

通过 LC/ELSD 揭示聚山梨酯水解的奥秘

Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析 HPLC 柱的应用

作者

Chenchen He, Wendi A. Hale,
Andrew Coffey,
Andrea Angelo P. Tripodi,
Amanda McQuay
安捷伦科技有限公司

摘要

聚山梨酯是一类表面活性剂，通常用作蛋白质类治疗药物的稳定剂。聚山梨酯水解问题日益引发关注，在高浓度制剂日益流行的趋势下尤其如此。高浓度制剂还会增加可水解聚山梨酯的宿主细胞蛋白质的浓度。本应用简报聚焦监测聚山梨酯水解的难题，展示了一种快速、高分离度的方法，可从聚山梨酯单酯中分离游离脂肪酸。该方法重现性高、残留率低，并且可用于其他应用，例如聚山梨酯的相对定量和游离脂肪酸分析。

前言

大多数单克隆抗体 (mAb) 和其他治疗蛋白质 (包括多特异性抗体、抗体偶联药物和融合蛋白) 的制剂缓冲液中含有稳定剂或表面活性剂, 以防止聚集和蛋白质-表面相互作用。随着治疗药物浓度的增加, 发生聚集的概率随之提高, 因此表面活性剂变得更加重要。聚山梨酯 (尤其是聚山梨酯 20 [PS 20] 和聚山梨酯 80 [PS 80]) 即使在低浓度下也能高效发挥作用, 且具有较高的生物兼容性, 因此成为蛋白质治疗药物的首选表面活性剂。由于聚山梨酯缺乏发色团, 因此可以使用通用检测器 (例如蒸发光散射检测器 (ELSD)) 进行检测。

尽管聚山梨酯作为表面活性剂在生物治疗制剂缓冲液中具有许多优势, 但也并非没有问题。聚山梨酯可通过水解或氧化而降解。本应用简报重点关注因水解而发生的降解。水解可通过化学或酶促方式进行。酶促水解更常见, 因为宿主细胞蛋白质会裂解酯键, 释放出脂肪酸。宿主细胞蛋白质 (通常为脂肪酶或酯酶) 在纯化过程中难以完全去除, 因此水解存在较大风险。对此, 美国药典 (USP) 已经开始销售稳定同位素标记的脂肪酶肽标准品^[1]。高浓度 mAb 制剂会使宿主细胞蛋白质的纯化和去除更加困难。聚山梨酯降解会影响表面活性剂稳定蛋白质的能力^[2], 并且可能导致蛋白质或游离脂肪酸颗粒的形成^[3,4]。

越来越多的蛋白质治疗药物制造商认识到这个问题, 并且开始应用聚山梨酯表征方法^[5,6]。但是, 使用传统的 C18 或 C8 HPLC 柱可能难以将游离脂肪酸与聚山梨酯单酯分离, 通常需要超过 30 分钟才能达到基线分离。混合模式色谱柱无法有效进行此类分析, 因为它们无法保留聚山梨酯的降解产物, 这些降解产物在死体积内就会被洗脱。本应用简报介绍了一种用于监测聚山梨酯水解的新型 HPLC 柱和解决方案, 其提供了一种快速、简便易行的方法以实现游离脂肪酸与聚山梨酯单酯峰之间的高分离度。

实验部分

材料

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich 或 Thermo Fisher Scientific。

仪器

将 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统与 Agilent 1290 Infinity II ELSD 联用。

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (部件号 G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (部件号 G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (部件号 G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 蒸发光散射检测器 (部件号 G7102A)

方法条件

表 1. 用于聚山梨酯分析的 LC/ELSD 参数

参数	值	
色谱柱	AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱, 300 Å, 3.5 µm, 2.1 × 50 mm (部件号 865750-907), 带保护柱 (部件号 821126-927)	
流动相 A	10 mM 乙酸铵	
流动相 B	甲醇	
流速	0.25 mL/min	
进样量	10 µL (除非另有说明)	
柱温	30 °C	
水解梯度	时间 (min) %B	
	0-0.2	0
	0.2-0.6	0-50
	0.6-1.5	50
	1.5-5.1	50-95
	5.1-7	95
	7-8	95-0
	8-10	0
游离脂肪酸梯度	时间 (min) %B	
	0-0.2	0
	0.2-0.6	0-50
	0.6-1.0	50
	1.0-1.5	50-55
	1.5-2.5	55
	2.5-4	55-60
	4-6.8	60-95
	6.8-8	95
	8-9	95-0
9-11	0	
进样针清洗	20:80 甲醇:水	
ELSD 蒸发器温度	30 °C	
ELSD 雾化器温度	30 °C	
气体流速	1.20 SLM	

样品前处理

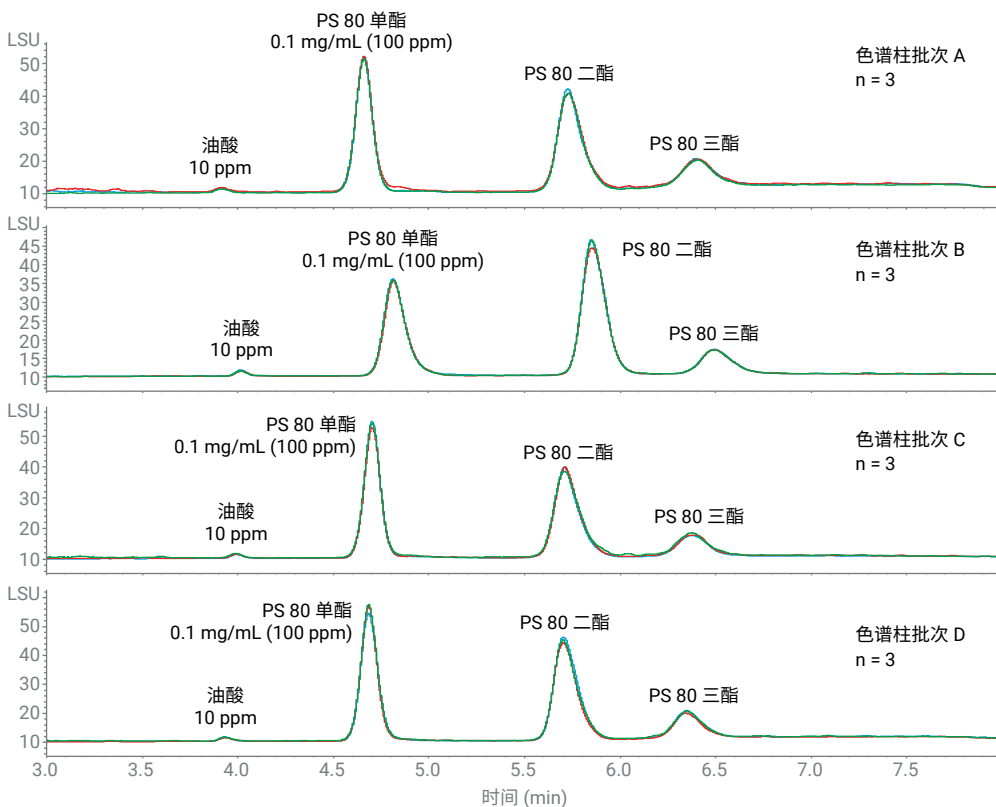
制剂缓冲液由最终浓度为 1.525 mg/mL 的磷酸氢二钠、0.8625 mg/mL 的磷酸二氢钠、6.1625 mg/mL 的氯化钠、1.3 mg/mL 的柠檬酸和 0.3 mg/mL 的三水柠檬酸钠组成，用氢氧化钠调节至 pH 6.0。将 PS 20 和 PS 80 以 100 ppm 加标至制剂缓冲液中，将油酸以 10 ppm 加标至制剂缓冲液中，并将月桂酸以 5 ppm 加标至制剂缓冲液中，进行重现性和残留研究。脂肪酸和定量样品前处理方案见“结果与讨论”章节。

结果与讨论

色谱柱质量和稳定性

开发任何新方法时，无论涉及进样间还是批次间一致性，确保重现性都至关重要。采用该方法时，游离脂肪酸必须与聚山梨酯单酯峰完全分离。理想情况下，应在尽可能短的时间内完成分离。

图 1 展示了这些要求。PS 80 及其主要脂肪酸（油酸）在 10 分钟运行中显示出高分离度。此外，对来自四个不同培养基批次的 3 个重复样品进行分析，并测量保留时间、峰面积和分离度。四个批次中油酸和 PS 80 单酯的保留时间一致，变化小于 1.5%（相对标准偏差 (RSD)）。12 个重复样品中油酸峰面积的重现性为 7.9%，且批次间 PS 80 单酯的 %RSD 为 12.4%。数据表明，该变化主要由批次 B 所致。尽管安捷伦液相色谱柱符合高质量标准，但在一定范围内的细微差异属于正常现象。这些差异对保留时间或分离度的影响不大，油酸与 PS 80 单酯之间的平均分分离度高达 4.97，%RSD 为 3.1%。



批次间保留时间 (n = 12)

分析物	平均值	%RSD
油酸	3.97	1.1
PS 80 单酯	4.72	1.3

批次间峰面积 (n = 12)

分析物	平均值	%RSD
油酸	7.27	7.9
PS 80 单酯	263.1	12.4

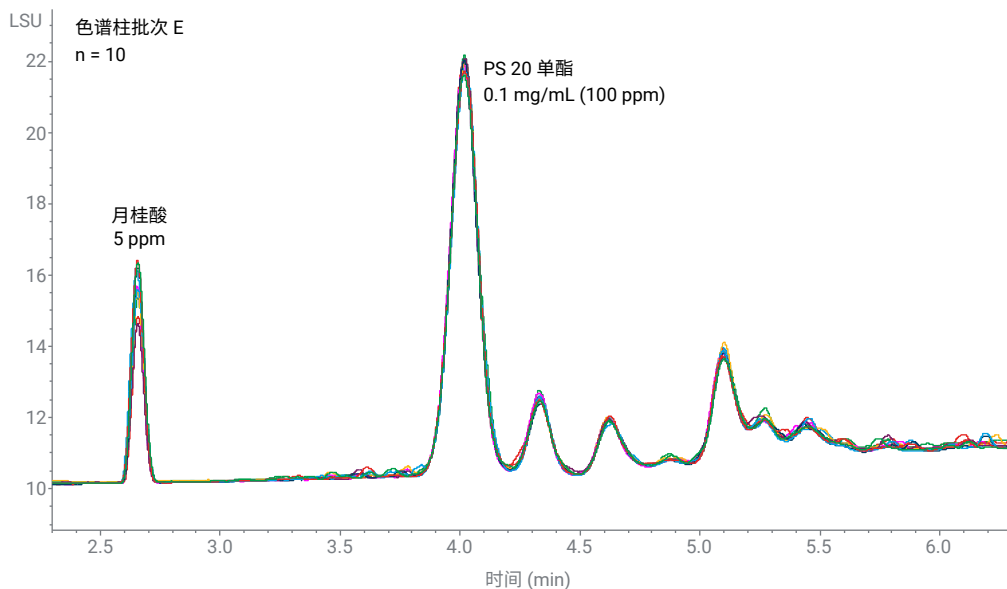
批次间分离度 (n = 12)

分析物	平均值	%RSD
油酸酯-PS 80	4.97	3.1

图 1. Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱的批次间重现性，在保留时间、分离度和峰面积方面获得了优异的精密性 (n = 12)

该方法通过优化设计，使 ELSD 设置适用于生物治疗药物常用的 PS 20 和 PS 80。图 2 显示了以月桂酸为主要脂肪酸的 PS 20 水解的示例，证明了采用与图 1 所示的不同批次的进样间重现性。保留时间的重现性非常出色，月桂酸与 PS 20 单酯之间的分离度也非常出色 (8.7)。该批次也具有良好

的重现性，%RSD 为 1.4%。与油酸类似，以低含量 (5 ppm) 加标的月桂酸的峰面积重现性为 12.8%。该数值接近检出限 (LOD)，表现出色。PS 20 单酯峰面积的 %RSD 为 1.3%，表明 10 次重复进样具有出色的重现性。



保留时间

分析物	平均值	%RSD
月桂酸	2.66	0.08
PS 20 单酯	4.02	0.05

峰面积

分析物	平均值	%RSD
月桂酸	19.99	12.8
PS 20 单酯	95.15	1.3

分离度 (月桂酸与 PS 20 单酯)

分析物	平均值	%RSD
月桂酸酯-PS 20	8.68	1.4

图 2. 该方法使用 Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱，也适用于聚山梨酯 20 分析，无需进行任何梯度或 ELSD 调整。保留时间、分离度和峰面积表现出优异的分析间重现性

为了提高方法的稳定性并优化通量，必须尽可能消除残留干扰。这一点很重要，因为游离脂肪酸可能是“粘性”化合物。使用“实验部分”章节中建议的进样针清洗步骤，未观察到 PS 20、PS 80 或其主要的游离脂肪酸的残留（图 3）。在这两种情况下，进样的游离脂肪酸的含量均控制在极低水平。如果游

离脂肪酸含量较高并造成残留问题，可以提高洗针液中甲醇的含量，最高可达 70%。请注意，以下章节中所述的游离脂肪酸实验无需进行此调整，但是如果开展游离脂肪酸分析，则可能需要进行调整。幸运的是，AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱是此类分析的理想选择。

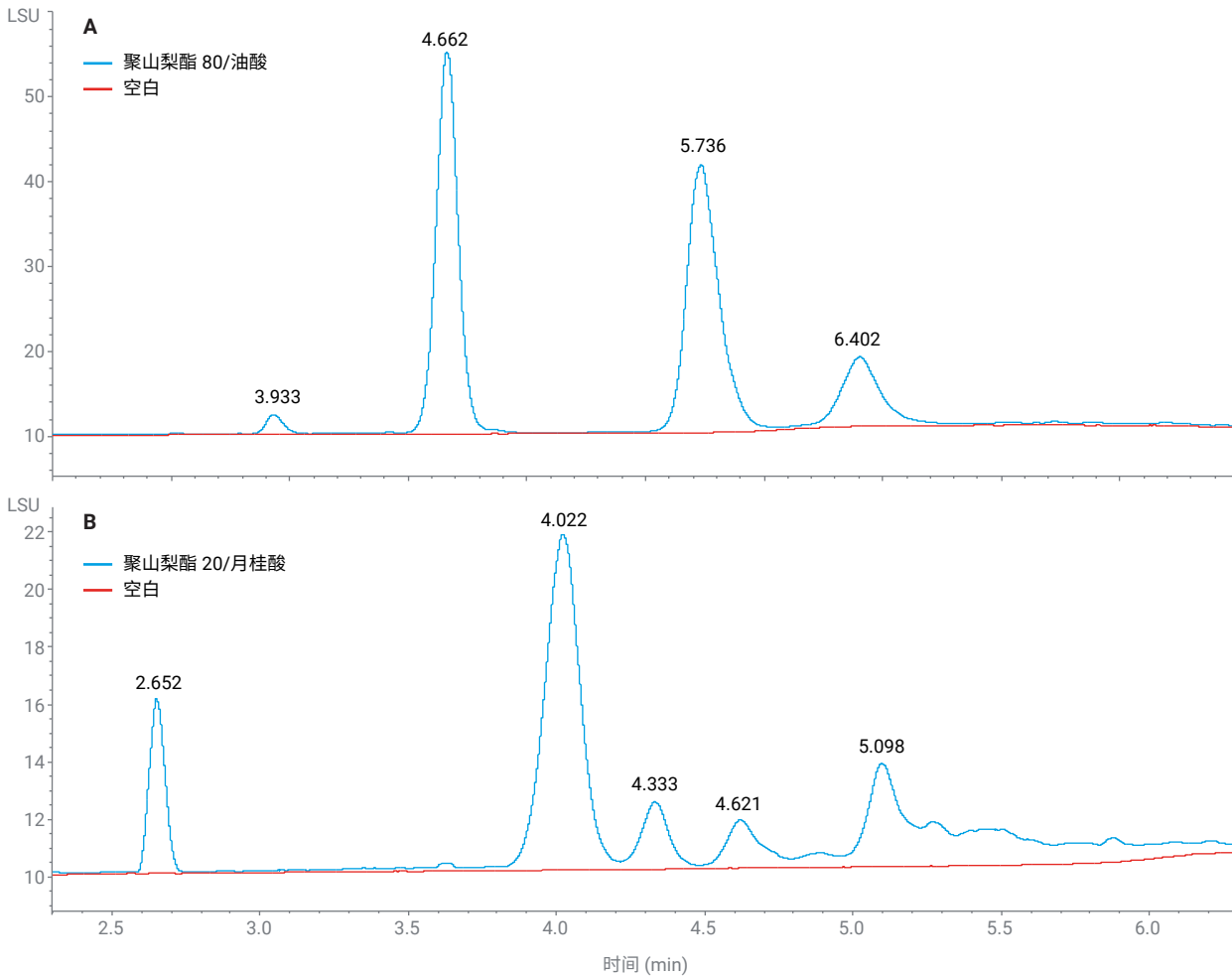


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱，未观察到聚山梨酯 80 (A) 和聚山梨酯 20 (B) 残留。游离脂肪酸同样没有残留

方法应用

可通过气相色谱进行游离脂肪酸分析，但该方法需要进行衍生化。使用 LC/ELSD 运行该方法无需额外的样品前处理，并可使用对聚山梨酯水解方法略加修改的梯度运行。在本实验中，向制剂缓冲液中加入 PS 80 及其游离脂肪酸，以模拟实际条件。此外，还进样四种不同体积（0、2、5 和 10 μL ）

的游离脂肪酸，并以相对于 USP 标准品的丰度对各游离脂肪酸进行加标。油酸的含量最高，达到 58%；亚麻酸的含量最低，为 4%。饱和脂肪酸在 ELSD 中的响应大于不饱和脂肪酸（图 4）。游离脂肪酸分析可用作筛查聚山梨酯降解的替代方法，且 AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱有助于快速分析。

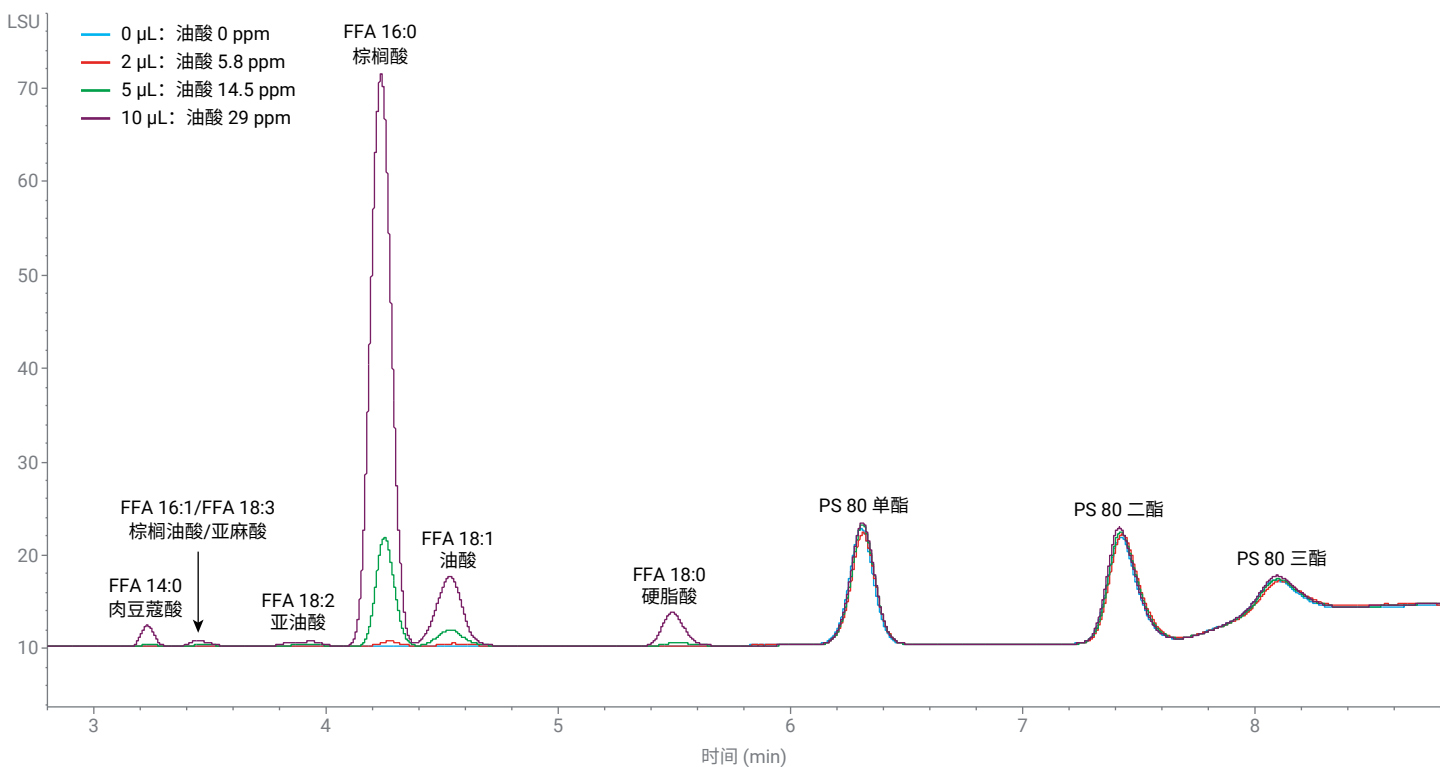


图 4. 使用 Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析色谱柱对聚山梨酯 80 进行游离脂肪酸分析。7 种脂肪酸中有 6 种可通过略加调整的梯度实现分离。脂肪酸以三种不同的体积（均为按照 USP 标准的相对量）进行加标

监管机构要求对药物产品成分进行定性和定量分析，因此对制剂缓冲液中聚山梨酯的含量进行定量是必要的。虽然混合模式色谱是此类分析的金标准方法，但将定量信息与定性降解表征相结合的分析方法同样非常有用，尤其是在开发实验室中。基于 126 种市售 mAb 的 PS 80 含量设计校准曲线，浓度范围为 0.001% 至 0.2% (w/v)^[7]。校准曲线上 10 个点的范围为 0.0005% 至 0.5% (w/v)，并进行两次重复采集。用制剂缓冲液制备标准标样，每个样品中加标有 0.025 mg/mL 油酸。最终进样量为 20 μ L。校准曲线在对数-对数标度上呈线性，并且根据单酯峰面积计算得到的值显示出高重现性（图 5）。校准曲线上最低点的 %RSD 为 20.9%，刚好处于定量下限的边缘（表 2）。

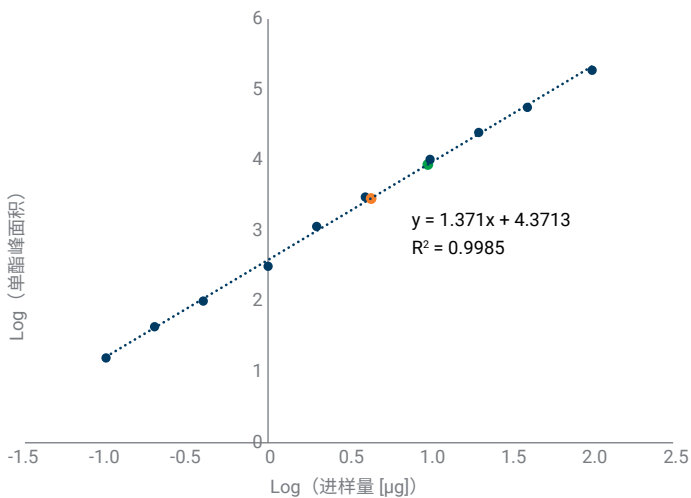


图 5. 基于 126 种 mAb 的聚山梨酯 80 含量所设计的校准曲线。尽管该分析方法专为定性分析而设计，但是对于希望提高实验室通量的科学家来说，该方法也可用于定量分析。未知物为加标有 200 和 500 ppm PS 80 的蛋白质

表 2. 校准曲线精密度。最低点刚好在定量限处，%RSD 为 20.9%。其余的点都在精密度限值范围内

校准 (ppm/%)	5/0.0005	10/0.001	20/0.002	50/0.005	100/0.01	200/0.02	500/0.05	1,000/0.1	2,000/0.2	5,000/0.5
%RSD	20.9	12.9	1.2	1.9	0.44	0.36	0.24	0.47	0.54	1.8

测试样品为含 5 mg/mL 市售蛋白质的制剂缓冲液，其中加标有 0.02% 和 0.05% PS 80。这些测试样品进行了两次重复采集。蛋白质在约 1 分钟内洗脱，未干扰脂肪酸或聚山梨酯峰。测试样品表现出高准确度和重现性，证明了该方法作为二合一方法用于聚山梨酯定量的可行性（表 3）。

表 3. 两个测试样品重复运行两次，表现出优异的准确度和精密度，为定量方法建立了概念验证

测试样品 (ppm/%)	200/0.02	500/0.05
平均值 (ppm)	220	470
准确度	110%	94%
%RSD	0.35	7.1

结论

聚山梨酯降解，尤其是由残留的宿主细胞蛋白质引起的水解，是科学界越来越重视的一个重要议题。本应用简报介绍了一种耗时 10 分钟的方法，该方法能够从聚山梨酯单酯中轻松分离游离脂肪酸，为聚山梨酯水解提供了一种高效的筛查工具。该方法稳定、可重现且操作简单。此外，该分析方法可用于半定量分析和游离脂肪酸分析。

参考文献

1. Host Cell Protein Contaminants in mAb and Protein Therapy Manufacturing. Available online: <https://www.usp.org/biologics/host-cell-proteins>
2. Zürcher, D.; Wuchner, K.; Arosio, P. Mitigation Strategies Against Antibody Aggregation Induced by Oleic Acid in Liquid Formulations. *Mol. Pharm.* **2024**, *21*, 5761–5771. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00754
3. Aryal, B.; Lehtimäki, M.; Rao, V. A. Stress-Mediated Polysorbate 20 Degradation and Its Potential Impact on Therapeutic Proteins. *Pharm. Res.* **2024**, *41*, 1217–1232. DOI: 10.1007/s11095-024-03700-7
4. Manning, M. C.; Holcomb, R. E.; Payne, R. W.; Stillahn, J. M.; Connolly, B. D.; Katayama, D. S.; Liu, H.; Matsuura, J. E.; Murphy, B. M.; Henry, C. S.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: Recent Advances. *Pharm. Res.* **2024**, *41*, 1301–1367. DOI: 10.1007/s11095-024-03726-x
5. Wuchner, K.; Yi, L.; Chery, C.; Nikels, F.; Junge, F.; Crotts, G.; Rinaldi, G.; Starkey, J. A.; Bechtold-Peters, K.; Shuman, M.; *et al.* Industry Perspective on the Use and Characterization of Polysorbates for Biopharmaceutical Products Part 1: Survey Report on Current State and Common Practices for Handling and Control of Polysorbates. *J. Pharm. Sci.* **2022**, *111*, 1280–1291. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.02.009
6. Wuchner, K.; Yi, L.; Chery, C.; Nikels, F.; Junge, F.; Crotts, G.; Rinaldi, G.; Starkey, J. A.; Bechtold-Peters, K.; Shuman, M.; *et al.* Industry Perspective on the Use and Characterization of Polysorbates for Biopharmaceutical Products Part 2: Survey Report on Control Strategy Preparing for the Future. *J. Pharm. Sci.* **2022**, *111*, 2955–2967. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.08.021
7. Strickley, R. G.; Lambert, W. J. A Review of Formulations of Commercially Available Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110*, 2590–2608. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.017

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE-004059

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025
2025 年 2 月 6 日，中国出版
5994-8123ZHCN