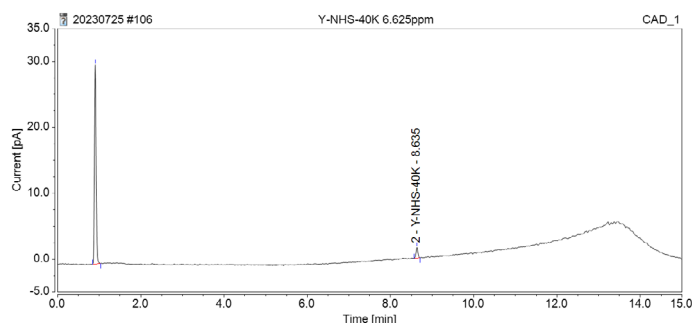


图16. Y-NHS-40K色谱图 (6.625µg/mL)

表6. 定量限测定结果

| 化合物 | LOD/LOQ (µg/mL) | 进样量 | LOD/LOQ S/N |
|---------------|-----------------|-----|-------------|
| MPEG2-NHS-40K | 2.2/7.6 | 1µl | 3.0/16.9 |
| 4ARM-PEG-20K | 3.0/9.9 | 1µl | 3.6/17.2 |
| 8ARM-MAL-40K | 3.1/7.3 | 1µl | 3.5/10.1 |
| Y-NHS-40K | 2.6/6.6 | 1µl | 4.0/15.0 |

3.2 实际样品分析测定结果

运用本文方法对PEG衍生物修饰后的重组蛋白疫苗样品进行上机分析，测定图谱见图17。结果显示：PEG修饰后的重组蛋白与游离PEG分离良好，游离PEG（MPEG2-NHS-40K）采用3.1.1中校正曲线直接线性定量，测得浓度为5.8539 μ g/mL，满足客户内控标准要求。

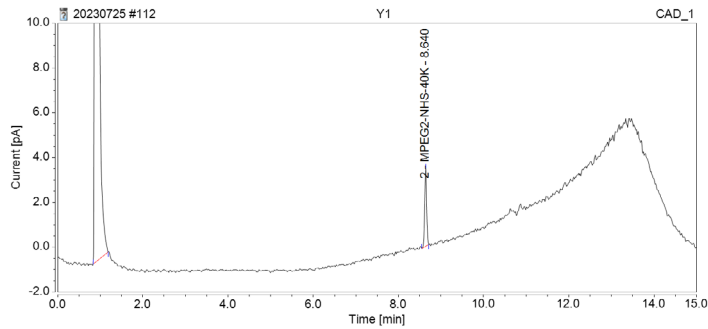


图17. 疫苗中MPEG2-NHS-40K测定结果（放大图）

结论

基于赛默飞Vanquish Flex超高效液相色谱仪结合CAD检测器，建立了不同类型PEG衍生物的CAD检测方法。本方法稳定性好、灵敏度高，线性相关系数良好。此方法今后可用于疫苗，脂质纳米颗粒载药系统，PEG结合型药物中游离PEG衍生物及其他相关物质的监测及此类产品的质控。

参考文献

- [1] 中国药典2020版第四部. 聚乙二醇.
- [2] MAbPac RP色谱柱在电喷雾检测器下测定PEG-蛋白，游离蛋白，游离PEG. 赛默飞世尔科技（中国）有限公司. AN_19019_CCS.
- [3] Kayori Takahashia, Shinichi Kinugasaa, et al. Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography (J). Journal of Chromatography A, 2008, 1193: 151-155.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific