

# 岛津生物药整体解决方案（四） ——生物药杂质和辅料分析篇



# 前言

近 20 年来，以基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程为代表的现代生物技术发展迅猛，并日益影响和改变着人们的生产和生活方式。目前，人类 60% 以上的生物技术成果集中应用于医药工业，用以开发特色新药或对传统医药进行改良，由此引起了医药工业的重大变革，生物技术药物得以迅速发展，生物制药行业成为最活跃、进展最快的产业之一。

生物技术药物是指采用 DNA 重组技术或其他创新生物技术生产的治疗药物，采用生物工艺、分离纯化技术制备并以生物学技术和分析技术控制中间产物和成品质量，常见的生物技术药物有重组蛋白（单克隆抗体、细胞因子、融合蛋白、激素、酶、多肽药物等）、基因/细胞治疗药物（病毒载体类基因治疗药、非病毒载体类基因治疗药、小核酸药物、细胞治疗产品）等。生物技术药物大多由微生物或哺乳动物细胞制备而来，具有复杂的分子结构，其生产涉及诸多生物学过程，如发酵、细胞培养、目的产物的分离纯化等，在这些生产过程中，目标产品容易受到各种生物或理化条件等的影响，因此质量控制标准与检测方法在生物技术药物研发中占有举足轻重的位置。近年来，国际上药品监管理念不断发生深刻变化，从“药品质量通过检验检测控制来实现”到“药品质量通过生产过程控制来实现”，进而又发展到“药品质量是通过良好的设计而生产出来的”（即“质量源于设计（QbD）”理念）。这些变化意味着药品从研发开始就要考虑最终产品的质量。在配方设计、工艺路线确定、工艺参数选择、物料控制等各个方面都要进行深入研究，积累丰富的数据，并依此确定最佳的产品配方和生产工艺，最终确保产品的安全、有效和质量可控。

生物技术药物质量研究主要包括分析方法的开发建立、理化特性分析、生物学活性测定、生产工艺的优化及稳定性评价、残留杂质检测、制剂相关的安全性研究、产品的配方及保存运输条件的确定等几个方面，其中任何环节的疏忽都可能对终产品的安全性和有效性产生影响。例如，在细胞培养过程中为消除泡沫而加入的消泡剂，不仅对细胞的生理产生不利影响，也会影响人体健康；蛋白质药物生产、贮藏、运输等过程中产生的聚集体则会导致药物失活，甚至引起严重不良反应；表面活性剂等药用辅料的品种与用量，直接与生物药临床用药安全性与毒副作用息息相关。因此，质量研究应贯穿生物技术产品的整个研发过程。通过质量研究可以对产品的性质有更全面的了解，确定产品的关键质量属性，并根据产品本身的变异及检测方法的精密度和稳定性确定相应的质控标准。因此，质量研究是质量控制的前提和基础，可在一定程度上促进质控水平的提高并不断完善质量标准。

岛津公司作为全球著名的分析仪器综合生产厂商，始终秉承“以科学技术向社会做贡献”的创业宗旨，紧跟生物药行业发展，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术，继推出《岛津生物药整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》后，细化生物技术药物研究领域，推出《岛津生物药整体解决方案（四）—生物药杂质和辅料分析篇》，重点介绍生物技术药物在质量研究与控制中涉及到的分析检测方法与应用实例，供广大制药行业从业人员参考。

# 目 录

<b>第一章 我国生物技术药物质量控制相关法规和技术指南 .....</b>	<b>1</b>
<b>第二章 浸出物与工艺杂质分析 .....</b>	<b>3</b>
1 利用 LCMS-8050 定量分析单抗生产用一次性细胞培养袋浸出物 .....	4
2 LCMS-8050 应用于单抗包材中浸出物的测定 .....	8
3 利用电感耦合等离子体发射光谱仪测定单抗药物中消泡剂残留量 .....	14
4 LCMS-8050 定量测定 Fc 融合蛋白药物原液中的杂质氢化可的松 .....	17
5 LCMS-8050 定量测定 Fc 融合蛋白药物原液中的杂质亚叶酸钙 .....	22
6 ICPMS-2030 测定蛋白药物中的杂质元素含量 .....	28
7 ICPMS-2030 测定缩宫素注射液中的元素杂质 .....	32
8 ICP-MS 法测定人血白蛋白中铝残留量 .....	37
9 石墨炉原子吸收法测定人血白蛋白中铝的残留量 .....	40
<b>第三章 聚集体与不溶性微粒分析 .....</b>	<b>44</b>
1 采用岛津 NEXERA BIO 生物兼容液相系统进行 Fc 融合蛋白的多聚体分析 .....	45
2 利用岛津 NEXERA BIO 生物兼容液相系统进行贝伐单抗生物类似药的多聚体分析 .....	51
3 NEXERA BIO 生物兼容液相色谱系统用于阿达木单抗的聚集体分析 .....	54
4 使用 AGGREGATES SIZER 测定不同压力条件下蛋白质的聚合物 .....	58
5 使用 AGGREGATES SIZER (带温控功能) 进行蛋白质稳定性的加速试验 .....	60
6 动态颗粒图像分析系统 ISPECT DIA-10 测试生物药中不溶性颗粒的粒度、粒形和颗粒圆度 .....	63
7 岛津动态颗粒图像分析系统 ISPECT DIA-10 测试干扰素样品中的不溶性微粒 .....	68
<b>第四章 药用辅料分析 .....</b>	<b>76</b>
1 LC-MSMS 定量重组人白介素中十二烷基硫酸钠 .....	77
2 应用 GC-FID 法分析聚山梨酯 80 中的脂肪酸含量 .....	84
3 GCMS 结合 SPME ARROW 定性分析吐温降解产物 .....	88
4 应用 MALDI-7090 检测聚乙二醇 PEG23000 的分子量及分布 .....	92
5 应用台式 MALDI-TOF 对注射剂中辅料吐温 80 进行降解评价 .....	95

# 第一章 我国生物技术药物质量控制相关法规和技术指南

近年来，随着生物技术的不断发展、新产品的不断出现，生物技术药物质量研究和控制也不断提高和完善。一般而言，质量研究是质量控制的前提和基础，而质量控制包括检测方法、标准物质和质量标准三大基础要素。在建立生物技术药物质量标准的工作中，质量控制检测方法和有关标准物质是生物药物质量标准的重要技术支撑，全面完善的质量标准是保证生物技术药物安全性与有效性的必备条件。

为指导和规范生物技术药物的研究与评价工作，推动生物医药行业健康发展，作为我国药物综合管理机构——国家食品药品监督管理总局（NMPA）针对生物技术药物质量控制，先后出台了若干法规和技术指南，并紧跟国际前沿、不断完善条例标准、引进成熟技术应用于生物技术药物的质量控制，使得药物安全性得到进一步提高。这些法规和技术指南均是我国生物技术药物质量控制研究的重要指导依据，为生物技术药物杂质与辅料分析提供了强有力的指导和技术支撑。

表 中国生物技术药物质量控制相关法规和技术指南

名称	颁布时间
《中国药典》(2020 版)	2020 年 6 月 24 日
《生物制品检验技术操作规范》	2019 年 8 月 1 日
细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）	2017 年 12 月 22 日
干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）	2015 年 7 月 31 日
生物制品稳定性研究技术指导原则	2015 年 4 月 15 日
生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）	2015 年 2 月 28 日
药品注册管理办法附件 3（生物制品注册分类：治疗用生物制品）	2007 年 7 月 10 日
生物制品质量控制分析方法验证技术一般原则	2005 年 12 月
进口药品注册检验指导原则	2004 年 6 月 25 日
人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则	2003 年 3 月 20 日
人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则	2003 年 3 月 20 日
人用单克隆抗体质量控制技术指导原则	2003 年 3 月 20 日
人用重组 DNA 产品质量控制技术指导原则	2003 年 3 月 20 日

为促进我国生物制药产业的健康、有序发展，NMPA 在借鉴世界卫生组织和国内外相关指导原则及国际生物类似药成功研发案例的基础上，结合我国生物药研发的实际情况和具体国情，于 2015 年 2 月 28 日发布了关于《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》的通告。在该指导原则中，与质量控制研究较为相关的“药学研究和评价部分”明确指出分析方法上，应采用先进的、敏感的技术和方法对产品进行质量特性分析。对某些关键的质量属性，应采用多种方法进行比对试验研究，建立合适的质量标准，并开展稳定性研究。《指导

原则》的发布，标志着我国对生物类似药的评价管理工作有了可供遵循的基本原则，为进一步规范此类药物的研发，提高其安全性、有效性和质量控制水平奠定了良好基础。

NMPA 于 2020 年 6 月 24 日正式颁布《中国药典》2020 年版。生物技术产品作为药典三部重要组成部分，在生物技术产品相关生物制品通则、生物技术产品相关总论、生物技术产品各论、生物技术产品相关通则等方面均进行了增修订。

新增情况：通则部分，药典新增通用技术要求“生物制品病毒安全性控制”。总论部分，药典新增制定了人用聚乙二醇化重组蛋白及多肽制品总论、人用基因治疗制品总论。该总论对基因治疗产品的过程控制、终产品检测等环节提出基本要求和指导。此外，2020 年版药典还新增了 3 个与生物技术产品密切相关的通则，分别是康柏西普效价测定法、单抗电荷变异体测定法和单抗 N 糖谱测定法。

修订情况：总论部分，基于国外技术要求和监管中发现的问题，2020 年版药典对人用重组 DNA 技术产品总论和人用重组单克隆抗体产品总论进行了修订，主要评估了异常毒性检查项目的必要性，并修订完善关于生产工艺和质控要求，如原液合批、制品检定等相关内容。通则部分，药典主要对单抗分子大小变异体（聚集体和碎片等）测定法和外源性 DNA 残留量测定法进行了修订。单抗分子大小变异体测定法主要增加了仪器设备和检测试剂的可选择性。其中仪器设备，在原有紫外检测器的基础上，添加了二极管阵列检测器，检测波长由 214 nm，新增为 214 nm 或 220 nm；检测试剂，在原有种类基础上，添加规定试剂的等效缓冲液或其他适宜浓度溶液可作为检测试剂。这些修订内容，较大程度地适应多样化生物技术产品的检测需求，使检测方法更加切实、灵活。

生物医药技术发展迅猛，各种新技术、新产品不断出现，生物技术产品相关标准不断提高，国家与相关机构的多项法规和技术指南也会随着不断提出与完善。这些相关法规提出，为保证我国生物技术产品的安全有效发挥重要作用，同时为创新型生物技术产品的研发发挥重要的技术指导作用，促进整体生物技术产业的发展，保障公众的用药安全。

## 第二章 浸出物与工艺杂质分析

生物药物在合成、储存等过程中，极易引入各种杂质。按照来源不同，生物药物杂质可以分为外来污染物和与产品相关杂质两大类，其中外来污染物包括微生物污染、热原、细胞成分、培养基中的成分、来自生产过程中各步骤的物质以及来自纯化步骤的物质等。大部分杂质不但没有药物疗法，反而具有一定的毒副作用。杂质含量的多少最终对药物的生物学活性、安全性、稳定性均会产生影响。因此，在药物开发过程中，对杂质进行鉴别、定量、定性和控制至关重要，可反映产品工艺的稳定性。

由塑性或弹性材料制造的过滤器、容器和其他组件等一次性塑料系统，广泛使用在生物技术药物的容器封闭、生产、输送和包装等过程。当这些组件与工艺中间体或最终药品直接接触时，会迁移一些化合物进入到溶液中，形成浸出物。这些浸出物可影响生产工艺效率（如抑制细胞生长）或成为工艺相关的药品杂质，从而潜在影响药品质量与患者安全。世界各地的 GMP 指南都要求与药品接触的表面不应具有反应性、添加性或吸收性的物质，以致药品的安全性、强度、纯度或质量发生改变而不符合官方要求或其他法规规定因此，对药品可浸出物的定性、定量以及毒理学评估，对产品安全性控制都非常重要。另外，为了提高药物产量、保证生产过程安全性等因素，生物药生产会在细胞培养过程中加入激素、消泡剂等物质。然而，这些物质的加入为后续生产引入了新成分，而且有些物质的残留会影响生物药的药效，甚至危害人体。鉴于国家对生物药生产工艺的监管越来越严格，有必要开发一系列的工艺杂质残留分析的检测方法。

有机质谱法作为含量测定的有力手段，具有准确、快速、重复性好、测定范围广等特点，可以针对常见的浸出物、药物杂质等建立高灵敏度、有效快速的监测方法，评价生产工艺安全性，也适用于红色警戒化合物或是有明确毒副作用化合物的筛查和定量检测，其在生物技术药物定量方面的应用近年来受到越来越多的关注。ICP-OES、ICP-MS、GFAAS 作为高灵敏度的元素分析手段，在检测药物中对人体有害的重金属含量或药物包材中的重金属等元素分析领域中应用广泛。本章节将对岛津液质、光谱及痕量元素分析产品对生物技术药物生产工艺中可浸出物与相关工艺杂质分析的应用案例进行介绍，为生物技术药物杂质分析提供可靠技术手段。

# 1 利用 LCMS-8050 定量分析单抗生产用一次性细胞培养袋浸出物

**摘要：**本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统定量分析单抗生产用一次性细胞培养袋浸出物抗氧化剂双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯（简称 bDtBPP），线性浓度范围内（1 ng/mL~100 ng/mL）线性相关性良好，相关系数为 0.9998，准确度在 97.9~104.6%之间。该方法分析速度快、稳定性和准确度高，可用于生物药生产用一次性培养袋中抗氧化剂 bDtBPP 的定量分析。

**关键词：**LCMS-8050 单抗 一次性培养袋浸出物 抗氧化剂

现代生物技术一般认为包括基因工程技术、细胞工程技术、酶工程技术和发酵工程技术，而这些技术的发展，尤其是在医药领域的发展，几乎都与细胞培养密切相关。比如基因工程药物或疫苗在研究生产过程中很多是通过细胞培养来实现的；细胞工程中更是离不开细胞培养，杂交瘤单克隆抗体，完全是通过细胞培养来实现的。正在倍受重视的基因治疗、细胞治疗也要经过细胞培养过程才能实现，发酵工程和酶工程有的也与细胞培养密切相关。总之，细胞培养在整个生物技术产业的发展中起到了关键作用。

为了提高生产工艺的灵活性，并减小厂房占地面积等，目前很多生物药企业会使用一次性使用系统（SUS），例如用一次性细胞培养袋代替传统的不锈钢设备。但是这些一次性聚合物材料中的化合物可能会在不同阶段以浸出物形式进入生产过程中，可能会影响生产效率（如抑制细胞生长）或成为工艺相关的药品杂质，从而潜在影响药品质量和患者安全。因此为了保证产品的质量和产量符合要求并确保生产工艺的最优化，非常有必要对一次性培养袋浸出物进行分析。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统定量分析单抗生产用一次性细胞培养袋浸出物抗氧化剂双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯（简称 bDtBPP）。该方法方便、快捷、准确度高，供生物药相关用户参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器	： CBM-20A	在线脱气机	： DGU-20A5
输液泵	： LC-30AD×2	质谱仪	： LCMS-8050
自动进样器	： SIL-30AC	色谱工作站	： LabSolutions Version 5.97
柱温箱	： CTO-20A		

## 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack Scepter C4-300 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9  $\mu$ m); P/N: 227-31175-

03

流动相: A相- 10 mM 甲酸铵+0.1%甲酸水溶液; B相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 1  $\mu$ L

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 50%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.0	Pump	B.Conc	95
3.0	Pump	B.Conc	95
3.1	Pump	B.Conc	50
4.0	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI-

接口温度: 300°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

DL 温度: 250°C

干燥气流速 : 10.0 L/min

驻留时间: 100 ms

加热气流速 : 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

加热模块温度: 400°C

MRM 参数: 见表 2

表 2. 抗氧化剂双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯 MRM 参数

CAS 号	中文名	英文名	前体离子 m/z	产物离子 m/z	CE(v)
69284-93-1	双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯	Bis(2,4-di-tert-butylphenyl)-	473.30	205.25	47
		phosphate		457.30	47

## 2. 样品前处理

吸取 200  $\mu$ L 细胞上清液样品到新的离心管中, 然后加入 400  $\mu$ L 乙腈, 涡旋使充分混匀, 室温下离心 15 分钟 (15000 rpm), 吸取上清液上机分析。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1 bDtBPP 标准品色谱图

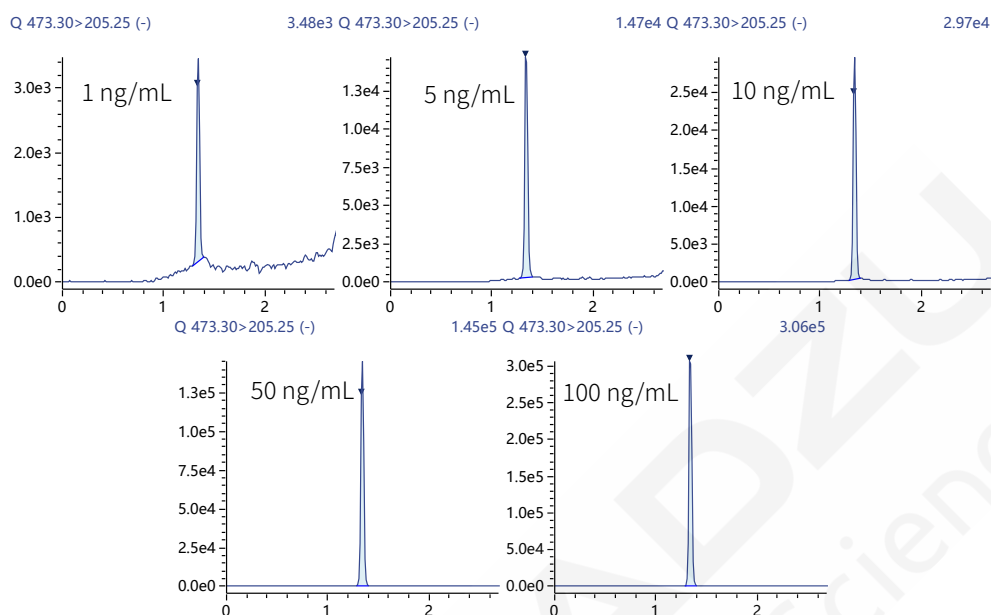


图 1. bDtBPP 标准品色谱图

#### 3.2 bDtBPP 标准曲线相关信息

采用外标法建立标准曲线，结果如表3所示。结果显示，bDtBPP在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数为0.9998，准确度在97.9~104.6%之间（表3）。

表 3. bDtBPP 标准曲线相关参数（采用 1/C 加权）

目标物	校准曲线	相关系数 R	准确度%
bDtBPP	$Y = (5950.19)X + (121.417)$	0.9998	97.9~104.6%

#### 3.3 精密度和准确度测定

取标准曲线中 5 ng/mL 的浓度点进行精密度和准确度测定，数据统计分析结果如表 4 所示。连续 6 针进样的峰面积比 RSD 小于 2.0%，准确度在 100.7~102.9%之间（表 4）。

表 4. bDtBPP 精密度测定结果（5 ng/mL）

目标物	峰面积	计算浓度 (ng/mL)	准确度
bDtBPP	30,082	5.035	100.7
	30,735	5.145	102.9
	30,070	5.033	100.7
	30,078	5.035	100.7
	30,190	5.053	101.1
	30,943	5.180	103.6
	30,082	5.035	100.7
RSD%	1.27	1.28	

### 3.4 实际样本测定结果

某单抗生产工艺中采用一次性细胞培养袋，对细胞培养过程中不同时间点的 10 个细胞上清液样品进行定量分析，结果如下表所示。表中“处理样品检测结果”表示细胞上清液样品按照第“2”部分的前处理步骤处理后直接分析得到的结果；该结果经过计算（\*稀释倍数 3）得到“原细胞培养上清液中检测结果”。

表 5. 细胞培养上清液样本检测结果

样品名称	处理后样品检测结果 (ng/mL)	原细胞培养上清液中检测结果 (ng/mL)
S1	39.515	118.545
S2	22.852	68.556
S3	29.135	87.405
S4	14.991	44.973
S5	24.068	72.204
S6	13.149	39.447
S7	10.715	32.145
S8	32.306	96.918
S9	36.153	108.459
S10	20.546	61.638

## 4. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统定量分析单抗生产用一次性细胞培养袋浸出物抗氧化剂双(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯（简称 bDtBPP），线性浓度范围内（1ng/mL~100ng/mL）线性相关性良好，相关系数为 0.9998，准确度在 97.9~104.6%之间。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，可用于生物药生产用一次性培养袋中抗氧化剂 bDtBPP 的定量分析。

## 2 LCMS-8050 应用于单抗包材中浸出物的测定

**摘要:** 本文利用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统分别建立了单抗包材浸出物己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物的测定方法。得到相应检测限和定量限，且线性良好，定量限重复性实验结果显示，其保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 1%和 10%，表明重复性良好。

**关键词:** LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统 单克隆抗体 包材浸出物

药用包材在药品货期过程中起到保护作用，为制剂质量提供一定保护作用，此外药用包材与制剂相容性尤为重要，不能与制剂相互作用而引起制剂质量的变化，比如包材浸出物引起活性成分的降解等。因此，针对包材浸出物的研究为证明药用包材相容性和安全性提供理论依据。

包材浸出物是指在正常的存储和使用条件下从包装部件迁移进入实际药品的化合物，在生物药行业，尤其是单克隆抗体药物，其包材浸出物的相关测定也尤为重要，其中橡胶制品硫化过程中，以伯胺为基础的硫化剂和氮氧化物反应生成致癌性 N-亚硝胺类化合物，故需对此类浸出物进行测定，为单抗包材相容性研究提供依据。

本文针对单抗包材的相关浸出物己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物，采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统，建立了相关分析检测方法，供相关检测人员参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A 5R
输液泵	: LC-30AD	自动进样器	: SIL-30AC
柱温箱	: CTO-20A	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions LCMS Ver. 5.93		

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件(己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A):

色谱柱: Shim-pack GIST (100 mm x 2.1 mm I.D., 2  $\mu$ m, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30001-04)

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液; B 相-甲醇

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量：5  $\mu$ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为20%，时间程序见表1

表1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pump	B.Conc	20
5.50	Pump	B.Conc	98
7.50	Pump	B.Conc	98
7.51	Pump	B.Conc	20
10.00	Controller	Stop	

LCMS-8050 质谱条件(己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A)：

离子源：ESI(+/-)

接口电压：4.0 kV

雾化气流速：3 L/min

加热模块温度：350°C

DL 温度：200°C

扫描模式：多反应监测(MRM)

接口温度：300°C

干燥气流速：5.0 L/min

MRM 参数：见表2

表2. MRM 参数

No.	名称	电离模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	己内酰胺	+	114	44*	-13	-26	-14
				79	-13	-19	-12
2	2-MBT	-	166	134*	11	22	15
				58	12	33	11
3	全氟辛酸	-	413	369*	12	10	14
				169	10	17	13
4	双酚 A	-	227	133*	11	18	15
				212	11	23	15

注：\*表示定量离子

液相色谱条件(氮亚硝胺类)：

色谱柱：ACE Excel 3 C18-AR, 150 mm x 4.6 mm I.D., 3  $\mu$ m

流动相：A相-0.1%甲酸水溶液 B相-0.1%甲酸甲醇溶液

流速：0.8 mL/min

柱温：40°C

进样量：20  $\mu$ L

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为30%，时间程序见表3。

表 3. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pump	B.Conc	30
8.50	Pump	B.Conc	70
13.00	Pump	B.Conc	75
14.00	Pump	B.Conc	98
16.00	Pump	B.Conc	98
16.10	Pump	B.Conc	30
20.00	Controller	Stop	

LCMS-8050 质谱条件(氮亚硝胺类):

离子源 : APCI (+)

接口电压 : 4.0 kV

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 200°C

DL 温度 : 180°C

扫描模式 : 多反应监测(MRM)

接口温度 : 300°C

干燥气流速 : 5.0 L/min

MRM 参数 : 见表 4

表 4. MRM 参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	N-亚硝基二甲胺 (NDMA)	75	58	-14	-14	-17
			43	-14	-16	-24
2	N-亚硝基吗啉 (NMOR)	117	87	-25	-15	-28
			86	-24	-14	-28
3	N-亚硝基甲乙胺 (NEMA)	89	61	-17	-15	-28
			43	-10	-15	-14
4	N-亚硝吡咯烷 (NPYR)	101	55	-20	-19	-26
			59	-12	-17	-28
5	N-亚硝基二乙胺 (NDEA)	103	75	-20	-15	-27
			42	-20	-19	-19
6	N-亚硝基哌啶 (NPIP)	115	69	-26	-14	-30
			42	-23	-15	-27
7	N-亚硝基二丙胺 (NDPA)	131	89	-28	-15	-29
			43	-23	-11	-29
8	N-亚硝基二丁胺 (NDBA)	159	57	-12	-15	-24
			103	-12	-14	-11
9	N-亚硝基二苯胺 (NNPA)	199	169	-19	-14	-29
			74	-13	-19	-28

注: \*表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配置

取相应标准贮备液 (100 mg/L), 用纯水做溶剂逐级稀释为 0.5、1、5、10、50、100 ng/mL 的标准系列工作溶液, 待上机分析。

### 1.4 样品前处理方法

样品和甲醇按照 1: 4 (V/V) 的比例混合, 漩涡 5 min, 10000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液, 上机分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 线性范围

按照 1.3 配制成相应浓度标准溶液, 以各目标物浓度为横坐标, 目标物峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 所得校准曲线线性关系良好, 线性相关系数大于 0.99, 准确度在 90.0%-110.0%之间。曲线结果如下表 5 所示。

表 5. 标准曲线

名称	标准曲线		
	线性方程	范围 (ng/mL)	相关系数 r
己内酰胺	$Y=12069.2X-963.675$	0.5-100	0.9987
2-巯基苯并噻唑	$Y=28562.1X+7625.91$	0.5-100	0.9955
全氟辛酸	$Y=7308.55X+2271.23$	0.5-100	0.9971
双酚 A	$Y=179627X+8754.57$	1.0-100	0.9985
NDMA	$Y=5180.70X+733.83$	1.0-100	0.9984
NMOR	$Y=5338.47X-687.383$	1.0-100	0.9992
NEMA	$Y=16807.6X-1874.47$	1.0-100	0.9979
NPYR	$Y=21059.9X+2271.26$	1.0-100	0.9983
NDEA	$Y=9771.63X+410.119$	1.0-100	0.9993
NPIP	$Y=23027.1X-5353.84$	1.0-100	0.9986
NDPA	$Y=14878.4X+817.259$	1.0-100	0.9988
NDBA	$Y=24052.7X+1089.32$	1.0-100	0.9997
NNPA	$Y=20532.1X+65.9848$	1.0-100	0.9987

### 2.2 灵敏度实验

配制 0.5 ng/mL 或 1.0 ng/mL 标准溶液进行灵敏度测试, 其结果如图 1 所示。

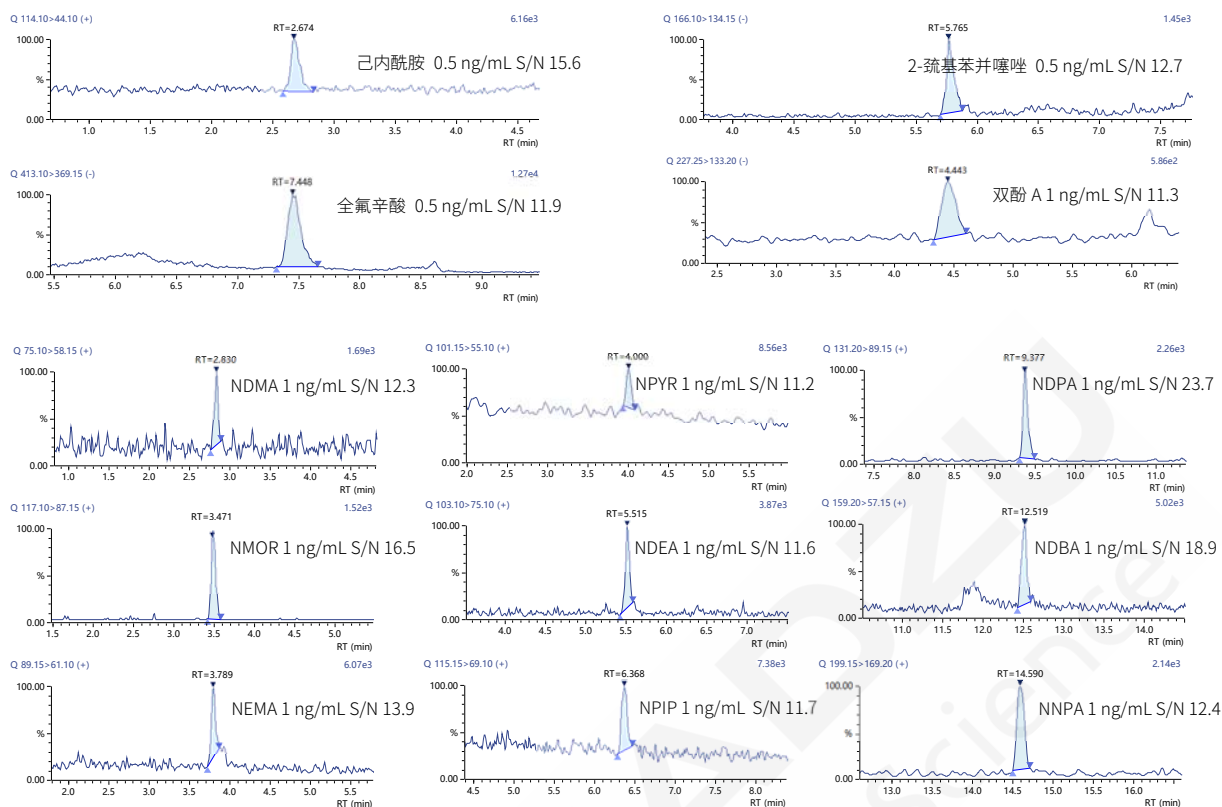


图 1. 0.5 ng/mL 或 1.0 ng/mL 标准样品色谱图

### 2.3 重复性实验

按照 1.3 步骤配制灵敏度相关浓度标准溶液，连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 6 所示。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD%)分别小于 1%和小于 10%，满足方法要求，表明仪器精密度良好。

表 6. 重复性测试 (n=6)

名称	己内酰胺		2-巯基苯并噻唑		全氟辛酸		双酚 A	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.685	23265	5.770	5706	7.553	74033	4.449	11531
2	2.687	23628	5.770	5415	7.565	69401	4.457	11113
3	2.679	21350	5.776	5501	7.562	74922	4.462	9855
4	2.674	23221	5.767	5008	7.540	76568	4.442	10829
5	2.692	20773	5.776	4901	7.536	73674	4.453	10407
6	2.679	21193	5.770	5513	7.540	68525	4.449	10589
AVG	2.683	22238	5.772	5341	7.549	72857	4.452	10721
RSD/%	0.24	5.6	0.06	5.9	0.16	4.3	0.15	5.4

名称	NDMA		NMOR		NEMA		NPYR	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	2.826	5498	3.470	5446	3.787	19764	3.997	24629
2	2.826	4738	3.485	5388	3.780	18456	3.986	23183
3	2.830	5247	3.471	5475	3.796	18423	3.988	22632
4	2.830	5452	3.477	5542	3.782	20730	3.988	23060

5	2.818	5054	3.481	4978	3.786	19419	3.998	23966
6	2.824	5800	3.473	4366	3.794	20149	3.992	21022
AVG	2.826	5298	3.476	5199	3.787	19490	3.992	23082
RSD/%	0.15	7.0	0.17	8.7	0.16	4.7	0.12	5.3

名称	NDEA		NPIP		NDPA		NDBA		NNPA	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	5.512	13856	6.365	24810	9.383	11096	12.514	22620	14.608	17864
2	5.515	13680	6.360	23960	9.381	11376	12.511	22000	14.601	16159
3	5.518	14353	6.364	25500	9.386	11238	12.512	22021	14.595	17024
4	5.513	16063	6.372	22813	9.374	9976	12.496	23387	14.603	17421
5	5.520	14651	6.363	28102	9.385	10956	12.520	25803	14.598	16286
6	5.528	15264	6.363	23111	9.372	10173	12.507	27079	14.603	14002
AVG	5.518	14645	6.365	24716	9.380	10803	12.510	23818	14.601	16459
RSD/%	0.11	6.1	0.06	7.8	0.06	5.4	0.06	8.9	0.03	8.3

## 2.4 实际样品测试

将样品按 1.4 步骤进行处理，上机分析，平行测定两次，检测结果见表 7。

表 7. 样品检测结果 (n=2)

名称	己内酰胺	2-巯基苯并噻唑	全氟辛酸	双酚 A	N-亚硝胺类
1	23.453	31.927	20.445	25.226	ND
2	23.059	30.745	20.555	27.844	ND
AVG	23.256	31.336	20.500	26.535	ND

注：浓度单位：ng/mL

## 3. 结论

本实验建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-850 测定单抗包材中相关浸出物己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和 N-亚硝胺类的方法，用外标法定量，定量限分为己内酰胺 0.5 ng/mL、2-巯基苯并噻唑 0.5 ng/mL、全氟辛酸 0.5 ng/mL、双酚 A 1 ng/mL 和 N-亚硝胺类 1 ng/mL；定量限浓度溶液重复进样 6 针，其保留时间和峰面积的 RSD%分别为小于 1%和小于 10%，满足方法要求。建立的方法可应用于单抗包材相关浸出物的测试。

### 3 利用电感耦合等离子体发射光谱仪测定单抗药物中消泡剂残留量

**摘要：**本文利用岛津电感耦合等离子体发射光谱仪 ICPE-9820 测定了单抗药物中消泡剂的残留量，实验结果表明：硅元素的相关系数  $r > 0.9997$ ，检出限为 0.035 mg/L，精密度好（RSD < 1.5%），加标回收率为 92.7%，该方法操作简便、快速，测试结果准确，可适用于测定蛋白类样品中消泡剂的残留量。

**关键词：**电感耦合等离子体发射光谱法 ICP-OES 消泡剂 硅含量

随着生物技术的不断革新，生物药行业也在快速发展，其中细胞培养技术作为生物药的一种生产方式也在不断迅速发展。在细胞培养过程中会产生大量的泡沫，进而对培养基中的细胞产生不利影响。为了消除泡沫带来的影响，生产时通常要把特定量的消泡剂加入其中来消除泡沫对培养液中的细胞所产生的不利影响。

消泡剂不仅对细胞的生理产生不利影响，也会影响人体健康，在消除泡沫的前提下应尽可能的减少消泡剂的用量。在对最终成品进行纯化过程中，要尽量去除消泡剂。在优化产品纯化工艺工程中，为了保证产品质量，需要对纯化的过程样以及最终产品进行消泡剂残留量的测定，从而确定最优的纯化工艺。

本文使用岛津电感耦合等离子体发射光谱法测定了细胞培养液硅元素的含量，该方法操作简单，定量准确，可以满足对蛋白类样品中消泡剂的残留量的测定。

#### 1. 实验部分

##### 1.1 仪器

岛津 ICPE-9820 电感耦合等离子体发射光谱仪

##### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质，使用硝酸溶液（1+1）浸泡 24 小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验用水为超纯去离子水。

##### 1.3 样品前处理

移取 2.5 mL 试样于 25 mL 容量瓶中，用超纯水定容至刻度线，摇匀，待测。同法制备样品空白溶液和样品加标溶液。

##### 1.4 仪器参数

高频功率：1.20 kW

等离子体气流速：14.0 L/min

辅助气流速：1.2 L/min

载气流速：0.7 L/min

炬管类型：标准炬管

雾化器类型：同心

雾化室：旋流

高频频率：27.12 MHz

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

用超纯水配制 Si 的标准溶液，标准溶液浓度见表 1。

表 1. Si 标准溶液浓度 (mg/L)

元素	观测方向	波长/nm	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6
Si	轴向	251.611	0.0	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0

### 2.2 硅元素标准曲线如下

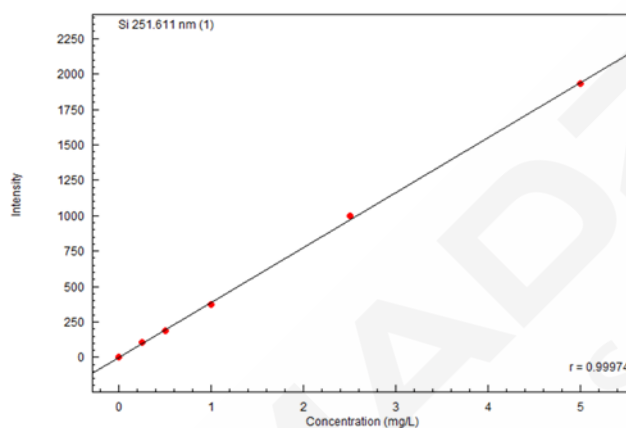


图 1. Si 元素的标准曲线  $r=0.99974$

### 2.3 Si 元素谱峰轮廓图

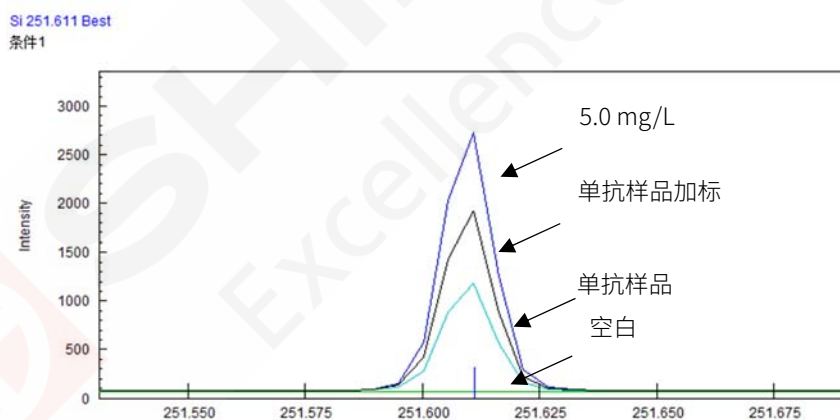


图 2. Si 元素谱峰轮廓图

### 2.4 样品分析结果及加标回收率

按照实验方法，对空白溶液重复测定 10 次，取 3 倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得硅元素在溶液中的检出限。为考察方法的准确性，对样品进行加标回收，实验结果见表 2。

表 2. 单抗药物样品分析及加标回收率

元素	分析结果 (mg/L)	样品结果 (mg/L)	加标浓度 (mg/L)	加标后测定 结果 (mg/L)	RSD(n=6) (%)	加标回收率 (%)	检出限 (mg/L)
Si	2.06	20.6	1.50	3.45	1.25	92.7	0.035

## 2.5 方法精密度实验

为了验证本方法的重复性，取 6 份同样的样品，分别向样品中加入硅元素的标准溶液（最终溶液硅元素加标量为 1.5 mg/L），求出 6 份样品加标测定结果的 RSD 值，确定方法的精密度，其结果见表 3。

表 3. 单抗药物样品加标样测定结果和精密度

元素	加标样测定结果 (mg/L)						RSD (%)
	1#样品	2#样品	3#样品	4#样品	5#样品	6#样品	
Si	3.49	3.50	3.46	3.43	3.40	3.39	1.25

## 3. 结论

本文利用岛津电感耦合等离子体发射光谱仪 ICPE-9820 测定了单抗药物中消泡剂的残留，建立了一种测定单抗药物中消泡剂残留量的方法。实验结果表明：该方法线性范围在 0.25-5.0 mg/L 时，硅元素的相关系数  $r > 0.9997$ ，仪器检出限为 0.035 mg/L，加标回收率为 92.7%，1.5 mg/L 的加标样品 6 次测定 RSD 值  $< 1.5\%$ ，该方法操作简便、快速，测试结果准确，可适用于测定蛋白类样品中消泡剂的残留量。

## 4 LCMS-8050 定量测定 Fc 融合蛋白药物原液中的杂质氢化可的松

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定 Fc 融合蛋白药物原液中杂质氢化可的松的方法。外标法定量，方法线性范围为 1.0~50.0 ng/mL，相关系数大于 0.999。各浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.09% 和 1.26~2.85% 之间。仪器检出限为 0.168 ng/mL，定量限为 0.570 ng/mL。Fc 融合蛋白药物原液样品中未检出氢化可的松，三个不同浓度样品加标回收率在 89.4%~114.8% 之间。高浓度样品分析后，氢化可的松无明显残留。

**关键词:** 氢化可的松 融合蛋白药物 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

目前大多数蛋白质药物,包括单克隆抗体药物的生产,普遍采用 CHO 细胞无血清培养。由于天然血清成分复杂且不明确,其具有携带支原体、病毒和朊病毒等风险,往往伴随着复杂的下游纯化工艺。为了商业化生产药物蛋白,一种成分明确且廉价的无血清培养基非常必要。而大多数商业化无血清培养基均是在传统培养基的基础上,添加生长因子、细胞因子、激素和转铁蛋白等优化而得。其中氢化可的松是其中一种常用无血清培养基添加剂,在重组 CHO 细胞培养过程中可延长细胞活率,提高 Fc 融合蛋白的糖基化质量,同时在细胞培养过程中可引起浓度依赖性的细胞生长抑制作用。

氢化可的松是一种肾上腺皮质层分泌的一种原发性糖皮质激素,临床上具有免疫抑制、抗毒和抗休克等作用。基于产品质量风险控制的考虑,需要在纯化阶段将其去除,以避免其对产品的潜在影响。为实现该目的,需要开发一种 Fc 融合蛋白药物原液中氢化可的松的分析方法,对其在原液中的残留情况进行监控,避免产品风险。

氢化可的松属于激素类细胞培养基添加剂,通常添加量较少,在最终产品中的含量较低。又由于生物药物价格昂贵,可供检测的样品量少。故需要开发一种灵敏度高的方法进行测定。三重四极杆质谱具有灵敏度高、选择性好的优点,适合此类样品的分析。

本文采用岛津公司 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用,建立了一种 Fc 融合蛋白药物原液中杂质氢化可的松的分析方法,7 分钟内完成测定,快速、简单、灵敏、准确,可用于蛋白质药物产品质量监控。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20A

柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色 谱 柱: Discovery HS F5-3, 2.1 mm I.D. × 150 mm L., 3.0 μm

流 动 相: A 相- 0.1%甲酸水溶液; B 相-0.1%甲酸乙腈溶液

流 速: 0.40 mL/min

样品体积: 1 μL

柱 温: 40°C

洗 针 液: 甲醇/水=1:1 (v:v)

洗针模式: 进样前后洗针, External only (进样针外壁清洗), Rinse Port

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%

时间程序: 见表 1

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.51	Pumps	Pump B Conc.	10
7.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

DL 温度: 250°C

加热气: 空气 10.0 L/min

加热模块温度: 400°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

干燥气: 氮气 10.0 L/min

驻留时间: 100 ms

碰撞气: 氩气 270 kPa

MRM 参数: 见表 2

接口温度: 300°C

喷雾针距离: +1 mm

表 2. MRM 参数

中文名称	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
氢化可的松	Hydrocortisone	50-23-7	363.25	121.10*	-10.0	-28.0	-13.0
				105.10	-13.0	-44.0	-21.0

\*代表定量离子对。

## 1.3 标准品溶液的配制

取标准储备溶液, 以 70%乙腈水溶液逐级稀释为 1、2、5、10、20、50 ng/mL 的标准系列溶液。

## 1.4 样品处理方法

取 Fc 融合蛋白药物原液样品 20 μL, 加入 10 μL 70%乙腈水溶液, 加入 70 μL 乙腈, 手

摇混匀 1 min, 15000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 上机分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

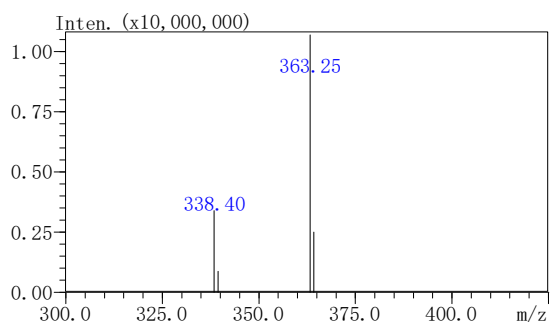


图 1. 氢化可的松一级质谱图

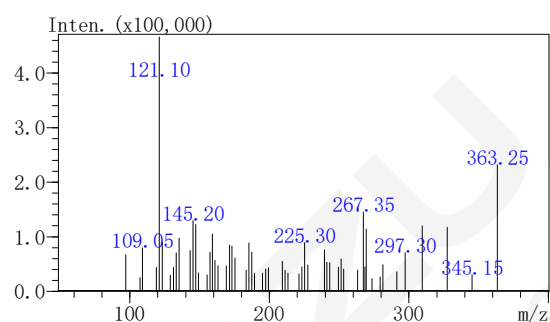


图 2. 氢化可的松产物离子扫描质谱图 (CE: -23V)

### 2.2 标准样品的 MRM 谱图

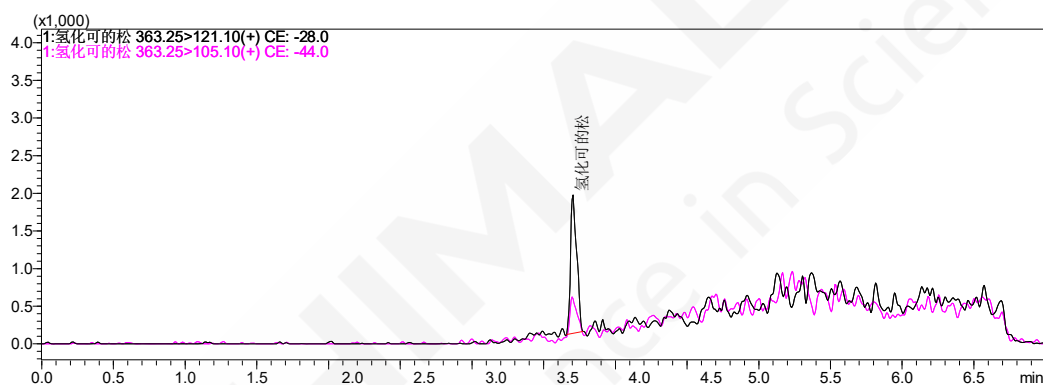


图 3. 标准品 MRM 谱图 (1.0 ng/mL)

### 2.3 线性关系、检出限和定量限

按照 1.3 配制 6 个不同浓度的标准系列溶液, 按照 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法绘制标准曲线。在 1.0~50.0 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数大于 0.999, 校准曲线如图 4 所示。线性方程、相关系数、检出限 (S/N=3, ASTM 方式) 和定量限 (S/N=10, ASTM 方式) 见表 3。

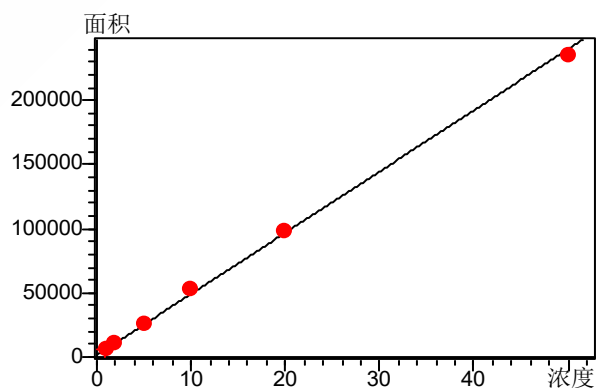


图 4. 氢化可的松校准曲线 (1.0~50.0 ng/mL)

表 3. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关 系数 r	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
氢化可的松	Y=4769.02X+1513.59	1.0~50.0	88.9~107.0	0.9992	0.168	0.570

## 2.4 精密度实验

对三个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的精密密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.09%和 1.26~2.85%之间, 仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (2.0 ng/mL)		RSD% (10.0 ng/mL)		RSD% (50.0 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氢化可的松	0.09	2.85	0.06	1.92	0.07	1.26

## 2.5 样品加标实验

取样品 20  $\mu$ L, 加入 10  $\mu$ L 标准溶液, 与样品进行相同的前处理, 得到三个不同浓度的加标样品。按照 1.2 中的分析条件分析, 考察样品加标回收率。结果如表 5 所示。Fc 融合蛋白药物原液样品中未检出氢化可的松, 三水平加标回收率在 89.4%~114.8%之间。

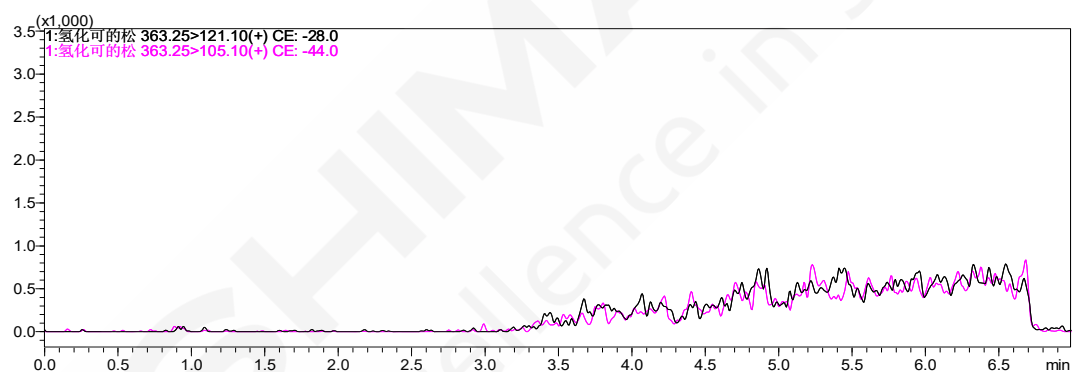


图 5. 样品 MRM 色谱图

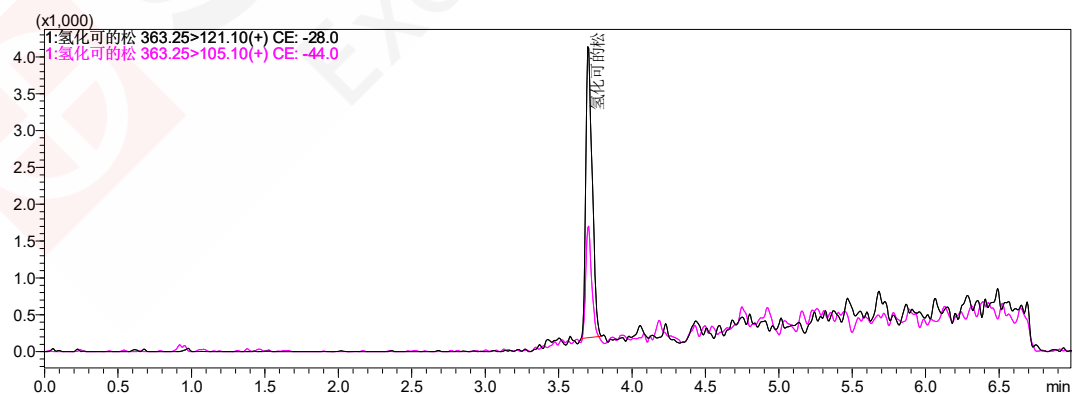


图 6. 加标样品 MRM 色谱图 (2.0 ng/mL)

表 5. 样品加标回收率

样品名称	理论加标样浓度 (ng/mL)	样品浓度 (ng/mL)	实际加标样浓度 (ng/mL)	样品加标回收率 (%)
Fc 融合蛋白	2.0		2.089	104.3
药物原液	10.0	N.D.	11.481	114.8
	50.0		48.273	96.5

\*:N.D. 表示未检出。

## 2.6 基质效应

考察三个不同浓度样品的基质效应,以基质加标溶液峰面积与溶剂标液峰面积之比来评价基质效应,结果如表 6 所示。结果表明,三个不同浓度样品的基质效应因子在 91.9~107.8% 之间,基质效应都在可接受的范围内。

表 6. 基质效应

浓度级别	浓度 (ng/mL)	基质效应因子 (%)
1	2.00	91.9
2	10.0	103.7
3	50.0	107.8

## 2.7 残留

高浓度样品 (50 ng/mL) 分析完成后,进样分析空白,考察残留情况。结果如图 7 所示。

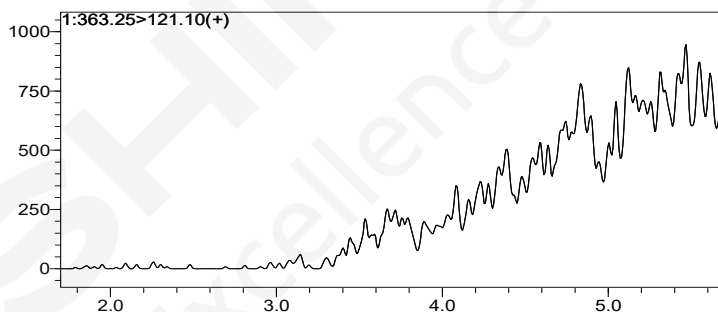


图 7. 残留考察

结果表明,在高浓度样品分析完成后,进样分析空白样品,氢化可的松检测通道中无明显目标化合物干扰。

## 3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定 Fc 融合蛋白药物原液中杂质氢化可的松的方法。样品经蛋白沉淀处理,7 min 内完成定量分析。方法操作简单,线性良好,相关系数 R 大于 0.999。仪器检出限为 0.168 ng/mL,定量限为 0.570 ng/mL。三水平加标回收率在 89.4%~114.8%之间。使用本方法分析 Fc 融合蛋白药物原液,未检出杂质氢化可的松。本方法灵敏、快速、选择性好、样品消耗量小,适用于 Fc 融合蛋白药物中杂质氢化可的松的检测,便于进行产品质量监控。

## 5 LCMS-8050 定量测定 Fc 融合蛋白药物原液中的杂质亚叶酸钙

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定 Fc 融合蛋白药物原液中亚叶酸钙的方法。外标法定量, 方法线性范围为 0.5~100.0 ng/mL, 相关系数大于 0.9999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.23~0.32% 和 1.33~2.90% 之间。仪器检出限为 0.082 ng/mL, 定量限为 0.248 ng/mL。Fc 融合蛋白药物原液样品中未检出亚叶酸钙, 三个不同浓度样品加标回收率在 90.7%~101.3% 之间。高浓度样品分析后, 亚叶酸钙无明显残留。

**关键词:** 亚叶酸钙 融合蛋白药物 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

目前大多数蛋白质药物, 包括单克隆抗体药物的生产, 普遍采用 CHO 细胞无血清培养。由于天然血清成分复杂且不明确, 其具有携带支原体、病毒和朊病毒等风险, 往往伴随着复杂的下游纯化工艺。为了商业化生产药物蛋白, 一种成分明确且廉价的无血清培养基非常必要。而大多数商业化无血清培养基均是在传统培养基的基础上, 添加生长因子、细胞因子、激素和转铁蛋白等优化而得。其中亚叶酸钙是其中一种无血清培养基添加剂, 可辅助叶酸合成 DNA, 进行 DNA 修复, 对于维持细胞培养及传代稳定性有重要作用。

亚叶酸钙在临床上常用作叶酸拮抗剂的解毒剂。基于产品质量风险控制的考虑, 需要在纯化阶段将其去除, 以避免其对产品的潜在影响。为实现该目的, 需要开发一种 Fc 融合蛋白药物原液中亚叶酸钙的分析方法, 对其在原液中的残留情况进行监控, 避免产品风险。

亚叶酸钙属于辅酶类细胞培养基添加基, 通常添加量较少, 在最终产品中的含量较低。又由于生物药物价格昂贵, 可供检测的样品量少。故需要开发一种灵敏度高的方法进行测定。三重四极杆质谱具有灵敏度高、选择性好的优点, 适合此类样品的分析。

本文采用岛津公司 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用, 建立了一种 Fc 融合蛋白药物原液中杂质亚叶酸钙的分析方法, 4 分钟内完成测定, 快速、简单、灵敏、准确, 可用于蛋白质药物产品质量监控。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GIST 2.1 mm I.D. × 50 mm L., 2.0 μm

流动相: A相- 0.1%甲酸水溶液; B相-甲醇

流速: 0.40 mL/min

样品体积: 1 μL

柱温: 40°C

洗针液: 甲醇/水=1:1 (v:v)

洗针模式: 进样前后洗针, External only (进样针外壁清洗), Rinse Port

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.20	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.51	Pumps	Pump B Conc.	15
4.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

DL 温度: 250°C

加热气: 空气 10.0 L/min

加热模块温度: 400°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

干燥气: 氮气 10.0 L/min

驻留时间: 100 ms

碰撞气: 氩气 270 kPa

MRM 参数: 见表 2

接口温度: 300°C

喷雾针离: +1 mm

表 2. MRM 参数

中文名称	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
亚叶酸钙	Folinic acid calcium	50-23-7	474.25	327.10*	-11.0	-22.0	-12.0
	salt hydrate			299.10	-11.0	-33.0	-21.0

\*代表定量离子对。

## 1.3 标准品溶液的配制

取标准储备溶液, 以超纯水逐级稀释为 0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准系列溶液。

## 1.4 样品处理方法

取 Fc 融合蛋白药物原液样品 20 μL, 加入 20 μL 超纯水, 混匀, 转入 30K 超滤离心柱, 12000 g 离心 5 min, 取流出液, 上机分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

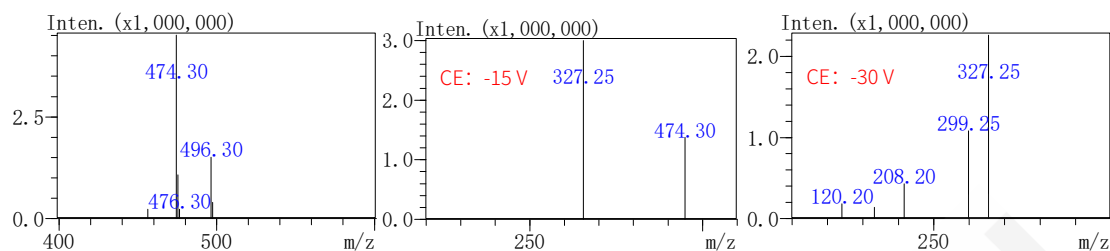


图 1. 亚叶酸钙一级质谱图

图 2. 亚叶酸钙产物离子扫描质谱图

### 2.2 专属性考察



图 3. 溶剂空白 MRM 谱图

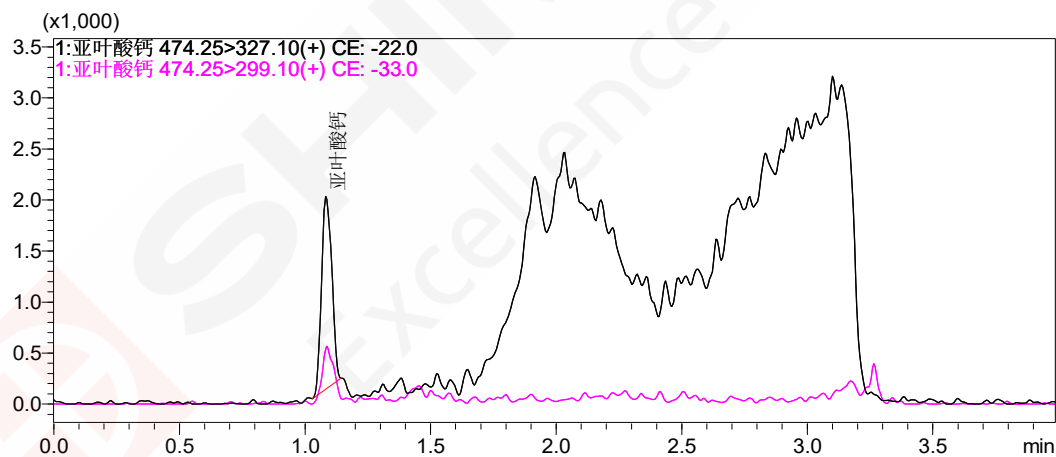


图 4. 亚叶酸钙 MRM 谱图 (0.5 ng/mL)

如上图所示，亚叶酸钙保留时间处，空白溶剂无干扰。

### 2.3 线性关系、检出限和定量限

按照 1.3 配制 8 个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制标准曲线。在 0.5~100.0 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.999，校准曲线如图 5 所示。线性方程、相关系数、检出限 (S/N=3, ASTM 方式) 和定量限 (S/N=10, ASTM 方式) 见表 3。

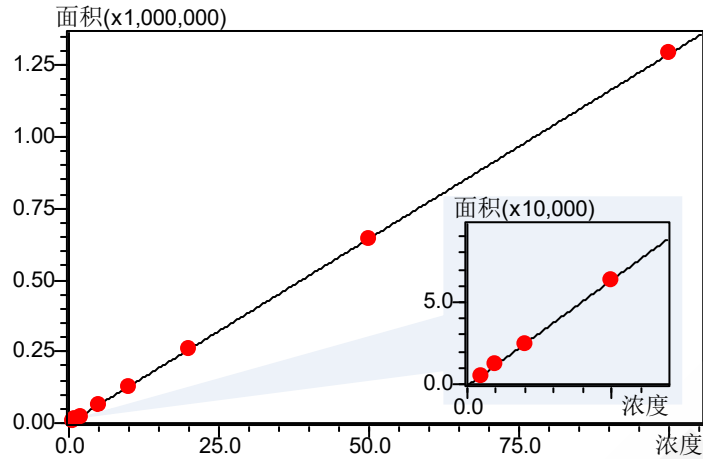


图 5. 亚叶酸钙校准曲线 (0.5~100.0 ng/mL)

表 3. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关 系数 r	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
亚叶酸钙	$Y=12919.50X-1090.15$	0.5~100.0	97.3~102.3	0.9999	0.082	0.248

## 2.4 精密度实验

对三个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的精密密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.23~0.32%和 1.33~2.90%之间, 仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (1.0 ng/mL)		RSD% (10.0 ng/mL)		RSD% (50.0 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
亚叶酸钙	0.26	2.90	0.32	1.33	0.23	2.72

## 2.5 样品加标实验

取样品 20  $\mu$ L, 加入 10  $\mu$ L 标准溶液, 加入 10  $\mu$ L 超纯水, 与样品进行相同的前处理, 得到三个不同浓度的加标样品。按照 1.2 中的分析条件分析, 考察样品加标回收率。结果如表 5 所示。Fc 融合蛋白药物原液样品中未检出亚叶酸钙, 三水平加标回收率在 90.7%~101.3% 之间。

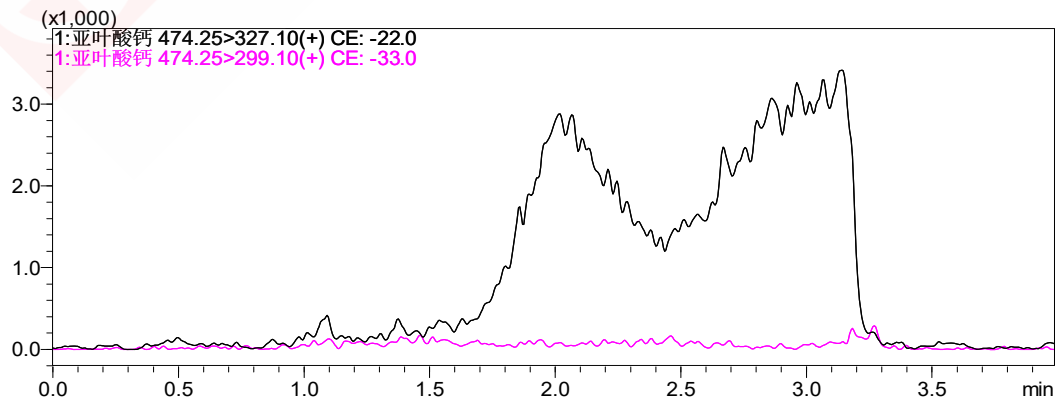


图 6. 样品 MRM 色谱图

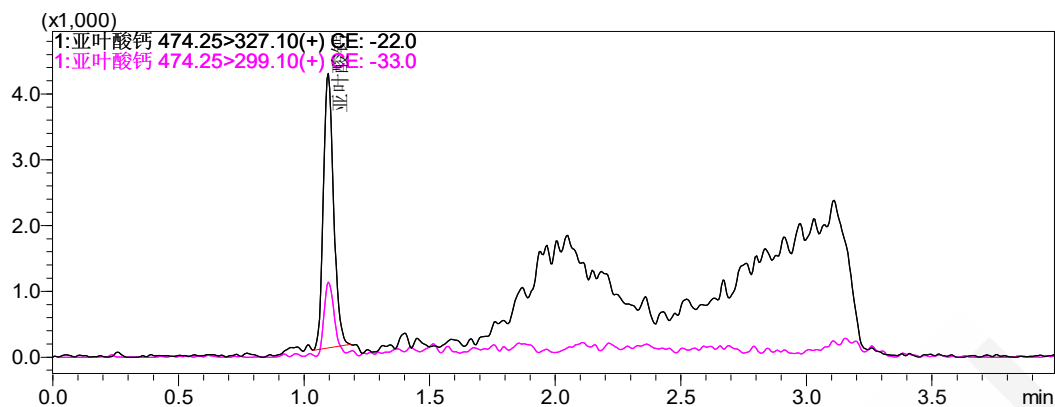


图 7. 加标样品 MRM 色谱图 (1.0 ng/mL)

表 5. 样品加标回收率

样品名称	理论加标样浓度 (ng/mL)	样品浓度 (ng/mL)	实际加标样浓度 (ng/mL)	样品加标回收率 (%)
Fc 融合蛋白	1.0		1.013	101.3
药物原液	10.0	N.D.*	9.074	90.7
	50.0		49.105	98.2

\*:N.D. 表示未检出。

## 2.6 残留

高浓度样品 (100 ng/mL) 分析完成后, 进样分析空白, 考察残留情况。结果如图 8 所示。

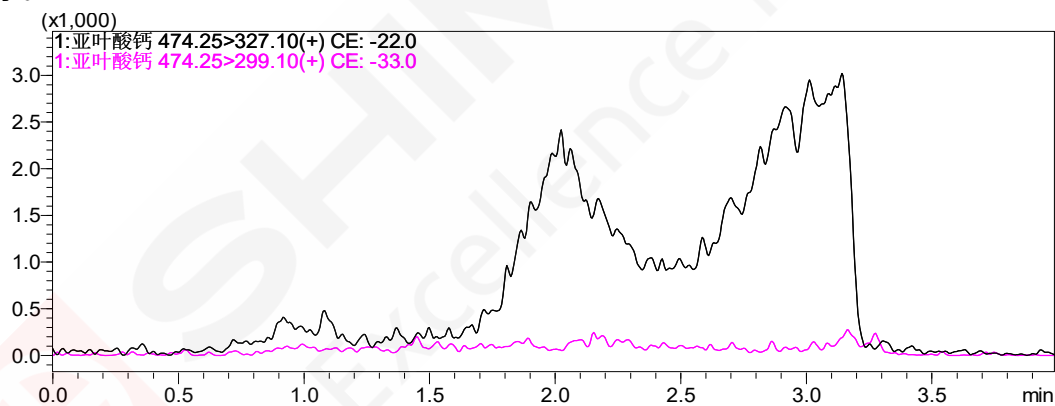


图 8. 残留考察

结果表明, 在高浓度样品分析完成后, 进样分析空白样品, 亚叶酸钙检测通道中无明显目标化合物干扰。

### 3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定 Fc 融合蛋白药物原液中杂质亚叶酸钙的方法。样品经超滤离心处理，4 min 内完成定量分析。方法专属性、精密度及回收率良好，在 0.5~100.0 ng/mL 浓度范围内线性良好。使用本方法分析 Fc 融合蛋白药物原液，未检出杂质亚叶酸钙。本方法灵敏、快速、选择性好、前处理简单且样品消耗量小，适用于 Fc 融合蛋白药物中杂质亚叶酸钙的检测，便于进行产品质量监控。



## 6 ICPMS-2030 测定蛋白药物中的杂质元素含量

**摘要：**本文采用水浴加热酸消解法处理蛋白药物水针制剂，使用岛津 ICPMS-2030 测定了该药物中多种杂质元素含量。实验结果表明：各元素的相关系数  $r > 0.9995$ ，加标回收率在 92.5~107.7% 之间，该方法操作简便、快速，样品前处理简单，可以满足蛋白药物中的元素杂质含量的测定需求。

**关键词：** ICP-MS 蛋白药物 杂质元素

药物中的元素杂质一直药物质量控制的重点关注内容，元素杂质不仅对药品的稳定性、保质期产生不利影响，还会因为潜在的毒性引发药物副反应。

传统的生物技术药物大多由活生物体（细菌或细胞）制备，具有复杂的分子结构，其生产涉及诸多生物学过程，如发酵、细胞培养、目的产物的分离纯化等，在这些生产过程中，目标产品容易受到各种来自于各个环节中产生的污染，从而导致产品中的杂质元素超标，影响药物质量，甚至改变药物的活性成分。

电感耦合等离子体质谱仪（ICPMS）作为元素分析的重要手段，相较于 ICPOES、AAS 等元素分析仪器而言，具有灵敏度高、线性范围宽、多元素同时分析的优点，因而广泛应用于药物中杂质元素的分析。

本文采用水浴加热酸消解法处理蛋白药物水针制剂，使用岛津 ICPMS-2030 测定了该药物中多种杂质元素含量。该方法操作简单，定量准确，可以满足蛋白药物水针制剂中杂质元素的测定需求。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

#### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质，使用硝酸溶液（1+1）浸泡 24 小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验所用  $\text{HNO}_3$  为优级纯试剂，实验用水为超纯去离子水。

#### 1.3 样品前处理

移取 400  $\mu\text{L}$  样品至塑料离心管中，加入 1000  $\mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$ 、600  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 。混合均匀后置于水浴锅中 70 $^\circ\text{C}$  加热至样品透明澄清后取出，冷却至室温，加水定容至 20 mL，上机测定各元素浓度。使用超纯水参照同样的前处理方法制备试剂空白。

#### 1.4 仪器参数

ICP-MS 仪器分析条件见表 1。

表 1. ICP-MS 分析条件

参 数	参数设定	参 数	参数设定
高频功率	1.20 kW	等离子体气	8.0 L/min
辅助气	1.10 L/min	载气	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流雾室	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

利用1%硝酸溶液配制空白溶液、以及各元素混合标准溶液，各元素的标准溶液浓度见表2。内标元素 Sc、Y浓度均为 20 µg/L，Rh、Re 浓度为50 µg/L，采用内标组件在线添加。

表 2. 各元素标准曲线溶液浓度系列

元素	STD1 (µg/L)	STD2 (µg/L)	STD3 (µg/L)	STD4 (µg/L)	STD5 (µg/L)	STD6 (µg/L)
As	0	0.1	0.5	1	5	--
Al	0	5	10	20	100	--
B	0	5	10	20	100	--
Ba	0	0.1	0.5	1	5	--
Cd	0	0.1	0.5	1	5	--
Co	0	0.1	0.5	1	5	--
Cr	0	0.1	0.5	1	5	--
Cu	0	0.1	0.5	1	5	--
Fe	0	0.5	1	5	10	--
Hg	0	0.05	0.1	0.5	1	2
Li	0	0.1	0.5	1	5	--
Mn	0	0.1	0.5	1	5	--
Ni	0	0.1	0.5	1	5	--
Pb	0	0.1	0.5	1	5	--
Sb	0	0.5	1	5	10	--
Si	0	100	200	500	1000	2000
V	0	0.1	0.5	1	5	--
Zn	0	0.1	0.5	1	5	--

## 2.2 部分元素标准曲线

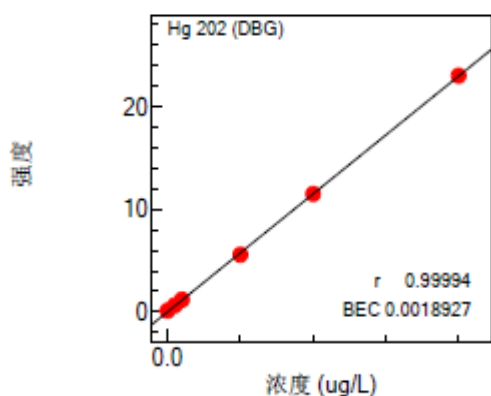


图 1. Cd 元素的标准曲线  $r=0.99994$

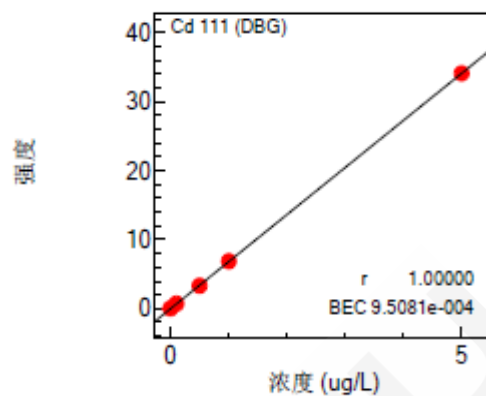


图 2. Hg 元素的标准曲线  $r=1.00000$

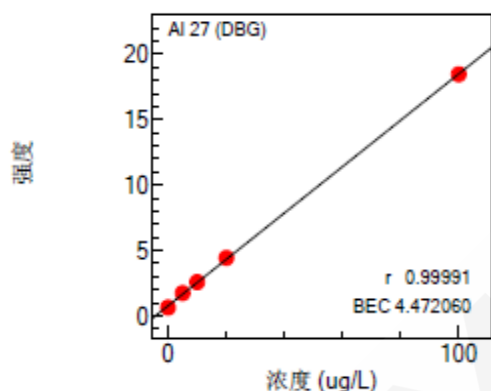


图 3. Al 元素的标准曲线  $r=0.99991$

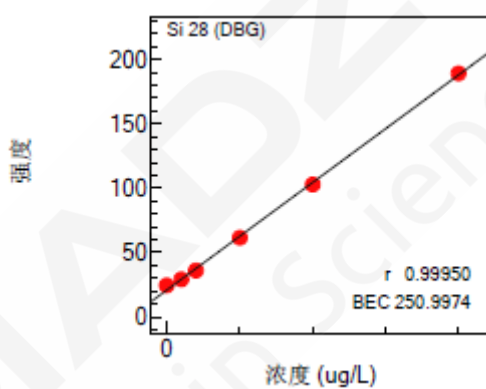


图 4. Si 元素的标准曲线  $r=0.99950$

## 2.3 样品分析结果及加标回收率

按照实验方法，对空白溶液重复测定10次，取3倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得各元素在溶液中的检出限；根据样品稀释倍数（50倍），求得该方法的检出限；

测定样品中的杂质元素含量，每个样品重复测定3次；同时进行样品加标回收实验，然后求出加标回收率，以便更全面系统的考察方法准确性。

表 3. 样品分析结果及加标回收率

分析元素	内标元素	仪器检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	分析结果 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标回收率 (%)	RSD (n=3, %)
砷 ( $^{75}\text{As}$ )	$^{89}\text{Y}$	0.012	0.6	N.D.	2	98.3	0.81
铝 ( $^{27}\text{Al}$ )	$^{45}\text{Sc}$	0.764	38.2	N.D.	5	107.7	2.76
硼 ( $^{11}\text{B}^*$ )	$^{45}\text{Sc}^*$	0.365	18.25	N.D.	5	95.7	6.1
钡 ( $^{135}\text{Ba}$ )	$^{103}\text{Rh}$	0.004	0.2	N.D.	2	98.3	1.98
镉 ( $^{111}\text{Cd}$ )	$^{103}\text{Rh}$	0.00006	0.003	N.D.	2	93.2	0.64
钴 ( $^{59}\text{Co}$ )	$^{45}\text{Sc}$	0.004	0.2	N.D.	2	93.8	1.92
铬 ( $^{52}\text{Cr}$ )	$^{45}\text{Sc}$	0.007	0.35	N.D.	2	98.4	1.23
铜 ( $^{63}\text{Cu}$ )	$^{45}\text{Sc}$	0.004	0.2	N.D.	2	102.7	0.32
铁 ( $^{56}\text{Fe}$ )	$^{45}\text{Sc}$	0.046	2.3	N.D.	2	103.0	0.15

汞 ( <sup>202</sup> Hg)	<sup>185</sup> Re	0.008	0.4	N.D.	0.4	100.9	1.17
锂 ( <sup>7</sup> Li*)	<sup>45</sup> Sc*	0.044	2.2	N.D.	2	100.5	2.57
锰 ( <sup>55</sup> Mn)	<sup>45</sup> Sc	0.005	0.25	N.D.	2	99.3	1.47
镍 ( <sup>60</sup> Ni)	<sup>45</sup> Sc	0.028	1.4	N.D.	2	103.6	0.80
铅 ( <sup>208</sup> Pb)	<sup>185</sup> Re	0.005	0.25	N.D.	2	102.3	0.85
锑 ( <sup>121</sup> Sb)	<sup>103</sup> Rh	0.100	5	N.D.	2	99.5	3.20
硅 ( <sup>28</sup> Si)	<sup>45</sup> Sc	10.04	502	N.D.	200	93.1	7.55
钒 ( <sup>51</sup> V)	<sup>45</sup> Sc	0.001	0.05	N.D.	2	98.7	1.22
锌 ( <sup>66</sup> Zn)	<sup>89</sup> Y	0.038	1.9	N.D.	2	92.5	1.55

备注： 1.N.D表示未检出； 2.\*为使用No Gas模式，其余为He气碰撞模式；

分析结果显示，岛津ICPMS-2030质谱仪测定蛋白药物水针制剂中的杂质元素含量，各元素的测定结果稳定性高，准确性好，加标回收率在92.5~107.7%之间，能够满足蛋白药物水针制剂中杂质元素的快速分析。

### 3. 结论

通过水浴加热酸消解的方式对样品进行消解，利用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测定了蛋白药物水针制剂中杂质元素的含量。元素线性关系及重复性好，定量准确，各元素的相关系数  $r > 0.9995$ ，加标回收率在 92.5~107.7%之间，该方法操作简便、快速，样品前处理简单，可以满足蛋白药物水针制剂中杂质元素的测定需求。

## 7 ICPMS-2030 测定缩宫素注射液中的元素杂质

**摘要：**本文参考 ICH Q3D 元素杂质指南及 USP<233> 对杂质元素的测定方法，利用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测定了缩宫素注射液中杂质元素的含量。实验结果表明：各元素的相关系数  $r > 0.9998$ ，加标回收率在 99~111% 之间，满足 USP<233> 对样品加标回收率 70%~150% 的要求，6 份样品 0.5 倍限量值加标回收率的相对标准偏差小于 3%，方法的精密度值 (%RSD) 完全符合 USP<233> 规定每种目标元素的 RSD 值小于 20% 的要求，该方法操作简便、快速，样品前处理简单，可以满足 ICH Q3D 中对注射药物中杂质元素限量值的测定要求。

**关键词：**ICH Q3D USP<233> ICP-MS 缩宫素注射液 杂质元素

缩宫素是垂体后叶激素的主要成分，由 6 个氨基酸组成的环状结构和 3 个氨基酸组成的侧链结构构成。作为妇产科药物，缩宫素具有间接刺激子宫平滑肌收缩的作用，临床用于引产、催产、产后及流产后因宫缩无力或缩复不良而引起的子宫出血。近年来，药物的杂质残留，越来越受到医药界的关注，不仅仅是由于某些杂质具有毒性，而且这些杂质会对药品的稳定性、有效期限产生不利的影响，甚至引发有害的副作用。因此，建立一种处理简单、快速、灵敏度高的方法来对注射药物中的金属元素进行测定显得尤为必要。

本文参考 ICH Q3D 的限量要求和 USP <233> 方法规程，采用直接稀释法处理注射液样品，使用岛津 ICPMS-2030 测定了注射药物中多种杂质元素含量。该方法操作简单，定量准确，可以满足 ICH Q3D 对注射药物中杂质元素限量值的测定要求。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪

#### 1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿分别为塑料或玻璃材质，使用硝酸溶液 (1+1) 浸泡 24 小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验所用  $\text{HNO}_3$  为优级纯试剂，实验用水为超纯去离子水。

#### 1.3 样品前处理

移取 1 mL 试样于 100 mL 容量瓶中，加入 2 mL  $\text{HNO}_3$ ，加入 Au 溶液作为稳定剂（最终溶液中 Au 浓度为 1 mg/L），用超纯水定容至刻度线，摇匀，待测。同法制备样品空白溶液和样品加标溶液。

#### 1.4 仪器参数

等离子体参数：

高频功率：1.2 kW

辅助气流速：1.1 L/min

炬管类型：Mini

雾化室：旋流

采样深度：5.0 mm

雾化器类型：同心

等离子体气流速：8.0 L/min

雾室温度：5 °C

载气流速：0.7 L/min

高频频率：27.12 MHz

碰撞池参数：

碰撞气种类：He

碰撞气流速：6.0 mL/min

池电压：-21 V

能量过滤器电压：7.0 V

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准曲线溶液配制

根据药品剂型和每日最大剂量 ( $\leq 10$  g/day) 定义目标元素限值“J”值为分析杂质元素的可接受浓度, 即样品经前处理后待测元素在溶液中的最大限值。USP<233> 规定了标准曲线系列为两个标准溶液和一个空白溶液, 每个元素标准溶液高浓度为目标限值的 1.5 倍 (即 1.5 J), 低浓度为目标限值的 0.5 倍 (即 0.5 J), 待测元素的目标限值 (J)。

利用 2% 的硝酸溶液配制空白溶液、0.5 J 和 1.5 J 浓度的各个元素混合标准溶液, 加入 Au 溶液作为稳定剂 (最终溶液中 Au 浓度为 1 mg/L), 各元素的限量值及标准溶液浓度见表 1。内标元素 In、Bi 浓度均为 50  $\mu\text{g/L}$ , Ge、Sc 浓度为 500  $\mu\text{g/L}$ , 采用内标组件在线添加。

表 1. 元素限值及标准曲线溶液浓度系列

元素	质量数 (amu)	注射给药 PDE ( $\mu\text{g/day}$ )	元素限值 ( $\mu\text{g/g}$ )	元素限值 J ( $\mu\text{g/L}$ )	标准曲线系列 ( $\mu\text{g/L}$ )		
					0	0.5 J	1.5J
镉	111	2	0.2	2	0	1.0	3.0
铅	208	5	0.5	5	0	2.5	7.5
砷	75	15	1.5	15	0	7.5	22.5
汞	202	3	0.3	3	0	1.5	3.0
钴	59	5	0.5	5	0	2.5	7.5
钒	51	10	1.0	10	0	5.0	15
镍	60	20	2.0	20	0	10.0	30.0
铊	203	8	0.8	8	0	4.0	12.0
铋	191	10	1.0	10	0	5.0	15.0
铱	188	10	1.0	10	0	5.0	15.0
铯	103	10	1.0	10	0	5.0	15.0
钇	99	10	1.0	10	0	5.0	15.0
硒	78	80	8.0	80	0	40.0	120.0
铂	194	10	1.0	10	0	5.0	15.0

备注：1. PDE为每日允许暴露剂量 ( $\mu\text{g/day}$ )；

2. 根据 10 g/day 的剂量及稀释 100 倍计算得到元素限值 (J)

## 2.2 部分元素标准曲线如

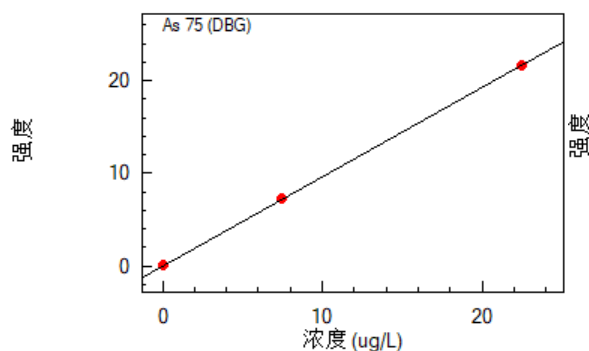


图 1. As 元素的标准曲线  $r=1.00000$

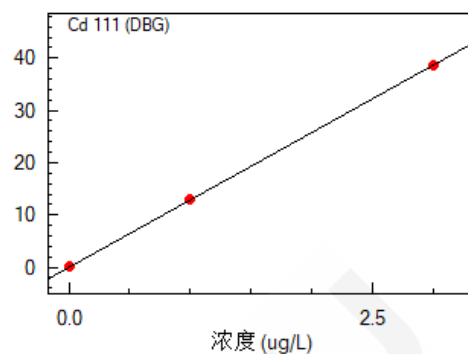


图 2. Cd 元素的标准曲线  $r=1.00000$

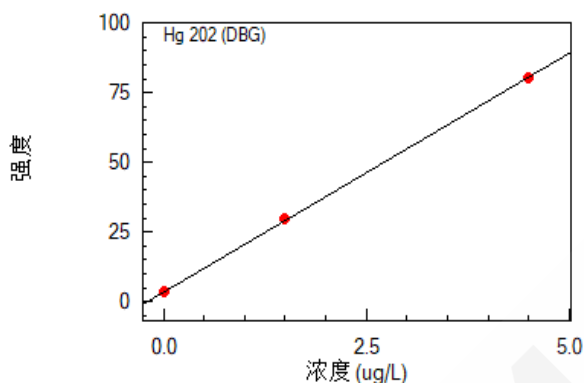


图 3. Hg 元素的标准曲线  $r=0.99998$

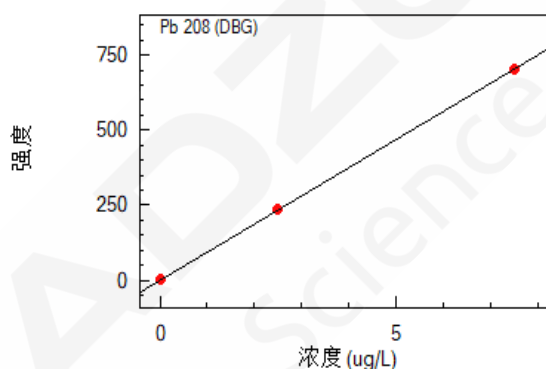


图 4. Pb 元素的标准曲线  $r=1.00000$

## 2.3 样品分析结果及加标回收率

按照实验方法，对空白溶液重复测定 10 次，取 3 倍强度的标准偏差除以曲线斜率求得各元素在溶液中的检出限；根据样品稀释倍数（100 倍），求得该方法的检出限；

测定样品中的杂质元素含量，每个样品重复测定 3 次；

根据 USP<233> 的指导原则，向样品中加入 0.5 J 限量的标准溶液，求出加标回收率，以考察方法的准确性。

表 2. 样品分析结果及加标回收率

元素	内标	分析结果 ( $\mu\text{g/L}$ )	0.5 J 加标 测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(n=3) (%)	0.5J 的加标 回收率 (%)	方法检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )
镉	$^{115}\text{In}$	ND	1.04	0.48	104	0.14
铅	$^{209}\text{Bi}$	0.21	2.81	0.79	104	0.08
砷	$^{72}\text{Ge}$	ND	7.70	1.05	103	0.97
汞	$^{209}\text{Bi}$	ND	1.66	2.32	111	6.78
钴	$^{45}\text{Sc}$	ND	2.72	1.25	109	0.09
钒	$^{45}\text{Sc}$	ND	5.17	0.72	103	0.13
镍	$^{72}\text{Ge}$	ND	10.8	1.78	108	1.08
铊	$^{209}\text{Bi}$	ND	4.14	1.68	104	0.02
铋	$^{209}\text{Bi}$	ND	5.22	1.64	104	0.02
铟	$^{209}\text{Bi}$	ND	4.98	1.96	100	0.07
铊	$^{115}\text{In}$	ND	5.33	1.26	107	0.06

钨	<sup>115</sup> In	ND	5.17	1.38	103	0.01
硒	<sup>72</sup> Ge	ND	39.7	0.49	99	4.90
铂	<sup>209</sup> Bi	ND	5.28	0.78	106	0.05

备注：ND 未检出；

结果显示，岛津 ICPMS-2030 质谱仪测定注射药物中的杂质元素含量，各元素的方法检出限远低于注射药物的含量限值，可以满足 ICH Q3D 对注射药物的杂质元素的限量要求。

0.5 倍的限量值的加标回收率在 99~111% 之间，满足 USP<233> 对样品加标回收率需要 70%~150% 的要求。

## 2.4 方法精密度实验

为了验证本方法的重复性，取 6 份同样的样品，分别向样品中加入各元素的 0.5 倍限量值（即 0.5J），求出 6 份样品加标测定结果的 RSD 值，确定方法的精密度，其结果见表 3。

表 3. 样品加标样测定结果和精密度

元素	加标样 (0.5J) 测定结果 (µg/L)						RSD (%)
	1#样品	2#样品	3#样品	4#样品	5#样品	6#样品	
镉	1.05	1.04	1.03	1.01	1.03	1.02	1.15
铅	2.80	2.82	2.80	2.72	2.73	2.91	2.48
砷	7.69	7.58	7.61	7.62	7.55	7.76	1.01
汞	1.66	1.67	1.63	1.58	1.64	1.67	1.90
钴	2.70	2.65	2.61	2.65	2.53	2.59	2.24
钒	5.16	5.11	5.00	5.14	4.90	5.01	1.94
镍	10.9	10.7	10.5	10.5	10.3	10.4	2.09
铊	4.12	4.13	4.10	4.05	4.05	4.16	1.06
铋	5.12	5.18	5.08	5.00	5.08	5.20	1.46
铍	5.04	4.99	4.95	4.84	4.99	5.09	1.69
铯	5.42	5.31	5.30	5.27	5.28	5.17	1.54
钨	5.25	5.14	5.13	5.12	5.12	5.06	1.19
硒	39.7	40.1	40.0	40.3	39.9	40.6	0.81
铂	5.20	5.11	5.09	5.05	5.03	5.12	1.16

结果表明，6 份样品 0.5 倍限量值加标样测定结果的相对标准偏差小于 3%，即该方法的精密度 (%RSD) 值完全符合 USP<233>规定的标准，即每种目标元素的 RSD 值小于 20%。

### 3. 结论

参考 ICH Q3D 元素杂质指南及 USP<233> 对杂质元素的测定方法，利用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测定了缩宫素注射液中杂质元素的含量。元素线性关系及重复性好，定量准确，各元素的相关系数  $r > 0.9998$ ，加标回收率在 99~111% 之间，6 份样品 0.5 倍限量值加标回收率的相对标准偏差小于 3%，各指标均符合 USP<233> 规定的标准。该方法操作简便、快速，样品前处理简单，可以满足 ICH Q3D 中对注射药物中杂质元素限量值的测定要求。



## 8 ICP-MS 法测定人血白蛋白中铝残留量

**摘要：**参考 2020 版《中国药典》通则 3208《人血白蛋白铝残留量测定》征求意见稿，使用岛津 ICPMS-2030 测定了人血白蛋白中铝的残留量。试验结果表明 ICPMS-2030 测定人血白蛋白样品中铝残留量具有较好的稳定性， $RSD(n=3)<5\%$ 。铝元素加标回收率 106%，可满足 2020 版《中国药典》通则 9101 规定回收率为 75~120% (1mg/kg) 的要求。

**关键词：**ICP-MS 人血白蛋白 铝

人血白蛋白是应对失血创伤引起的休克、脑水肿及损伤引起的颅压升高、肝硬化及肾病引起的水肿或腹水、新生儿高胆红素血症等疾病的一种静脉注射用药，在临床、急救上有重要的应用。人血白蛋白中铝残留量一直是《中国药典》严格限制的项目，且要求低于 200  $\mu\text{g/L}$ 。

在 2015 版《中国药典》中，仅将原子吸收分光光度法作为唯一测定人血白蛋白中铝残留量的方法，由于铝残留量限值较低、原子吸收分光光度计测定铝的稳定性较差等因素，人血白蛋白生产厂家在测定铝残留量的过程中存在很大的不确定性。2020 版《中国药典》对通则 3208 人血白蛋白铝残留量测定进行了增订，增加了电感耦合等离子体质谱法作为铝残留量测定的第二法，充分发挥电感耦合等离子体质谱法灵敏度高、准确度高等特点，可以很好的应对人血白蛋白铝残留量的测定。

ICP-MS 作为高灵敏度、多元素快速分析的无机质谱技术，是痕量、超痕量元素分析的主要手段，可以轻松应对人血白蛋白中铝残留量测定的需求。本文使用 ICP-MS 分析了人血白蛋白中铝残留量。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪。

#### 1.2 仪器分析条件

高频功率：1.2 kW

辅助气流速：1.1 L/min

炬管类型：Mini

雾化室：旋流

采样深度：5.0 mm

碰撞气体：He

碰撞气流速：0 mL/min

等离子体气流速：8.0 L/min

载气流速：0.7 L/min

雾化器类型：同心

雾室温度：5  $^{\circ}\text{C}$

高频频率：27.12 MHz

池电压：-21 V

能量过滤器电压：7.0 V

## 2. 样品前处理

精密移取供试品 1 mL，加稀释液（5 HNO<sub>3</sub> (v/v) 水溶液）9 mL，涡旋摇匀后静置 4 小时，静置后放入离心机中 4000 rpm 离心 30 min，上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后待测。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 标准曲线和检出限

用稀释液（5 HNO<sub>3</sub> (v/v) 水溶液）将铝元素标准溶液稀释为浓度分别为 0 μg/L、2.5 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、40 μg/L 的溶液。以 500 μg/L 的 <sup>45</sup>Sc 作为内标溶液，采用内标组件在线添加。标准曲线见图 1，检出限见表 1。

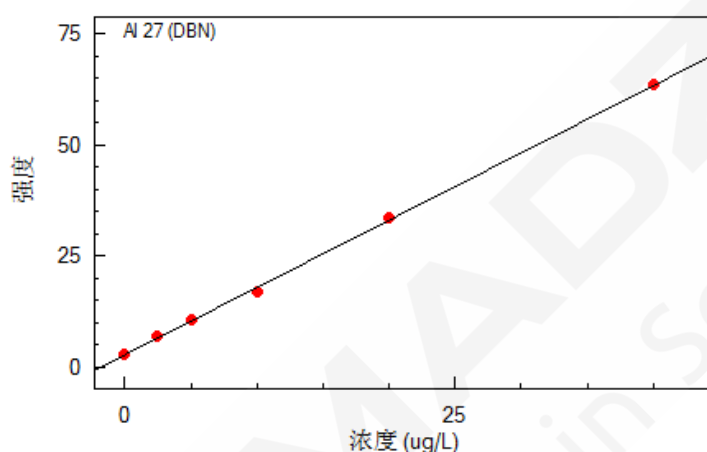


图 1. 铝标准曲线 ( $r=0.99974$ )

表 1. 铝元素检出限

元素	质量数(amu)	内标	检出限 (μg/L)	方法检出限 (μg/L)
Al	27	<sup>45</sup> Sc	0.13	1.3

### 3.2 样品结果

使用岛津 ICPMS-2030 测定人血白蛋白中铝残留量，按照限值浓度加标，并测定样品的加标回收率，实验结果见表 2。

表 2. 人血白蛋白铝残留量分析结果

元素	质量数	测定结果 (μg/L)	RSD(%) (n=3)	样品含量 (μg/L)	加标浓度 (μg/L)	测定结果 (μg/L)	加标回收率 (%)
Al	27	4.06	4.32	40.6	20	25.3	106

测定结果表明，ICPMS-2030 测定人血白蛋白样品中铝残留量具有较好的稳定性，RSD(n=3)<5%。加标回收率 106%，满足 2020 版《中国药典》通则 9101 规定回收率为 75~120% (1 mg/kg) 的要求。

#### 4. 结论

使用岛津 ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪测定了人血白蛋白中铝残留量，加标回收率 106%，样品测定相对标准偏差  $RSD < 5.0\%$ 。该方法具有灵敏度高，检出限低，重复性好，分析速度快，操作简单等特点，可以完全满足 2020 版《中国药典》规定的人血白蛋白中铝残留量分析的要求。



## 9 石墨炉原子吸收法测定人血白蛋白中铝的残留量

**摘要：**本文参考 2010 版《中国药典》（第三部），分别使用简单标准加入法和中国药典推荐方法测定了人血白蛋白中铝的残留量。实验结果表明，简单标准加入法测得结果与中国药典方法测定结果相当，相对误差不超过 1.41%。该方法操作简便，准确度高，适合大批量人血蛋白复杂基体样品的快速检测需求。

**关键词：**中国药典 人血白蛋白 铝残留量 简单标准加入法

人血白蛋白可以调节血液的胶体渗透压，临床上用量很大。在人血白蛋白生产过程中很容易引入金属元素污染，比如水源、瓶子及胶塞等，其中由于潜在的毒理作用，中国药典要求人血白蛋白中铝残留量不得高于 200  $\mu\text{g/L}$ 。

标准加入法是常用定量方法之一，该方法可以有效去除基体效应，在复杂基体样品分析中应用广泛，但是对于样品量比较大的用户，需要配制多条标准加入序列，工作量加大。简单标准加入法是简化了的标准加入法，对于基体相似样品，使用同一条工作曲线，简少了工作量。

本文参考 2010 版《中国药典》，分别采用简单标准加入法和中国药典方法对人血白蛋白中铝残留量进行测定。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器配置

AA7000、WizAArd 工作站

#### 1.2 试剂

实验中所用水为纯净水；

塑料器皿于硝酸溶液浸泡 24 小时；

铝标准使用液：100 ng/mL。

#### 1.3 仪器参数

分析测试参数见表 1。

表 1. 石墨炉原子化条件参数

元素	波长 (nm)	石墨管类型	灰化		原子化	
			温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间 (s)	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间 (s)
Al	309.3	平台石墨管	1200	30	2600	5

注：本样品粘性大，平台石墨管可以使样品延展在石墨管平台，受热均匀，灰化充分，原子化态蒸气分布均匀。

## 2. 实验方案

### 2.1 标准加入法及简单标准加入法

标准加入法可以避免复杂样品基体干扰，但是测定多个样品时，需要对每个样品配制标准加入序列，建立工作曲线方程；岛津 WizAard 工作站特有的“简单的标准加入法”功能，对于基体相同或相似样品只需配制一个样品标准加入序列，其他基体相似样品无需建立独立标准加入序列，使用同一条工作曲线方程。

表 2. 标准加入法方案设计

项目	浓度/ (ng/mL)			
	0	2	4	6
样品/mL	0.1	0.1	0.1	0.1
标准铝溶液/mL	--	0.1	0.2	0.3
2%硝酸镧/mL	0.5	0.5	0.5	0.5
1% HNO <sub>3</sub> /mL	4.4	4.3	4.2	4.1

### 2.2 药典方法（中国药典第三部 附录VII K）

药典采用单点校正法测定，并且浓度校正点吸光度通过铝标准溶液加样品混合液吸光度减去样品吸光度得到，这样测得基体匹配下的标液吸光度值，从而有效的避免了样品基体对测定可能产生的影响。

按照表 2，精密移取制备空白对照、样品液、混合液（铝标准溶液和样品混合液），依次进样。铝含量计算公式：

$$c_{Al} = \frac{8 \times (S_0 - B) \times 25}{S - S_0}, \text{ ng/mL}$$

其中： $S_0$ ——样品液吸光度读数；

$B$ ——空白对照吸光度读数；

$S$ ——混合液吸光度读数。

表 3. 药典方法方案设计

项目	空白对照	样品液	混合液
样品/mL	-	0.1	0.1
铝标准溶液/mL	-	-	0.2
1% HNO <sub>3</sub> /mL	2.5	2.4	2.2

### 3. 实验结果

#### 3.1 简单标准加入法

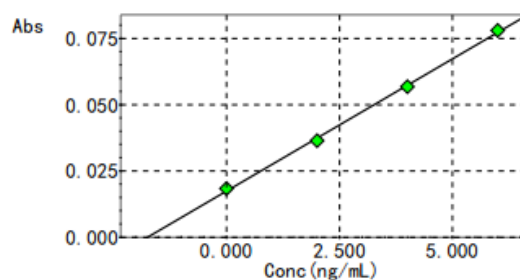


图 1. 标准加入法曲线

表 4. 简单标准加入法测试结果

样品	1#	2#
样品液 ( $S_0$ )	1.151	1.749
稀释倍数	50	
铝残留 $C_{Al}$ , $\mu\text{g/L}$	57.55	87.45

注：本实验以 2#采用标准加入法，1#采用简单标准加入法。

#### 3.2 药典方法

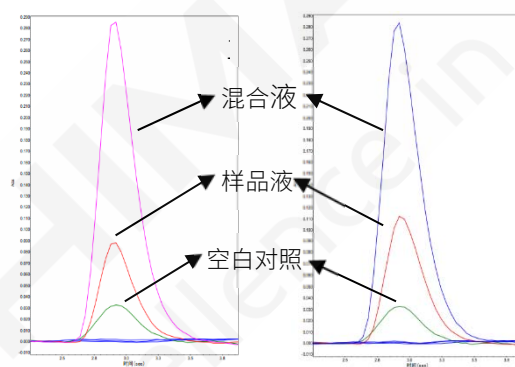


图 2. 药典方法样品原子化轮廓峰

表 5. 药典方法测试结果

样品	1#	2#
空白对照 (B)	0.0316	
样品液 ( $S_0$ )	0.0870	0.1078
混合液 (S)	0.2850	0.2840
铝残留 $C_{Al}$ , ng/mL	55.96	86.49
简单标准加入法 $C_{Al}$ , ng/mL	57.55	87.45
相对误差, %	1.41	0.55

#### 4. 结论

本文参考 2010 版《中国药典》第三部，分别使用简单标准加入法和药典方法对人血白蛋白中铝残留量进行测定。实验结果表明，两种测定方法相对误差不大于 1.41%，利用简单标准加入法可以快速准确测定人血蛋白大批量复杂基体的样品，可大大提高分析工作效率。



## 第三章 聚集体与不溶性微粒分析

蛋白质药物是目前销售量最大的生物技术药物，但确定种类的蛋白质分子本身非常不稳定，其结构中非共价键的稳定性很容易受摇动、温度等外界环境因素和自身化学键相互作用的影响形成可逆或不可逆的非天然结构的寡聚体或多聚体。作为蛋白质产品的蛋白类药物，在生产过程中需要经过酸处理、热处理和机械处理等过程，这些过程都有可能产生蛋白质折叠甚至聚集。此外，蛋白类药物在贮藏、运输、销售以及用药过程中由于外力因素的作用也可能产生聚集。蛋白质类药物发生聚集后，会导致药物活性与药品中蛋白单体浓度降低，从而药效明显减弱或消失，严重时还会产生有害的毒理学作用和因免疫反应而导致人体出现休克症状。因此，蛋白质聚集是生物治疗药物蛋白质的关键质量属性。监测聚集体的形成，对蛋白质类生物药的安全和质量保证来说至关重要。

对于小于 100nm 的不可见聚集体的分析，体积排阻色谱（Size exclusion chromatography, SEC）由于其灵敏度好、操作简单、样品前处理少、分析速度快、分离条件温和等特点，自重组蛋白药物诞生以来一直是蛋白类药物聚集体表征的标准技术之一。当不引起样品聚集状态的变化并且可消除与柱填充介质的非特异性相互作用时，SEC 被认为是最为稳定与准确的分析方法。该技术在监测蛋白质药物的稳定性和降解模式方面发挥着重要作用，对于指导蛋白质药物筛选及纯化工艺的开发具有重要意义。岛津基于 SEC 的分析原理，充分利用生物兼容液相系统 Nexera Bio 和 Shim-pack Bio 尺寸排阻色谱柱开发出多种蛋白类药物聚集体分析方法，可提供良好峰形、快速分离、稳定可靠的技术手段。

对于 10 $\mu$ m 以上的不溶性微粒分析，美国药典和日本药典规定使用光阻法进行检定，2020 版中国药典第四部关于不溶性微粒物检查，第一法光阻法，第二法显微计数法。光阻法只能给出计数浓度，不能查看粒子形貌及聚集状态，显微计数法虽然能查看粒子形貌及个数，但检定效率低且代表性差。岛津基于流动成像技术开发的 iSpect DIA-10 粒子分析系统可以很好地解决上述问题，可为生物药开发及品质监控提供全新的解决方案。但在 100nm 至 10 $\mu$ m 之间的聚集体分析目前并无有效的评价方法、无相关的在线模拟实验（温度、机械压力影响）手段、无法进行定量分析、无法回收已测样品等。针对这一系列问题，岛津开发的 Aggregates Sizer 生物医药聚集体评价系统可以对 40nm 至 20 $\mu$ m 之间的粒子进行定量分析，可以弥补该类粒子分析的空缺。

本章节将对岛津生物兼容液相系统 Nexera Bio、生物医药聚集体评价系统 Aggregates Sizer 以及动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 对蛋白类生物技术药物聚集体与不溶性微粒的应用案例进行介绍，为生物技术药物聚集体分析提供可靠技术手段。

# 1 采用岛津 Nexera Bio 生物兼容液相系统进行 Fc 融合蛋白的多聚体分析

**摘要：**本文采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法。本实验采用岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱，考察了流动相盐浓度及流速对 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的影响。结果表明在 150 mM 磷酸钠缓冲液+500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 mL/min 的流速条件下，待测样品中的多聚体与单体分离效果良好。另外，样品经 6 次重复测定，Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%，单体和多聚体含量的 RSD 分别为 0.019%和 1.908%，重复性良好。本方法对 Fc 融合蛋白的质量控制具有较好的参考意义。

**关键词：**体积排阻色谱 生物液相 Fc 融合蛋白 多聚体

Fc 融合蛋白是利用基因工程等技术将某种具有生物学活性的功能蛋白分子与 Fc 片段融合而产生的新型蛋白，功能蛋白可以是能结合内源性受体（或配体）的可溶性配体（或受体）分子或其他需要延长半衰期的活性物质。该类融合蛋白不仅保留了功能蛋白分子的生物学活性，并且还具有一些抗体的性质，如长效半衰期。

融合蛋白容易在细胞培养和纯化生产工艺流程中聚集产生多聚体，另外，药物的存储条件及自身的稳定性对多聚体的产生也有着不同程度的影响。由于多聚体具有免疫源性，所以蛋白的纯度及多聚体含量的检测显得尤为重要。目前检测蛋白类药物的纯度主要有两种方法，非还原蛋白质电泳和体积排阻色谱法。非还原蛋白质电泳需要在变性条件下进行，一般会影响多聚体的检测，而体积排阻色谱法条件温和，不会对蛋白的形态产生较大的影响。因此，体积排阻色谱法能较准确的检出蛋白中多聚体的含量。

体积排阻色谱法（SEC）是利用多孔凝胶固定相的独特特性产生的一种主要依据分子尺寸大小的差异来进行分离的方法。本实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法对 Fc 融合蛋白中的多聚体分析条件进行了摸索和优化。Nexera Bio 采用了耐高压的 Peek 管路和惰性进样针，不仅耐腐蚀且能降低生物大分子的吸附有效地保障了良好的分析重复性。用于清洗柱塞的蠕动泵可以定时地对附着在柱塞表面的盐和缓冲液进行清洗，能有效降低盐析现象，实现高盐流动相体系下输液泵的稳定送液。本实验经色谱条件的优化，建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法，为该行业的用户进行多聚体分析提供参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 试剂

水：超纯水

磷酸二氢钠：ACROS

磷酸氢二钠：ACROS

氯化钠：Alfa Aesar

蛋白质分子量标准品：碳酸酐酶 29 kDa、牛血清白蛋白 66 kDa、 $\beta$ -淀粉酶 200 kDa、脱铁蛋白 443 kDa、甲状腺球蛋白 669 kDa，均为粉末，购自 Sigma Aldrich。

#### 1.1.2 仪器

本实验采用岛津 Nexera Bio 生物液相系统，包括 CBM-20A 系统控制器，Nexera Bio LC-20AD<sub>XR</sub> 输送泵，Nexera Bio SIL-20AC<sub>XR</sub> 自动进样器，Nexera Bio CTO-20AC<sub>XR</sub> 柱温箱，SPD-M20A 检测器，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-Sen SEC-H 300 (7.8 mm i.d.×300 mm L, 3  $\mu$ m, 300 Å)

流 动 相：150 mM 磷酸缓冲液-500 mM 氯化钠 (pH=7.0)

流 速：0.5 mL/min

柱 温：30°C

检 测 波长：280 nm

进样体积：10  $\mu$ L

### 1.3 样品处理

取 80 mg/mL 的 Fc 融合蛋白样品溶液适量，用水稀释至 5 mg/mL 。

## 2. 结果讨论

为确定 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的最佳流动相组成，本实验考察了不同磷酸盐缓冲液浓度、氯化钠浓度及流速变化对分析的影响。

### 2.1 磷酸缓冲盐浓度的选择

离子强度是影响 SEC 方法开发过程中提供色谱柱分离效果的一个重要因素，为最大限度地降低蛋白质与固定相填料的离子相互作用及二者之间可能存在的吸附作用，通常需要加入高浓度的盐溶液作为流动相以降低这种作用。本实验考察了 pH 7.0 条件下，25 mM、50 mM、100 mM 及 150 mM 磷酸缓冲盐与 150 mM 氯化钠组成的流动相对融合蛋白样品中多聚体分析的影响，以面积归一化法计算多聚体的含量，分析结果如图 1 和表 1 所示。

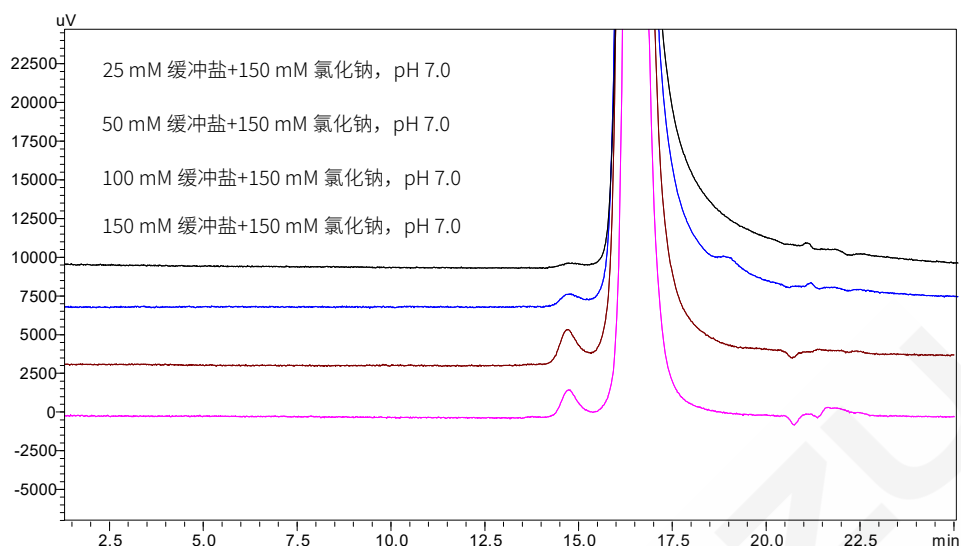


图 1. 不同浓度磷酸缓冲盐条件下样品溶液色谱图

表 1. 不同浓度磷酸缓冲盐条件样品分析结果

缓冲盐浓度 (mM)	主峰保留时间 (min)	主峰面积 (%)	多聚体峰面 积 (%)	主峰理论 塔板数	主峰分离 度	主峰拖尾 因子
25	16.398	100.000	--	4068	--	1.873
0	16.378	99.702	0.298	4453	1.807	1.585
100	16.396	99.102	0.898	4908	1.930	1.369
150	16.470	98.541	1.459	5050	2.027	1.329

从上述实验结果可知，在不同磷酸缓冲盐体系下，Fc 融合蛋白单体峰保留时间基本一致。在 25 mM 的磷酸缓冲盐浓度下，Fc 融合蛋白单体峰拖尾明显，单体峰之前的多聚体未被检出。随着磷酸缓冲盐浓度的增加，单体和多聚体的峰形更加尖锐，单体峰拖尾因子逐渐减小，多聚体的含量逐渐增加，主峰与多聚体峰的分​​离效果越来越好，故本实验选择 150 mM 作为磷酸缓冲盐的实验浓度。

## 2.2 氯化钠浓度的选择

为降低蛋白样品和固定相之间的非特异性相互作用，通常在流动相体系中加入合适的添加剂如 NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 等。本实验考察了 pH 7.0 条件下，150 mM、300 mM 及 500 mM 氯化钠与 150 mM 磷酸缓冲盐组成的流动相对融合蛋白样品中多聚体分析的影响，分析结果如图 2 和表 2 所示。

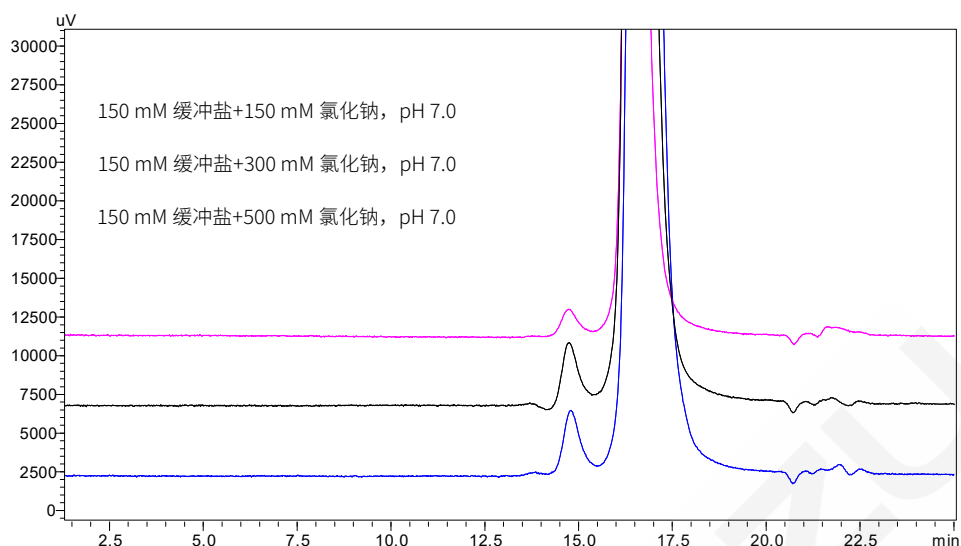


图 2. 不同浓度氯化钠条件下样品溶液色谱图

表 2. 不同浓度氯化钠条件下样品分析结果

氯化钠浓度 (mM)	主峰保留时 间 (min)	主峰面积 (%)	多聚体峰面 积 (%)	主峰理论 塔板数	主峰 分离度	主峰拖尾 因子
150	16.470	98.541	1.459	5,050	2.027	1.329
300	16.527	98.244	1.756	4,717	2.060	1.382
500	16.649	98.225	1.775	4,488	2.097	1.369

从上述实验结果可知，在不同氯化钠浓度下，Fc 融合蛋白单体主峰保留时间无明显变化。随着氯化钠盐浓度的提高，单体与多聚体的分离度有所提高，故本实验选择 500 mM 氯化钠作为实验浓度。

### 2.3 流速选择

线速度会影响基于蛋白质尺寸分离的分离度。本实验考察了 0.3 mL/min、0.5 mL/min 和 0.8 mL/min 的流速对多聚体分析的影响，分析结果如图 3 和表 3 所示。

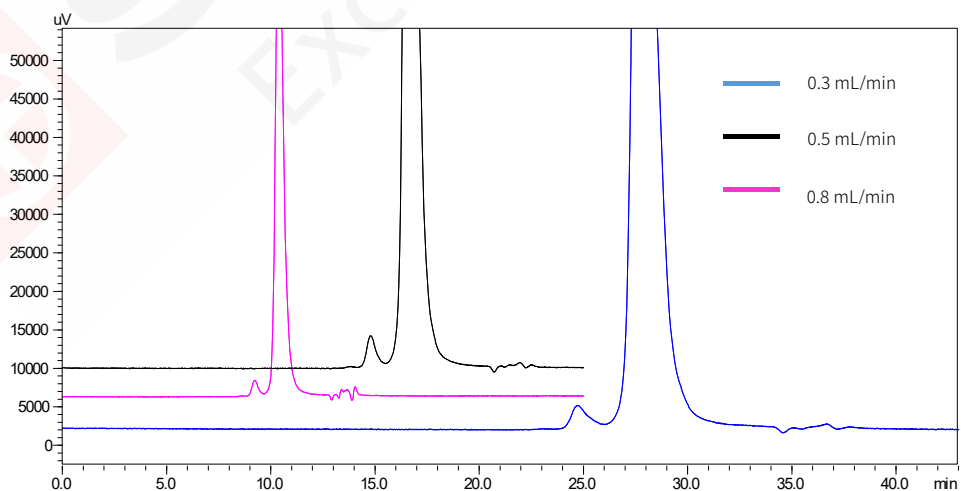


图 3. 不同流速条件下样品溶液色谱图

表 3. 不同流速条件下样品分析结果

流速 (mL/min)	主峰保留时间 (min)	主峰面积 (%)	多聚体面积 (%)	主峰理论 塔板数	主峰 分离度	主峰拖尾 因子
0.3	27.821	98.640	1.360	4851	2.120	1.400
0.5	16.649	98.225	1.775	4488	2.097	1.369
0.8	10.388	98.194	1.806	4031	1.980	1.353

由上述结果可知，随着流速的增加，Fc 融合蛋白单体和多聚体的保留时间提前，多聚体与单体之间的分离度随之下降。低流速有利于多聚体的分离，但色谱峰峰宽增加明显。综合分析效果，本实验选择 0.5 mL/min 的流速作为实验条件。

## 2.4 色谱柱孔径的选择

本实验选择岛津 Shim-Sen SEC-H 系列的色谱柱作为蛋白多聚体分析的体积排阻色谱柱，由于本实验的目的为测定 Fc 融合蛋白样品（约 80kDa）中的多聚体，根据 SEC-H 系列色谱柱的蛋白分离范围（表 4）及待测蛋白的分子量，孔径为 300 的色谱柱为首选色谱柱。在上述选择的色谱条件下，以 Shim-Sen SEC-H 300 分析 5 种不同分子量的标准蛋白（图 4），结果表明，各标准蛋白之间的分离度良好，说明该色谱柱适用于待测样品中多聚体的分析。

表 4. 岛津 Shim-Sen SEC-H 化合物分离范围

孔径	蛋白分离范围	水溶性聚合物分离范围
80	<10000	-----
100	100-100000	500-10000
150	500-150000	500-25000
300	5000-1250000	1000-100000

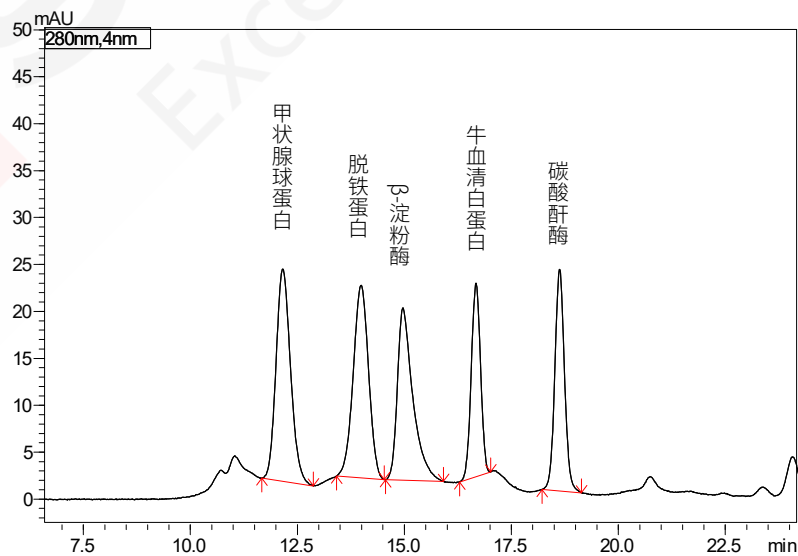


图 4. 标准蛋白 SEC 色谱图

## 2.5 重复性试验

在 150 mM 磷酸钠缓冲液+500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 ml/min 的流速条件, 对 5 mg/mL 的样品溶液重复测定 6 次, 重复性样品典型色谱图及结果如图 5 和表 5 所示。重复测定 6 次, 主峰与多聚体色谱峰分离度无明显变化, Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%, 单体和杂质含量的 RSD 分别为 0.019%和 1.908%, 重复性良好。

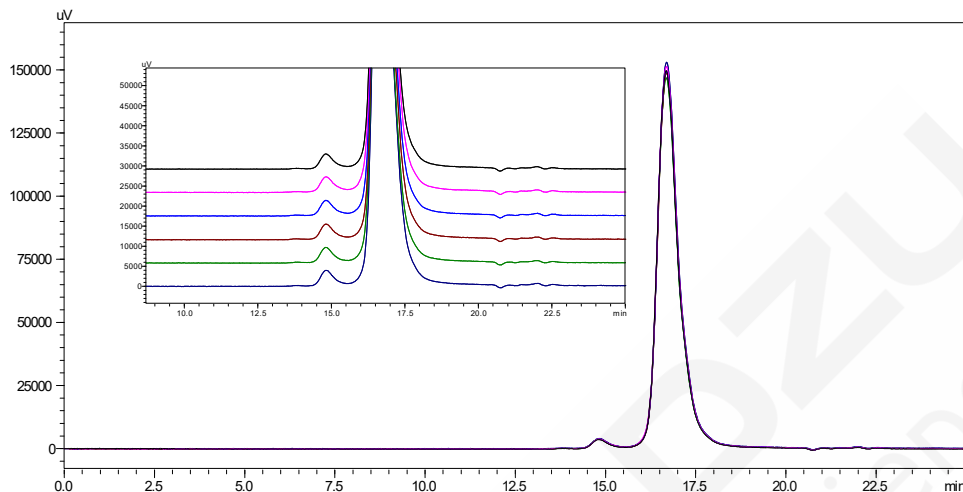


图 5. 重复性典型样品色谱图

表 5. 重复性实验结果 (n=6)

No.	主峰保留时间 (min)	主峰面积 (%)	多聚体面积 (%)	主峰 分离度	主峰 拖尾因子
1	16.683	98.336	1.664	2.088	1.383
2	16.689	98.346	1.654	2.095	1.359
3	16.687	98.325	1.675	2.090	1.380
4	16.689	98.332	1.668	2.103	1.386
5	16.683	98.295	1.705	2.088	1.382
6	16.692	98.341	1.659	2.119	1.385
RSD (%)	0.021	0.019	1.098	---	---

### 3. 结论

本实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法建立了 Fc 融合蛋白多聚体的分析方法。采用岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱, 考察了流动相盐浓度和流速对 Fc 融合蛋白样品多聚体分析的影响。结果表明在 150 mM 磷酸钠缓冲液+500 mM 氯化钠 (pH=7.0) 的流动相、0.5 ml/min 的流速条件下, 待测样品中的多聚体与单体分离效果良好。另外, 本文分析了待测样品中多聚体分析色谱柱的选择依据, 以 Shim-Sen SEC-H 300 为色谱柱, 样品经 6 次重复测定, Fc 融合蛋白单体保留时间 RSD 为 0.021%, 单体和多聚体含量的 RSD 分别为 0.019%和 1.908%, 重复性良好。本方法对 Fc 融合蛋白的质量控制具有较好的参考意义。

## 2 利用岛津 Nexera Bio 生物兼容液相系统进行贝伐单抗生物类似药的多聚体分析

**摘要：**实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio，根据体积排阻色谱法分离原理，建立了贝伐单抗多聚体的分析方法。本实验采用岛津 Shim-pack Bio Diol-300 体积排阻色谱柱进行分析，10min 内完成单抗单体与二聚体的分离，通过连续进样六针，考察峰面积与保留时间重复性。结果表明该方法对贝伐单抗与未知两种单抗检测所得的保留时间和峰面积的变化小于 RSD 1%，重复性较好，可对单抗检测提供快速、稳定的检测手段。

**关键词：**Nexera Bio 单抗 SEC 多聚体

单克隆抗体 (mAb) 是治疗癌症的重要生物制剂。mAb 生物类似药的生产具有挑战性，因为在上游和下游处理 (DSP) 中可能发生各种变化。蛋白质聚集是这种变异之一，这是一种 mAb 积聚并聚集在一起的生物现象。聚集属于关键质量属性 (CQAs)，因为聚集体不仅降低 mAb 生物类似药的功效，而且还可以刺激免疫原性反应，导致治疗中的各种不良事件。因此，需要准确分析 mAb 的单体，二聚体和更高聚集体以开发更高质量的治疗剂。我们在这里提出了一种强大的，完善的尺寸排阻色谱 (SEC) 方法，用于 mAb 聚集分析。

### 1. 实验

在 Tris 缓冲液中制备 1mg/mL 的贝伐单抗生物类似药样品。样品直接进样到 Shimadzu Nexera Bio UHPLC-UV 进行分析。分析条件如表 1 所示。

表 1. 用于表征 mAb 聚集的尺寸排阻色

LC system	: Nexera Bio UHPLC
Column	: Shim-pack Bio Diol-300 (150 mm x 4.6 mm; 2 $\mu$ m)
Column temperature	: Ambient
Mobile phase	: 150 mM Sodium Phosphate buffer, pH 7.0
Flow rate	: 0.2 mL/min
Elution mode	: Isocratic flow
Elution time	: 15 min
Injection volume	: 5 $\mu$ L
Detector	: UV, 220 nm

### 2. 结果和讨论

图 1 显示了贝伐单抗生物类似药的单体和二聚体的相对丰度，其中峰在 10 分钟内快速洗脱。结果表明，贝伐单抗生物类似药由约 1.9% 二聚体和 98.1% 单体组成。评估 UHPLC-UV 系统下每次样品分析的重现性，如图 2 所示。

对于单体和二聚体，六次样品分析的保留时间和峰面积的变化小于 RSD 1% (表 2)。此外，该方法和 UPHLC-UV 系统用于分析另外两种 mAb 样品 (图 3)。结果表明两种 mAb 样品的单体纯度均大于 95%。

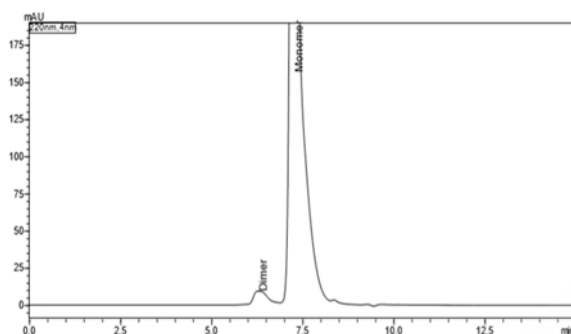


图 1. UHPLC-UV (220nm) 贝伐单抗生物类似药的色谱图

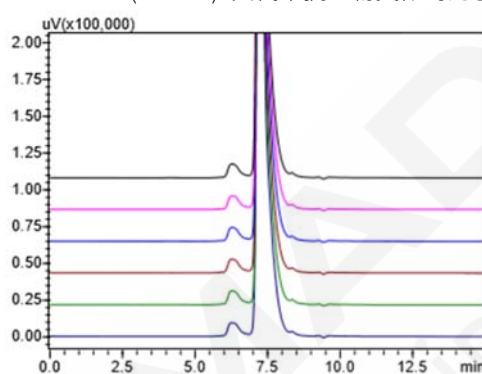


Figure 2 UHPLC-UV (220 nm) chromatograms of six injections of bevacizumab biosimilar sample.

图 2. UHPLC-UV (220nm) 贝伐单抗生物类似药六次进样分析的色谱图。

表 2. 贝伐单抗生物类似药的二聚体和单体的保留时间和峰面积 (n=6) 多次进样之间的重复性

	Dimer		Momomer	
	RT	Area	RT	Area
Injection_1	6.276	213,014	7.245	11,104,320
Injection_2	6.287	213,566	7.252	11,101,718
Injection_3	6.289	213,197	7.246	11,100,827
Injection_4	6.291	212,678	7.249	11,092,490
Injection_5	6.292	212,686	7.251	11,066,707
Injection_6	6.291	212,615	7.244	11,035,553
Average	6.288	212,959	7.248	11,083,553
%RSD	0.094	0.176	0.046	0.246

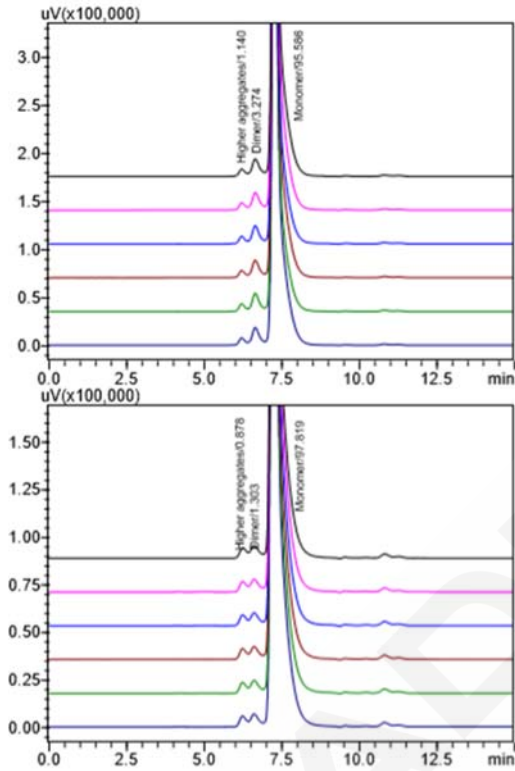


图 3. UHPLC-UV (220nm) 2 种未知 mAb (上, 下图) 样品六次进样分析色谱图, 结果重现性好

### 3. 结论

我们在 Nexera Bio UHPLC 系统下建立了快速的 SEC 方法, 并用于定量 mAb 聚集体。评估了该方法的保留时间和峰面积的稳定性和重复性 (RSD <1%)。

## 3 Nexera Bio 生物兼容性液相色谱系统用于阿达木单抗的聚集体分析

**摘要:** 本文使用尺寸排阻色谱 (SEC) 进行单克隆抗体 (mAb) 聚集体分析, 采用色谱柱为 Shim-pack Bio Diol-200, 流动相为 150 mmol/L 磷酸钠缓冲液和 150 mmol/L 氯化钠溶液的流动相条件进行分析, 二聚体和单体分离度为 2.232, 色谱分离良好。重复性结果显示, 二聚体和单体的保留时间和峰面积的 RSD% 均小于 0.5%, 重复性良好。实验数据表明 Nexera Bio 液相色谱系统和 Shim-pack Bio SEC 色谱柱在 SEC 分析中, 可以提供良好色谱峰形, 带来快速有效分离, 保证稳定可靠分析。

**关键词:** Nexera Bio HPLC Shim-pack Bio mAb 聚集体 SEC

单克隆抗体 (mAb) 是一类单一 B 细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体。一般通过杂交瘤技术或基因工程技术构建细胞株, 经过细胞培养代谢、纯化等工艺步骤制备产生。

mAb 在生产、储存、运输过程中都会伴随聚集体的形成, 这种聚集体的形成多由单抗氨基酸序列的错误折叠、不完全折叠造成 “hot spots” 的暴露, “hot spots” 一般为氨基酸序列, 具有高度疏水性、低电荷性且易形成  $\beta$ -折叠等特性, 接着以 “hot spots” 为核心将不同单体聚集在一起, 进而形成成为聚集体。单抗的聚集体会影响其作为治疗药物的安全性和有效性, 聚集体不仅会降低药物的效果, 还会引起机体的免疫反应, 具有潜在的副作用。故在 mAb 研发、生产过程中需对其聚集体进行严格监控。

尺寸排阻色谱 (SEC) 是 mAb 聚集体分析常用的一种分析方法。此应用利用 Nexera Bio 生物惰性液相系统和 Shim-pack Bio Diol-200 生物惰性色谱柱进行 SEC 测试, 用于阿达木单抗的聚集体分析。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津 Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统。具体配置为: DGU-20A<sub>3</sub> 在线脱气机, LC-20AD<sub>XR</sub> Bio 输液泵, SIL-20A<sub>XR</sub> Bio 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。



图 1. Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统硬件示意图

## 1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-pack Bio Diol-200 (4.6 mm I.D. × 300 mm L., 3 μm)

流 动 相：含 150 mmol/L 磷酸钠和 150 mmol/L 氯化钠的水溶液 (pH=6.8)

流 速：0.5 mL/min

柱 温：30°C

波 长：214 nm

进 样 量：5 μL

洗脱方式：等度洗脱

## 1.3 样品制备

标准工作溶液配制：取适量阿达木单抗储备母液，用超纯水配制成浓度为 2.5 mg/mL 的工作溶液。

## 2. 结果讨论

### 2.1 Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统

Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统泵头采用惰性碳材料包覆，能够有效抵御高盐非挥发性缓冲盐腐蚀，延长使用寿命；不锈钢包覆的 PEEK 管路，提高系统耐压值；管路结合处利用金的优良延展性，让管路接合更紧密，避免微量漏液；高韧性和强度的化学惰性陶瓷针避免金属接触，降低样品非特异性表面作用。此生物惰性液相色谱系统能够显著提高生物大分子分析的耐用性和性能，保证分析的良好重现性，并极大降低高盐流动性体系的维护成本，为尺寸排阻色谱分析提供良好分析条件。

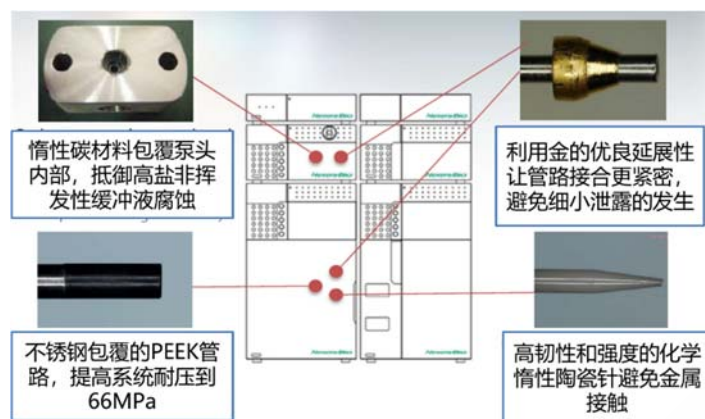


图 2. Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统

## 2.2 分离度考察

采用 Shim-pack Bio Diol-200 色谱柱，流动相为 150 mmol/L 磷酸钠缓冲液和 150 mmol/L 氯化钠溶液的流动相条件进行分离度考察，从表 1 中可以看出，二聚体和单体分离度为 2.232，分离效果良好，达到基线分离。拖尾因子为 1.015，色谱峰形匀称、尖锐。表明 Shim-pack Bio Diol-200 色谱柱能够提供良好色谱分离效果，以及降低生物样品非特异性表面作用，保证良好色谱峰形。

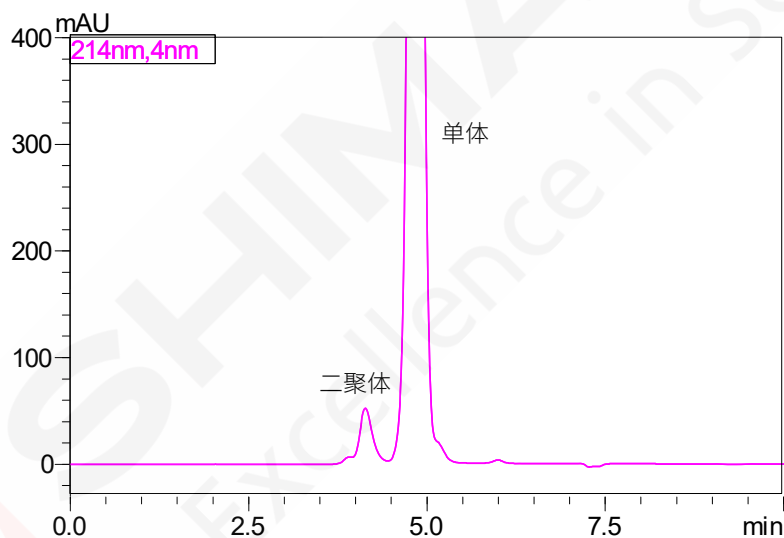


图 3. 分离度考察色谱图

## 2.3 重复性

将单抗工作溶液按上述分析条件进行重复测定 6 次，进行重复性考察。

从图 4 中可以看出二聚体与单体的分离度良好，在 7min 之内即可快速洗脱出来，表明 Shim-pack Bio 色谱柱在保证分离效果的基础上，减少分析时间，提高分析通量。从表 1 中看出，重复进样 6 次测试，二聚体和单体的保留时间和峰面积的 RSD%均小于 0.5%，表明分析方法重复性良好、Nexera Bio 生物惰性液相色谱系统稳定可靠。

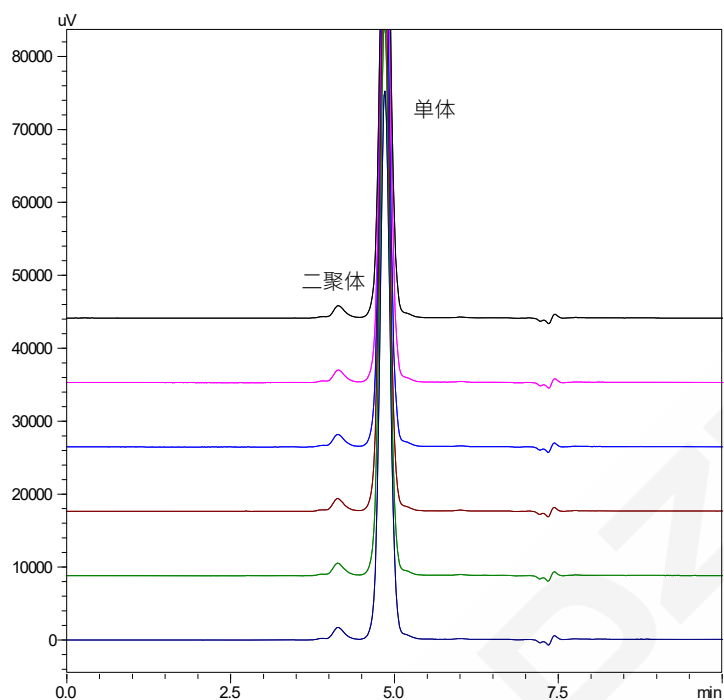


图 4. mAb 二聚体和单体的保留时间和峰面积 (n=6) 多次进样测试结果

表 1. 重复性结果

	二聚体		单体	
	RT(min)	Area	RT(min)	Area
Injection-1	4.142	613,148	4.857	24,851,784
Injection-2	4.142	617,394	4.856	24,976,957
Injection-3	4.135	618,005	4.849	24,993,118
Injection-4	4.132	618,310	4.845	25,016,533
Injection-5	4.133	617,998	4.847	25,009,431
Injection-6	4.138	614,078	4.852	24,824,758
Average	4.137	616,489	4.851	24,945,430
RSD%	0.11	0.37	0.10	0.34

### 3. 结论

本实验针对 SEC 分析 mAb 进行分析测试。结果表明在确定分析条件下，二聚体和单体分离度良好，且重复性结果良好，系统稳定可靠。在 Nexera Bio 生物惰性液相色谱下，能够有效避免高盐流动相及蛋白质易吸附等对分析结果稳定性的影响，同时配合 Shim-pack Bio 专用色谱柱，可以保证快速、高效、稳定分析，从而满足单克隆抗体药物质量控制中 SEC 分析的需求。

## 4 使用 Aggregates Sizer 测定不同压力条件下蛋白质的聚合物

**摘要：**本文使用生物医药品聚合物分析系统 Aggregates Sizer 对静脉注射免疫球蛋白聚合体的形成进行评价。实验结果表明，使用 Aggregates Sizer 不仅可以通过质量计算，还可以通过个数计算聚合体生成量，采用 qLD 法可以有效评价蛋白质在研发制造过程中受热压或机械刺激对生物药品的影响评价。

**关键词：**Aggregates Sizer 蛋白质 聚集体

近年来，因生物药物可对病原体进行特异性攻击，且副作用小，效果显著而备受关注。但是与低分子医药品相比，生物医药品具有抗压能力弱、容易聚合的弱点。有研究表明，生物医药品因压力发生聚合后，不仅会导致药效下降，还可能使药效消失，严重时还会因免疫反应而导致患者出现休克等症状。因此，生物药物生产领域，在可能受到的压力下（运输、保存及使用时的热压力和物理性压力）其稳定性的研究是非常重要的。

蛋白质制剂是生物医药品的一种，其聚合物的粒径范围在 0.2~10 μm 之间。该区域被称作 SVP (SubVisible Particle) 区域。传统蛋白质聚合体评价方法中存在“无法一次性完成 SVP 区域测定”、“无法边施压边测定”、“无法回收已测样品”和“无法进行定量”等问题。为了解决上述问题，岛津公司开发了生物医药品聚合物分析系统 Aggregates Sizer (图 1)。

本次分析使用 Aggregates Sizer 对 IVIG (Intravenous immunoglobulin, 静脉注射免疫球蛋白) 施加热压力和物理性压力，对聚合体的形成进行评价。通过定量分析 SVP 区域的聚合物浓度，可确定压力类型和搅拌板材质对聚合物形成过程和速度的影响。



图 1. 生物医药品聚合物分析系统“Aggregates Sizer”

### 1. 样品和测定方法

将静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 作为样品，使用 PBS (Phosphate buffer saline, 磷酸盐缓冲生理盐水) pH 7.4 作为缓冲液，对冻干样品进行了透析，并将其作为储备溶液在 4°C 以下保存。再用 PBS (pH 7.4) 将上述储备溶液稀释到 0.87 mg/mL 后进行测定。热压力分

析是在 1.5 mL 的管中，在 70°C 的温度下对 1 mL 的 IVIG 溶液（0.87 mg/mL）进行 5、7、9 分钟培养后，利用小容量池（0.4 mL）进行测定。搅拌压力分析使用玻璃、不锈钢（SUS 316）和 PEEK 等 3 种搅拌板进行测定。在 Aggregates Sizer 的附件批量检测池（图 2）中将 5 mL 的 IVIG 溶液（0.87 mg/mL）置于室温中，按照 190 次/分钟的速度搅拌，并进行 8 个小时的连续测定。

使用 Aggregates Sizer 根据 qLD 法（Quantitative Laser Diffraction，定量激光衍射散射法）进行 SVP 区域的粒径分布和定量分析。Aggregates Sizer 是一种采用波长 405 nm 大功率半导体激光器的衍射散射式粒度仪，可检测到 0.04°~160°的散射光强度。根据米氏散射理论可以得到特定直径和浓度下的球状粒子的散射模式以及强度，因此，通过将其与样品的散射模式相比，可以获得绝对浓度下的粒径分布。米氏散射理论的 qLD 法需要已知样品的折射率以及密度，本次分析使用的折射率 1.46-0.10i 由蔗糖浓度梯度得到，密度为 1.37 g/cm<sup>3</sup>。

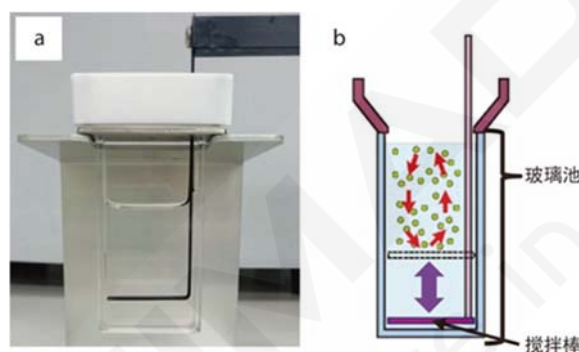


图 2. 批式池的结构

(a) 实物; (b) 示意图: 通过搅拌板上下运动施加物理性压力

## 2. 结果与结论

图 3 为基于热压力以及玻璃棒搅拌压力的 IVIG 聚合物粒径分布以及生成量的典型示例。由图可知，施加热压力时，只在 0.2 μm 附近增加聚合物，而 1 μm 以上的粒径处并未生成聚合物。施加搅拌压力时，随着时间的增加，可以发现在 0.2~10 μm 区域聚合物增加。FDA 认证中将 SVP 区域分为 0.2~2 μm 和 2~10 μm 两个区域进行评价，而使用 Aggregates Sizer 进行分析，只要测定一次就可以得到该区域的聚合物生成量信息。

综上所述，使用 Aggregates Sizer 不仅可以通过质量计算，还可以通过个数计算聚合物生成量。根据分析结果可知，qLD 法可有效评价蛋白质在制造和精制过程中所受热压力以及搅拌的影响。

### 参考文献

本报告是与大阪大学内山进老师等共同研究发表的论文摘要。详细内容请参照原文: "Quantitative Laser Diffraction Method for the Assessment of Protein Subvisible Particles", Totoki et al, 2014, J. Pharm. Sci. 104 (2): 618-626. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.24288/references> (开放存取)。

## 5 使用 Aggregates Sizer（带温控功能）进行蛋白质稳定性的加速试验

**摘要：**本文使用生物药品聚合物分析系统 Aggregates Sizer TC（带温控功能）进行蛋白质稳定性的加速试验。实验结果表明，聚合物生成量受加速试验温度的影响，随温度升高而增加。为了合理地评价加速试验时的聚合物生成量，温控极其重要。

**关键词：**Aggregates Sizer 蛋白质 加速试验

生物药品在生产、保管和运输过程中，会接触到金属、树脂、玻璃等各种物质，并且药品容器有不同的材质，蛋白质的稳定性会因其发生变化。因此，必须选择适当的材质作为容器。在实际制造工序中，从几种材质中进行选择将提高成本，并且需要长达几个月的时间进行验证。但如果通过加速试验事先选择材质，将有助于提高生物医药品生产流程的效率。

在本次分析中，我们使用生物药品聚合物分析系统 Aggregates Sizer TC（带温控功能）（以下简称为 Aggregates Sizer TC）附带的 3 种材质的搅拌盘（PEEK、不锈钢、玻璃），在一定温度下一边施加物理性压力一边监控聚合物生成量，以进行蛋白质稳定性的加速试验。由此可知，不同材质对聚合物产生的不同影响以及评价稳定性时温控的重要性。下文将进行详细说明。

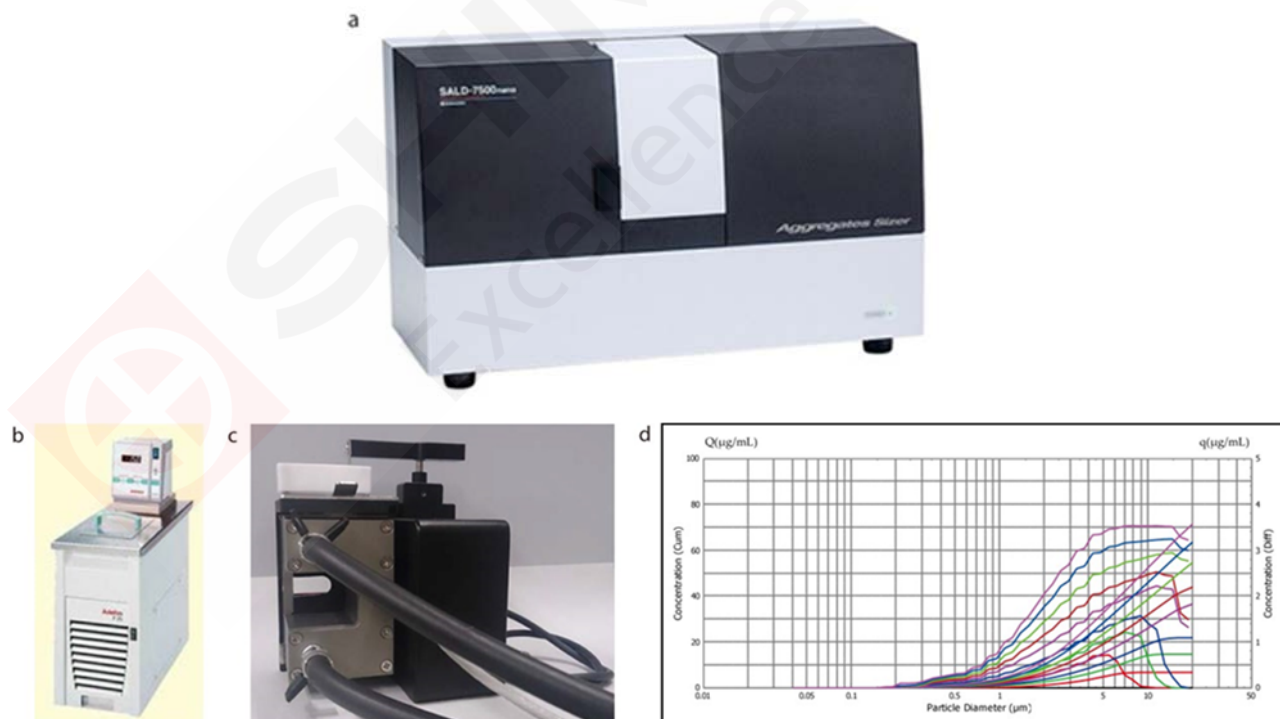


图 1. 生物药品聚合物分析系统 Aggregates Sizer TC（带温控功能）  
(a) 主机；(b) 循环恒温槽；(c) 批量检测池（带温控功能）；(d) 监控画面

## 1. 样品和测定方法

用 PBS (pH 7.4) 对从牛冷冻干燥样品提取的 Y-球蛋白进行制备的 1 mg/mL 溶液样品。

在批量检测池（带温控功能，图 1 (c)）中将 5 mL 的样品溶液按照 190 次/分钟的频率搅拌 40 分钟后进行测定。本次试验使用了 PEEK、不锈钢 (SUS 316) 和玻璃等 3 种材质的搅拌棒。另外，在加速试验中，使用循环恒温槽，将温度保持在 23°C、30°C 或者 42°C 的任意一个温度下然后测定。

粒径分布以及定量值使用 Aggregates Sizer 的 qLD 法 (Quantitative Laser Diffraction Method)，即定量激光衍射和散射法) 进行测定。其中，折射率为  $1.46 \sim 0.10i$ ，密度为  $1.37 \text{g/cm}^3$ 。

## 2. 结果与评价

图 2 为在 42°C 下使用 PEEK 搅拌盘时粒径分布经时变化的典型示例。由图可知，随着时间变化，聚合物逐渐生成。图 3 为聚合物分析标准的粒径范围  $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$  和  $2 \sim 10 \mu\text{m}$  内，在 23°C、经时 40 分钟后的聚合物生成量。比较各个区域的聚合物生成量可知，使用 PEEK 搅拌盘时在  $2 \sim 10 \mu\text{m}$  区域聚合物生成量最多，而使用不锈钢搅拌盘，在  $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$  区域的聚合物生成量最多。此外，在任一区域，使用玻璃搅拌盘生成的聚合物均为最少。图 4 为使用 PEEK 搅拌盘，在不同温度下的聚合物生成量的比较。由此可知，聚合物生成量受加速试验温度的影响，随温度升高而增加。综上所述，为了合理地评价加速试验时的聚合物生成量，温控极其重要。

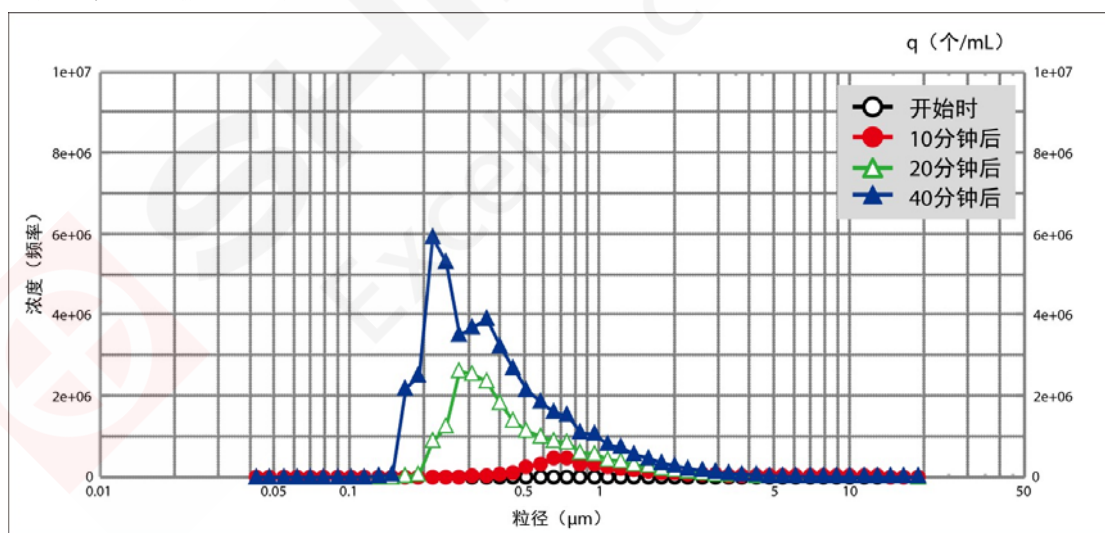


图 2. 加速试验中聚合体的生成过程 (PEEK、42°C)

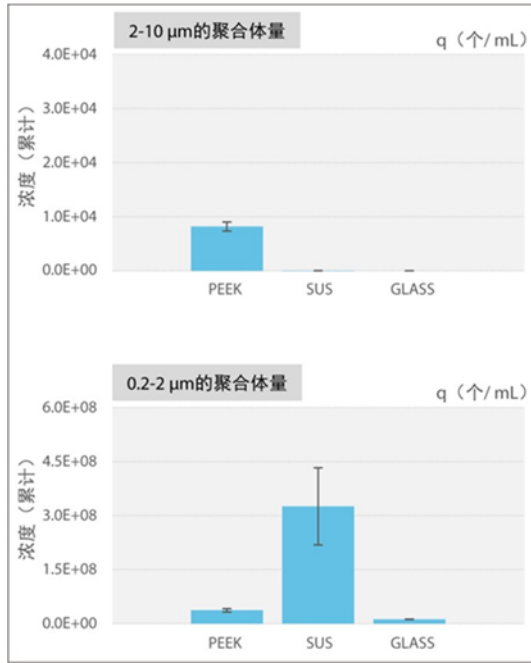


图 3. 各种材质的各区域内聚合体生成量的比较  
(23 °C、40 分钟后)

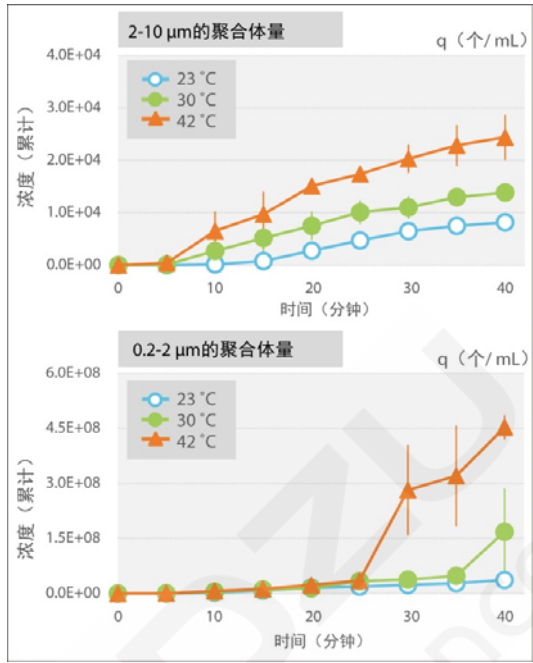


图 4. 在各温度下聚合体生成过程的比较  
(PEEK)

## 6 动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 测试生物药中不溶性颗粒的粒度、粒形和颗粒圆度

**摘要：**本文使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 建立了生物药中不溶性颗粒粒度、粒形和圆度的测试方法。实验结果表明，使用 iSpect DIA-10 在获取生物药中不溶性颗粒粒度的同时，还能直接观察颗粒物的粒形状况，并获得颗粒物的数量浓度，仪器操作简便，数据稳定，可快速获取生物药中不溶性颗粒的颗粒信息。

**关键词：**生物药 不溶性颗粒料 动态图像 粒度 粒形

随着生物技术的不断革新，生物药行业也在快速发展，其中蛋白类生物药如单抗、ADC、融合蛋白等的发展如火如荼。蛋白类生物药的稳定性对产品研发和临床试验都有很大影响，对最终成品的保存和运输也是重大考验。在蛋白类生物药的研发过程中，药物可能会发生团聚而形成粒径不同的聚集体，也可能在培养过程中大颗粒破裂成小颗粒，使样品中颗粒数量增多。无论是蛋白类生物药颗粒发生团聚或是破裂，都会对最终的产品造成影响。药物颗粒数量和粒径分布存在计数不便，需人工识别等缺陷，且无法有效获知颗粒物粒形信息。

岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 可弥补以上不足，不仅可获知颗粒粒度信息，还能直接观察颗粒物的粒形状况，并获得颗粒物的数量浓度。

本文采用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 测试生物药单抗中颗粒物的粒度和粒形，iSpect DIA-10 可以测量最小体积为 50  $\mu\text{L}$  的样品，样品消耗量少，因此还可以对稀缺样品进行测定。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10



图 1. 动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10

#### 1.2 实验器皿及试剂

1 mL 移液枪及枪头

## 2. 样品的前处理

取适量单抗药物样品使用 0.9%氯化钠注射液分散，摇匀后，使用移液枪直接吸取样品溶液，插入 iSpect DIA-10 仪器进样口后自动测试。

## 3. 样品测试

使用移液枪直接吸取样品，插入仪器进样口后自动测试，测定条件如下：

表 1. iSpect DIA-10 分析条件

参数	参数设定
帧速率	10 fps
进样体积	200 $\mu$ L
成像阈值	110
泵速	0.1 mL/min

## 4. 结果与讨论

### 4.1 粒径大小和分布

iSpect DIA-10 软件可以给出每个样品颗粒的粒径，并可按照多种条件进行筛选排列，如面积等效直径、费雷德 (Feret) 直径、周长、长宽比、圆度、最大长度等。使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 对单抗药物样品所含颗粒的形状和颗粒数浓度进行分析，并可以给出所有测试颗粒的面积等效直径及其他参数，我们选择按面积等效直径从小到大对颗粒进行筛选排列，不溶性颗粒的部分粒形特征如图 2~图 5 所示。

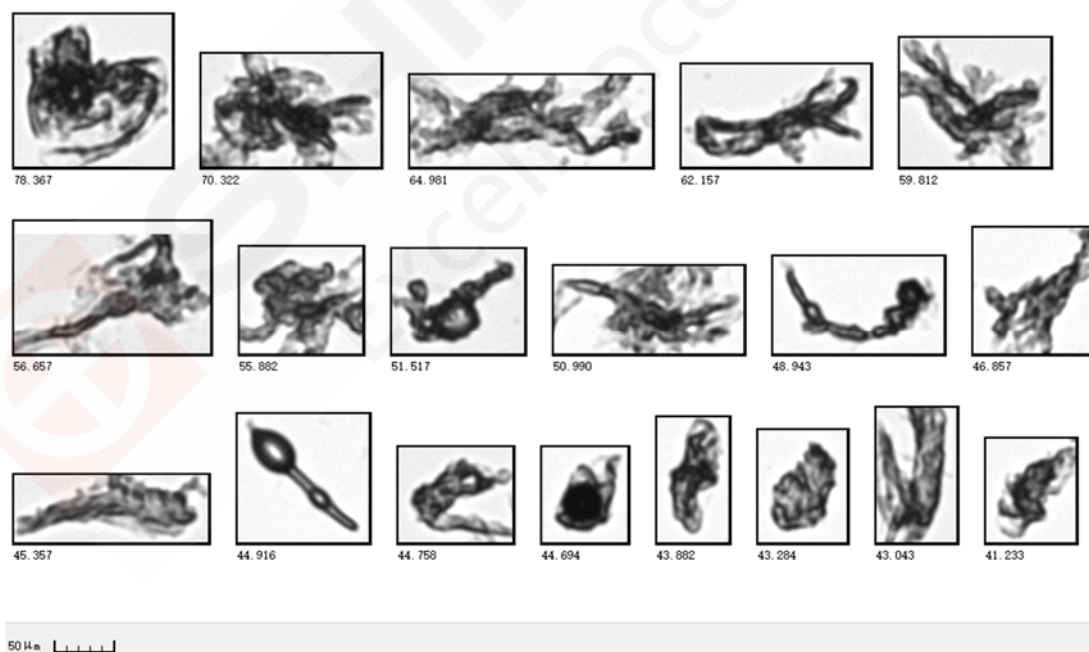


图 2. 单抗药物中不溶颗粒粒形图 (a)

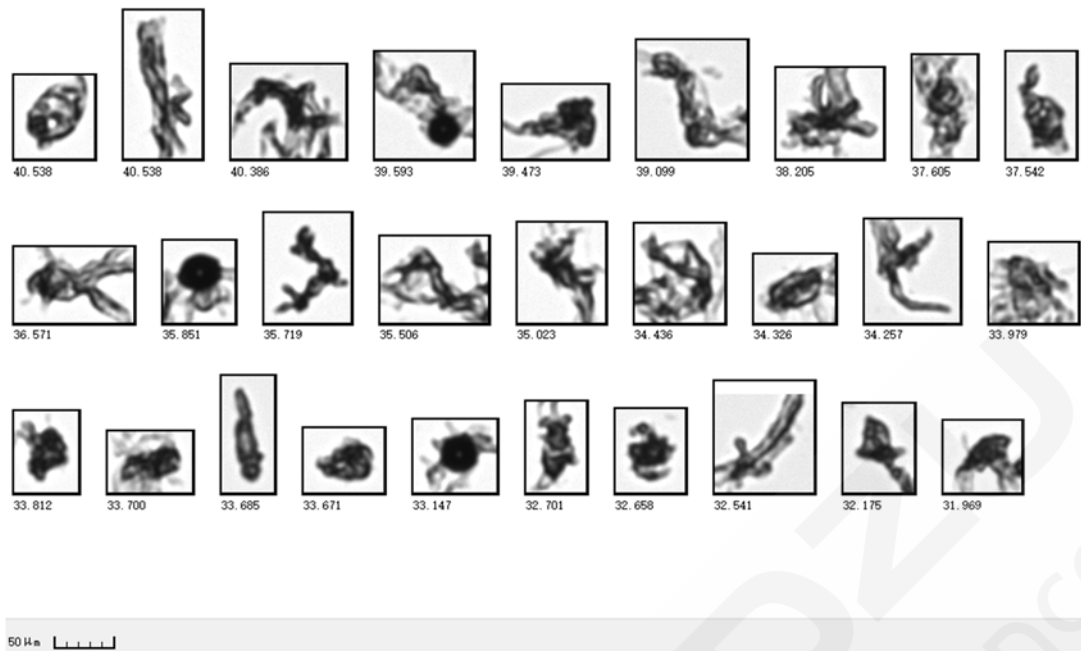


图 3. 单抗药物中不溶颗粒粒形图 (b)

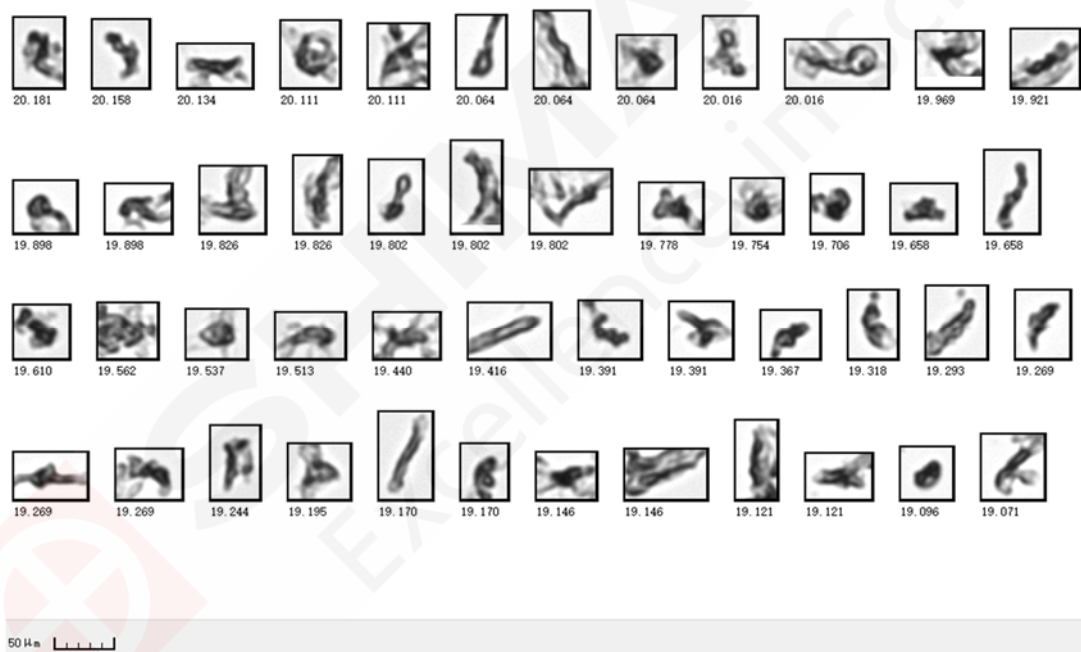


图 4. 单抗药物中不溶颗粒粒形图 (c)



图 5. 单抗药物中不溶颗粒形图 (d)

使用 DIA-10 进行分析，样品中所有流经流通池的颗粒都会被拍照记录下来，软件通过自动统计分析，可展示所有颗粒的排列图像并计算颗粒的粒径分布。实验结果显示，从样品颗粒形图可以得知样品中的颗粒形状不规则，同时存在少量粒径较大且形状不规则的颗粒，样品的颗粒数浓度为 52058 个/mL。可以使用软件的计算功能统计不同粒径范围颗粒的比例，不同粒径范围群颗粒数据统计如表 2 所示。

表 2. 单抗药物中不溶颗粒粒径统计表

统计条件	颗粒数浓度 (个/mL)	百分比 (%)
$X < 5 \mu\text{m}$	27610	53.0
$5 \mu\text{m} \leq X < 10 \mu\text{m}$	17876	34.4
$X \geq 10 \mu\text{m}$	6572	12.6
$X \geq 25 \mu\text{m}$	489	0.9

注：X 代表面积等效直径。

## 4.2 颗粒圆度分析

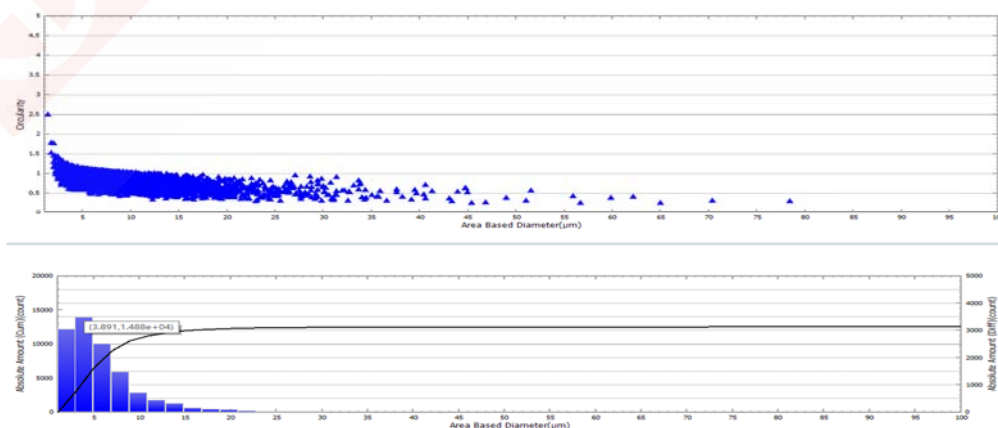


图 6. 单抗药物中不溶颗粒圆度-面积等效直径分布图 (上图) 和颗粒个数-面积等效直径分布图 (下图)

图 6 为单抗药物中不溶颗粒圆度-面积等效直径分布图和粒径分布图。圆度-面积等效直径分布图中纵坐标圆度 (Circularity) 表示颗粒圆形的程度, 圆度越接近 1 表示颗粒越圆。横坐标为颗粒的面积等效直径。测试软件可以实现对特定范围条件下颗粒个数、比例和圆度等的自动统计分析。这里举例如下: 圆度在 0.8~1.2 以外 (即形状不够圆) 的颗粒通过软件自动计算, 其比例如下表 3 所示。

表 3. 单抗药物中不溶颗粒圆度统计表

统计条件	颗粒数浓度 (个/mL)	百分比 (%)
$0.8 \leq Y < 1.0$	8855	17.0
$1.0 \leq Y < 1.2$	12469	24.0
$Y \geq 1.2$	18204	35.0
$Y < 0.8$	12530	24.0

注: Y 代表圆度。

## 5. 结论

本文使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 对单抗药物中不溶颗粒进行分析, 同时获知了单抗药物中不溶颗粒的粒度、粒形和颗粒圆度等信息。实验结果表明, 该单抗药物样品中的颗粒形状不规则, 同时存在少量粒径较大且形状不规则的颗粒。岛津 iSpect DIA-10 动态颗粒图像分析系统, 可高效的对生物样品所含颗粒进行快速分析, 在获取颗粒尺寸、形状的统计值以及颗粒数浓度信息的同时, 用户还可根据需求对样品中不同粒形的颗粒进行统计, 实现对生物样品中颗粒的形状、颗粒数浓度和成分识别的综合分析, 为生物药的研发提供助力。

## 7 岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 测试干扰素样品中的不溶性微粒

**摘要：**本文使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 建立了干扰素药品中不溶性微粒的测试方法，分别测试了使用预灌封注射器和西林瓶储存的干扰素样品中不溶性微粒。实验结果表明，西林瓶储存的干扰素样品中存在少部分的形状不规则微粒，预灌封注射器储存的干扰素样品中不溶性微粒均为圆形，使用预灌封注射器储存的样品中不溶性微粒数要大于使用西林瓶储存的样品。岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 在获取干扰素样品中不溶性微粒数量浓度同时，还能直接观察微粒的粒形状况，并获得不溶性微粒的粒度信息。该仪器操作简便，数据稳定，可快速获取干扰素中不溶性微粒的颗粒信息。

**关键词：**干扰素 不溶性微粒 预灌封注射器 西林瓶

干扰素是一类具有生物活性的糖蛋白，具有抗病毒、抑制细胞增殖、调节免疫及抗肿瘤作用。随着分子生物学及 DNA 重组技术不断革新，已有大批用于抗肿瘤、抗病毒的高效干扰素诞生，因此干扰素日益受到人们的广泛关注。

目前干扰素常见包装形式主要有药用玻璃瓶包装和预灌封注射器等。由于预灌封注射器主要用于小容量注射剂的包装存储，具有操作简便快速、剂量准确和降低污染等优势，在生物药和疫苗等药领域具有广泛用途。为保证预灌封注射器的活塞能在玻璃腔体内滑动自如，通常要对针管内腔和橡胶活塞进行硅活化处理。在药物储存和运输过程中，在外力作用下硅油会向药物中迁移。由于硅油与水不互溶，硅油会在药物中形成硅油滴。在硅油滴的作用下，药物中的蛋白质可能会发生聚集，继而形成不溶性微粒。在药物中的不溶性微粒进入人体后，可能会引发血栓、过敏反应和热原反应等不良反应，危害人体健康。因此，有必要对预灌封注射器储存的药物中的不溶性微粒进行检测。

本文采用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 分别对玻璃瓶包装和预灌封注射器储存的干扰素样品进行测试，iSpect DIA-10 可测量最小体积为 50  $\mu\text{L}$  的样品，样品消耗量少，因此可对稀缺样品进行测定。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10



图 1. 动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10

## 1.2 实验器皿及试剂

1 mL移液枪及枪头

## 2. 样品的前处理

西林瓶储存样品：由于样品为固体，按照说明书要求，向瓶内加入 1 mL 超纯水使样品复溶，摇匀后，使用移液枪直接吸取样品溶液，插入 iSpect DIA-10 仪器进样口后自动测试。

预灌封注射器储存样品：使用移液枪直接吸取样品溶液，插入 iSpect DIA-10 仪器进样口后自动测试。

## 3. 样品测试

使用移液枪直接吸取样品，插入仪器进样口后自动测试，测定条件如下：

表 1. iSpect DIA-10 分析条件（西林瓶储存样品）

参数	参数设定
帧速率	10 fps
进样体积	800 $\mu$ L
成像阈值	110
泵速	0.1 mL/min

表 2. iSpect DIA-10 分析条件（预灌封注射器储存样品）

参数	参数设定
帧速率	10 fps
进样体积	400 $\mu$ L
成像阈值	110
泵速	0.1 mL/min

## 4. 结果与讨论

### 4.1 不溶性微粒粒形和微粒数浓度测试

iSpect DIA-10 软件可以给出每个样品颗粒的粒径，并可按照多种条件进行筛选排列，如面积等效直径、费雷德（Ferret）直径、周长、长宽比、圆度、最大长度等。使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 分别对预灌封注射器和西林瓶储存的干扰素样品中不溶性微粒的形状和颗粒数浓度进行分析，还能获得所有测试不溶性微粒的面积等效直径及其他参数。选择按面积等效直径从大到小对颗粒进行筛选排列，西林瓶储存干扰素样品中不溶性微

粒的粒形图如图 2-图 5 所示，预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒的粒形图如图 6-图 9 所示。

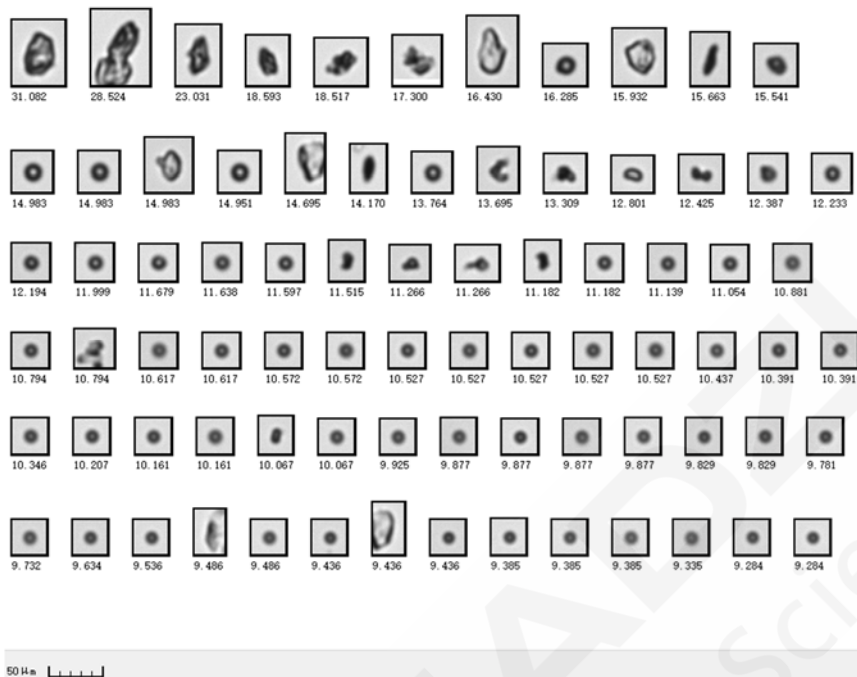


图 2. 西林瓶储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

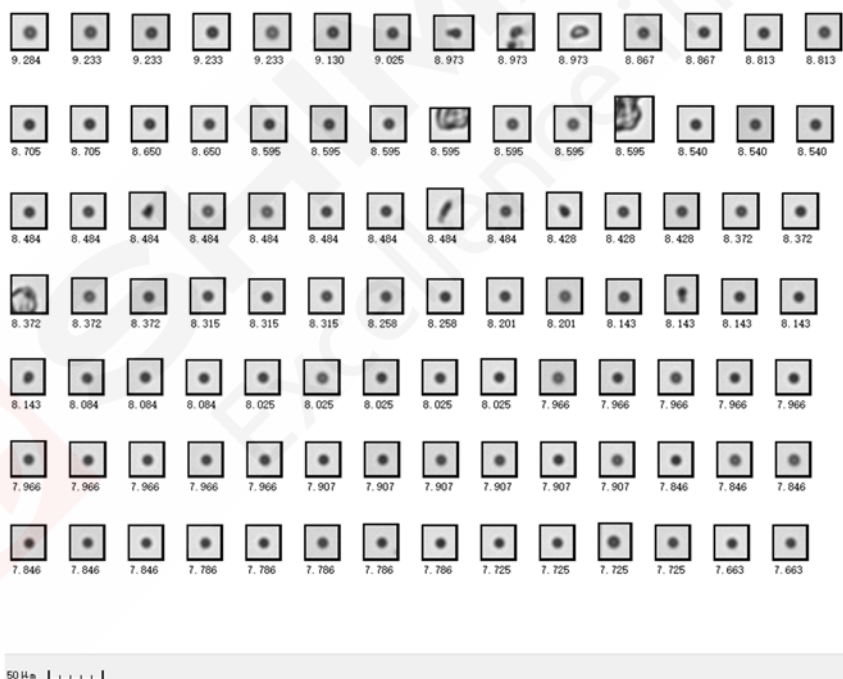


图 3. 西林瓶储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

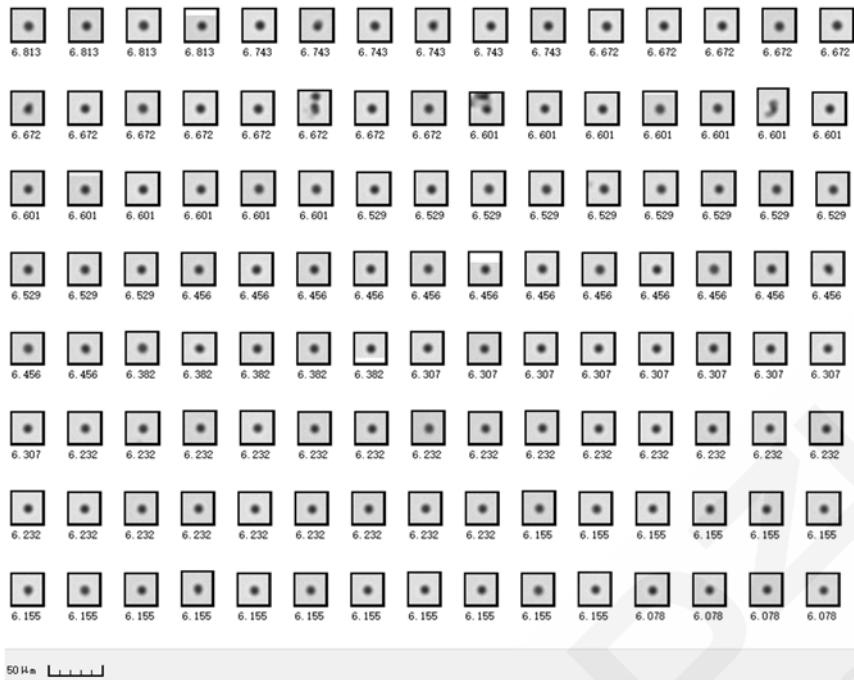


图 4. 西林瓶储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

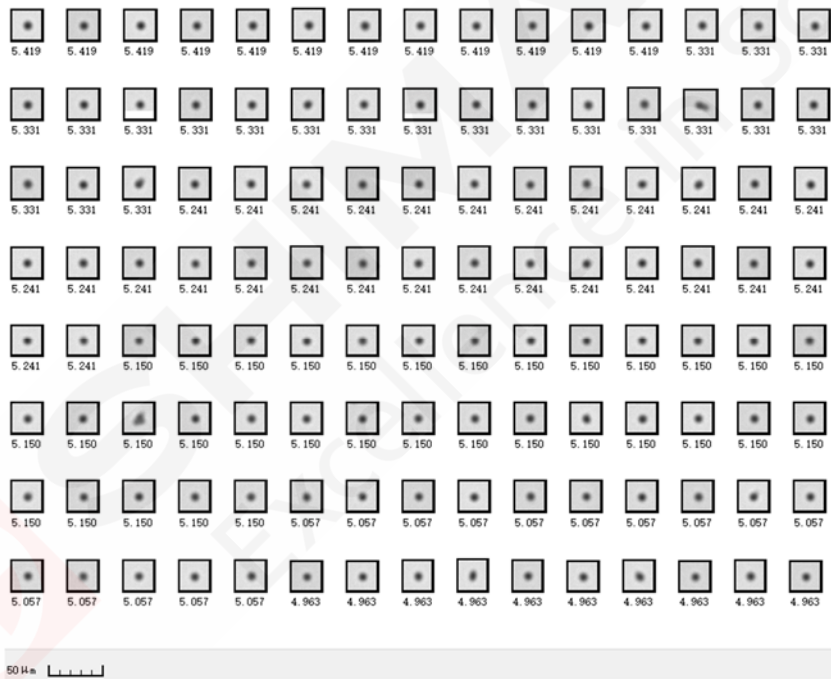


图 5. 西林瓶储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

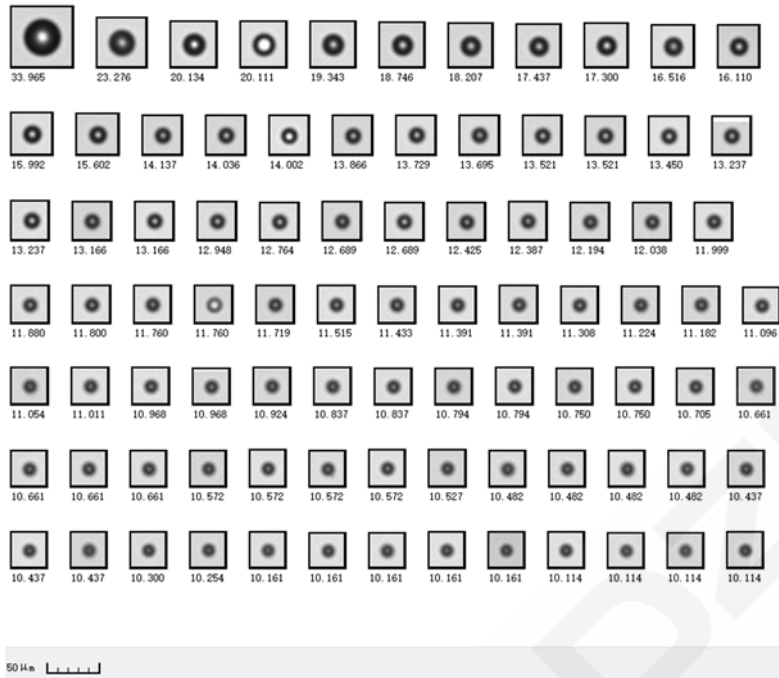


图 6. 预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

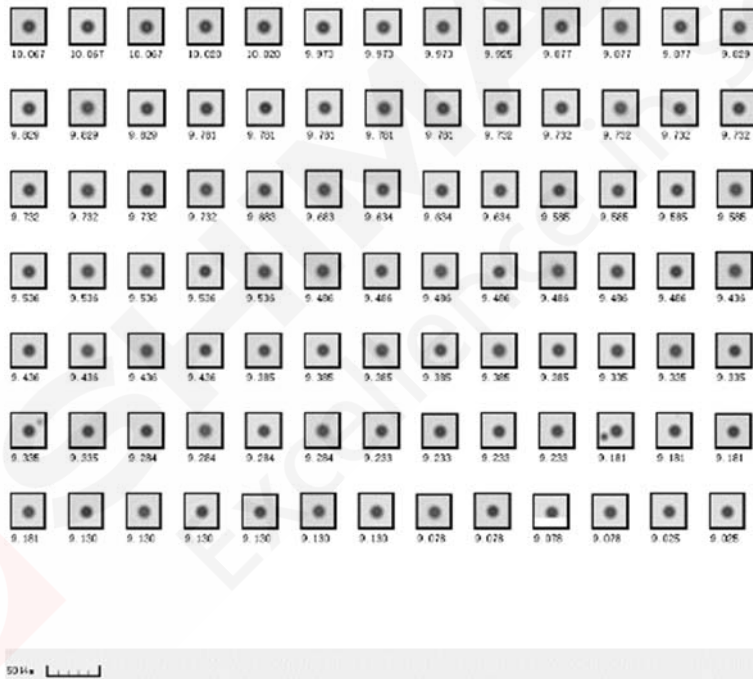


图 7. 预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

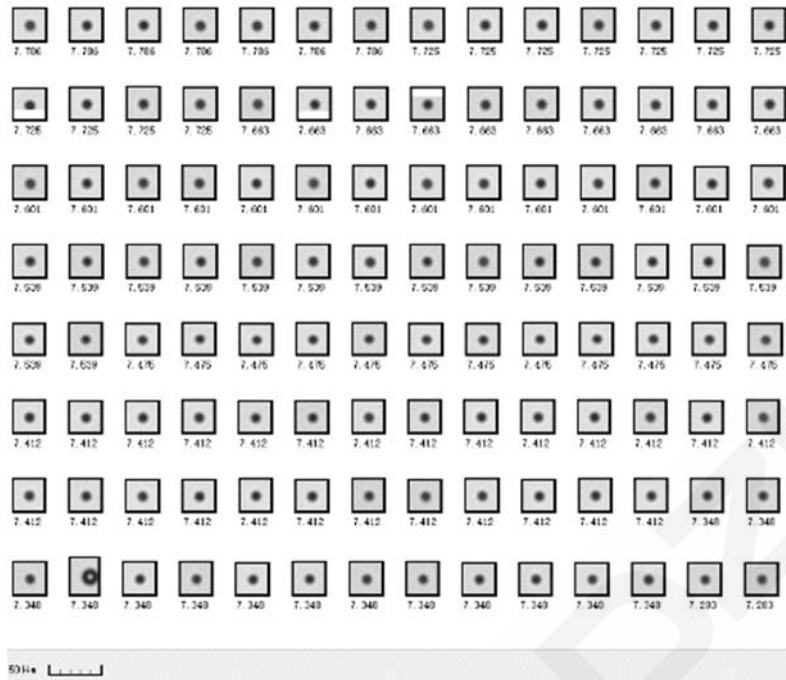


图 8. 预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图



图 9. 预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒粒形图

使用 DIA-10 进行分析，样品中所有流经流通池的颗粒都会被拍照记录下来，软件通过自动统计分析，可展示所有颗粒的排列图像并计算颗粒的粒径分布。实验结果显示，西林瓶储存的干扰素样品中存在少部分的形状不规则微粒，样品的颗粒数浓度为 1766 个/mL。预灌封注射器储存的干扰素样品中不溶性微粒均为圆形，样品的颗粒数浓度为 5190 个/mL。

#### 4.2 粒径大小和分布

西林瓶储存干扰素样品中不溶性微粒的粒径分布图如图 10 所示，预灌封注射器储存干扰素样品中不溶性微粒的粒径分布图如图 11 所示。

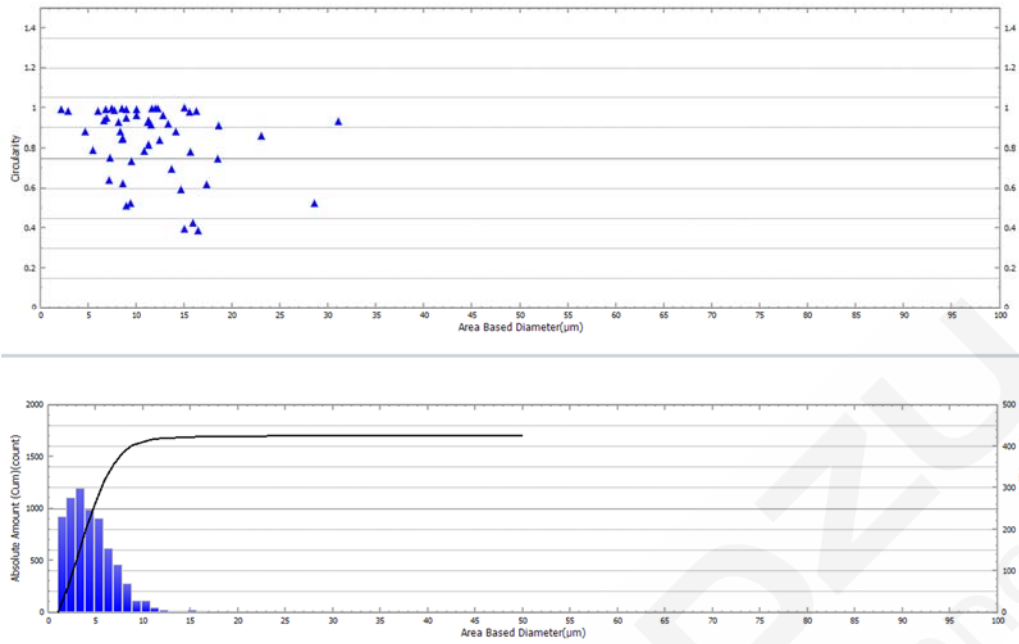


图 10. 西林瓶储存干扰素样品中不溶颗粒圆度-面积等效直径分布图（上图）和颗粒个数-面积等效直径分布图（下图）

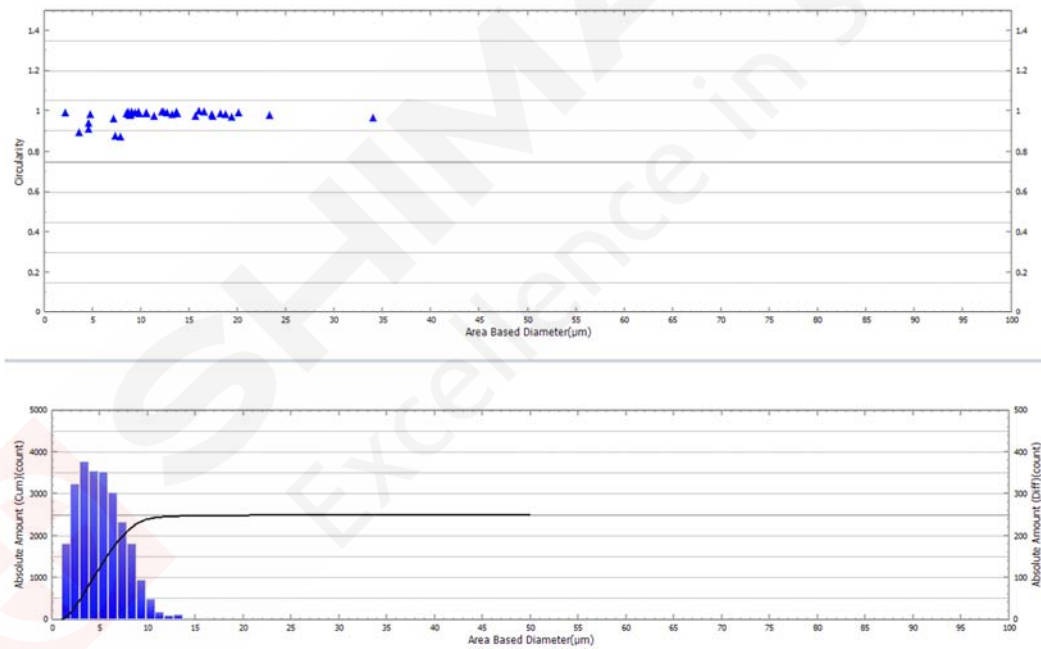


图 11. 预灌封注射器储存干扰素样品中不溶颗粒圆度-面积等效直径分布图（上图）和颗粒个数-面积等效直径分布图（下图）

使用软件的计算功能统计不同粒径范围不溶性微粒的比例，结果如表 3 所示。

表 3. 干扰素样品中不溶颗粒粒径统计表

统计条件	西林瓶储存干扰素样品		预灌封注射器储存干扰素样品	
	颗粒数浓度 (个/mL)	百分比 (%)	颗粒数浓度 (个/mL)	百分比 (%)
$X < 5 \mu\text{m}$	1115	50.52	2622	63.14
$5 \mu\text{m} \leq X < 10 \mu\text{m}$	592	45.80	2377	33.52
$X \geq 10 \mu\text{m}$	59	3.68	191	3.34
$X \geq 25 \mu\text{m}$	2	0.04	2	0.11

注：X 代表面积等效直径。

## 5. 结论

本文使用岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 对干扰素中不溶颗粒进行分析，同时获知了不同包装类型干扰素样品中不溶颗粒的粒度、粒形和颗粒浓度等信息。实验结果表明，使用预灌封注射器储存的样品中不溶性微粒数要大于使用西林瓶储存的样品。岛津动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 在获取干扰素样品中不溶性微粒数量浓度同时，还能直接观察微粒的粒形状况，并获得不溶性微粒的粒度信息。该仪器操作简便，数据稳定，通过对药物样品中颗粒的形状、颗粒数浓度的综合分析，可为药物的研发、包装改进和运输条件确认等提供科学的数据支撑。

## 第四章 药用辅料分析

药用辅料是指在制剂处方设计时，为解决制剂的成型性、有效性、稳定性、安全性加入处方中除主药以外的一切药用物料的统称，具有赋形、充当载体、提高稳定性、增溶、助溶、缓控释等重要功能。药用辅料不仅赋予药物一定剂型，充当药物制剂的基础材料和重要组成部分，也对提高药物的疗效、降低不良反应有重要影响，与药物的临床疗效、生物利用度、毒副作用等密切相关。因此，生物制品制造过程中所使用的原辅材料的质量是实现药品安全、高效的基础，对制品的安全性和稳定性有直接的影响。

为保证药用辅料的安全，加强药用辅料的质量控制，我国自 1953 年第一版《中国药典》收载药用辅料品种开始，至 2010 年版《中国药典》扩充了药用辅料的药典标准体系，2015 年版药典将药用辅料按制剂用途、辅料作用和给药途径共分三类，收录药用辅料 270 种，标准与通则类标准合并单独形成了《中国药典》第四部。到目前 2020 版《中国药典》，药用辅料标准体系更加完备，达到了药用辅料在关键质量属性上和制剂中发挥的功能性上两方面的要求，同时修订版继续扩大药用辅料品种标准的收载，新增 65 个、修订 212 个，新增药用辅料指导原则 2 个，修订药用辅料通则和指导原则各 1 个。由此可见，我国对药用辅料监管的重视程度不断提高，在产品研制、生产、使用、检验、监督管理以及流通等环节要求更加严格。

为迎合国家药用辅料质量与管理要求，岛津发挥产品技术优势，不断推进新技术、新产品应用，助力加快推进药用辅料行业高质量发展。本章节将对岛津液质、气相与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对生物技术药物辅料分析的应用案例进行介绍，为药用辅料的分析检测提供多种分析手段。

# 1 LC-MSMS 定量重组人白介素中十二烷基硫酸钠

**摘要:** 本文用 LCMS-8045 发展了重组人白介素中十二烷基硫酸钠 (SDS) 含量测定的方法。本方法具有更好的抗基质干扰能力、更高的选择性和灵敏度。本方法系统考察了流动相和色谱柱对峰形 (灵敏度) 的影响, 并系统对比了不同提取溶剂 (盐溶液、酸溶液、碱溶液和乙腈水溶液) 对测定结果的影响。除色谱、质谱条件和前处理溶剂以外, 本方法还考察了加标回收、测试精密度、进样重复性、灵敏度和线性范围等参数。其中, 回收率考察了原液和成品两种基质对 SDS 测定的影响, 以及成品中不同浓度 SDS (加标 80%, 100% 和 120%) 加标回收率。结果显示, 本方法具有较宽的线性范围、较好的重复性 (峰面积 RSD% < 3%)、较好的回收率 (93%-99%) 和较高的检测灵敏度 (进样 1  $\mu$ L 所得 LOQ 为 9.34  $\mu$ g/L)。本方法灵敏度比已报道的紫外分光光度法、气相色谱法和已报道的 LCMS 测其它基质中 SDS 含量的方法分别高 2141、412、107 倍。

**关键词:** LC-MS/MS 重组人白介素 十二烷基硫酸钠 SDS

表面活性剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 是常用的生物制品 (尤其是蛋白类生物制品) 助溶剂, 能促进蛋白溶解并维持蛋白样品的稳定性。但过量的 SDS 会对人体产生副作用, 因此应将 SDS 用量控制在明确的安全范围内。此外, 在重组蛋白的质量标准研究汇总发现, 用鲎试剂法检测细菌内毒素含量和用抑菌圈法测定残余抗生素活性时, 检品中的 SDS 对实验结果有干扰, 必须将其中的 SDS 稀释到一定的浓度后才能排除干扰。无论监控产品中 SDS 含量, 还是避免其对重组蛋白测试结果的影响, 均需要对产品中 SDS 的含量进行测定。

SDS 是一种紫外吸收弱的化合物 (如图 1), 难以通过紫外检测器直接检测。张明芳等发展了一种吡啶橙染色法衍生 SDS 后, 用紫外分光光度计进行测试。该方法在一定程度上解决了 SDS 的含量测定问题, 检测限 (LOD) 为 20 mg/L。但该方法难以避免衍生方法的共同缺点, 如测定结果易受基质干扰和衍生试剂品质影响、衍生效率结果影响的问题。Shende 等用盐酸水解后提取 SDS 降解产物 n-十二醇, 再用气相色谱 (GC) 检测 n-十二醇含量, 从而反推样品中 SDS 含量的方法进行测试, 并将该方法用于脑膜炎四价疫苗 A、C、W 和 Y 中 SDS 的含量测定。该方法过程繁琐且测定结果受水解转换效率、转换产物在盐酸中稳定性、提取效率等影响。灵敏度相对于衍生-紫外分光光度法无明显提升, LOD 为 1.27 mg/L。戴光琴等发展了一种高效液相色谱-质谱法测定非布司他片中 SDS 的含量。该方法无需衍生, 操作简单, 但所用的 SIM 检测方式抗干扰能力差, 易受分子量相近化合物的影响导致应对复杂基质中 SDS 的检测较为困难。此外, 该方法还存在线性范围较窄 (0.1-1 mg/L), 方法灵敏度无明确数据报道等不足。

综上所述, 有必要发展一种前处理简单、抗干扰能力强、灵敏度高、适合复杂基质中 SDS 含量测定的方法。本文发展的高效液相串联质谱法, 可应对上述要求, 适合重组人白介素中

间品和成品中 SDS 的含量测定。

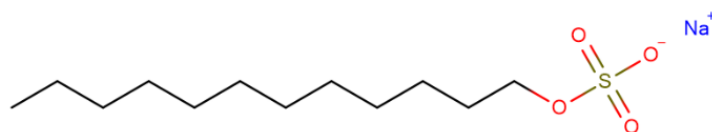


图 1. SDS 结构

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

LC-30AD (高压二元泵), SIL-30AC<sub>MP</sub> (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A (系统控制器); LCMS-8045(三重四极杆质谱仪)配 ESI 电离源; LabSolutions Ver. 5.96 (色谱工作站)。

### 1.2 分析条件

色谱条件	质谱条件
色 谱 柱: Kinetex C18 (2.1 x 50 mm, 2.7 μm)	离 子 源: ESI, 正模式
流 动 相: A-5 mM NH <sub>4</sub> Ac +0.01%FA 水溶液; B-0.01%FA-乙腈	雾化气流速: 3.0 L/min
柱 温: 30°C	干燥气流速: 10 L/min
梯 度: 见表 1	驻留时间: 10 ms
流 速: 0.3 mL/min	接口温度: 300°C
进样体积: 1 μL	MRM 参数: 见表 2
进样清洗: 三路清洗方式 (R0-R1-R2)	DL 温度: 250°C
	接口电压: 4.0 kV

表 1. 梯度程序

时间 (min)	B%
0.0	20
3.0	90
4.0	90
4.1	20
7.0	20

表 2. MRM 参数

物质名称	前体离子	产物离子	驻留时间 (msec)	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
SDS	265.0	97.0*	10	18.0	26.0	15.0
		80.0	10	13.0	55.0	30.0

\*表示定量离子

## 2. 样品前处理

**对照品溶液：**称取适量 SDS (Sodium dodecyl sulfate, 购自 Sigma, CAS #: 151-21-3) 对照品, 用水配制成 1 mg/L 的母液备用。取母液适量, 用 0.1%FA-水溶液逐级稀释、配制成浓度为 1-1000  $\mu\text{g/L}$  范围内的对照品溶液。

**原液：**用 500 mM 磷酸盐水溶液稀释至 1 mL, 配成原液母液。取 100  $\mu\text{L}$  母液, 用 500 mM 磷酸盐水溶液逐级稀释 100 倍 (中间溶液); 取中间溶液 100  $\mu\text{L}$ , 加 900  $\mu\text{L}$  乙腈, 混匀后, 14000 r/min, 离心 10 min, 取上清液分析。

**成品：**用 500 mM 磷酸盐水溶液溶解到 1 mL, 配成成品母液。取 100  $\mu\text{L}$  母液, 用 500 mM 磷酸盐水溶液逐级稀释 100 倍 (中间溶液); 取中间溶液 100  $\mu\text{L}$ , 加 900  $\mu\text{L}$  乙腈, 混匀后, 14000 r/min, 离心 10 min, 取上清液分析。

**加标回收：**取对照品母液 100  $\mu\text{L}$ 、加入 100  $\mu\text{L}$  水和 800  $\mu\text{L}$  乙腈 (对照); 取 100  $\mu\text{L}$  样品、加入 100  $\mu\text{L}$  水和 800  $\mu\text{L}$  乙腈 (样品); 取 100  $\mu\text{L}$  样品、加入 100  $\mu\text{L}$  对照品母液和 800  $\mu\text{L}$  乙腈, 混匀 (加标样品)。将以上溶液以 14000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液分析。  
回收率 =  $\frac{(A \text{ 加标样品} - A \text{ 样品})}{A \text{ 对照}} \times 100\%$ 。A: 目标化合物峰面积。对照品溶液浓度为测试样品浓度的 80%、100%和 120%。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 色谱、质谱条件优化

取浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的 SDS 标准溶液在  $m/z$ 100-2000 范围内, ESI 源正负离子同时扫描。在负离子模式下得到  $m/z$  为 265.0 以[M]<sup>-</sup>形式存在的 SDS 分子离子峰。以该分子离子峰为目标在  $m/z$  50-300 范围内进行多碰撞电压 (CE) 下的产物离子扫描, 选择响应强度最大且多个 CE 下均稳定存在的 97.0 和 80.0 作为产物离子。使用 LabSolutions MRM 自动优化功能, 得到 SDS 最优的 MRM 条件如表 1 所示。选择响应最强的离子对 265 $\rightarrow$ 97.0 作为定量离子, 265 $\rightarrow$ 80.0 作为定性离子。

SDS 为强阴离子, 容易与反相色谱柱残留的高能位点基团作用, 出现拖尾峰。因此, 如何改善峰形从而改善检测灵敏度是 SDS 分析色谱条件优化的首要任务。本文共考察了有机相种类和水相添加剂种类对峰形的影响。与甲醇相比, 乙腈可为 SDS 提供更为对称的峰形。以乙腈为有机相, 进一步考察了纯水相、水相添加甲酸 (0.1%) 和水相添加甲酸铵-甲酸 (2 mM 甲酸铵-0.01%甲酸) 对 SDS 峰形的影响, 结果如图 2 所示。纯水相条件下, 色谱峰呈现出两边展宽的现象, 水相添加甲酸出现前伸峰, 水相添加甲酸铵-甲酸, 色谱峰峰宽降低且无明显拖尾或前伸。因此, 选择乙腈作为有机相, 添加甲酸铵-甲酸的水相作为另一相, 用于 SDS 分析。

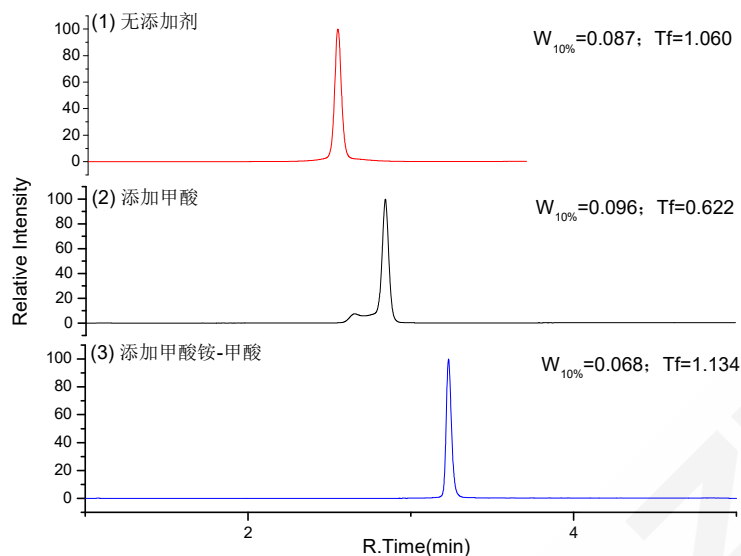


图 2. SDS 色谱条件优化谱图 ( $W_{10\%}$ :10%峰高处峰宽;  $Tf$ : 拖尾因子)

### 3.2 提取条件优化

SDS 带有较强的负电荷, 可与重组人白介素蛋白的氨基等正电荷基团结合, 导致难以被溶剂提取。为了更为准确的测定重组人白介素中 SDS 的含量, 需实现最大程度提取样品中 SDS。本文考察了乙腈、5%甲酸、5%氨水、500 mM 乙酸铵(pH=6)和 500 mM 磷酸二氢钠(pH=6.8)作为提取剂对 SDS 提取的影响, 结果如表 3 所示。不同提取溶剂均可实现 SDS 的提取, 但磷酸盐作为提取溶剂测得的含量稍高, 分析原因为磷酸盐可屏蔽 SDS 与重组人白介素蛋白之间的静电作用, 有利于 SDS 的提取。因此, 选择磷酸盐作为提取溶剂。

表 3. 不同提取溶剂对 SDS 测定结果的影响

提取溶剂	原液 ( $\mu\text{g/L}$ )	成品 ( $\mu\text{g/L}$ )
乙腈	620.7	139.2
5%甲酸	610.7	149.6
5%氨水	591.3	138.4
500 Mm 乙酸铵(pH=6)	597.6	148.7
500 mM 磷酸二氢钠(pH=6.8)	625.1	155.9

### 3.3 方法学考察

取 1.2 所述各浓度对照品溶液, 按照 1.3 所述分析条件进行测定。用 ASTM 法, 以目标化合物 S/N 不小于 3 和 10 所对应的浓度分别为 LOD 和 LOQ 浓度, 测得本方法中 SDS 的 LOD 为  $4.67 \mu\text{g/L}$  ( $S/N=5.3$ ), LOQ 为  $9.34 \mu\text{g/L}$  ( $S/N=11.0$ )。以待测样品大致浓度为中心, 左右共取 5-6 个浓度点, 以浓度为横坐标, 目标化合物峰面积为纵坐标, 各组分线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明各组分在考察浓度范围内线性关系良好,  $R^2$  大于 0.999, 各标准点精准度在 95-105%之间。

表 4. 各组分工作曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	线性方程	$R^2$
1	SDS	9.34-1000	$A = 1559.5 C - 11961$	0.9992

取高 (299 μg/L)、中 (74.75 μg/L)、低 (18.69 μg/L) 三个浓度的 SDS 对照品溶液, 平行进样 5 针, 计算目标化合物的峰面积相对标准偏差 (RSD%) 分别为 2.78%、1.49% 和 0.89%, 可满足定量分析的需求。

本文从两方面考察了方法的回收率: 第一、不同基质对回收率测试的影响(原液和成品); 第二、不同厂家产品中不同浓度的加标回收。其中, 不同基质的加标以浓度居中的样品 (约 500 μg/L) 为考察对象, 考察 100% 加标, 原液和成品的回收率分别为 99.8% 和 97.2%。不同厂家产品中不同浓度的加标回收 (80%、100% 和 120% 加标) 考察结果如表 5 所示, 无论是低浓度还是高浓度加标回收, 均可得到较好的回收率, 回收率在 93.2%-98.7% 之间。

表 5. 不同厂家产品加标回收率

厂家编号	样品中 SDS 浓度 (μg/支)	RSD%		
		80%加标	100%加标	120%加标
3	3.9	95.2%	94.5%	95.6%
2	240.2	94.0%	93.2%	94.6%
2	376.3	97.9%	98.7%	98.4%

### 3.4 样品测试

将本方法用于 7 个成品厂家和 1 个原液厂家, 共 24 批次重组人白介素中 SDS 的含量测定, 结果如表 6 所示, 典型色谱质谱图如图 3 所示。从结果可以看出, SDS 在原液和成品中的含量从几 μg/支到几百 μg/支不等, 并且溶液样品中 SDS 的含量显著低于固体样品。虽然 SDS 为人为添加的试剂, 从理论上分析应该批次差异较小。但实际测得的产品中 SDS 含量的批次重复性可以看到, 同一厂家不同批次重组人白介素产品中 SDS 含量差异较大, 由于 SDS 极容易吸附和残留、需要从工艺过程系统排查原因。

本研究尝试分析了液体制剂中 SDS 含量普遍低于固体制剂的原因: 第一、测试精密度问题; 第二、样品稳定性问题。本文选择低 (样品 P23)、中 (样品 P18)、高 (样品 P14) 三种浓度成品, 溶解/稀释后, 平行三次取样分析, 测试 SDS 含量, 并对测试结果进行 RSD% 计算得结果分别为 5.23%、0.48% 和 0.77%。因此, 排除测试精密度问题的影响。进一步测试样品稳定性影响, 溶解固体后进行溶解后立即测试和放置 5 天后测试, 两次测试结果, 如图 4 所示。样品溶解 5 天后测试得到的 SDS 含量普遍低于立即测试结果, 推测可能的原因为溶液中的 SDS 容易吸附在样品容器 (玻璃) 上, 导致样品溶液中实际的 SDS 含量减少。这种吸附会随时间的增加而增加, 因此推测液体制剂中 SDS 含量普遍低于固体制剂的原因为玻璃容器对 SDS 的吸附。该现象在标品测试中也有发现, 如果选择玻璃材质样品瓶放置 SDS, 浓度随放置时间增加而降低。

表 6. 不同厂家重组人白介素产品中 SDS 的含量测定

厂家编号	样品编号	SDS (μg/支)	厂家编号	样品编号	SDS (μg/支)
原液	P01	356.4	M03	P18	410.6
M01	P02	318		P19	500.4
M02	P03	339.5		P20	372.2
	P11	613.6	M04	P05	32.0
	P12	590.4	M05	P06	550.6
	P13	628.9		P22	387.5
	P14	732.6	M06	P07	8.1
	P15	662.0	M07	P08	12.6
M03	P04	510		P09	395.9
	P21	350.5		P10	625.9
	P16	349.0		P23	15.9
	P17	315.7		P24	412.2

注：P23 和 P08 为液体

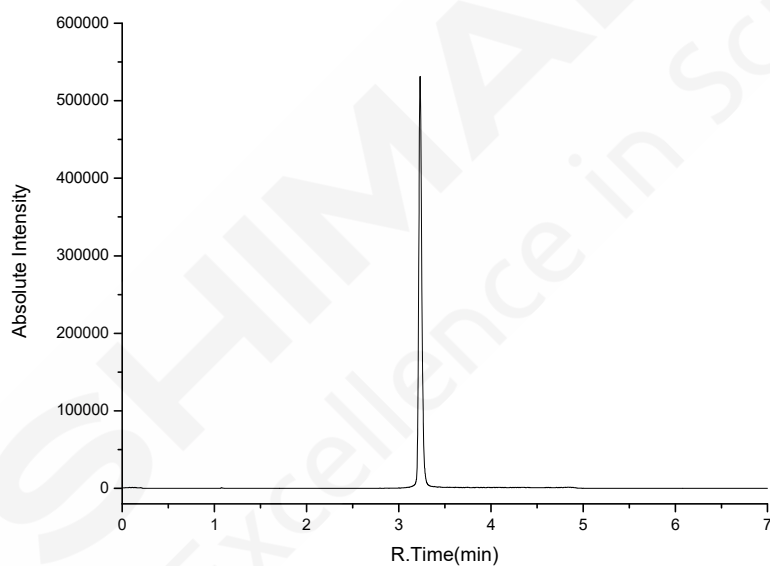


图 3. P05 中 SDS 含量测定

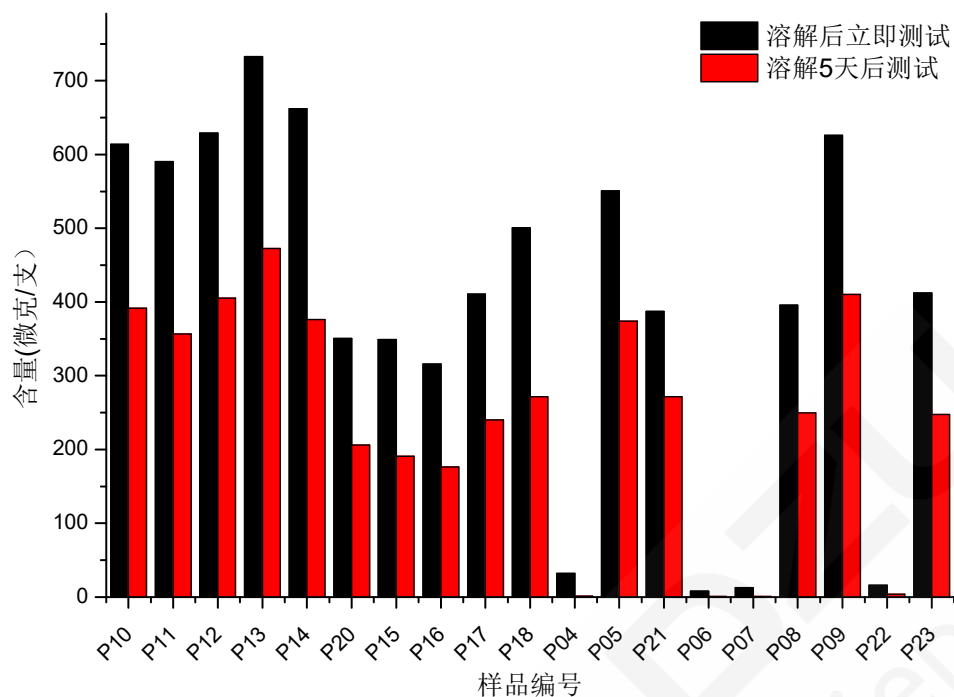


图 4. 样品溶解后不同测试时间对测得结果的影响

#### 4. 结论

本文建立了一种 LC-MS/MS 定量方法，用于重组人白介素中 SDS 的含量测定。该方法弥补了现有方法的不足，线性范围宽、灵敏度高、重复性好、且免受基质干扰，可用于原液和成品中 SDS 的含量测定。

## 2 应用 GC-FID 法分析聚山梨酯 80 中的脂肪酸含量

**摘要：**本文应用岛津 Nexis GC-2030，配备火焰离子检测器（FID），参考《中国药典》2015 年版中的甲酯化前处理方法，按面积归一法计算，分析了市售聚山梨酯 80 中 7 种脂肪酸的组成。结果表明各脂肪酸甲酯分离良好，精密度均小于 2% (n=7)，方法重现性均小于 0.1% (n=6)，7 种脂肪酸甲酯的检出限在 0.1 ~ 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。采用此方法分别计算来自三个厂家的市售聚山梨酯 80 中油酸的含量，分别为 60%、77%和 40%。

**关键词：**气相色谱仪 FID 聚山梨酯 80 吐温

聚山梨酯 80，又名吐温 80，是一种非离子型表面活性剂。它是聚氧乙烯去水山梨醇与油酸进行酯化后得到的。由于合成原料质量不一，聚山梨酯 80 通常为混合物。比如，聚山梨酯 80 的分子结构中脂肪酸部分的组成大多不同，油酸为主要成分，同时还含有其他脂肪酸，如肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸等。由于聚山梨酯 80 对亲脂性药物有较好的助溶作用，因此常被用作注射剂及口服液的增溶剂或乳化剂，是一种常用的药物制剂辅料。但近年来，在临床应用中出现了一些安全性问题的报道，如过敏、溶血等不良反应。研究表明，副作用的产生可能跟聚山梨酯 80 的纯度不高有关，而测定脂肪酸的组成在一定程度上反映了聚山梨酯 80 的纯度。

本文参考《中国药典》2015 年版推荐的三氟化硼-甲醇衍生化的前处理方法，遵照药典规定的仪器条件，应用岛津 GC-FID 建立了聚山梨酯 80 中脂肪酸组成的测定方法，并对来自 3 个厂家的聚山梨酯 80 样品进行了测定。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

Nexis GC-2030 气相色谱仪  
火焰离子检测器（FID）

#### 1.2 分析条件

气相条件：

色谱柱：SH-Rtx-Wax (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.5 $\mu\text{m}$ )	线速：40 cm/s
柱温程序：90 $^{\circ}\text{C}$ _20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _160 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)_2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _220 $^{\circ}\text{C}$ (20min)	进样方式：不分流
进样口温度：190 $^{\circ}\text{C}$	检测器温度：250 $^{\circ}\text{C}$
流速控制方式：恒线速方式	尾吹气流量：24 mL/min
	氢气流量：32 mL/min
	空气流量：200 mL/min

## 2. 样品制备

### 2.1 对照品溶液

分别取肉豆蔻酸甲酯、棕榈酸甲酯、棕榈油酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯与亚麻酸甲酯的对照品适量，加正庚烷制成 0.1 mg/mL 的对照品混合溶液。

### 2.2 样品前处理

准确称量市售吐温 80 样品 0.1g，置于 50 mL 锥形瓶中，加入 2% 氢氧化钠甲醇溶液 2 mL，在 65°C 水浴中加热回流 30 分钟，放冷，加入 14% 三氟化硼甲醇溶液 2 mL，在水浴中加热回流 30 分钟，放冷，加正庚烷 4 mL，继续回流 5 分钟，放冷，加入 10 mL 饱和氯化钠，振摇，静置待分层，取上层液，用水洗涤 3 次，每次 4 mL，上层液用无水硫酸钠干燥后，即为样品溶液。

## 3. 结果与讨论

### 3.1 专属性考察

图 1 是对照品混合溶液的色谱图。各脂肪酸甲酯的信息和保留时间如表 1 所示。各色谱峰的分离度均大于 2.5，分离良好。理论塔板数按油酸甲酯峰计算高于 13000，满足《中国药典》2015 年版的要求。

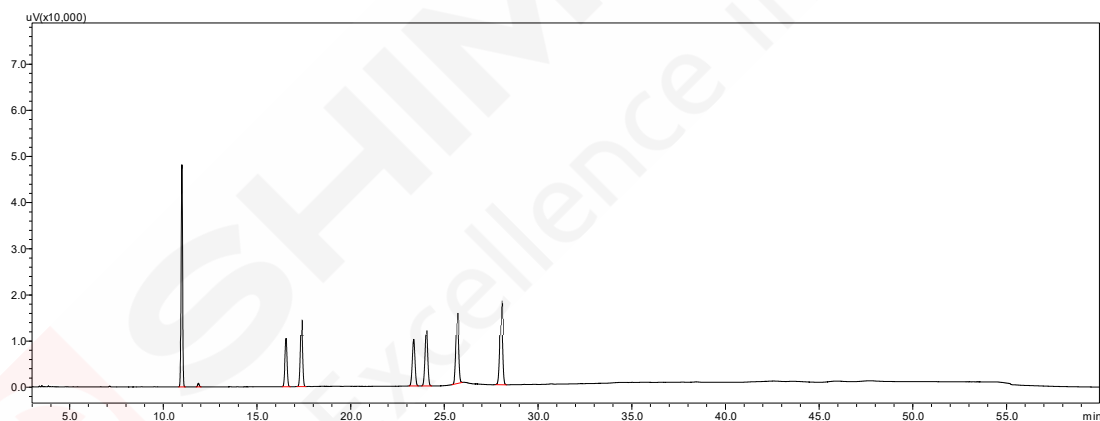


图 1. 对照品混合标准溶液色谱图 (0.1 mg/mL)

表 1. 各组分信息

No.	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	保留时间 (min)
1	肉豆蔻酸甲酯	Methyl myristate	124-10-7	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10.989
2	棕榈酸甲酯	Methyl palmitate	112-39-0	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	16.548
3	棕榈油酸甲酯	Methyl palmitoleate	1120-25-8	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	17.370
4	硬脂酸甲酯	Methyl stearate	112-61-8	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	23.362
5	油酸甲酯	Methyl oleate	112-62-9	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	24.040
6	亚油酸甲酯	Methyl linoleate	112-63-0	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	25.684
7	亚麻酸甲酯	Methyl linolenate	301-00-8	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	28.030

### 3.2 方法精密度实验

精确称量上海某公司的吐温 80 (批号 20181211) 0.1g, 按照 2.2 中的步骤前处理, 制备一份样品溶液。在 1 天内连续进样 7 次, 每次进样 1  $\mu\text{L}$ , 记录各脂肪酸甲酯的保留时间和峰面积, 计算 RSD%, 考察方法的精密度。结果如表 2 所示, 所有 RSD% 值均小于 2%, 方法精密度良好。

表 2. 方法精密度结果 (n=7)

脂肪酸甲酯	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
肉豆蔻酸甲酯	0.02	0.52
棕榈酸甲酯	0.02	0.69
棕榈油酸甲酯	0.02	1.18
硬脂酸甲酯	0.02	0.82
油酸甲酯	0.02	0.90
亚油酸甲酯	0.01	1.51
亚麻酸甲酯	未检出	未检出

### 3.3 方法重现性实验

用上海某公司的吐温 80 (批号 20181211), 按照 2.2 中的步骤前处理, 共制备 6 份样品溶液, 每份取 1  $\mu\text{L}$  进样, 采用《中国药典》2015 年版推荐的面积归一法计算各个脂肪酸甲酯的百分比含量, 考察方法的重现性。结果如表 3 所示, RSD% 均小于 0.1%, 重现性良好。

表 3. 方法重现性结果 (n=6)

脂肪酸甲酯	含量%	RSD%
肉豆蔻酸甲酯	0.61	0.01
棕榈酸甲酯	5.25	0.00
棕榈油酸甲酯	1.78	0.01
硬脂酸甲酯	1.84	0.00
油酸甲酯	59.66	0.00
亚油酸甲酯	3.90	0.02
亚麻酸甲酯	未检出	未检出

### 3.4 仪器检出限考察

将对照品混合溶液用正庚烷稀释至 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在选定的分析条件下进样 1  $\mu\text{L}$ , 按照 3 倍的信噪比计算仪器检出限, 分别为: 肉豆蔻酸甲酯 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 棕榈酸甲酯 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 棕榈油酸甲酯 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 硬脂酸甲酯 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 油酸甲酯 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 亚油酸甲酯 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 亚麻酸甲酯 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 3.5 仪器重复性考察

用浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品混合溶液, 重复进样 7 次, 每次进样 1  $\mu\text{L}$ , 考察仪器的重复性, 结果如表 4 所示。

表 4. 仪器重复性结果 (n=7)

脂肪酸甲酯	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
肉豆蔻酸甲酯	0.02	0.25
棕榈酸甲酯	0.02	0.85
棕榈油酸甲酯	0.01	0.87
硬脂酸甲酯	0.02	1.87
油酸甲酯	0.01	1.36
亚油酸甲酯	0.02	0.84
亚麻酸甲酯	0.02	0.97

### 3.6 样品测定

按照 2.2 中的前处理方法, 在选定的分析条件下, 测定来自三个厂家的吐温 80 样品的脂肪酸组成, 结果如表 5 所示。油酸含量越高, 表明聚山梨酯 80 的纯度越高。这三个厂家的商品中油酸含量从 40%-77%不等。

表 5. 3 个厂家共 3 批聚山梨酯 80 样品的脂肪酸组成测定

厂家	批号	脂肪酸组成 (%)						
		肉豆蔻酸	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸
上海某厂家	20181211	0.61	5.27	1.80	1.84	59.87	3.95	未检出
北京某厂家 I	20181205	0.03	5.07	0.08	1.56	77.43	未检出	未检出
北京某厂家 II	301C054	未检出	10.21	0.12	4.10	40.08	1.91	未检出

## 4. 结论

聚山梨酯 80 中油酸的含量与其纯度紧密相关, 通过对聚山梨酯 80 中脂肪酸组成的检测, 可有效控制其含有的杂质, 减低临床用药的风险。采用岛津公司 Nexis GC-2030 气相色谱仪结合 FID 检测器, 完全可以实现《中国药典》2015 年版中对聚山梨酯 80 的相关检测要求, 操作简便、重现性好。

### 3 GCMS 结合 SPME Arrow 定性分析吐温降解产物

**摘要：**本文建立了 GCMS 结合 SPME Arrow 定性分析吐温降解产物的分析方法。分析结果表明，冷藏保存数月后的吐温降解产物主要为醛、酮、酸类物质，如：庚醛、2-辛酮、壬酸等，NIST20 商品谱库检索相似度均在 90 以上。冷藏保存数天的吐温未检测到醛、酮、酸等降解物质。

**关键词：**吐温 降解产物 SPME

吐温 (Tween)，又名聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯，是生物药物制剂中使用最广泛的表面活性剂之一，可防止蛋白质在溶解过程中变性、聚集、表面吸附和絮凝。

生物制剂中的吐温可以通过氧化和水解途径降解。由于吐温的降解可能会影响蛋白质制剂的质量、功效、安全性和稳定性，因此，药品监管部门对吐温的控制策略的审查日益严格，以确保在药物产品的保质期内吐温含量保持恒定。

近期也有生物药企业反映吐温保存一段时间后，通过液相色谱仪（衍生-荧光方法）无法检测到吐温，岛津采用 MALDI-TOF 分析后发现吐温分子量出现减小的趋势，意味着制剂中吐温发生了降解，因此确定吐温降解后的产物，了解其是否对人体有副作用是非常必要的。

本文采用 GCMS 结合 SPME 进样定性分析吐温降解产物，使用三合一萃取填料萃取吐温中小分子组分并使用气相色谱质谱仪进行分析。此方法无需手动前处理，全自动进样分析，操作简便、快速。

#### 1. 实验部分

##### 1.1 仪器

气相色谱-质谱联用仪：GCMS-QP2020 NX

自动进样器：AOC-6000

##### 1.2 分析条件

AOC-6000条件

进样方式：SPME Arrow

萃取时间：30 min

萃取填料：DVB/CarbonWR/PDMS

解析温度：250°C

平衡温度：40°C

解析时间：2 min

GCMS条件

进样口温度：250°C

柱温程序：50°C(1 min)\_10°C/min\_280°C  
(5 min)

色谱柱：Rxi-5Sil MS, (30 m×0.25  
mm×0.25 μm)

载气控制方式：恒线速度 (36.3 cm/sec)

进样方式：分流进样（分流比10:1）

色谱质谱接口温度：250°C

离子方式：EI

采集方式：Scan（45~500 m/z）

离子源温度：230°C

### 1.3 样品前处理

准确移取 10 mL 吐温样品至顶空瓶，密封，经 AOC-6000+GCMS 分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 空白色谱图

将烘烤后的顶空瓶压盖后上机分析，得到空白的色谱图。

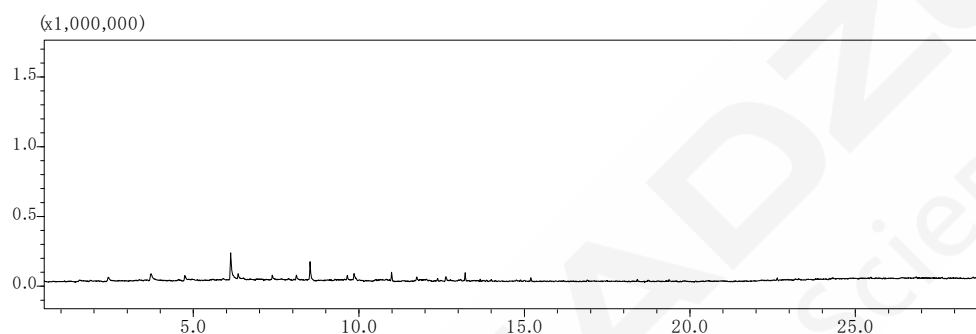


图 1. 空白色谱图

### 2.2 样品 1 色谱图及定性结果

样品1为4°C下保存3个月的吐温样品，按照1.2分析条件分析后色谱图如图2所示。通过 NIST 20商品谱库检索，定性结果如表1所示，主要为醛、酮、酸类化合物。

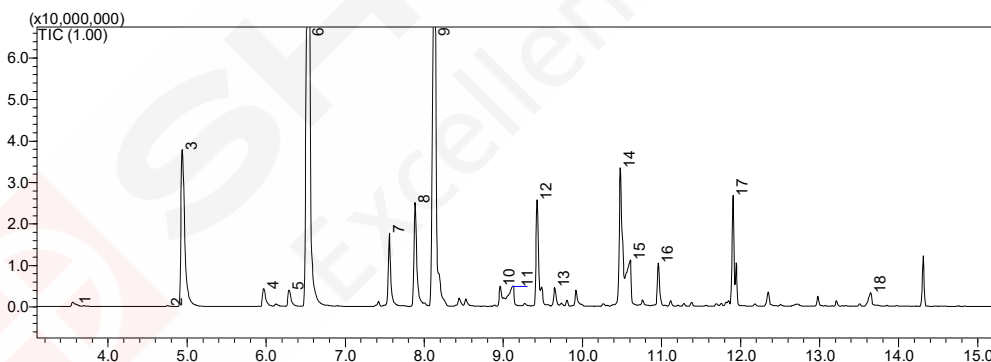


图 2. 样品 1 色谱图

表 1. 样品 1 定性结果

No.	保留时间 (min)	中文名称	英文名称	CAS 号	峰面积	相似度
1	3.595	正己醛	Hexanal	66-25-1	4224939	97
2	4.755	2-庚酮	2-Heptanone	110-43-0	739256	95
3	4.935	庚醛	Heptanal	111-71-7	120962849	98
4	5.965	正庚醇	1-Heptanol	111-70-6	10814852	98
5	6.285	2-辛酮	2-Octanone	111-13-7	9589556	97
6	6.495	正辛醛	Octanal	124-13-0	355853513	97
7	7.555	辛醇	1-Octanol	111-87-5	35350133	98
8	7.880	2-壬酮	2-Nonanone	821-55-6	59956460	95
9	8.100	壬醛	Nonanal	124-19-6	294889854	97
10	8.955	反式-2-壬醛	(E)-2-nonenal	18829-56-6	6459699	96
11	9.115	辛酸	Octanoic acid	124-07-2	13749281	94
12	9.420	甲基正辛酮	2-Decanone	693-54-9	53968868	96
13	9.645	癸醛	Decanal	112-31-2	8663707	94
14	10.475	反式-2-癸烯醛	(E)-2-decenal	3913-81-3	86196422	95
15	10.600	正壬酸	Nonanoic acid	112-5-0	42874139	97
16	10.955	/	3-Methyl-hepta-	34780-69-3	18751787	90
17	11.900	2-十一烯醛	2-Undecenal	2463-77-6	45775000	94
18	13.650	反-2-十二烯酸	Trans-2-	15790-94-0	8097914	95

### 2.3 样品 2 色谱图及定性结果

样品2为4°C下保存20天的吐温样品，按照1.2分析条件分析后色谱图如图3所示。通过NIST 17谱库检索，定性结果如表2所示，主要为硅氧烷类化合物，可能来源为存放吐温的塑料瓶。

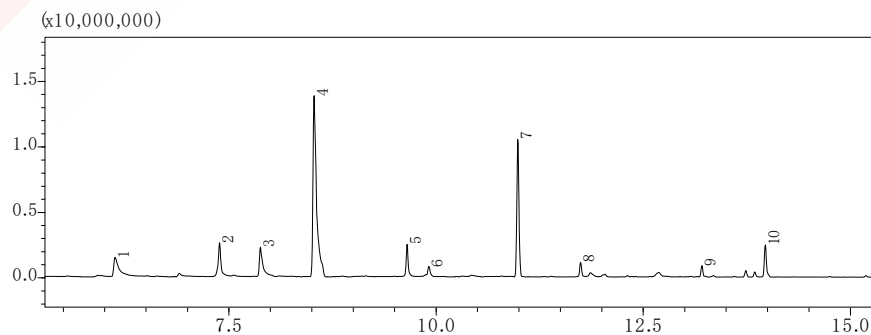


图 3. 样品 2 色谱图

表 2. 样品 2 定性结果表

No.	保留时间 (min)	中文名称	英文名称	CAS 号	峰面积	相似度
1	6.125	未知				
2	7.387	六甲基环三硅氧烷	Hexamethyl- cyclotrisiloxane	541-5-9	5382493	90
3	7.881	未知				
4	8.528	环五聚二甲基硅氧烷	Decamethyl- cyclopentasiloxane	541-2-6	41422413	87
5	9.650	八甲基环四硅氧烷	Octamethyl- cyclotetrasiloxane	556-67-2	3963202	89
6	9.913	未知				
7	10.987	十二甲基环六硅氧烷	Dodecamethyl- cyclohexasiloxane	540-97-6	18415712	88
8	11.745	未知				
9	13.209	/	Isopropyl pentakis(trimethylsilyl)	71579-69-6	1211903	83
10	13.974	对乙氧基苯甲酸乙酯	4-Ethoxy-ethyl ester benzoic acid-	23676-9-7	4330947	97

备注：未知指 NIST 谱库检索相似度小于 80。

### 3. 结论

本文建立了 GCMS 结合 SPME Arrow 定性分析吐温降解产物的分析方法。分析结果表明，冷藏保存数月后的吐温降解产物主要为醛、酮、酸，如：庚醛、2-辛酮、壬酸等，NIST20 谱库检索相似度均在 90 以上。冷藏保存数天的吐温中未检测到醛、酮、酸等降解产物。

## 4 应用 MALDI-7090 检测聚乙二醇 PEG23000 的分子量及分布

**摘要:** 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一, 它可以快速给出聚合物的质量分布, 单体结构等信息, 并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津 MALDI-7090, 以反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB) 为基质, 分析聚乙二醇 23000 (PEG23000), 得到了分子量的分布及单体结构信息。

**关键词:** 台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-7090 聚乙二醇 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 具有简单、快速获取从低分子到高分子各种样品的分子量信息的优点, 聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。岛津的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-7090, 具有飞行距离长 (线性模式 2.1 米、反射模式 4.1 米)、分析速度快 (2000 Hz 355 nm 固态激光器采集)、仪器维护方便 (True Clean 自动 UV 激光源清洗) 和软件满足 21 CFR Part 11 合规性的特点。

聚合物是由称为单体的次级单元重复连接而成的分子, 由于其物理和化学性质, 在医学、药学等各个领域发挥着重要的作用。聚合物的分析可以使用 SEC/GPC 分析、NMR/FT-IR 分光法等的各种分析手法, 其中, MALDI-TOF 由于可以快速得到聚合物的分子量分布、多分散性以及端基结构信息, 因此, 广泛应用于制造业和质量实验室。

PEG 聚乙二醇具有优良的润滑性、保湿性、分散性, 是良好的粘接剂、抗静电剂、柔软剂, 在化妆品、制药、化纤、橡胶、塑料、农药及食品加工等行业中均有着极为广泛的应用。本文以反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈 (DCTB) 为基质, 应用 MALDI-7090 及聚合物分析软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析了常用药用辅料聚乙二醇 23000 (PEG23000) 的分子量分布及单体信息, 可作为聚合物样品分析时的参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-7090



图 1. 岛津 MALDI-7090 质谱仪

## 1.2 分析条件

调谐模式：反射正离子模式

扫描范围：m/z 10000-40000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：115-120

脉冲引出质量：23000 Da

## 2. 样品前处理

取样品加四氢呋喃配制为 10 mg/mL 的样品工作液。取 10  $\mu$ L 的样品工作液、10  $\mu$ L 的 DCTB 基质溶液 (20 mg/mL)、5  $\mu$ L 辅助盐溶液 NaTFA (5 mg/mL) 预混合，再取 1  $\mu$ L 混合液点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

## 3. 结果与讨论

合理基质的选择等前处理过程是影响 MALDI-TOF 信号表现的主要方面。本实验过程中使用聚合物分析常用基质 CHCA、Dithranol、THAP 等进行测试，结果表现为样品离子化效果较差而致无明显目标信号。经过多次筛选，最后选定 DCTB 基质，质谱图信号良好。

PEG23000 的质谱检测结果如图 2 所示。样品检测到聚合物离子峰系列，相邻聚合单元分子量相差 44 Da，其中信号强度较高的离子峰系列的分子量分布与结构式  $\text{CH}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2$  相符。样品的分子量分布信息由聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析计算。Polymerix 软件分析结果见表 1。

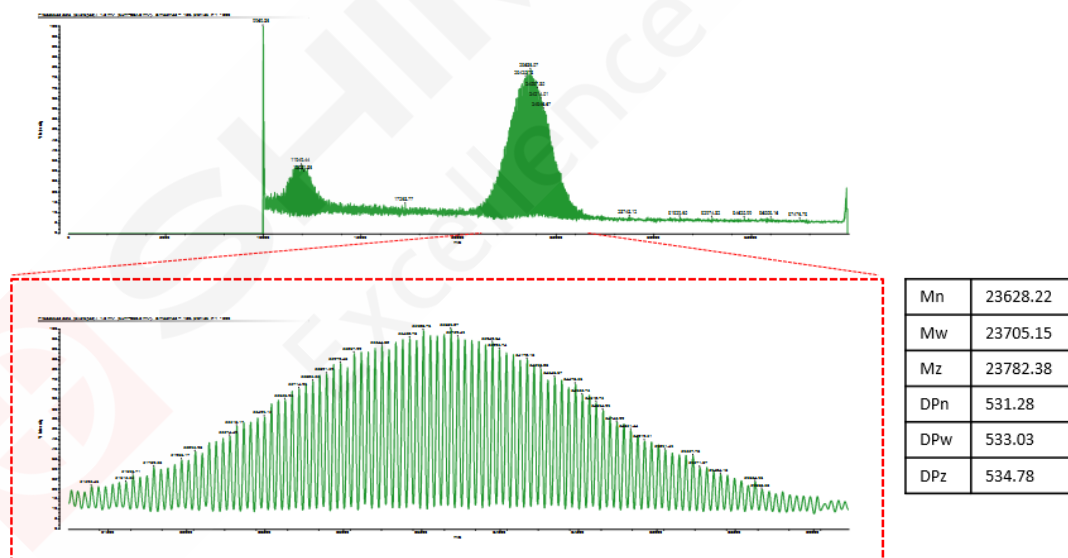


图 2. PEG23000 样品一级质谱图 (上: m/z 10000-40000; 下: 局部放大 m/z 21000-26000)

表 1. Polymerix 软件分析结果

参数	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub>	M <sub>z</sub>	PD	DP <sub>n</sub>	DP <sub>w</sub>	DP <sub>z</sub>	Repeat	Adduct	Series Formula
结果	23628.22	23705.15	23782.38	1.003	531.28	533.03	534.78	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	Na	CH <sub>3</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>

#### 4. 结论

本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-7090 分析 PEG23000，直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息。MALDI-7090 作为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有飞行距离长、分析速度快、仪器维护方便和软件合规的特点，是聚合物分析的有力工具。



## 5 应用台式 MALDI-TOF 对注射剂中辅料吐温 80 进行降解评价

**摘要：**本文建立了应用台式 MALDI-TOF 对注射剂中辅料吐温 80 进行降解评价的方法。结果表明，注射剂中吐温 80 在特定环境下容易发生降解，通过比较标品及注射剂中吐温 80 的分子量分布，可以对注射剂中吐温 80 的降解程度进行评价。该方法简单易行，数据精确、分析速度快、通量高，为医药行业注射剂中辅料吐温 80 的质量控制提供了参考。

**关键词：**基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 吐温80 降解

吐温80，又名聚山梨酯80，化学名称为聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯，是一种亲水型非离子表面活性剂，在注射剂中广泛地用作药物的增溶剂，可以增加药物的溶解性。注射剂在临床应用时，由于避过了肝肠循环直接进入人体，吸收快、作用迅速，一旦辅料出现质量问题，就会迅速对机体产生不可逆的损伤，危害程度很大。吐温80具有很强的破裂细胞膜的作用而引起刺激性，溶血性和组胺释放（致敏性），近年来国内外出现多起因吐温80质量问题或使用不当导致注射剂不良反应（过敏、溶血等）的报道。吐温80中亲脂成份包括不饱和脂肪酸，这些不饱和脂肪酸十分容易氧化降解而产生更多的有毒成份，由此而产生的毒副反应将会超过产品本身带来的益处。吐温80来源复杂，对吐温80原料的质量以及注射剂中吐温80的降解程度进行监测对保证临床用药安全至关重要。

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020，通过比较标品及注射剂中吐温 80 的分子量分布，可以快速对注射剂中吐温 80 的降解程度进行评价。该方法简单易行，数据精确、分析速度快、通量高，为医药行业注射剂中辅料吐温 80 的质量控制提供了参考。

### 1. 实验部分

#### 1.1 仪器

MALDI-8020 台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪



图 1. MALDI-8020

## 1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 500-5000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：65

## 1.3 样品前处理

取吐温80标品按注射剂中吐温80的浓度比例加入用于配制注射剂的缓冲液中，作为吐温80对照样品。取样品加水稀释10倍作为样品工作液。取1  $\mu\text{L}$  NaTFA(三氟乙酸钠, 1 mg/mL) 点靶，自然干燥。取1  $\mu\text{L}$  样品工作液和1  $\mu\text{L}$  葱三酚基质溶液 (20 mg/mL) 依次点在靶点的盐结晶层上，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 吐温 80 标品分析

使用岛津 MALDI-8020 分析吐温 80 标品的一级质谱图见图 2。质谱图中可见三个明显的“钟形”离子峰簇，分别为 m/z 500-1600、m/z 1100-2700、m/z 2500-4000，其中 m/z 1100-2700 之间的离子峰簇信号强度最高。以该离子峰簇为例，使用 Polymerix 软件进行分子量统计分析，结果见表 1，相邻不同质谱峰相差 44 Da，与吐温 80 的单体  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  分子量相符。

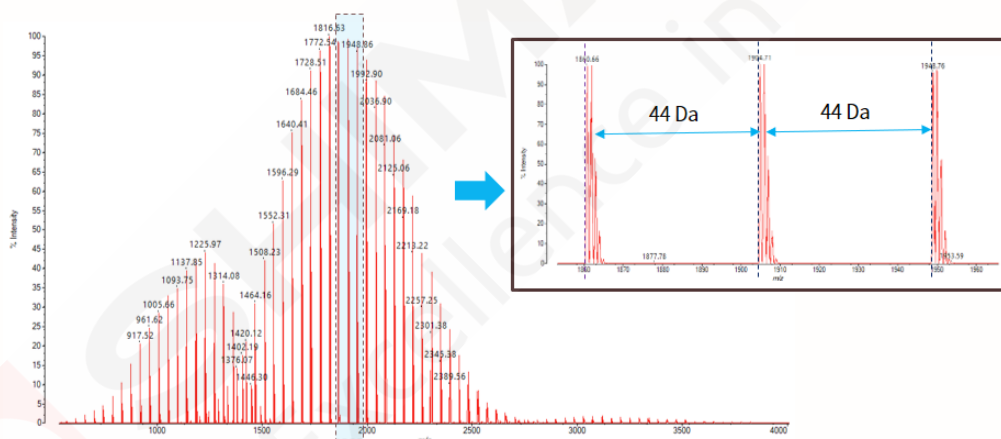


图 2. 吐温 80 标品的一级质谱图

### 2.2 不同处理的注射液制剂缓冲液吐温 80 降解分析

取某医药企业提供的两份注射液制剂缓冲液样品，保存条件分别为 4°C 20 天及 40°C 28 天，应用 MALDI-8020 进行分子量检测，质谱图见图 3，分子量统计信息见表 1。由图可见，4°C 保存 20 天时，注射液中吐温 80 的分子量分布与标品相比无显著变化，但 40°C 保存 28 天时吐温 80 重均分子量明显变小，检测到 m/z 500-1100、m/z 1000-1800、m/z 1200-2000 三个离子峰簇，其中 m/z 1200-2000 离子峰簇中包含的质谱峰的数量较多，可能为吐温 80 降解后产生的碎片。该结果表明吐温 80 不太稳定，受特定环境影响容易发生降解，应用 MALDI-8020 通过分子量检测可以对是否发生降解进行监测。

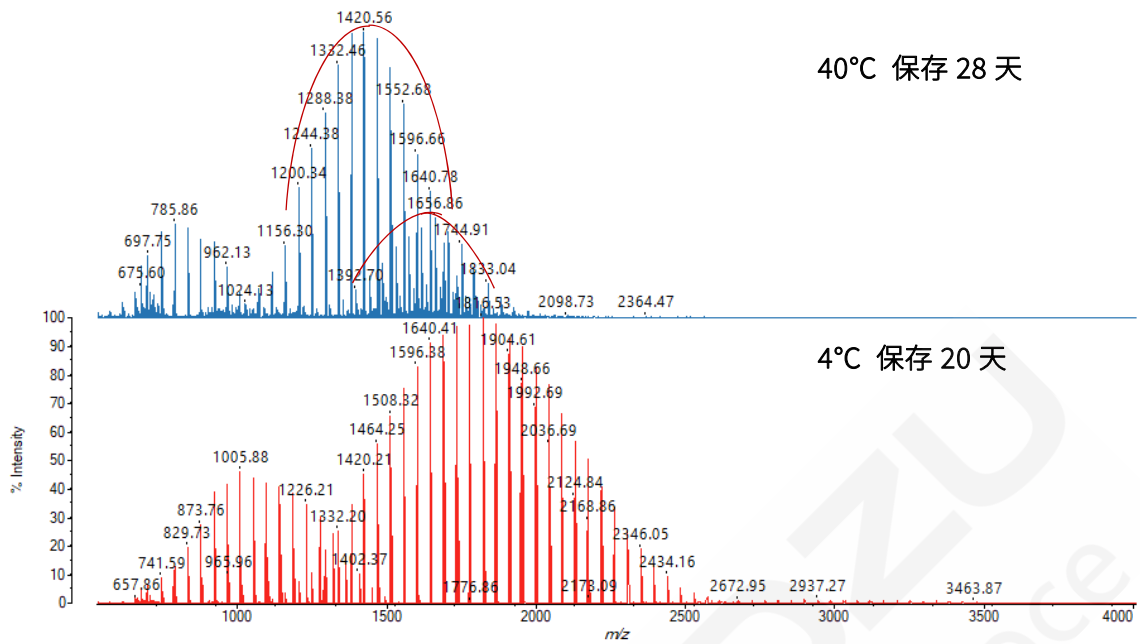


图 3. 不同保存条件下的注射液制剂缓冲液中吐温 80 的一级质谱图

### 2.3 不同品牌多西他赛注射液中吐温 80 分子量分析

从市场上购买三种不同品牌的多西他赛注射液，应用 MALDI-8020 进行分子量分析，检测结果见图 4。从结果来看，品牌 1 与品牌 3 吐温 80 的分子量分布相比标品无明显变化，但品牌 2 中的吐温 80 的重均分子量明显减小，检测到  $m/z$  500-1100、 $m/z$  1000-1800、 $m/z$  1400-1900 三个离子峰簇，可能是吐温 80 在原料来源、药物生产或成品保存过程中发生了降解所致。应用 MALDI-8020 对注射剂中吐温 80 进行分子量检测，简单易行，检测结果可为吐温 80 的质控提供参考，有助于保障临床用药安全。

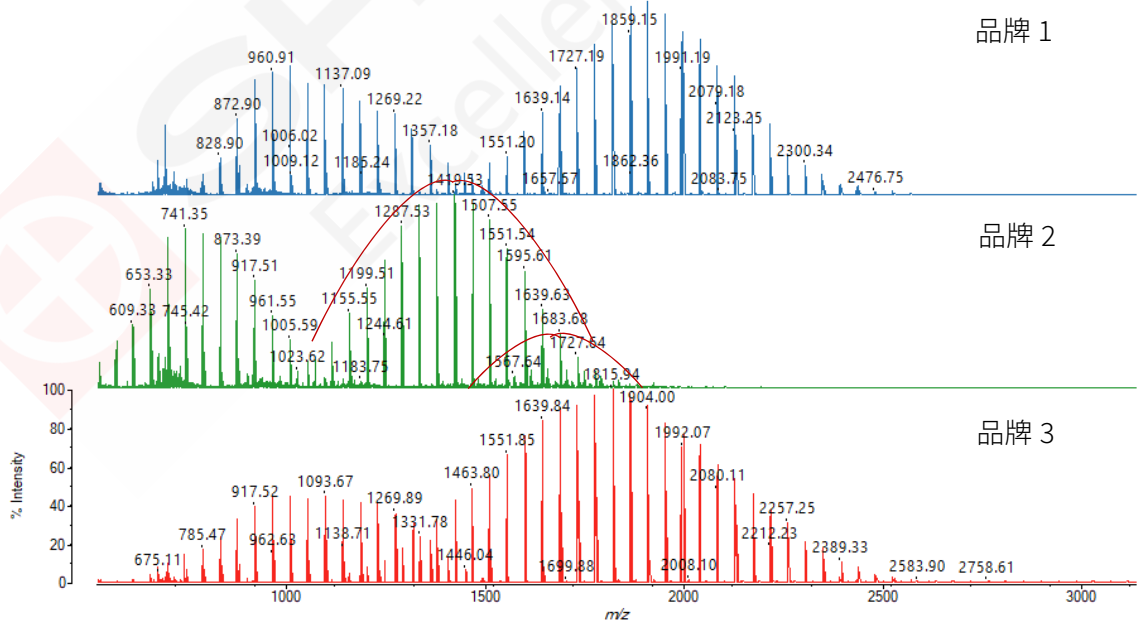


图 4. 市售不同品牌注射剂中吐温 80 的一级质谱图

表 1. 样品分子量统计信息 (分析软件: Polymerix)

样品	DPn	DPw	DPz	Mn	Mw	Mz
吐温 80 标品	41.42	42.10	42.76	1855.75	1885.90	1914.92
缓冲液 1	39.22	40.02	40.80	1758.95	1794.12	1828.41
缓冲液 2	31.31	31.77	32.26	1410.42	1431.01	1452.39
市售 1	41.29	41.77	42.24	1850.22	1871.19	1892.00
市售 2	30.98	31.34	31.69	1395.96	1411.91	1427.58
市售 3	39.66	40.49	41.30	1778.37	1814.84	1850.30

备注: 缓冲液 1-某注射液制剂缓冲液 4°C保存 20 天; 缓冲液 2-某注射液制剂缓冲液 40°C保存 28 天; 市售 1-市售多西他赛注射液品牌 1; 市售 2-市售多西他赛注射液品牌 2; 市售 3-市售多西他赛注射液品牌 3。

### 3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测注射液中吐温 80 的分子量分布信息, 通过样品与标品的分子量变化对比, 可以判断吐温 80 是否发生明显降解, 为吐温 80 的质控评价提供参考。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱, 操作简便、体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便, 性能卓越, 是医药行业中聚合物类辅料分子量分析的有力工具。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司/岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

<p><b>北京</b> 北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层 邮政编码: 100020 电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531</p>	<p><b>上海</b> 上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋 邮政编码: 200233 电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666</p>	<p><b>广州</b> 广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦 邮政编码: 510656 电话: (020)3718-3888 传真: (020)3718-3804</p>
<p><b>沈阳</b> 沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层 邮政编码: 110016 电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577</p>	<p><b>成都</b> 成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼 B座12层 邮政编码: 610063 电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420</p>	<p><b>昆明</b> 昆明市青年路432号天恒大酒店 908室 邮政编码: 650021 电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991</p>
<p><b>西安</b> 西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501 邮政编码: 710065 电话: 029-62737878 传真: (029)6273-7879</p>	<p><b>南京</b> 南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座 邮政编码: 210005 电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237</p>	<p><b>深圳</b> 深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C 邮政编码: 518040 电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100</p>
<p><b>乌鲁木齐</b> 乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座 邮政编码: 830002 电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273</p>	<p><b>重庆</b> 重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601 邮政编码: 400011 电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551</p>	<p><b>香港</b> 香港九龙尖沙咀海洋中心1028室 SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY, TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG 电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438</p>
<p><b>郑州</b> 郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室 邮政编码: 450007 电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982</p>	<p><b>武汉</b> 武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室 邮政编码: 430060 电话: (027)5908-0488 传真: (027)5908-0470</p>	

用户服务热线电话: 800-8100439  
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知