doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.11.016

高效液相色谱 - 电喷雾检测器法测定程序性死亡蛋白 - 1 抑制剂中甘露醇含量*

田沛霖，李玥琦，王思渊，鲁　辉，张国林△

（江苏省苏州市药品检验检测研究中心，江苏 苏州　215104）

摘要：目的　建立测定程序性死亡蛋白（PD - 1）抑制剂中甘露醇含量的高效液相色谱 - 电喷雾检测器（HPLC - CAD）法。**方法**　色谱柱为 Supelco apHera NH_2 氨基分析柱（150 mm × 2 mm，5 μm），流动相为乙腈 - 水溶液（80∶20，*V* / *V*），流速为 1.0 mL / min，柱温为 40 ℃，进样量为 3 μL。CAD 雾化室温度为 50 ℃，幂率为 1.0，采样频率为 10 Hz，过滤常数为 5.0 s。**结果**　甘露醇质量浓度在 0.125 ~ 1.000 mg / mL 范围内与峰面积线性关系良好（r = 0.997 3，n = 5）；精密度、稳定性均良好；检测限和定量限分别为 0.200 μg / mL 和 0.625 μg / mL；平均回收率为 95.31%，*RSD* 为 1.01%（n = 6）。**结论**　该方法操作简单、灵敏度高、检测迅速、结果准确，可用于 PD - 1 抑制剂中甘露醇的含量测定。

关键词：程序性死亡蛋白 - 1 抑制剂；甘露醇；高效液相色谱法；电喷雾检测器；含量测定

中图分类号：R979.5；R927.2　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）11 - 0063 - 04**

Determination of Mannitol in Programmed Death - 1 Inhibitor by HPLC - CAD

TIAN Peilin, LI Yueqi, WANG Siyuan, LU Hui, ZHANG Guolin

(Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou, Jiangsu, China　215104)

Abstract: Objective　To establish a high - performance liquid chromatography - charge aerosol detection (HPLC - CAD) method for the determination of mannitol in the programmed death - 1 (PD - 1) inhibitor. **Methods**　The chromatographic column was Supelco apHera NH_2 amino analysis column (150 mm × 2 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile aqueous solution (80 ∶ 20, *V* / *V*), the flow rate was 1.0 mL / min, the column temperature was 40 ℃ and the injection volume was 3 μL. The detector of CAD was applied with the nebulization temperature of 50 ℃, power function value (PFV) of 1.0, collection frequency of 10 Hz and filtration constant of 5.0 s. **Results**　The linear range of mannitol was 0.125 - 1.000 mg / mL (r = 0.997 3, n = 5). The results of precision and stability tests were good. The limit of detection (*LOD*) and limit of quantitation (*LOQ*) were 0.200 μg / mL and 0.625 μg / mL, respectively. The average recovery of mannitol was 95.31% with an *RSD* of 1.01% (n = 6). **Conclusion**　The established method is simple, sensitive, rapid and accurate, which can be used for the determination of mannitol in the PD - 1 inhibitor.

Key words: programmed death - 1 inhibitor; mannitol; HPLC; CAD; content determination

程序性死亡蛋白 - 1（PD - 1）抑制剂是目前唯一在中国应用的免疫抑制剂[1]。其通过 PD - 1 免疫检查点对 T 淋巴细胞活化和增殖的抑制作用，恢复 T 淋巴细胞的活性和个体免疫系统杀伤肿瘤细胞的能力[2]。目前，PD - 1 抑制剂治疗肝癌、胃癌、黑色素瘤、鼻咽癌、非小细胞肺癌等多种实体瘤的效果良好[3-5]，应用前景广阔。现已上市的 PD - 1 抑制剂产品多为注射液或冻干粉针剂，往往会加入甘露醇以提高制剂稳定性，防止多肽或蛋白相互聚集，调整缓释制剂产品降解速率等[6]。甘露醇为六元糖醇，测定方法包括氧化还原滴定法[7-8]、分光光度法[9-10]、高效液相色谱法[11]、气相色谱 - 质谱联用法[12]、离子色谱法[13]等。其中，高效液相色谱 - 示差折光检测器（HPLC - RID）法是目前最常用的方法，已收载于历版《中国药典》，普遍用于各 PD - 1 抑制剂产品现行质量标准。但 RID 受温度及流动相组成等外界因素干扰较大[14]，不适合梯度洗脱，且存在灵敏度较低、信号欠稳定等不足[15]，在样品浓度较低时重复性较差。电喷雾检测器（CAD）为新型检测器，近年来发展迅速，2020 年版《中国药典（四部）》通则 0512 HPLC 法中首次增加了对该检测器的相关介绍[16]。其检测原理是将洗脱液雾化后形成颗粒，经蒸发管干燥后与带电氮气碰撞，使分析物颗粒表面带正电荷，通过静电计测量分析物颗粒表面的电荷量，使分析物颗粒的质量色谱峰面积与表面所带电荷量相关，成为确定物质浓度的依据[17]。本研究中建立了快速、准确测定 PD - 1 抑制剂特瑞普利单抗注射液中甘露醇含量的 HPLC - CAD

*基金项目：江苏省苏州市科技计划项目［SYS2020199；SS202040］。

第一作者：田沛霖，女，硕士，主管药师，研究方向为药品检验及质量控制，（电话）0512 - 66090229（电子信箱）ah_leen7468@sina.com。

△通信作者：张国林，男，博士，副主任药师，研究方向为药品检验及质量控制，（电子信箱）zhangguolin2006@163.com。

法，为完善该类制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱仪（美国赛默飞世尔科技有限公司），包括Corona Veo RS型CAD、变色龙工作站；XSE205DU型电子天平（梅特勒－托利多仪器有限公司，精度为0.01 mg / 0.1 mg）；Millipore Synergy型超纯水机（美国密理博公司）。

1.2 试药

特瑞普利单抗注射液（国内某企业，批号分别为201908030，201909032，201909034，规格均为每瓶240 mg∶6 mL）；甘露醇对照品（中国食品药品检定研究院，批号为100533－202006，纯度为99.5%）；乙腈（色谱纯，霍尼韦尔公司，批号为V3OA1H）；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Supelco apHera NH_2氨基分析柱（150 mm×2 mm，5 μm）；流动相：乙腈－水溶液（80∶20，*V* / *V*）；流速：1.0 mL / min；进样室温度：5 ℃；柱温：40 ℃；进样量：3 μL；雾化气：氮气（纯度超过99.0%），雾化室温度：50 ℃；幂率：1.0；采样频率：10 Hz；过滤常数：5.0 s。

2.2 溶液制备

取甘露醇对照品50 mg，精密称定，置25 mL容量瓶中，加超纯水溶解并定容，制成质量浓度为2.0 mg / mL的对照品贮备液。分别精密量取适量上述溶液，置10 mL容量瓶中，用超纯水稀释至刻度，制成质量浓度分别为0.125，0.250，0.500，0.800，1.000 mg / mL的溶液，作为标准曲线溶液。精密量取样品1 mL，用超纯水稀释50倍，即得供试品溶液。取超纯水，作为空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：取2.2项下空白溶液、对照品贮备液、供试品溶液各适量，按2.1项下色谱条件分别进样测定。色谱图见图1。可见，空白溶液色谱无干扰；对照品贮备液和供试品溶液色谱中，甘露醇色谱峰理论板数均大于1 000，拖尾因子均小于1.0，表明方法专属性良好。

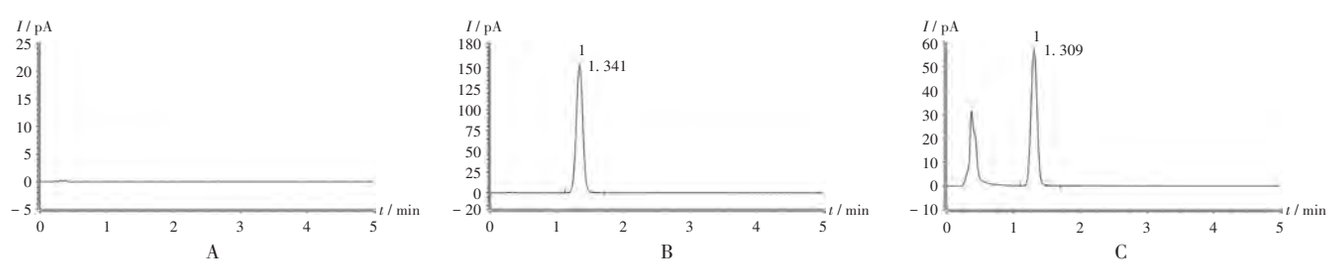
线性关系考察：CAD的响应值与被检测物质的量通常呈指数关系，但在小质量范围内可基本呈线性关系[16]。按2.2项下方法配制对照品标准曲线溶液（取甘露醇对照品51.42 mg，精密称定），分别精密吸取上述溶液各3 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，以甘露醇质量浓度为横坐标（*X*，mg / mL）、峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得回归方程 $Y = 9.336\,6X + 1.177\,0$（$r = 0.997\,3$，$n = 5$）。结果表明，甘露醇质量浓度在0.125～1.000 mg / mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限确定：取2.2项下质量浓度为0.5 mg / mL的标准曲线溶液，逐级稀释并进样测定。当信噪比（*S* / *N*）约为10∶1时，得到甘露醇的定量限为0.625 μg / mL；当*S* / *N*约为3∶1时，得到甘露醇的检测限为0.200 μg / mL。

精密度试验：取2.2项下质量浓度为0.5 mg / mL的标准曲线溶液，按2.1项下色谱条件重复进样测定6次。结果峰面积的*RSD*为0.49%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下质量浓度为0.5 mg / mL的标准曲线溶液，按2.1项下色谱条件分别于0，4，8，12，16，20，24 h时进样测定。测得甘露醇峰面积的*RSD*为0.23%（$n = 7$），表明甘露醇溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品适量，共6份，依法制备供试品溶液，分别精密加入甘露醇对照品10 mg，按2.1项下色谱条件进样测定，并计算回收率。结果见表1。



1. 甘露醇

A. 空白溶液　B. 对照品贮备液　C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Mannitol

A. Blank solution　B. Reference stock solution　C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1　加样回收试验结果（$n = 6$）

Tab. 1　Results of the recovery test（$n = 6$）

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
26.03	10.80	36.48	96.76	95.31	1.01
26.03	10.88	36.43	95.59		
26.03	10.24	35.75	94.92		
26.03	10.01	35.62	95.80		
26.03	10.48	35.97	94.85		
26.03	10.91	36.28	93.95		

2.4　样品含量测定及方法比较

取 3 批样品，分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件分别进样测定，记录色谱峰峰面积，以标准曲线计算甘露醇含量。同时，按企业现行质量标准的方法，采用 HPLC－RID 法对产品中甘露醇的含量进行测定。结果 2 种方法甘露醇含量均在企业现行质量标准规定限度范围，且 3 批样品含量测定结果的相对偏差（*RD*）分别为 0.99%，0.24%，1.10%，表明 2 种方法均能较好地测定样品中的甘露醇含量。详见表 2。

表 2　HPLC－CAD 法和 HPLC－RID 法测定 PD－1 抑制剂中甘露醇含量测定结果

Tab. 2　Results of content determination of mannitol in the PD－1 inhibitor by the HPLC－CAD and HPLC－RID methods

批号	含量(mg/mL)		$\bar{X}$(mg/mL)		*RD*(%)	
	HPLC－CAD 法	HPLC－RID 法	HPLC－CAD 法	HPLC－RID 法	HPLC－CAD 法	HPLC－RID 法
201908030	26.03	26.98	25.55	26.06	1.88	3.53
	25.07	25.14				
201909032	25.84	26.14	25.16	25.28	2.68	3.38
	24.49	24.43				
201909034	26.17	27.59	26.04	26.62	0.50	3.62
	25.91	25.66				

3　讨论

3.1　HPLC－CAD 色谱条件参数选择

过滤常数：取同一份质量浓度为 0.5 mg/mL 的甘露醇对照品溶液，分别在过滤常数为 0.1，0.2，0.5，1.0，2.0，3.6，5.0，10.0 s 且其余色谱条件不变的情况下依次进样。当过滤常数小于 2.0 s 时，色谱峰峰形存在明显分叉；当过滤常数为 10.0 s 时，峰高最低。综合考虑，最终选择过滤常数为 5.0 s。

进样量：取同一份质量浓度为 0.5 mg/mL 的甘露醇对照品溶液，进样量分别为 20，10，5，3 μL。当进样量大于 10 μL 时，色谱峰出现过载；当进样量为 5 μL 时，所得标准曲线的线性关系一般（$r < 0.99$）。故最终选择进样量为 3 μL。

3.2　与现行质量标准检测结果比较

由表 2 可知，2 种检测方法测定甘露醇含量的差异不显著。但现行 HPLC－RID 法测得结果，2 份平行样品之间 *RD* 较大，且出峰时间需要约 20 min；采用 HPLC－CAD 法时样品 *RD* 更小，约 1.5 min 即可出峰，说明该方法重复性良好，且更加快速、高效。同时，HPLC－CAD 法样品进样只需 3 μL，而现行方法为 20 μL。对于生产成本较高的生物制品来说，HPLC－CAD 法检测时所需样品量更少，可在保证检测结果准确的前提下，有效节约成本。此外，采用 HPLC－CAD 法检测时，定量限和检测限均明显低于 HPLC－RID 法，仪器具有更高的响应值和灵敏度。故经综合评估，HPLC－CAD 法测定甘露醇具有独特优势。

3.3　方法评价

目前，我国的生物大分子药物正处于蓬勃发展阶段，其质量控制标准有待进一步完善。以 PD－1 抑制剂中甘露醇含量测定为例，现行质量标准中多以 HPLC－RID 法进行检测，但该方法对环境敏感，灵敏度较差，无法进行梯度洗脱，且在低浓度检测时重复性较差。CAD 是新型通用检测器，具有检测范围宽、灵敏度高、重复性好、操作简便等特点[17]。CAD 对所有物质均有响应，且其响应值几乎仅与被测物质的量有关，不依赖于化合物的结构与性质，无需进行复杂的衍生操作即可检测大部分非挥发性和半挥发性物质[18]。本研究中建立的测定 PD－1 抑制剂中甘露醇含量的 HPLC－CAD 法，与现行质量标准相比，方法操作简便、灵敏度高、出峰时间短、有效可控，可为相关企业对甘露醇的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 唐淑慧，李　丽，侯黎莉. PD－1 抑制剂免疫相关不良反应的研究进展[J]. 临床与病理杂志，2021，41(3)：720－725.
[2] BRAHMER JR，LACCHETTI C，SCHNEIDER BJ，et al. Management of Immune－Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy：American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary[J]. Journal of Oncology Practice，2018，14(4)：247－249.
[3] 沈仕俊，甘　平，王园园，等. PD－1/PD－L1 通路抑制剂治疗进展期胃癌的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2021，29(13)：2363－2368.
[4] 廖元宇，白玉贤. PD－1/PD－L1 抑制剂治疗晚期肝细胞癌的机制及研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2021，29(11)：1989－1993.
[5] 罗详冲，李高峰. 特瑞普利单抗在恶性肿瘤治疗中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2020，27(8)：946－950.
[6] 郭宁子，张伊洁，许明哲，等. 多肽微球注射剂中甘露醇含量测定研究[J]. 药物分析杂志，2020，40(6)：999－1004.
[7] 刘振融，郝　林. 响应面优化果胶酶浸提海带甘露醇条件的研究[J]. 食品工业，2018，39(2)：177－181.
[8] 李　颜，史薇娜，唐庆九，等. 比色法测定冬虫夏草和蛹虫草中多糖和甘露醇的含量[J]. 食用菌学报，2007，14(3)：53－57.
[9] 王心珉. 紫光分光光度法和高效液相色谱法测定百令胶囊中 *D*－甘露醇含量的比较[J]. 中国实用医药，2017，12(31)：