ELSD-HPLC 法测定重组人干扰素 α2b 注射液中的泊洛沙姆 188

滕宝霞[1#]，俞　露[2#]，牟建平[1*]，刘景会[2]，贺晓文[1]
（1. 甘肃省药品检验研究院，甘肃兰州 730060；2. 长春生物制品研究所有限责任公司细胞因子室，吉林长春 130000）

摘要：建立了蒸发光散射检测器 - 高效液相色谱（ELSD-HPLC）法测定重组人干扰素 α2b（**1**）注射液中泊洛沙姆 188（**2**）的含量。色谱柱采用球状亲水硅胶 TSKgel G3000SW 柱（7.5 mm×600 mm，10 μm），以水∶乙腈（75 ∶ 25）为流动相，等度洗脱。流速为 0.6 ml/min，漂移管温度为 105 ℃，载气流量为 3.0 L/min。结果显示，**2** 在 0.1 ～ 1.25 mg/ml 内线性关系良好。**2** 的平均回收率（*n*=9）为 101.2%，RSD 为 0.5%。建立的方法专属性强，可用于 **1** 注射液中 **2** 含量的测定。

关键词：重组人干扰素 α2b 注射液；泊洛沙姆 188；药用辅料；蒸发光散射；凝胶色谱
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）05-0716-04
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.018

Determination of Poloxamer 188 in Recombinant Human Interferon α2b Injection by ELSD-HPLC

TENG Baoxia[1#], YU Lu[2#], MU Jianping[1*], LIU Jinghui[2], HE Xiaowen[1]
(*1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730060;*
2. Cytokine Room, Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Changchun 130000)

ABSTRACT: An evaporative light scattering detector-high performance liquid chromatography (ELSD-HPLC) method was established to determine the content of poloxamer 188 (**2**) in recombinant human interferon α2b (**1**) injection. The spherical hydrophilic silica gel TSKgel G3000SW column (7.5 mm×600 mm, 10 μm) was used with water∶acetonitrile (75∶25) as mobile phase (isocratic elution). The flow rate was 0.6 ml/min, the drift tube temperature was 105 ℃, and the carrier gas flow was 3.0 L/min. The results showed that it was linear for **2** in the range of 0.1 - 1.25 mg/ml. The average recovery (*n*=9) of **2** was 101.2%, with the RSD of 0.5%. The established method is highly specific, which can be used for the determination of **2** in **1** injection.

Key Words: recombinant human interferon α2b injection; poloxamer 188; pharmaceutical excipient; evaporative light scattering; gel chromatography

重组人干扰素 α2b（recombinant human interferon α2b，**1**）是由 165 个氨基酸残基组成的单链多肽，理论相对分子质量为 19 219，等电点在 5.5 ～ 6.5，分子中无糖链，属于Ⅰ型干扰素[1]。干扰素具有广谱抗病毒作用，在抗病毒过程中不直接灭活病毒，而是通过诱导细胞产生不同的蛋白因子介导抗病毒作用，主要用于治疗乙型肝炎、丙型肝炎、病毒性皮肤病、慢性子宫颈炎、呼吸道病毒感染等；在发挥抗肿瘤作用时可直接抑制肿瘤细胞增殖，通过免疫调节机制提高机体抗肿瘤能力，抑制肿瘤基因的表达，阻止正常细胞向肿瘤细胞转化，临床用于治疗造血系统恶性肿瘤和淋巴瘤等。

市售 **1** 多为冻干粉针剂。相关研究表明，干扰素等细胞因子能够在血液中稳定作用的原因与体液

#对文章贡献等同
收稿日期：2022-02-08
作者简介：滕宝霞（1965—），女，主任药师，从事药品检验和相关方法研究。
俞　露（1991—），女，工程师，从事蛋白类药物检验方法开发研究。
通信作者：牟建平（1990—），男，工程师，从事药品检验和相关方法研究。
E-mail：837506034@qq.com

的小分子环境、胶体环境、重金属螯合作用、pH缓冲条件、离子强度、渗透压环境等有关，有研究者根据这一特性研制了 **1** 多剂量液体制剂，不仅可避免冻干工艺对干扰素蛋白分子的破坏，同时可提高患者使用依从性[2]。药用辅料能保障药品发挥药效，同时赋予药品新的功能，是可能会影响药品质量、安全性和有效性的重要成分。泊洛沙姆188（poloxamer 188，**2**）是 **1** 注射液中的辅料，主要作为乳化剂、增溶剂。为保证产品质量，应对制剂中 **2** 的含量进行控制[3]。《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）未收录 **2** 含量的测定方法。已有研究多采用分光光度法检测 **2**，操作复杂且准确度与专属性较差，制品中的其他辅料对检测结果均有不同程度干扰[4—5]。

本研究根据 ChP 2020 四部通则 9101 分析方法验证指导原则、0514 分子排阻色谱法和 0512 高效液相色谱法，建立了蒸发光散射检测器 - 高效液相色谱（ELSD-HPLC）法测定 **1** 注射液中 **2** 的含量，以期为药用辅料 **2** 的研究提供参考。

1 仪器与试药

Chromaster 5430 型高效液相色谱仪（日本 Hitachi 公司，含 AllChrom 6000 型蒸发光散射检测器）；**2** 对照品（分析纯，南京威尔药业集团股份有限公司，批号 20190202）；**1** 注射液（规格 3 ml ∶ 3×10^7 IU，含 **2** 2.0 mg/ml，批号 S20190401、S20200201、S20201008）和空白溶液（**1** 注射液但不含 **2**）均由长春生物制品研究所有限责任公司提供；乙腈含量为 99.9%，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 球状亲水硅胶 TSKgel G3000SW 柱（7.5 mm×600 mm，10 μm）；流动相 水∶乙腈（75∶25），等度洗脱；流速 0.6 ml/min；柱温 室温；漂移管温度 105 ℃；载气 空气；载气流量 3.0 L/min；进样量 20 μl。

2.2 溶液配制

阴性对照溶液：精密量取空白溶液 2 ml，置 10 ml 量瓶中，用水定容，即得阴性对照溶液。

对照品贮备液：精密称取 **2** 对照品约 200 mg，置 100 ml 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，即得对照品贮备液。

供试品溶液：精密量取 **1** 注射液 2 ml，置 10 ml 量瓶中，用水定容，即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

取“**2.2**”项下阴性对照溶液、对照品贮备液和供试品溶液（批号 S20190401），分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果见图 1，制剂中的 **1** 和其他辅料对 **2** 的测定均无干扰，理论板数按 **2** 峰计不低于 1 500，供试品溶液色谱图中 **2** 峰与前后峰的分离度均符合要求，方法专属性强。

2.4 线性试验

精密称取 **2** 对照品 0.2 g，置 100 ml 量瓶中，用流动相溶解并定容，摇匀；分别精密量取上述溶液适量，用流动相稀释成质量浓度分别为 1.25、1、0.75、0.5、0.25、0.1 mg/ml 的系列浓度线性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件分别进样测定，以质量浓度的对数值（x）为横坐标、峰面积的对数值（y）为纵坐标，绘制标准曲线，得标准曲线方程 y=1.291 1x－7.327 8，r=0.999 2，表明 **2** 在 0.1 ～ 1.25 mg/ml 内线性关系良好。

2.5 准确度试验

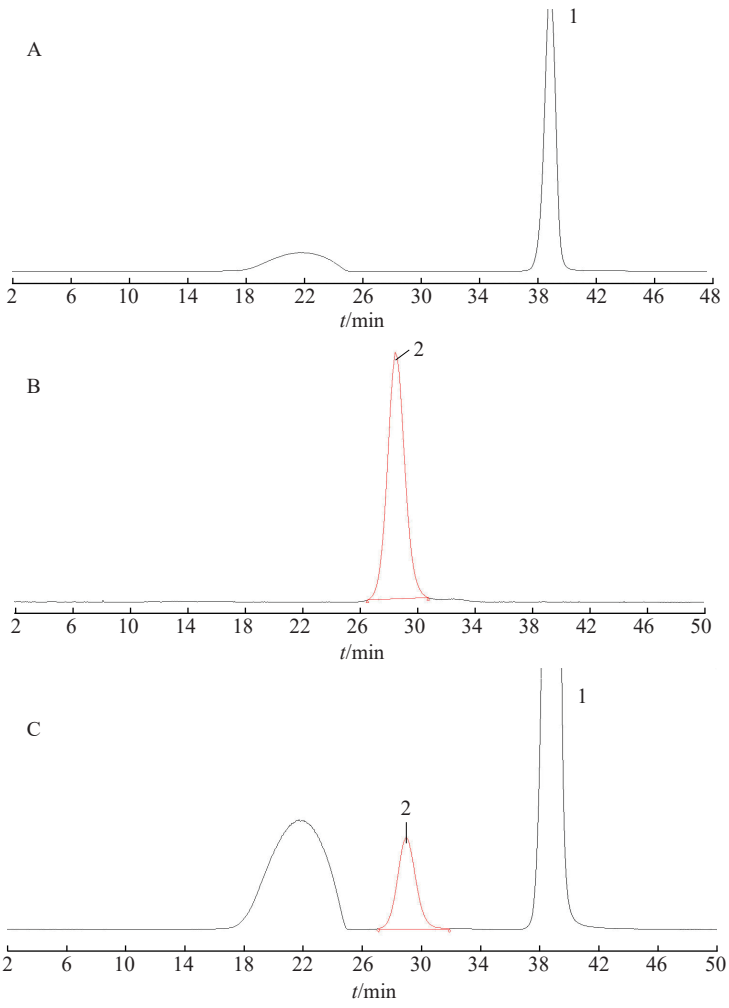
精密称取 **2** 对照品适量，高、中和低剂量（分别约为 2.46、2.05、1.65 mg）各 3 份，分别置 9 个 10 ml 量瓶中，用空白溶液溶解并定容，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按“**2.4**”项下标准曲线计算得 **2** 的平均回收率（n=9）为 101.2%，RSD 为 0.5%。

2.6 精密度试验

取“**2.2**”项下对照品贮备液 2.5 ml，置 10 ml 量瓶中，用空白溶液定容，制成质量浓度为 0.5 mg/ml 的精密度试验溶液。取上述溶液，分别在不同时间段测定样品的中间精密度，结果显示不同时间测得的峰面积 RSD（n=5）为 1.0%。

2.7 重复性试验

取“**2.2**”项下对照品贮备液 2.5 ml，置 10 ml 量瓶中，用水定容，制成质量浓度为 0.5 mg/ml 的重复性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件重复进样



A：阴性对照溶液，B：对照品贮备液，C：供试品溶液

1－其他未知辅料；2－**2**

图 1　典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms

5 次。结果显示，**2** 的峰面积 RSD（n=5）为 1.2%。

2.8　定量限试验

分别精密量取“**2.2**”项下对照品贮备液适量，用水稀释，制成质量浓度为 100、50、25、12.5 μg/ml 的系列标准溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，**2** 的定量限为 12.5 μg/ml。

2.9　耐用性考察

取“**2.7**”项下的重复性试验溶液，分别在 0、2、6、12、24 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果显示 **2** 在 24 h 内均稳定，峰面积 RSD（n=5）为 1.6%。

对流动相的比例进行调节（±5%）以考察其对检测结果的影响。结果显示，在流动相允许的变化范围内，供试品溶液中 **2** 的分离度均满足要求。

此外，还考察了在流速 0.5、0.6、0.7 ml/min 条件下测得的供试品溶液中 **2** 峰的分离度，结果显示供试品溶液中 **2** 的分离度均满足要求。

2.10　样品测定

取“**2.2**”项下对照品贮备液 4 ml，置 10 ml 量瓶中，用水定容，制成质量浓度为 0.8 mg/ml 的 **2** 对照品溶液，分别精密吸取 20、10、5 μl 以及“**2.2**”项下 3 批供试品溶液（批号 S20190401、

S20200201、S20201008）各 20 μl，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以 **2** 对照品溶液的质量浓度对数值（x）为横坐标、峰面积对数值（y）为纵坐标，绘制标准曲线，得外标三点法对数方程 y=1.407 4x+7.305 4，r=0.999 9，再计算 **1** 注射液中 **2** 的含量。结果显示，3 批 **1** 注射液中 **2** 的含量分别为 2.095、2.100、2.120 mg/ml，与 **1** 注射液中 **2** 的处方含量一致。

3 讨论

泊洛沙姆为环氧丙烷和环氧乙烷经开环聚合反应制备的两端为聚氧乙烯、中间为聚氧丙烯的三嵌段共聚物，无毒性、无刺激性，因生物相容性好、化学性质稳定，常作为静脉注射剂的辅料[5]。根据相对分子质量和聚氧乙烯含量的不同，泊洛沙姆可分为多种型号。由于其无紫外特征吸收，选择通用型蒸发光散射检测器进行检测[6—8]。

1 注射液为液体制剂，在制剂中 **2** 含量检测的专属性研究中发现，取 **1** 注射液原液 20 μl 直接进样时，色谱图中的 **2** 峰与相邻峰不能有效分离。考察了供试品的进样浓度，结果显示供试液中含 **2** 为 0.4 mg/ml 时分离度最佳。

1 注射液中干扰素及其他辅料均为大分子物质，色谱柱选择球状亲水硅胶 TSKgel G3000SW 柱（7.5 mm×600 mm，10 μm）进行测定，经比较表明，选择柱长为 600 mm 的色谱柱较 300 mm 的色谱柱能够达到更好的分离度。

建立蒸发光散射检测方法主要是要确定漂移管温度和载气流量。通过对软件推荐参数（漂移管温度 103 ℃，载气流量 2.8 L/min）进行优化，最终确定采用高温不分流模式，以漂移管温度 105 ℃、载气流量 3.0 L/min 为检测条件。

蒸发光散射检测器的响应值与被测物质的量通常成指数关系，在 **2** 含量的测定中，为确保含量测定的准确性，以外标三点法对数方程计算含量结果。

参考文献：

[1] 梁果义, 刘晓航. 重组人干扰素α2b的制备研究[J]. 生物技术进展, 2016, **6**(3): 212-218.

[2] 张 磊, 邓 杰, 田 莉, 等. 液体稳定干扰素及其相关研究[J]. 药物生物技术, 2005, **12**(6): 383-388.

[3] 中国食品药品检定研究院. 药用辅料和药品包装材料检验技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 12-14.

[4] 李 响, 李永红, 于 雷, 等. 蒸发光散射检测法测定重组人IL-12注射液中泊洛沙姆188[J]. 药物评价研究, 2018, **41**(9): 1644-1647.

[5] 杨成建, 曾清如, 杨海君, 等. 几种聚氧乙烯型非离子表面活性剂的分光光度法测定及其应用[J]. 分析化学, 2006, **34**(5): 642-646.

[6] 徐佳茗, 夏学军, 刘玉玲. 凝胶色谱-蒸发光散射检测法测定紫杉醇脂肪乳注射液中泊洛沙姆188的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, **34**(7): 1237-1240.

[7] 徐雨生, 廖川江, 段美娟. 泊洛沙姆作为温度敏感型凝胶基质的安全性评价[J]. 食品与药品, 2021, **23**(4): 337-341.

[8] 王占璋, 卢浩扬, 倪晓佳, 等. 星点设计法优化布南色林-泊洛沙姆温敏水凝胶处方及含量测定[J]. 今日药学, 2021, **31**(1): 18-22.