

聚乙二醇化重组人干扰素 β -1a 注射液中游离聚乙二醇残留量的测定

张苏, 张培彪(鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要: 目的 对聚乙二醇化重组人干扰素 β -1a(PEG-rhIFN- β -1a)注射液中的残留聚乙二醇丁醛(PEG)进行方法学研究。方法 采用 Phenomenex Jupiter C₄ 色谱柱, 流动相: A 相, 0.1% 三氟乙酸-水溶液; B 相, 0.1% 三氟乙酸-乙腈溶液, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 蒸发光检测器, 漂移管温度为 113.0 °C, 载气流速为 3.1 L·min⁻¹。结果 PEG 在 0.6~2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好, 相关系数为 0.998 4, 检出限为 0.20 μg , 定量限为 0.40 μg , 精密性、稳定性和重复性试验的 RSD 均 <2.0%, 平均回收率为 96%~100%。结论 运用该方法对 PEG-rhIFN- β -1a 注射液中游离 PEG 残留量测定, 残留量 <1.0%。

关键词: PEG-rhIFN- β -1a 注射液; 游离聚乙二醇; 蒸发光检测器

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)08-0966-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.014

Determination of Free PEG in PEG-rhIFN- β -1a Injection

ZHANG Su, ZHANG Peibiao(Lunan Pharmaceutical Corporation Co., Ltd., Linyi 273400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high performance liquid chromatography method for determination of free PEG in PEG-rhIFN- β -1a injection. **METHODS** Phenomenex Jupiter C₄ column was used with a mobile phase of gradient elution (A phase-0.1% trifluoroacetic acid-water; B phase: 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile), gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature was 25 °C. Evaporation light detector(ELSD), drift tube temperature was 113.0 °C, and carrier gas flow rate of 3.1 L·min⁻¹. **RESULTS** PEG concentration in the range of 0.6~2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed good linearity, correlation coefficient was 0.998 4, detection limit was 0.20 μg , quantitation limit was 0.40 μg , the RSD of precision, stability and reproducibility were all <2.0%. The average recovery was from 96% to 100%. **CONCLUSION** Using this method, the free PEG in PEG-rhIFN- β -1a injection is determined by this method and the free PEG is <1.0%.

KEY WORDS: PEG-rhIFN- β -1a injection; free PEG; evaporation light detector

干扰素 β -1a 在预防多发性硬化以及抑制其进展方面效果显著^[1-3], 经聚乙二醇修饰后可显著增加药物在体内的半衰期, 同时可以降低药物的免疫原性和不良反应^[4-5]。聚乙二醇化重组人干扰素 β -1a 是将纯化后的重组人干扰素 β -1a 与 20 KDa 的单甲氧基聚乙二醇丁醛反应, 在干扰素末端共价连接一分子聚乙二醇, 从而在体内延缓降解而达到长效作用^[6]。

在注射液中对聚乙二醇的残留进行控制, 在保证药品质量方面至关重要^[7]。常用的聚乙二醇分析法如: 电位法、比色法、光干涉法和碘沉淀法等均会受到与蛋白质共价结合的聚乙二醇干扰, 测定结果误差很大^[8-10]。

本实验利用高效液相色谱-蒸发光检测器对注射液中的聚乙二醇残留进行分析, 该方法简单快速, 结果准确, 可用于聚乙二醇修饰后药品的修饰剂残留分析。

1 仪器和方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配 ELSD 检测器(美国 Agilent 公司); XS105 电子天平(梅特勒)。mPEG-丁醛(20 kDa)对照品(北京凯正生物工程发展有限公司, 批号: KZ-M20BAD-120227, 纯度: 99.1%); PEG-rhIFN- β -1a 注射液(批号: 201203b001, 201203b002, 201203b003)均为自制; 试验用水为注射用水。

1.2 色谱条件

Phenomenex Jupiter C₄ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸-水溶液, B 为 0.1% 三氟乙酸-乙腈溶液; 以 0~30 min, 5%B→95%B 进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 25 °C; ELSD 温度为 113.0 °C; 载气流速为 3.1 L·min⁻¹。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取 mPEG-丁醛(20 kDa)25 mg, 置

25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;制成每 1 mL 中含 20 μg 溶液,为 mPEG-丁醛对照品溶液。

1.4 供试品溶液的制备

取供试品 100 μL 直接进样。

1.5 测定方法及结果计算

分别取 mPEG-丁醛对照品溶液 30, 40, 50 μL 、60, 80, 100 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以 mPEG-丁醛对照品主峰峰面积的常用对数值对应其相应的 mPEG-丁醛对照品含量的常用对数值做线性回归,求得线性回归方程。将测得供试品中 mPEG-丁醛峰面积代入线性回归程,得供试品溶液中 mPEG-丁醛的含量,供试品溶液中 mPEG-丁醛的含量与供试品溶液中蛋白质含量的比值即为供试品中游离 mPEG-丁醛的残留量。结果计算:按以下公式计算: $\text{Log}A=a+b \times \text{Log}W(1)$, $P=(W/w) \times 100\%$ 。

式中: A 为 mPEG-丁醛主峰峰面积; W 为 mPEG-丁醛含量(μg); a 为直线方程截距; b 为直线方程斜率; P 为供试品中 mPEG-丁醛残留量; w 为供试品蛋白含量(μg)。

2 结果与讨论

2.1 峰定位与专属性试验

PEG-rhIFN- β -1a 注射液 PEG 残留量测定中供试品溶液组分不影响 PEG 色谱峰的测定,分析方法的专属性好。高效液相色谱图见图 1。

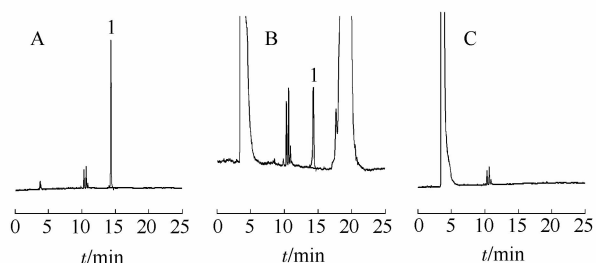


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-空白样品溶液; 1-PEG。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; C-blank; 1-PEG.

2.2 系统适用性试验

取 mPEG-丁醛(20 kDa)对照品溶液,依法连续进样 6 次,进样量 50 μL ,记录 PEG 主峰的峰面积,峰面积的 $\text{RSD} < 2.0\%$,保留时间的 $\text{RSD} < 1.0\%$ 。且理论板数按 PEG 峰计算 ≥ 2000 。试验表明该方

法系统适用性良好。

2.3 线性范围与检出限

精密量取对照品溶液稀释至适当浓度分析,以峰高为基线噪声的 3 倍($S/N=3$)计算检出限;以峰高为基线噪声的 10 倍($S/N=10$)计算定量下限,结果表明:PEG 在 0.6~2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度内线性良好,相关系数为 0.998 4,检出限为 0.20 μg ,定量限为 0.4 μg 。

2.4 精密度

操作者 A 于第 1 天配制 6 份 mPEG-丁醛对照品溶液,依法进样 50 μL ,记录 PEG 主峰的峰面积。操作者 A 和操作者 B 分别于第 2 天同法配制 6 份 mPEG-丁醛对照品溶液,依法进样 50 μL ,记录 PEG 主峰的峰面积。重复性测定(第 1 天,操作者 A 测定的 6 个结果)结果的 RSD 为 0.86%;不同天,不同人测定结果的 18 个数值的 RSD 为 0.97%,表明该方法的精密度良好。

取同 1 批次聚乙二醇化重组人干扰素 β -1a(PEG-rhIFN- β -1a)注射液 6 支,分别依法进样 100 μL ,记录样品中 PEG 主峰的峰面积,根据 PEG 线性回归方程计算出注射液中游离 PEG 含量,并计算出注射液中游离 PEG 残留量,注射液重复测定 6 次游离 PEG 残留量的 RSD 为 0.95%,表明该方法测定聚乙二醇化重组人干扰素 β -1a 注射液中游离 PEG 残留量的重复性较好。

2.5 回收率

称取 mPEG-丁醛(20 kDa)约 25 mg,加 PEG-rhIFN- β -1a 注射液辅料溶液溶解并逐步稀释成终浓度为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,同法配制 9 份,分为 3 组,每组分别进样 40(80%)、50(100%)、60 μL (120%),记录色谱图,根据“2.3”项下所得回归方程计算 PEG 含量,计算得 PEG 回收率为 96%~100%,表明该方法准确度良好,结果见表 1。

表 1 PEG-rhIFN- β -1a 注射液 PEG 残留量测定准确度试验
Tab. 1 The accuracy test of PEG in PEG-rhIFN- β -1a injection

浓度/%	PEG 峰面积	已知量/ μg	测定量/ μg	回收率/%	$\text{RSD}/\%$
80	5.382 62	0.809 6	0.782 9	96.70	0.48
	5.336 61	0.809 6	0.779 2	96.24	
	5.429 07	0.809 6	0.786 7	97.17	
100	8.291 34	1.012 0	0.998 0	98.62	0.80
	8.365 92	1.012 0	1.003 0	99.11	
	8.136 48	1.012 0	0.987 4	97.57	
	11.321 29	1.214 4	1.188 8	97.89	
120	11.328 27	1.214 4	1.189 2	97.92	0.23
	11.406 42	1.214 4	1.193 8	98.30	

2.6 溶液稳定性试验

配制 mPEG-丁醛(20KDa)对照品溶液和供试品溶液, 室温下放置 8 h, 分别于 0, 1, 2, 4, 6 和 8 h 进样分析, 记录 PEG 的峰面积, 峰面积的 RSD<2.0%, 表明样品溶液和对照品溶液至少在 8 h 内稳定。

2.7 样品测定

取 3 批注射液(批号: 201203b001, 201203b002, 201203b003), 直接进样 100 μ L, 测定 3 批样品中 PEG 残留量。测得 3 批样品中游离 PEG 残留量均 <0.3%, 均在限度范围内, 结果见表 2。

表 2 PEG-rhIFN- β -1a 注射液 PEG 残留测定

Tab. 2 The PEG residues of PEG-rhIFN- β -1a injection sample

批号	PEG 峰面积	PEG 含量/ μ g	PEG 残留量/%
201203b001	6.0190 2	0.834	0.25
201203b002	6.3687 3	0.861	0.23
201203b003	6.6434 4	0.881	0.25

3 结论

本实验建立了测定 PEG-rhIFN- β -1a 注射液中游离 PEG 残留量的 HPLC 方法。经验证, 该方法表现出良好的线性、精密性、稳定性、重复性及准确度。对 3 批实际样品进行测定, PEG 残留量均 <1.0%, 在限度范围内。方法快速简便、灵敏准确、重现性好, 可作为 PEG-rhIFN- β -1a 注射液中游离 PEG 残留量的质量控制方法。

REFERENCES

- [1] KAGAWA T, MORIZANE T, SAITO H, et al. A pilot study of long-term weekly interferon-beta administration for chronic hepatitis B [J]. Am J Gastroenterol, 1993, 88(2): 212-216.
- [2] HOU Y L, ZHOU P B, LIU G F. Efficacy and safety assessment of interferon beta for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review [J]. Chin Remed Clin(中国药物与临床), 2009, 9(1): 21-25.
- [3] YANG Y K, HAN N, LI J, et al. Safety and clinical efficacy of recombinant human interferon β 1b for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis [J]. Chin J Biol(中国生物制品学杂志), 2009, 22(12): 1221-1224.
- [4] LU J, LIU Q F, LUO G A, et al. Advances in PEGylation of drug conjugates [J]. Chin J Organic Chem(有机化学), 2009, 29(8): 1167-1174.
- [5] WANG Y S, YOUNGSTER S, GRACE M, et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(4): 547-570.
- [6] PASUT G, VERONESE F M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(13): 1177-1188.
- [7] VERONESE F M, BOSSARD M J. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications [M]. Berlin: Birkhauser Verlag AG, 2005: 11-31.
- [8] XU Y X, BU F R, CHEN X, et al. Study on determination of PEG in α_1 -antitrypsin [J]. Chin J Blood Transf(中国输血杂志), 2008, 21(4): 280-282.
- [9] GAO R, JIANG Z Y. A two-phase system spectrophotometric method for determination of polyethylene glycol in pegylated protein mixtures [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2003, 22(4): 44-46.
- [10] TAN T W, SHEN Z Y. Determination of polyethyleneglycol in biomaterials and foods [J]. Food Ferment Indust(食品与发酵工业), 1990, 21(4): 44-48.

收稿日期: 2013-10-12

农吉利碱凝胶剂体外透皮与初步药效学研究

周敏敏, 赵丹丹, 章德军, 黄绳武* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究农吉利碱凝胶剂体外透皮性能, 并考察其对小鼠鳞状细胞癌的初步药效作用。方法 采用立式 Franz 扩散池, 进行农吉利碱凝胶剂体外透皮试验; 以小鼠鳞状细胞癌为动物模型, 考察农吉利碱凝胶剂疗效。结果 农吉利碱凝胶剂体外透皮性能良好, 农吉利碱凝胶剂对小鼠鳞状细胞癌有明显抑制作用, 高剂量组抑癌率达 35.26%。结论 农吉利碱凝胶剂透皮性能良好, 具有明显抑制鳞状细胞癌的作用。

关键词: 农吉利碱; 凝胶剂; 体外透皮; 初步药效学

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)08-0968-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.015

作者简介: 周敏敏, 女, 硕士生
E-mail: hsw55@163.com

Tel: 18767166972

E-mail: 18767166972@163.com

*通信作者: 黄绳武, 男, 教授

Tel: 18606505050