

蒸发光散射检测法测定重组人 IL-12 注射液中泊洛沙姆 188

李 响, 李永红, 于 雷, 贾春翠, 周 勇*, 饶春明*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘 要: 目的 建立定量测定重组人 IL-12 注射液中泊洛沙姆 188 的 HPLC 分析方法。方法 采用 Waters Alliance 系统、蒸发光检测器、赛分 Poly RP-100 色谱柱, 以 0.1%TFA 水溶液 (A)-0.1%TFA 乙腈溶液 (B) 作为流动相梯度洗脱: 0~5 min, 50%A→50%A; 5~6 min, 50%A→5%A; 6~12 min, 5%A→5%A; 12~13 min, 5%A→50%A; 13~20 min, 50%A→50%A。体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30℃ 测定重组人 IL-12 注射液中泊洛沙姆 188。结果 HPLC 法测定泊洛沙姆 188 的保留时间 RSD ($n=6$) 为 0.19%, 峰面积 RSD ($n=6$) 为 1.7%。泊洛沙姆 188 在低 (50%)、中 (100%)、高 (150%) 个浓度的回收率分别为 93.3%、93.1%、93.8%, 平均回收率为 93.4%。泊洛沙姆 188 在 1.5~9 μg ($r>0.99$) 与峰面积呈良好的线性关系。结论 建立了重组人 IL-12 注射液中泊洛沙姆 188 含量检测的高效液相色谱法, 并对建立的分析方法进行专属性、准确度、精密性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性的验证, 测定了 3 批重组人 IL-12 注射液中的泊洛沙姆 188 的量。

关键词: 重组人介素-12; 泊洛沙姆 188; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测; 药用辅料

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)09-1644-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.014

Determination of Poloxamer 188 in Recombinant IL-12 Injection by HPLC-ELSD

LI Xiang, LI Yonghong, YU Lei, JIA Chuncui, ZHOU Yong, RAO Chunming

National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To develop a HPLC method for potency determination of poloxamer 188 in recombinant human IL-12 injection. **Methods** A Waters Alliance 2695 system with a sepax poly RP-100 column was used for separation and subsequent detection by an evaporative light scattering detector(ELSD); 0.1%TFA-water and 0.1%TFA-acetonitrile were used as eluent A and B, and gradient elution conditions were as follows: 0—5 min, 50%A→50%A; 5—6 min, 50%A→5%A; 6—12 min, 5%A→5%A; 12—13 min, 5%A→50%A; 13—20 min, 50%A→50%A. The flow rate was 1.0 mL/min; the column was maintained at 30℃. **Results** The RSD of retention time and peak area for poloxamer 188 were 0.19% and 1.7%, respectively ($n=6$); the recovery rates at low (50%), middle (100%) and high (150%) dose were 93.3%, 93.1% and 93.8%, and the average was 93.4%; the potency of poloxamer 188 between 1.5 μg and 9.0 μg was linearly related to peak area. **Conclusions** A HPLC for potency determination of poloxamer 188 in recombinant IL-12 injection was successfully developed and validated in specificity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LoQ), linearity, detection range and robustness. The developed method was finally applied to potency determination of poloxamer 188 in three recombinant IL-12 injections.

Key words: recombinant human IL-12; poloxamer 188; high-performance liquid chromatography; evaporative light scattering detect; pharmaceutic adjuvant

白介素 12 (IL-12) 是目前发现的一种对人体免疫活性细胞诱导和调节作用最强和范围最广的细胞因子之一, 可与白介素 2 (IL-2) 协同诱导细胞毒 T

细胞和杀伤细胞, 诱导自然杀伤细胞表达干扰素 γ ^[1-3]。研究发现, IL-12 及其诱导产生的干扰素 γ 与多种病毒感染相关, IL-12 能促进 T 细胞免疫应答^[4-6], 可增

收稿日期: 2018-01-11

基金项目: 十三五科技重大专项课题“生物类似药质量相似性评价体系建设研究 (2015ZX09501008)”资助项目

第一作者: 李 响 Tel:(010)67095586 E-mail:lix@nicpbp.org.cn

*通信作者: 周 勇 Tel:(010)67095684 E-mail:zhouy@nicpbp.org.cn

饶春明 Tel:(010)67095380 E-mail:raocm@nicpbp.org.cn

强或改善艾滋病、麻风、利氏曼原虫和血吸虫等慢性感染宿主的细胞免疫功能^[7-8], IL-12 可以明显抑制肿瘤的生长和转移, 延长荷瘤动物生存时间, 在抗感染及抗肿瘤免疫中有着广泛的应用前景^[9-11]。

泊洛沙姆 188 (Poloxamer188) 是一种高分子非离子表面活性剂, 是优良的药物制剂新辅料, 无毒, 对皮肤黏膜无刺激性、过敏性, 对人体十分安全, 现已广泛用于制药工业, 主要作乳化剂、稳定剂、增溶剂和分散剂^[12-14]。

本文研究的重组人 IL-12 注射液是某国内企业通过基因重组技术由 CHO 细胞高效表达, 高度纯化后得到的重组蛋白药物。目前处于临床试验申报阶段。其制剂中含有泊洛沙姆 188, 处方量为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

《中国药典》2015 年版中未有记载泊洛沙姆含量测定方法, 文献记载的泊洛沙姆的检测方法很少, 主要有分光光度法^[15], 也有采用凝胶色谱法测定脂肪乳液中泊洛沙姆含量^[16], 但未有文献载有重组蛋白药物中泊洛沙姆 188 含量检测的相关方法, 本着对药用辅料含量的质量控制, 本文建立了反相色谱蒸发光散射检测重组人白介素 12 (rhIL-12) 注射液中泊洛沙姆 188 的方法。采用反相高效液相色谱法, 将泊洛沙姆 188 与 rhIL-12 注射液中的其他物质进行分离并用蒸发光检测器检测, 确定 rhIL-12 注射液样品中泊洛沙姆 188 的量。并对所建方法进行了专属性、准确度、精密度、重复性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性的验证。

1 材料

1.1 材料和试剂

泊洛沙姆 188 (Roche, 货号 10050924); 乙腈 (ACN); 三氟乙酸 (TFA); 纯化水; 赛分 Poly RP-100 色谱柱 (货号 260100-4625, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 100 $\text{\AA}$, 粒径 5 μm), RSpak 色谱柱 DS-413 (货号 F7001012, 150 mm $\times$ 4.6 mm), 流动相 A (0.1% TFA 水溶液); 流动相 B (0.1% TFA 的乙腈溶液)。rhIL-12 注射液 3 批, 由国内某生产企业提供。

1.2 仪器设备

HPLC 系统: Waters Alliance 2695, 蒸发光散射检测器 (ELSD) (ALLTEC), Empower3 操作软件 (Waters 公司)。

2 方法与结果

2.1 泊洛沙姆 188 标准品溶液的配制

精密称定 (100 $\pm$ 10) mg 泊洛沙姆 188, 直接

转移至 100 mL 量瓶中, 加适量纯化水定容至 100 mL, 避免气泡形成。吸取 5.0 mL 此泊洛沙姆 188 溶液, 转移至另一个 50 mL 量瓶中, 加适量纯化水定容至 50 mL。混匀即得。样品无需任何稀释即可进样。

2.2 色谱条件

体积流量 0.8 mL/min, 进样量 60 μL , 样品温度 (10 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$, 柱温 (40 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 。ELSD 参数: 气体流速 1.0 SLM; 雾化器温度 45 $^{\circ}\text{C}$; 蒸发温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 。数据输出速率 10 Hz; 选择检测器增益 (PMT) 和光源强度 (LED) 设置, 从而使最高标准不超过 1.0 伏满量程。

洗脱梯度: 0~5 min, 50%A $\rightarrow$ 50%A; 5~6 min, 50%A $\rightarrow$ 5%A; 6~12 min, 5%A $\rightarrow$ 5%A; 12~13 min, 5%A $\rightarrow$ 50%A; 13~20 min, 50%A $\rightarrow$ 50%A。用 50% 流动相 A 和 B 灌注 HPLC 系统。用 50% 流动相 A 和 B 以 0.8 mL/min 的流速平衡 HPLC 系统至少 30 min。为避免试剂中蛋白或其他辅料对检测器的污染, 在进样后的前 5 min 及泊洛沙姆 188 洗脱步骤结束后, 应将流向切换至废液。

2.3 专属性考察

将 rhIL-12 注射液、泊洛沙姆 188 溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$)、注射液缓冲液、rhIL-12 原液、注射液缓冲液 (不含泊洛沙姆 188), 按照 2.2 项色谱条件依次进样, 考察方法专属性。rhIL-12 注射液, 泊洛沙姆 188 标准溶液及 rhIL-12 注射液缓冲液中均含目标峰, 而 rhIL-12 原液及注射液空白缓冲液 (不含泊洛沙姆) 均无目标峰, 可证实目标峰 (保留时间 10.9min) 为泊洛沙姆 188。其峰形良好, 附近无其他杂峰干扰, 由此可见本方法可很好地分离和检测样品中的泊洛沙姆 188。见图 1。

2.4 线性关系考察

取 0.1 mg/mL 的泊洛沙姆 188 标准溶液, 进样体积 15、30、45、60、75、90 μL 作为标曲。重复操作, 平行制备 3 份样品, 按照 2.2 项色谱条件依次进样, 记录泊洛沙姆 188 标准品不同进样量的峰面积, 以进样量与标准品的峰面积做线性回归, 得标准曲线方程。计算相关系数 (R^2), 计算每次测定泊洛沙姆 188 的质量浓度区间范围。平行 3 次试验的回归方程分别是: $Y=477\ 511X-517\ 319$, $R^2=0.996\ 1$; $Y=545\ 001X-504\ 035$, $R^2=0.9978$; $Y=560\ 439X-540\ 656$, $R^2=0.996\ 3$ 。泊洛沙姆 188 在质量浓度范围 1.5~9.0 μg 线性关系良好。

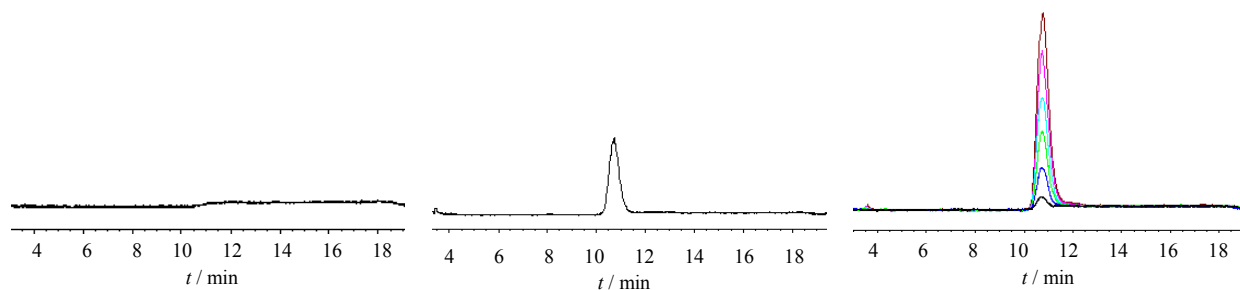


图1 空白对照(A)、样品(B)、不同进样量的泊洛沙姆 188(C)的标准色谱图

Fig.1 HPLC-ELSD of blank reference (A), rhIL-12 with poloxamer188 (B), different content poloxamer 188 standards (C)

2.5 精密度和重复性试验

取 rhIL-12 注射液,按照“2.2”项色谱条件进样,样品连续进样 6 针,计算泊洛沙姆 188 含量测定结果 RSD 为 1.7%,精密度良好。

2.6 稳定性试验

取 rhIL-12 注射液,分别在 0、24 h 后按照“2.2”项色谱条件连续进样 6 针,考察日间稳定性(RSD)为 1.9%,稳定性良好。

2.7 准确度、回收率试验

将 rhIL-12 注射液分成 3 份,每份 100 μL ,分别加入 50、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 泊洛沙姆标准品溶液 100 μL ,按照“2.2”项色谱条件依次进样,考察低、中、高 3 个浓度的回收率情况。3 个不同质量浓度的泊洛沙姆 188 的回收率分别为 93.3%、93.1%、93.8%。

2.8 定量限、检测限试验

将 100 $\mu\text{g/mL}$ 泊洛沙姆 188 标准溶液用流动相梯度稀释到浓度大约为 $S/N=10$,重复操作制备 5 份样品,按照 2.2 项色谱条件依次进样,当泊洛沙姆 188 稀释到 2 $\mu\text{g/mL}$ 时,其 S/N 值在 4~8,方法检测限小于 0.2 μg 。当泊洛沙姆 188 稀释到 4 $\mu\text{g/mL}$,其 S/N 值在 9~13,方法定量限约为 0.4 μg 。

2.9 耐用性试验

改变色谱柱使用昭和(shodex)DS-413 检测样品中的泊洛沙姆 188 含量,按照“2.2”项色谱条件依次进样,重复检测 3 次,检查不同色谱柱方法的可靠性、耐用性。结果发现,检测条件发生一定偏差的情况下,目标峰保留时间(10.9 min)无变化,泊洛沙姆 188 质量浓度分别为 92.1、94.0、95.5 $\mu\text{g/mL}$,RSD($n=3$)为 1.8%。

改变检测条件,漂移管温度、载气体积流量分别设为 80 $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 L/min 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 L/min,检查

目标峰保留时间及样品检测值,结果发现,在改变气体体积流量或温度的情况下,目标峰保留时间无变化,对同一样品泊洛沙姆 188 检测值 RSD 分别为 2.9%和 1.7%。

2.10 rhIL-12 注射液中泊洛沙姆 188 含量测定结果

按照上述建立的 HPLC 方法,测定 3 批 rhIL-12 注射液中泊洛沙姆 188 质量浓度分别是 92.8、90.2、94.0 $\mu\text{g/mL}$ 。样品中泊洛沙姆 188 含量理论值在 90~100 $\mu\text{g/mL}$,泊洛沙姆 188 含量检测值 RSD $\leq$ 4%,符合标准规定。

3 讨论

rhIL-12 注射液是一种重组蛋白药物,采用反相色谱梯度洗脱将泊洛沙姆 188 与 rhIL-12 注射液中的其他物质进行分离是最常用的方法,泊洛沙姆 188 具有高亲水性,ODS 柱难以保留,采用具有强疏水性能基质(如高交联度的聚苯乙烯/二乙烯基苯)的柱子,更适合分析分离该类物质的反相分析。

泊洛沙姆 188 没有紫外吸收,不能采用常用的紫外检测器,可以选择通用型检测器如示差折光检测和蒸发光散射检测,由于示差折光检测很难采用梯度洗脱^[17],且考虑到反相有机流动相的易挥发特性,更适合蒸发光散射检测器,本实验优先选用反相梯度洗脱,蒸发光散射检测泊洛沙姆 188。

实验比较了不同的漂移管温度、载气体积流量下目标峰保留时间及样品检测值漂移管温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,目标峰检测不到,漂移管温度 80~100 $^{\circ}\text{C}$,气体体积流量 1.0~1.5 L/min 目标峰保留时间基本不变,检测值与正常条件下相比 RSD 均小于 5%。选择实验检测条件为温度 100 $^{\circ}\text{C}$,气体体积流量 1.0 L/min。

在试验中,样品进样后,目标峰出现前后(0~

5 min, 12~20 min) 可用切向阀切换, 已避免高强度信号物质干扰或者污染蒸发光检测器。

随着药品质控标准的不断完善, 对重组蛋白药物中的药用辅料含量的准确控制越来越受到关注, 药用辅料含量的可控性关乎生产工艺的稳定, 药品安全性及稳定性和有效性。随着药品配方的升级, 新型药用辅料种类不断增加, 泊洛沙姆 188 已经应用到多种重组蛋白药物制剂中, 研究建立相关的检测分析方法十分必要^[18]。本文基于高效液相技术采用蒸发光检测器, 建立了 rhIL-12 注射液中泊洛沙姆 188 的含量测定方法。该方法还可为其他重组蛋白药物中泊洛沙姆 188 的含量测定, 提供了方法学参考, 有利于质量控制。

参考文献

- [1] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes [J]. *Exp Med*, 1989, 170(3): 827-845.
- [2] Chan S H, Perussia B, Gupta J W, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers [J]. *Exp Med*, 1991, 173(4): 869-879.
- [3] Stubblefield Park S R, Widness M, Levine A D, et al. T cell-, in-terleukin-12-, and gamma interferon-driven viral clearance in measles virus-infected brain tissue [J]. *J Virol*, 2011, 85(7): 3664-3676.
- [4] Finley S D, Gupta D, Cheng N. Inferring relevant control mechanisms for interleukin-12 signaling in naive CD4(+) T cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2011, 89(1): 100-110.
- [5] Jayanthi S, Koppolu Bp, Smith S G. Efficient production and purification of recombinant human interleukin-12 (IL-12) overexpressed in mammalian cells without affinity tag [J]. *Protein Expr Purif*, 2014(102): 76-84.
- [6] Zhang L, Morgan R A, Beane J D. Tumor infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2278-2288.
- [7] 陈 姝, 陆惠民, 张山鹰, 等. 白细胞介素 12 在伯氏疟原虫红细胞内期感染中的免疫调节作用 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2004(1): 1-4.
- [8] Therwa H, Barnett J B, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(3): 789-806.
- [9] Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, et al. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine [J]. *Transl Med*, 2012(10): 234.
- [10] Wei L Z, Xu Y, Nelles M E, et al. Localized interleukin-12 delivery for immunotherapy of solid tumours [J]. *Cell Mol Med*, 2013, 17(11): 1465-1474.
- [11] 范怀艳, 韦 嘉. 白细胞介素 12 在病毒感染中作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2014, 20(11): 1940-1942.
- [12] Kaul G, Huang J, Chatlapalli R, et al. Quality-by-design case study: investigation of the role of poloxamer in immediate-release tablets by experimental design and multivariate data analysis [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011, 12(4): 1064-1076.
- [13] 周巧云, 张朝晖, 潘俊芳, 等. 泊洛沙姆为载体的疏水性药物新剂型研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(4): 315-319.
- [14] Emanuele M, Balasubramaniam B. Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function [J]. *Drugs R D*, 2014, 14(2): 73-83.
- [15] 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 (5): 642-646.
- [16] 徐佳茗, 夏学军, 刘玉玲. 凝胶色谱-蒸发光散射检测法测定紫衫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.
- [17] 王巧娥, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术研究进展 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(6): 126.
- [18] 王 猛, 张钧寿, 周建平. 注射用辅料泊洛沙姆 188 [J]. *药学与临床研究*, 2007(1): 10-13.