

Vanquish Core正相色谱系统结合CAD电雾式检测器用于消泡剂二甲基硅油残留检测

沈国滨 冉良骥

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词：Vanquish Core，正相色谱，电雾式检测，消泡剂，二甲基硅油，残留检测

1 引言

在生物药生产过程中，经常会面临细胞培养液表面泡沫堆积的困扰，为避免液泛跑料，需中途暂停通气搅拌，这必然降低装罐系数，影响发酵的效率和产能。当前相对流行的做法是加入少量消泡剂，抑制泡沫生成，从而提高产能。

目前常用的消泡剂主要包括聚醚类和有机硅类。其中以二甲基硅油为代表的有机硅类由于其相对更优异的消泡性能，而被生物制药企业广泛使用^[1]。二甲基硅油作为一种常见的消泡剂，为无色或浅黄色液体，无味，透明度高，具有生理惰性、良好的化学稳定性，疏水性好，并具有很高的抗剪切能力，用作消泡剂不仅消泡迅速，且抑泡持久，添加量低，成本较小。

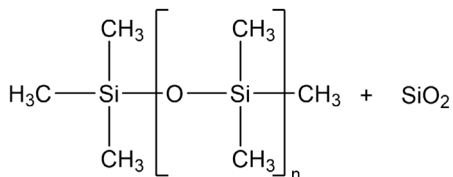


图1 二甲基硅油（Simethicone）结构

虽然二甲基硅油有上述优点，但消泡剂属于生产过程中引入的外来物质，随着药监部门对生物制剂监管的不断加强，企业在对临床试验药物开展结构确证和质量研究时，对于某些特定工艺相关杂质（如消泡剂），需要结合理论添加量和工艺清除情况对残留安全性风险进行评估^[2]。目前已有大量企业调研或开展消泡剂残留检测方案研究^[3-5]。

但基于二甲基硅油特殊的性质，导致其检测，尤其是利用液相色谱检测存在一定难点。

1. 溶解性差：二甲基硅油化学性质稳定，疏水性好，不溶于水，通常溶于氯仿、二氯甲烷、四氢呋喃等有机溶剂中。因此，使用液相色谱系统进行检测时，需要液相色谱系统能够兼容和耐受正相有机溶剂，对液相色谱系统具有很大挑战；
2. 无紫外吸收：二甲基硅油本身没有紫外吸收，无法使用紫外等需要待测物结构中含有发色团的检测器进行检测，需要寻求其他通用型检测手段；
3. 残留量低：目前对于二甲基硅油等消泡剂检测，主要为残留检测，对方法和检测器灵敏度要求很高。

赛默飞Vanquish Core正相色谱系统，能够耐受正己烷、二氯甲烷和四氢呋喃等正相试剂，同时安装了适用于正相系统的脱气机和漏液报警装置，能够帮助客户从容应对棘手的正相色谱应用。同时，赛默飞特色的通用型检测器——CAD电雾式检测器是分析无紫外和弱紫外吸收化合物的利器，具有良好的重现性和高灵敏度等特点，在制药与生物制药、食品、化工及环境等方面均有广泛应用。



图2 Vanquish Core正相色谱系统和CAD电雾式检测器

本文利用Vanquish Core正相色谱系统和CAD检测器，开发了两种二甲基硅油检测方法，为企业在二甲基硅油残留检测方面提供技术参考。

2 实验部分

2.1 仪器配置

Vanquish Core正相色谱系统，包含

基座：Vanquish System Base C VC-S01--02

泵：Quaternary Pump CN VC-P21-A-01

自动进样器：Split Sampler CT VC-A12-A-01

柱温箱：Column Compartment C VC-C10-A-03

检测器：Vanquish Charged Aerosol Detector VH-D20-A

正相包：Normal-Phase (NP) kit Vanquish Core Systems PN: 6036.3972

色谱软件：Chromeleon Chromatography Data System7.3.1

2.2 试剂与标准品

试剂：乙腈（色谱级，Merck），二氯甲烷（色谱级，CNW），四氢呋喃（不含稳定剂，色谱级，CNW），去离子水（Milli Q超纯水机），盐酸（分析纯，国药）

标准品及样品：标准品为30%二甲基硅油乳油（30% Simethicone Emulsion USP, Dow），样品为某单抗注射液，蛋白浓度2 mg/mL。

2.3 标准溶液配置

1 mg/mL二甲基硅油储备液配制^[1,4]：准确移取30%二甲基硅油乳油标准品约0.55 g至200 mL玻璃瓶中，加入41.25 mL水、165 mL二氯甲烷和200 μ L 20%盐酸溶液（用于破乳），充分振荡混匀，室温避光静置至少1小时后，取下层澄清二氯甲烷溶液，即得二甲基硅油储备液，室温避光保存于玻璃试剂瓶中。

标准工作溶液配制：取适量上述1 mg/mL二甲基硅油储备液，以二氯甲烷为稀释剂，配制0.5~50 μ g/mL的系列标准工作溶液，进样分析。

2.4 样品前处理

单抗注射液样品：取500 μ L样品，与200 μ L 20%盐酸溶液和750 μ L二氯甲烷在样品瓶中充分振荡混匀。

单抗注射液加标样品：取500 μ L样品，加10 μ L 1 mg/mL二甲基硅油储备液与200 μ L 20%盐酸溶液和750 μ L二氯甲烷在样品瓶中充分振荡混匀。

以上溶液在充分振荡后静置至少20 min，于8500转/min离心5 min，取下层澄清二氯甲烷溶液200 μ L，进样分析。

2.5 色谱条件

本文开发了两种不同流动相体系的二甲基硅油分析方法，具体色谱条件如下：

2.5.1 二氯甲烷体系

色谱柱：Acclaim C8柱，250 × 4.6 mm，5 μm（P/N：059141）

流动相：A：乙腈；C：二氯甲烷

流速：1.0 mL/min；梯度洗脱程序见表1

进样量：10 μL

柱温：40 °C（配被动预加热器，加热模式：Still Air）

CAD：蒸发温度：50 °C，采集频率：5 Hz，过滤常数：5 s，PFV=1.0

表1 二氯甲烷体系梯度洗脱程序

Time, min	A, %	B, %
0	45	55
5	15	85
10	45	55
20	45	55

2.5.2 四氢呋喃体系

色谱柱：ProSwift™ RP-1S Analytical柱，50 × 4.6 mm，SS（P/N：064297）

流动相：A：水；B：乙腈；C：四氢呋喃

流速：1.0 mL/min；梯度洗脱程序见表2

进样量：10 μL

柱温：40 °C（配被动预加热器，加热模式：Still Air）

CAD：蒸发温度：50 °C，采集频率：5 Hz，过滤常数：5 s，PFV=1.0

表2 四氢呋喃体系梯度洗脱程序

Time, min	A, %	B, %	C, %
0	50	50	0
0.5	50	50	0
0.6	0	100	0
5	0	100	0
5.1	0	20	80
10	0	20	80
10.1	50	50	0
15	50	50	0

3 结果与讨论

3.1 色谱柱筛选

3.1.1 二氯甲烷体系

针对乙腈-二氯甲烷体系流动相，考察了Biobasic-4（2.1×100 mm，5 μm）、Hypersil Gold C4（4.6×150 mm，5 μm）、Accu-core C8（4.6×100 mm，2.6 μm）和Acclaim C8（4.6×250 mm，5 μm）四款柱子。其中Biobasic-4在CAD上柱流失较大，背景较高，灵敏度较差，无法满足二甲基硅油残留检测需求。而Hypersil Gold C4和Accucore C8柱在此流动相体系下二甲基硅油峰形较差。相对而言，Acclaim C8柱在峰形和灵敏度方面均表现更优，故选择Acclaim C8在乙腈-二氯甲烷体系流动相下进行实验。

3.1.2 四氢呋喃体系

针对乙腈-四氢呋喃体系流动相，考察了MabPac-RP（2.1×100 mm，4 μm）、ProSwift-RP-1S Analytical（50 × 4.6 mm，SS）和Accucore C18（4.6×150 mm，2.6 μm）三款柱子。其中MabPac-RP虽然在峰形和灵敏度等方面均有较好表现，但其无法长期耐受高比例四氢呋喃流动相，在使用80%四氢呋喃流动相进行检测过程中发现柱压持续升高现象。而Accucore C18柱，二甲基硅油峰形差，灵敏度较差。最终选择ProSwift-RP-1S Analytical柱，该色谱柱是专门为生物分子分析设计的反相整体柱，柱反压低，且可以耐受高至80%的四氢呋喃，同时二甲基硅油峰形和灵敏度方面均较好。

3.2 两种方案结果比较

3.2.1 线性与灵敏度

两个方法体系下典型的二甲基硅油谱图见图3。其中四氢呋喃体系，由于梯度变化快，梯度变化导致的系统峰会在二甲基硅油出峰位置形成干扰，故需通过扣除空白的方式消除梯度带来的系统峰影响，本文中如无特别说明，均是扣除空白后的谱图。两种方法下，二甲基硅油响应良好，在1~50 μg/mL浓度范围内，具有良好的线性（二次函数拟合），相关系数R²值均在0.999以上。方法灵敏度较高，方法检出限均在0.3 μg/mL左右，结果见表3。

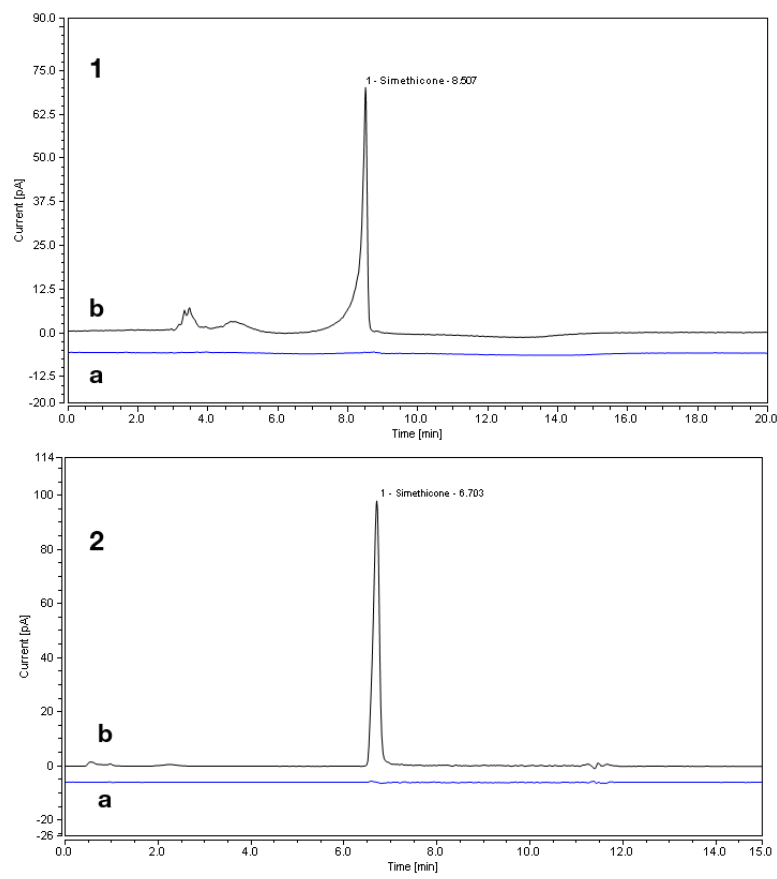


图3 二甲基硅油典型谱图

（1. 二氯甲烷体系，2. 四氢呋喃体系；a. 溶剂空白；b. 50 μg/mL二甲基硅油标准品）

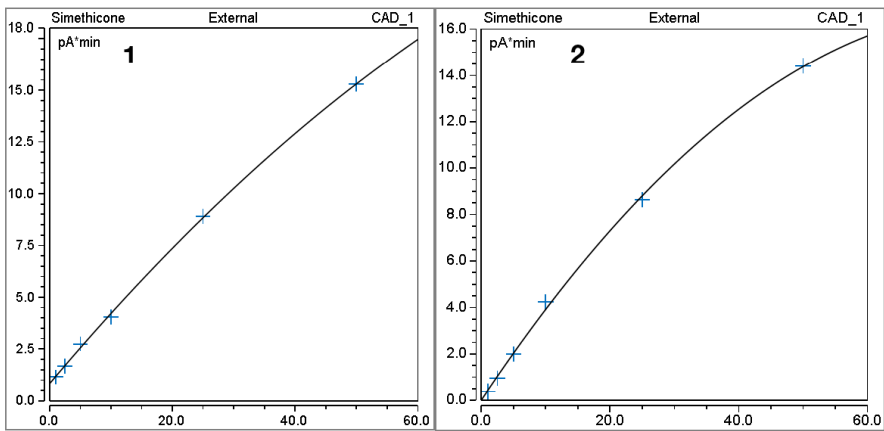


图4 线性（1~50 μg/mL；1. 二氯甲烷体系，2. 四氢呋喃体系）

表3 线性及灵敏度结果

二甲基硅油	保留时间, min	线性范围, µg/mL	线性方程	相关系数 R ²	检出限, µg/mL
二氯甲烷体系	8.5	1~50	Y=-2.579E-03x ² +0.4162x+0.0163	0.9990	0.32
四氢呋喃体系	6.7	1~50	Y=-1.235E-03x ² +0.3514x+0.8306	0.9995	0.38

3.2.2 重复性

两种方法重复性表现均良好，如图5和表4所示，以10 µg/mL对照品为例，连续进样6针，保留时间RSD均小于0.1%，峰面积RSD均小于2.0%。

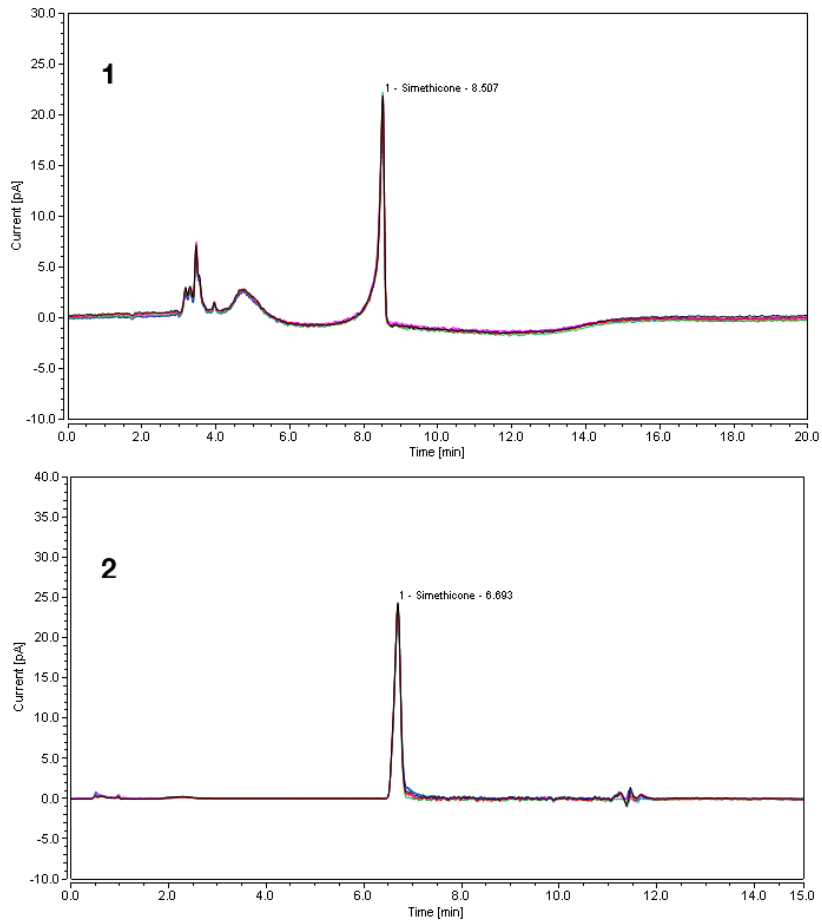


图5 重复性谱图（10 µg/mL，n=6；1. 二氯甲烷体系，2. 四氢呋喃体系）

表4 重复性结果（10 µg/mL，n=6）

RSD，%	保留时间	峰面积
二氯甲烷体系	0.08	1.62
四氢呋喃体系	0.03	1.96

3.2.3 样品检测结果

以四氢呋喃体系为例，对抗注射液样品进行分析，谱图如图6所示。样品中未检出二甲基硅油残留，样品的加标回收率在93.1~105.9%之间。样品前处理过程中，样品和萃取剂二氯甲烷的比例可根据需求进行适当调整，以满足定量和回收率要求。另外，方法检出限可通过调整萃取量或结合浓缩等步骤，进一步提高。

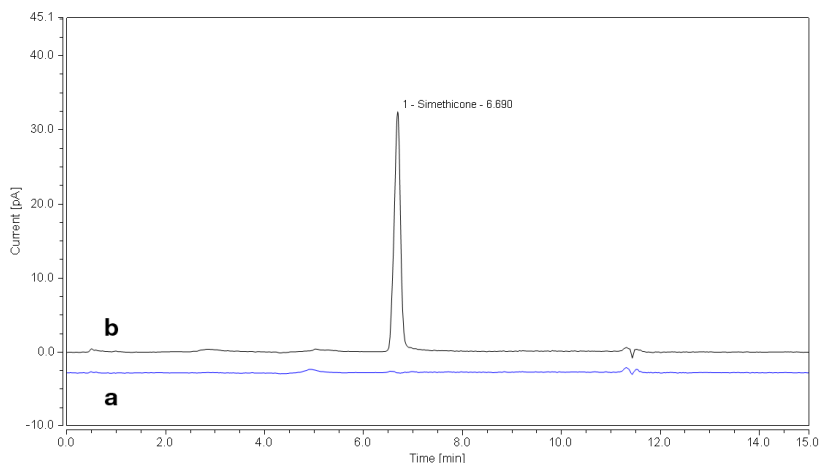


图6 单抗注射液样品检测谱图 (a. 样品, b. 样品加标, 加标量13.3 $\mu\text{g/mL}$)

3.2.4 两种方案结果对比

对比两种检测方案结果, 两种方法在线性、重复性等方面均表现良好, 灵敏度相当。峰形方面, 四氢呋喃体系峰形更对称, 更尖锐, 但四氢呋喃体系流动相变化较快, 有明显梯度峰, 故需要进行扣空白处理。另外, 四氢呋喃体系使用的ProSwift-RP-1S Analytical柱, 其具有的较大孔径分布和低背压特性, 使得其更适用于大分子蛋白生物样品中残留二甲基硅油的检测。

4 结论

本文开发了两种不同流动相体系的二甲基硅油分析方法, 两种方法在线性、重复性等方面均表现良好, 灵敏度相当。客户可根据样品性质, 选择合适的色谱柱和对应的分析方法进行二甲基硅油检测。Vanquish Core正相色谱系统良好的正相兼容性, 结合CAD检测器高灵敏度, 可以满足相关企业在原辅料和工艺控制过程中对于消泡剂二甲基硅油残留检测的要求, 为客户应对临床试验药物质量研究提供可靠的技术支持。

参考文献

- [1] Douglas E Moore. A RP-LC method with evaporative light scattering detection for the assay of simethicone in pharmaceutical formulations[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 30:273-278.
- [2] Song Lina. General Chemistry Manufacture and Control (CMC) issues during Investigational New Drug(IND) application of innovative monoclonal antibody products[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2021, 37(10):1301-1304.
- [3] 柯志. 一种抗体药物中有机硅消泡剂的残留检测方法[P]. CN 114720573 A, 2022.
- [4] 常志远. 一种检测重组蛋白产品收货液、中间体、原液中二甲基硅油消泡剂残留的分析方法[P]. CN 116448928 A, 2023.
- [5] Marc Plante. PN70538-Analysis of Silicone Oils by High Performance Liquid Chromatography and Corona Charged Aerosol Detection. Thermo Scientific, 2013.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific