

# HPLC 测定重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液中抗氧化剂及其降解物

鹿泽华<sup>1</sup>, 冀苏龙<sup>1</sup>, 刘帅虎<sup>1</sup>, 王力<sup>1</sup>, 高彦<sup>1</sup>, 申志强<sup>2</sup>, 李景艳<sup>1\*</sup>, 王斌<sup>2\*</sup> (1. 河南晟明生物技术研究院有限公司, 河南新乡 453000; 2. 华兰生物基因工程有限公司, 河南新乡 453000)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 对重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液中 11 种抗氧化剂及其降解物含量测定方法。方法 采用饱和硫酸铵沉淀蛋白, 离心后上清液转移至经甲醇活化后的 C<sub>18</sub> 固相萃取小柱中, 分别用 4 mL 甲醇、5 mL 乙酸乙酯依次洗脱小柱, 洗脱液用甲醇-乙酸乙酯 (2 : 3) 混合溶剂定容后过 0.22 μm PTFE 疏水滤膜, 经 HPLC 分析, 外标法定量。色谱条件: Kinetex<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub> 100Å (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 检测波长 230 nm, 柱温箱 30 °C, 进样量 5 μL, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相 0.1% 甲酸-甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 运行时间 45 min。结果 11 种目标物在 2.5~35 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好 ( $R^2 \geq 0.99$ )。在 25, 10, 5 μg·mL<sup>-1</sup> 3 个浓度水平下, 平均加样回收率为 88.1%~106.5%, RSD 为 0.10%~9.05%。6 份样品重复性 RSD 为 2.01%~4.77%, 12 份样品中间精密度 RSD 为 2.58%~9.75%, 对 3 批次重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液的 0 月, 25 °C 加速 3 月及 6 月正/倒置样品进行检测, 结果显示所有批次样品在不同检测点均未有抗氧化剂及其降解物浸出。结论 该方法专属性好、准确度与精密度高、溶液稳定性好、方法耐用性高, 能够用于对药品中抗氧化剂类物质的含量检测。

**关键词:** 重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液; 抗氧化剂; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)01-0112-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223808

引用本文: 鹿泽华, 冀苏龙, 刘帅虎, 等. HPLC 测定重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液中抗氧化剂及其降解物[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 112-118.

## Determination of Antioxidants and Their Degradation Products in Recombinant Exendin-4-FC Fusion Protein Injection by HPLC

LU Zehua<sup>1</sup>, JI Sulong<sup>1</sup>, LIU Shuaihu<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>1</sup>, SHEN Zhiqiang<sup>2</sup>, LI Jingyan<sup>1\*</sup>, WANG Bin<sup>2\*</sup> (1. Henan Shengming Biotechnology Research Co., Ltd., Xinxiang 453000, China; 2. Hualan Genetic Engineering Co., Ltd., Xinxiang 453000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for determining the content of 11 antioxidants and their degradation products in recombinant Exendin-4-FC fusion protein injection by HPLC. **METHODS** The protein was precipitated with saturated ammonium sulfate. After centrifugation, the supernatant was transferred to a C<sub>18</sub> solid phase extraction cartridge activated by methanol. Then the cartridge was eluted with 4 mL of methanol and 5 mL of ethyl acetate respectively, and the eluent was diluted with methanol-ethyl acetate (2 : 3) mixed solvent and passed through a 0.22 μm PTFE hydrophobic filter. It was analyzed by HPLC and quantified by external standard method. Chromatographic conditions: Kinetex<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub> 100Å (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm) column, the detection wavelength was 230 nm, the column oven was 30 °C, the injection volume was 5 μL and the flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, mobile phase was 0.1% formic acid-methanol (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B), the running time was 45 min. **RESULTS** The 11 target substances showed a good linear relationship in the range of 2.5~35 μg·mL<sup>-1</sup> with  $R^2 \geq 0.99$ . At three different concentration (25, 10, 5 μg·mL<sup>-1</sup>) of spiked samples, the average recovery rates of 11 antioxidants ranged from 88.1% to 106.5%, with RSDs in the range of 0.10%~9.05%. The RSDs of 6 repeatable samples was 2.01%~4.77%, which of 12 intermediate precision samples was 2.58%~9.75%. The positive/inverted samples of three batches of recombinant Exendin-4-FC fusion protein injection were detected at 0 month, 3 months and 6 months (25 °C), and the results showed that there was no antioxidant and its degradation leaching in all batches of samples at different detection points. **CONCLUSION** The method has good specificity, high accuracy and precision, good solution stability, high durability and can be used for the content detection of antioxidants in drugs.

**KEYWORDS:** recombinant Exendin-4-FC fusion protein injection; antioxidants; HPLC

作者简介: 鹿泽华, 男, 硕士 E-mail: lzh4993@hualan.com \*通信作者: 李景艳, 女, 硕士 E-mail: 602419592@qq.com 王斌, 男, 硕士, 中级工程师 E-mail: wb2286@hualan.com

抗氧化剂,也称防老剂,在 高分子聚合材料中少量添加即能延缓或抑制聚合物氧化过程,进而达到延缓材料的老化、延长材料使用寿命的目的<sup>[1-2]</sup>,因此,抗氧化剂成为高分子材料生产过程中被广泛使用的助剂<sup>[3]</sup>。药用卤化丁基橡胶塞作为药品常用的包装材料之一<sup>[4]</sup>,广泛应用于各类注射剂及口服产品中。在其制造过程中,会加入多种配合剂,以改善加工性能、提高生产效率、改善产品使用性能等,通常添加的抗氧化剂种类按结构分类主要有受阻胺类、受阻酚类、亚磷酸酯类等<sup>[5]</sup>。由于胶塞在与药液的长期接触中,其添加的抗氧化剂有可能迁移到药液中,易与药物产生相容性问题,从而影响药品的最终质量,甚至产生严重的不良反应<sup>[6-10]</sup>。欧盟在 2011 年发布的 (EU)NO10/2011 法规将多种抗氧化剂的特定迁移量或特定总迁移量加以限定<sup>[11]</sup>。中国目前对抗氧化剂类物质的检测方法主要有 HPLC<sup>[12-15]</sup>、GC<sup>[16]</sup>、HPLC-MS/MS<sup>[17-18]</sup> 和 GC-MS/MS<sup>[19-20]</sup>,目前已发表的报道中检测样品大多是胶塞本身或水溶性样品,对含有高浓度蛋白的生物制品中抗氧化剂的测定鲜有报道。本研究采用固相萃取法,以重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液为分析基体,建立高蛋白类药品中抗氧化剂及有关降解物的测定方法,用于确认成品药品的内包装材料中抗氧化剂成分是否迁移至药液中,从而为研究药品安全性提供技术支持。

## 1 仪器与试剂

H-CLASS 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 5804R 离心机 (德国 Eppendorf 公司,离心半径: 10.6 cm); New Classic MS 十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); HYQ-2121A 涡旋混匀器 (美国精祺公司)。

11 种抗氧化剂: 3,5-二叔丁基-4-羟基苯基丙酸 (上海浩鸿生物医药科技有限公司,批号: la0817088; 纯度: 99%); 2,6-二(叔丁基)-4-羟基-4-甲基-2,5-环己二烯-1-酮 (BHT-OH, TRC, 批号: 1-MIK-140-4; 纯度: 98%); 2,4-二叔丁基苯酚 (2,4-DTBP, SIGMA, 批号: BCBX4597; 纯度: 99%); 2,6-二叔丁基-1,4-苯醌 (DBQ, 东京化成工业株式会社,批号: D2256; 纯度: >98%); 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT, 批号: C13473 336; 纯度: 98%); 2,2'-亚甲基双(4-甲基-6-叔丁基苯酚)(Plastanox2246, 批号: C10166147; 纯度  $\geq$

99%)、三(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)异氰脲酸酯 (Irganox3114, 批号: C11328868; 纯度: 98%)、3-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)丙酸十八烷酯 (Thanox1076, 批号: C10497819; 纯度: 98%) 均购自上海麦克林生化有限公司; 四(3,5-二叔丁基-4-羟基氢化肉桂酸)季戊四醇酯 (Irganox1010, 河北百灵威超精细材料有限公司,批号: LTB0S80; 纯度: 98%); 1,3,5-三甲基-2,4,6-三(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)苯 (Ethanox330, 成都艾科达化学试剂有限公司,批号: 202007131; 纯度: 99%); 三(2,4-二叔丁基苯基)亚磷酸酯 (Irgafos168, 上海阿拉丁生化科技有限公司,批号: T822863; 纯度: 98%); 甲醇、甲酸、乙酸乙酯 (色谱纯, Sigma-Aldrich 公司); 硫酸铵 (分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 超纯水为 Milli-Q IQ 7000 Element 超纯水仪制备。重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液 (华兰基因工程有限公司,批号: 201810001, 201811002, 201903001; 规格: 每瓶 1.5 mg/0.5 mL)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Kinetex<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub> 100Å (100mm×4.6mm, 2.6μm) 色谱柱; 检测波长 230 nm, 柱温箱 30 °C, 进样量 5 μL, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 运行时间 45 min, 流动相 0.1% 甲酸-甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~2 min, 67%A; 2~5 min, 67%→85%A; 5~11 min, 85%A; 11~13 min, 85%→88%A; 13~14.8 min, 88%A; 14.8~18 min, 88%→100%A; 18~35 min, 100%A; 35~40 min, 100%→67%A; 40~45 min, 67%A)。

### 2.2 对照品溶液的配制

对照品储备液: 精密称取 Fenozan acid、BHT-OH、2,4-DTBP、DBQ、BHT、Plastanox 2246 对照品各 0.500 0 g 于 6 个 10 mL 量瓶中, 分别加入适量的甲醇, 轻摇使其溶解后定容至 10 mL, 摇匀即得浓度均为 50 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备溶液; 精密称取 Irganox3114、Irganox1010、Ethanox330、Thanox1076、Irgafos168 对照品各 0.100 0 g 于 5 个 25 mL 量瓶中, 分别加入适量的甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 混合溶剂轻摇使其溶解后定容, 摇匀, 即得浓度均为 4 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备溶液, 于 4 °C 冰箱中避光、密封保存, 有效期 6 个月。

混合对照品溶液 ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ): 分别准确移取  $0.5 \text{ mL } 50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Fenozan acid、BHT-OH、2,4-DTBP、DBQ、BHT、Plastanox2246 对照品储备溶液,  $6.25 \text{ mL } 4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Irganox3114、Irganox1010、Ethanox330、Thanox1076、Irgafos168 对照品储备溶液于  $50 \text{ mL}$  量瓶中, 用适量的甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 混合溶剂稀释、定容, 摇匀后, 避光、密封保存在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中, 有效期 6 个月。

混合对照品溶液 ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ): 准确移取  $1 \text{ mL } 500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  混合对照品溶液于  $10 \text{ mL}$  量瓶中, 用适量的甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 混合溶剂稀释、定容, 摇匀后, 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中避光、密封保存, 有效期 6 个月。

对照品工作溶液: 分别准确移取  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  混合对照品使用溶液  $0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 3.5 \text{ mL}$  于 5 个  $5 \text{ mL}$  量瓶中, 用适量的甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 混合溶剂稀释、定容, 得到浓度分别为  $2.5, 5, 10, 25, 35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品工作溶液。

### 2.3 供试品处理

精密移取  $1 \text{ mL}$  样品溶液于  $50 \text{ mL}$  离心管中, 加入  $4 \text{ mL}$  饱和硫酸铵溶液, 涡旋混匀, 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下以  $9000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $20 \text{ min}$ 。之后, 将上清液全部转移至预先分别用  $5 \text{ mL}$  甲醇活化和  $5 \text{ mL}$  水平衡后的  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱中,  $10 \text{ mL}$  水淋洗, 负压抽干后分别用  $4 \text{ mL}$  甲醇、 $6 \text{ mL}$  乙酸乙酯依次洗脱, 收集洗脱液于  $10 \text{ mL}$  量瓶中。最后, 用甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 混合溶剂定容, 混匀后, 取适量溶液过  $0.22 \mu\text{m}$  PTFE 疏水滤膜后进行上机检测。

## 3 方法学验证

### 3.1 专属性试验

取适量混合溶剂甲醇-乙酸乙酯 (2:3) 作为溶

剂空白 (A), 取配制的  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品工作液作为溶液 (B), 按“2.3”项下供试品处理方法制备样品空白 (C), 同时将添加一定浓度的样品溶液作为溶液 (D)。取以上 4 种溶液按“2.1”项下条件分别进行上机检测。结果显示, 溶剂空白和样品基质对目标物的测定不存在干扰, 且各组分分离良好, 证明了该方法专属性好, 相关色谱图见图 1, 各目标物的出峰保留时间见表 1。

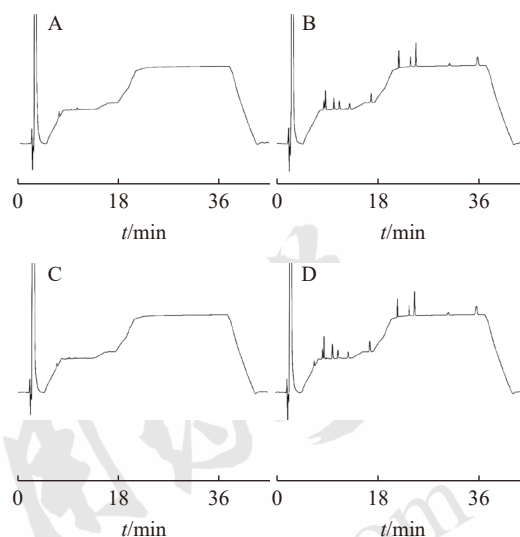


图 1 高效液相色谱图

A-溶剂空白; B- $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品工作液; C-样品空白; D-浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  加标样品。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-solvent blank; B- $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  control working solution; C-sample blank; D- $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  spiked sample.

### 3.2 线性关系、检测限和定量限

取“2.2”项下配制的  $2.5, 5, 10, 25, 35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  11 种抗氧化剂混合对照品工作溶液。按“2.1”项下色谱条件进行上机检测, 以峰面积 (A) 为纵坐标 (Y), 质量浓度 (C,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 为横坐

表 1 11 种抗氧化剂及其降解物的线性回归方程、相关系数及检测限、定量限

Tab. 1 Linear regression equation, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of 11 antioxidants and their degradation products

名称	保留时间/min	线性回归方程	相关系数/ $r^2$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Fenozan acid	8.56	$Y=13\ 404X-2\ 196.6$	0.999 5	0.313	0.625
BHT-OH	8.84	$Y=28\ 294X-2\ 601.3$	0.999 8	0.222	0.444
2,4-DTBP	10.36	$Y=18\ 315X-2\ 466.2$	0.999 8	0.251	0.502
DBQ	11.35	$Y=14\ 611X-3\ 632.7$	0.999 6	0.500	1.000
BHT	13.20	$Y=12\ 289X-1\ 628.5$	0.999 8	0.876	1.751
Plastanox2246	17.09	$Y=20\ 043X-1\ 649.2$	0.999 6	0.439	0.877
Irganox3114	22.08	$Y=18\ 600X-2\ 388.3$	0.999 8	0.225	0.450
Irganox1010	24.18	$Y=13\ 738X-2\ 563.1$	0.999 8	0.313	0.626
Ethanox330	25.17	$Y=37\ 368X-8\ 648.2$	0.999 8	0.151	0.303
Thanox1076	31.22	$Y=7\ 349.2X-5\ 528.2$	0.999 9	1.252	2.505
Irgafos168	36.31	$Y=30\ 824X-12\ 658$	0.999 8	0.438	0.877

标(X)绘制对照品工作曲线,计算11种抗氧化剂及其降解物的线性回归方程及相关系数。

结果显示,各目标物在2.5~35 μg·mL<sup>-1</sup>内均呈现良好的线性关系,相关系数均>0.99。同时以信噪比为3:1和10:1确定了各目标物的检测限和定量限。由于重组Exendin-4-FC融合蛋白注射液每日最大临床使用剂量为4 mL,以抗氧化剂BHT的每日最大允许暴露量(permissible daily exposure, PDE)1 250 μg·d<sup>-1</sup>为参考,根据公式(1)计算得出11种抗氧化剂及其降解物的分析评价阈值(analytical evaluation threshold, AET)为375 μg·mL<sup>-1</sup>,远高于方法的定量限,说明该方法灵敏度高,能够满足重组Exendin-4-FC融合蛋白注射液中对11种抗氧化剂及其降解物的监控。结果见表1。

$$AET(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{PDE}{\text{每日最大使用剂量}} = \frac{1250 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}}{4 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}} = 375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \quad (1)$$

### 3.3 加样回收率试验

在重组Exendin-4-FC融合蛋白注射液中分别添加不同量的11种抗氧化剂混合对照品溶液进行加样回收率实验,使样品中各目标物的浓度分别为5, 10, 25 μg·mL<sup>-1</sup>,每个浓度梯度平行制备3份,11种抗氧化剂的回收率及RSD见表2。

### 3.4 精密度试验

由2名不同分析人员分别平行制备6份加样

表2 11种抗氧化剂及其降解物的回收率及RSD值

Tab. 2 Recovery and RSD values of 11 antioxidants and their degradation products

名称	加入量/ μg·mL <sup>-1</sup>	回收率/%			平均回 收率/%	RSD/ %	名称	加入量/ μg·mL <sup>-1</sup>	回收率/%			平均回 收率/%	RSD/ %
Fenozan acid	5	92.6	89.8	91.4	91.3	1.54	Irganox3114	5	91.0	89.4	89.6	90.0	0.97
	10	102.2	103.1	101.0	102.1	1.03		10	101.4	101.3	101.2	101.3	0.10
	25	87.9	90.8	98.6	92.4	5.99		25	93.6	90.4	99.0	94.3	4.61
BHT-OH	5	92.3	90.1	90.2	90.9	1.37	Irganox1010	5	90.6	89.1	90.0	89.9	0.84
	10	105.4	110.0	104.2	106.5	2.87		10	102.0	101.4	101.8	101.7	0.30
	25	94.1	90.5	98.1	94.2	4.04		25	96.3	93.0	99.3	96.2	3.28
2,4-DTBP	5	95.8	90.8	89.6	92.1	3.57	Ethanox330	5	90.2	89.1	89.2	89.5	0.68
	10	96.4	100.4	98.9	98.6	2.05		10	101.3	103.2	101.8	102.1	0.96
	25	87.4	81.3	97.2	88.6	9.05		25	95.7	92.3	99.2	95.7	3.61
DBQ	5	95.1	90.0	94.9	93.3	3.10	Thanox1076	5	88.5	88.3	87.6	88.1	0.54
	10	93.0	93.7	93.1	93.3	0.41		10	101.4	108.8	102.6	104.3	3.81
	25	89.9	86.0	97.8	91.2	6.59		25	93.8	89.5	98.3	93.9	4.69
BHT	5	89.3	95.8	85.5	90.2	5.77	Irgafos168	5	89.0	89.0	88.0	88.7	0.65
	10	97.1	94.3	100.1	97.2	2.98		10	99.7	100.0	100.1	99.9	0.21
	25	91.5	86.0	99.5	92.3	7.35		25	93.2	89.3	99.1	93.9	5.25
Plastanox2246	5	90.8	90.6	93.2	91.5	1.58							
	10	100.8	103.5	99.5	101.3	2.01							
	25	97.5	93.1	98.3	96.3	2.91							

浓度为10 μg·mL<sup>-1</sup>的加标样品(n=6/人,共12份),计算此条件下的RSD。结果表明,12份精密度样品中11种抗氧化剂及其降解物的RSD为2.58%~9.75%,说明该方法精密度良好。结果见表3。

### 3.5 重复性试验

平行制备6份加标浓度为10 μg·mL<sup>-1</sup>的加标样品(n=6),计算此条件下的RSD。结果表明,平行制备的6份重复性样品中11种抗氧化剂及其降解物的RSD为2.01%~4.77%,说明该方法重复性良好。

### 3.6 稳定性试验

制备加标浓度为10 μg·mL<sup>-1</sup>的加标样品,并保存在室温条件下,在“2.1”项色谱条件下分别于0, 4, 8, 12, 24, 48 h取样进行上机检测。以时间点0 h的溶液为对照,计算这5份稳定性样品回收率,结果显示,各时间点内11种抗氧化剂及其降解物回收率在94.2%~111.7%,且峰面积RSD值在2.01%~4.96%。说明了该溶液在实验室室温下保存48 h稳定。结果见表4。

### 3.7 耐用性试验

3.7.1 色谱柱温度 比较28, 30, 32 °C 3种进样口温度对色谱峰的影响,在“2.1”项色谱条件其余试验条件不变的情况下上机检测。结果显示,3种色谱柱温度下11种抗氧化剂及其降解物分离度均>1.5,达到要求;与30 °C下色谱峰面积相比,其余2种试验温度下色谱峰面积百分比为98.2%~101.5%,即色谱柱温度在28~32 °C内对抗氧化剂检

表3 11种抗氧化剂及其降解物的精密度试验结果

Tab. 3 Precision test results of 11 antioxidants and their degradation products

化合物名称	基体浓度/ μg·mL <sup>-1</sup>	分析员1实测峰面积			RSD/% (n=6)	分析员2实测峰面积			RSD/% (n=12)
		145 205	158 393	157 152		122 916	132 982	127 905	
Fenozan acid	10	149 595	152 195	157 013	3.39	127 858	128 751	128 788	9.75
BHT-OH	10	350 430	350 071	339 632	2.72	343 739	362 910	341 136	2.58
2,4-DTBP	10	353 216	368 639	357 815	4.77	363 440	351 660	357 227	5.36
		235 557	231 483	258 601		240 201	259 682	235 936	
DBQ	10	231 030	234 838	227 076	3.21	266 583	233 871	240 217	3.08
		178 885	174 237	173 521		174 197	168 584	166 598	
BHT	10	164 971	175 975	181 208	3.89	176 426	165 214	171 729	4.63
		139 303	146 825	150 870		141 571	148 653	134 787	
Plastanox2246	10	137 212	147 550	149 790	2.01	140 144	130 068	146 838	2.99
		240 589	236 745	241 394		230 555	231 768	224 103	
Irganox3114	10	235 396	246 329	233 069	2.25	242 226	223 444	235 439	2.60
		215 949	213 389	217 696		208 743	209 323	208 079	
Irganox1010	10	210 885	223 677	221 856	2.06	214 948	207 231	208 484	2.70
		151 825	149 900	153 050		147 728	146 676	145 710	
Ethanox330	10	149 067	157 058	155 669	2.31	151 670	144 897	145 312	2.67
		458 988	442 518	449 983		433 916	432 542	431 371	
Thanox1076	10	437 379	462 694	460 567	2.93	445 164	438 610	430 056	3.68
		79 311	74 344	75 761		73 114	70 561	70 842	
Irgafos168	10	73 210	76 800	77 720	3.26	74 058	72 748	71 878	4.10
		351 035	342 860	354 481		333 031	330 532	331 112	
限度/%		338 413	367 446	364 426	≤6	340 299	324 945	330 002	≤11

表4 11种抗氧化剂及其降解物的稳定性试验结果

Tab. 4 Stability test results of 11 antioxidants and their degradation products

化合物名称	理论峰面积 0 h	4 h		8 h		12 h		24 h		48 h		峰面积RSD/%
		峰面积	回收率/%	峰面积	回收率/%	峰面积	回收率/%	峰面积	回收率/%	峰面积	回收率/%	
Fenozan acid	133 805	138 346	103.4	135 883	101.6	141 953	106.1	137 831	103.0	138 960	103.9	2.01
BHT-OH	319 254	327 152	102.5	309 260	96.9	301 986	94.6	310 484	97.3	332 396	104.1	3.66
2,4-DTBP	204 035	204 979	100.5	209 689	102.8	206 626	101.3	212 991	104.4	224 585	110.1	3.63
DBQ	152 773	149 052	97.6	148 837	97.4	153 740	100.6	152 832	100.0	167 285	109.5	4.41
BHT	122 793	122 480	99.7	128 936	105.0	127 163	103.6	123 107	100.3	132 665	108.0	3.27
Plastanox2246	221 445	211 919	95.7	208 699	94.2	214 978	97.1	216 908	98.0	239 160	108.0	4.96
Irganox3114	200 382	201 292	100.5	200 940	100.3	200 878	100.2	203 319	101.5	211 298	105.4	2.06
Irganox1010	140 278	140 947	100.5	140 343	100.0	142 486	101.6	143 282	102.1	149 174	106.3	2.36
Ethanox330	412 559	413 526	100.2	412 481	100.0	413 673	100.3	415 383	100.7	435 414	105.5	2.16
Thanox1076	68 350	68 641	100.4	68 377	100.0	68 953	100.9	70 509	103.2	76 365	111.7	4.45
Irgafos168	315 750	306 824	97.2	313 689	99.3	314 904	99.7	316 475	100.2	329 520	104.4	2.34
限度/%				80~115								≤6

测无明显影响。结果见表5。

**3.7.2 柱流量** 比较 0.37, 0.40, 0.43 mL·min<sup>-1</sup> 3种柱流量对色谱峰的影响, 在“2.1”项色谱条件其余试验条件不变的情况下上机检测。结果显示, 3种流速下11种抗氧化剂及其降解物分离度均>1.5, 达到要求; 与0.40 mL·min<sup>-1</sup>下色谱峰面积相比, 其余2种试验温度下色谱峰面积百分比为98.0%~101.6%, 即柱流量在0.37~0.43 mL·min<sup>-1</sup>内

对抗氧化剂及其降解物检测无明显影响。结果见表5。

#### 4 样品检测

对3批次重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液 S201811002, S201810001, S201903001的0月, 25℃加速3月及6月正/倒置样品进行检测, 结果显示所有批次样品在不同检测点均未有抗氧化剂及其降解物浸出, 结果见图2。

表 5 11 种抗氧化剂及其降解物的耐用性试验结果

Tab. 5 Durability test results of 11 antioxidants and their degradation products

类别	理论峰(2.1色谱条件)		柱温28 °C		柱温32 °C		柱流量0.37 mL·min <sup>-1</sup>		柱流量0.43 mL·min <sup>-1</sup>	
	系统适用性 RSD/%	加标样品平均分离度	系统适用性 RSD/%	加标样品平均分离度	系统适用性 RSD/%	加标样品平均分离度	系统适用性 RSD/%	加标样品平均分离度	系统适用性 RSD/%	加标样品平均分离度
Fenozan acid	0.42	/	1.27	/	1.33	/	1.50	/	4.03	/
BHT-OH	0.96	2.0	1.84	1.2	0.57	1.1	1.53	1.3	2.48	1.3
2,4-DTBP	0.51	9.5	2.70	6.1	2.02	5.9	1.53	6.3	3.60	6.5
DBQ	1.03	5.1	5.24	3.4	2.23	3.4	1.49	3.7	2.65	3.6
BHT	1.02	8.0	4.81	5.6	3.86	5.5	2.46	6.2	2.23	6.0
Plastanox2246	0.84	15.7	2.58	11.4	2.82	11.1	1.82	11.8	2.51	12.8
Irganox3114	0.19	26.4	1.32	3.1	0.24	23.4	1.41	13.1	0.17	26.2
Irganox1010	0.14	13.9	0.48	1.4	0.41	13.3	1.40	8.8	0.41	12.7
Ethanox330	0.12	5.4	0.52	5.2	0.28	4.8	1.38	5.0	0.33	4.7
Thanox1076	0.18	21.7	3.93	20.3	1.32	18.7	1.52	19.5	1.68	19.0
Irgafos168	0.34	11.8	0.36	10.6	0.59	10.5	1.10	10.0	0.59	10.5
限度/%	≤6	≥1.0	≤6	≥1.0	≤6	≥1.0	≤6	≥1.0	≤6	≥1.0

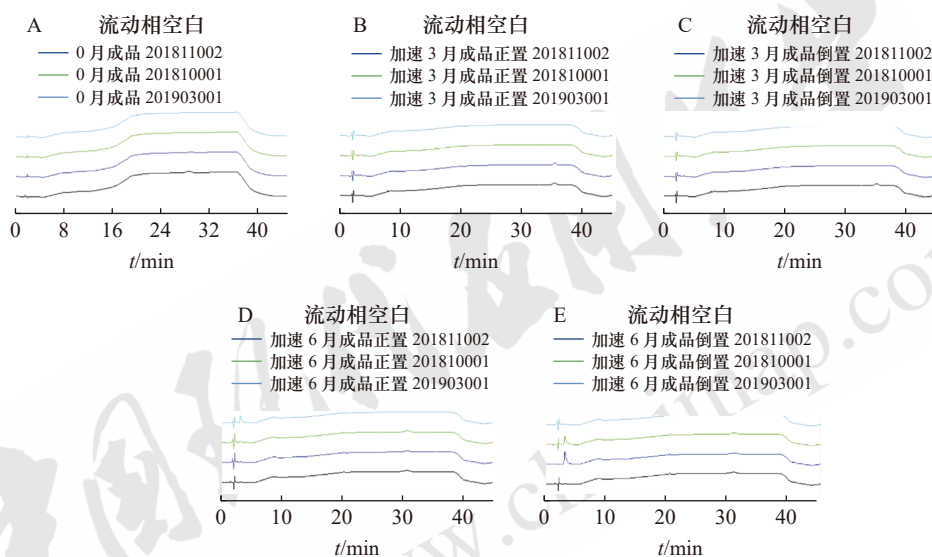


图 2 迁移实验液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of migration experiment

## 5 讨论

### 5.1 萃取方式选择

分别采用加标注射液样品-有机溶剂液液萃取及有机/无机溶剂沉淀蛋白后固相萃取纯化 2 种方式优化纯化过程。其中,液液萃取分别采用二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,11 种抗氧化剂及其降解产物经二氯甲烷萃取后的加样回收率为 0~76.7%,经乙酸乙酯萃取后的加样回收率为 0~96.2%。而经甲醇沉淀蛋白并通过固相萃取柱纯化后的加样样品回收率为 0~103.7%,经饱和硫酸铵水溶液沉淀蛋白并通过固相萃取柱纯化后的加样回收率为 86.8%~103.1%,相比采用液液萃取的方式 11 种目标物回收率更高,故采用饱和硫酸铵水溶液沉淀

蛋白后固相萃取纯化方式进行样品处理,并对该方法中固相萃取柱纯化时洗脱溶剂进行优化。

### 5.2 固相萃取法洗脱溶剂的选择

根据分析目标物的性质,试验对比了甲醇、乙腈、乙酸乙酯及不同比例甲醇/乙酸乙酯溶剂(甲醇:乙酸乙酯体积比分别为 7:3,4:6,5:5,6:4,3:7)为洗脱溶剂依次洗脱时的效果。结果发现,当采用甲醇:乙酸乙酯(体积比 4:6)时样品加样回收率最高,11 种目标物的回收率为 93.3%~106.5%,洗脱效果相对最好。

### 5.3 浓缩方式选择

为提高方法的灵敏度、消除溶剂效应,本实验对比了氮吹、旋蒸 2 种浓缩方法。结果发现,

相比于其他目标物,在采用旋蒸对样品进行浓缩处理时 Fenozan acid 回收率<60.0%。当控制氮吹温度在 35 ℃ 左右时,可将损失降低,满足回收测定要求,所以最终选择在 35 ℃ 下氮吹浓缩处理样品。

## 6 小结

药品作为与消费者生命健康息息相关的特殊商品,其安全问题一直备受关注。药包材作为药品的重要组成部分,一方面方便了药品使用,提高了其稳定性,另一方面也会反过来影响药品质量。为充分保障药品的安全性,各国也出台了相关法律法规<sup>[16-18]</sup>要求加强药包材与药品之间的相容性研究。抗氧化剂作为包装材料尤其是塑料和橡胶材质中的常用添加剂,在包材与药液的长期接触中其有可能从包材迁移进入药液,继而引发安全性问题。所以,为加强药品的安全性、有效性,充分保障患者的生命健康,建立药品中抗氧化剂的含量检测方法是评估药品相容性研究中的技术所需,也是重要一环。

本研究以重组 Exendin-4-FC 融合蛋白注射液为分析基体,建立了生物制品中抗氧化剂及其降解物的含量检测方法,并通过系统、全面、准确的方法学验证证明了该方法具有专属性强、灵敏度高、准确度和精密度好、检出限和定量限低等优点,可为监控药品质量提供一定的技术支持。

## REFERENCES

- [1] FU J Y, ZHANG Z D, ZHAO W, et al. Plastic antioxidant industry in China: Current situation analysis and research progress & development proposals [J]. *Plast Addit(塑料助剂)*, 2021, 146(2): 14-19,65.
- [2] LU Y, ZHAN L Y, GONG Q H, et al. Classification, mechanism and research progress of antioxidants[J]. *Plast Addit(塑料助剂)*, 2016(2): 43-50.
- [3] CHEN L, HU J Y, WANG S Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2012, 67(5): 1013-1024.
- [4] XIONG W, DING G J, WANG Q L, et al. Compatibility evaluation of the ganciclovir and sodium chloride injection and polypropylene infusion bottle[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(8): 1166-1172.
- [5] LI C H, XUE W L, XING S, et al. Leaching and migration studies on 11 antioxidants and free sulfur in brominated butyl rubber plugs [J]. *Chin J Anal Lab(分析实验室)*, 2020, 39(1):

- 91-96.
- [6] LIU L, LI T T, TONG W, et al. Research progress on detection of chemical additives for medicinal butyl rubber stopper and its compatibility with drugs[J]. *Jiangxi Chem Ind(江西化工)*, 2017(1): 11-14.
- [7] REN W X, WENG X M, LIU C. Risk analysis and control strategies of production and quality management of ophthalmic preparations [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(9): 1144-1146.
- [8] 化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)[S]. 2012.
- [9] 化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)[S]. 2018.
- [10] Guidance on Plastic Immediate Packaging Materials[S]. 2005.
- [11] EU Regulation No 10/2011. Plastic materials and articles intended to come into contact with food[S]. 2011.
- [12] CHEN Y, JIN L, YU H, et al. Content determination of antioxidants PEPQ in infusion of 3-layer Co-extrusion bags by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(8): 963-965.
- [13] MENG Y F. Feasibility study on the infusion packaged with domestic non-PVC 5-layers Co-extruded film[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(4): 455-460.
- [14] ZHANG D M, YU M Y, LIU W K, et al. Study of 11 antioxidants in tobramycin eye drops by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 37(15): 1862-1866.
- [15] LING X, ZHANG D M, WANG S, et al. Quality assessment of mezlocillin sodium for injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(8): 990-994.
- [16] PENG J, WANG H, ZHOU Q, et al. Detection of antioxidants, butylated hydroxyanisole, 2, 6-di-tert-butyl-p-methyl phenol and tertiary butylhydroquinone in edible oil by gas chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志)*, 2022, 32(4): 399-401,405.
- [17] DONG B, LI Z C, WANG L F, et al. Simultaneous determination of specific migration amounts of 9 antioxidants in plastic food contact materials by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal(分析测试学报)*, 2021, 40(3): 377-382.
- [18] YU Q L, ZHANG Y M, QIU Y, et al. Rapid screening of 12 antioxidants in medicinal rubber plugs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal(分析测试学报)*, 2022, 41(6): 910-915.
- [19] LI Z W, WANG H, LIN L F, et al. Determination of three antioxidants in plastic products by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chem Analysis Meter(化学分析计量)*, 2018, 27(3): 73-76.
- [20] YU S W, WANG C M, CHEN Y. Determination of 34 kinds of antimicrobial agents and antioxidants in Chinese herbal extracts by GC-MS [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2021, 38(24): 3173-3178.

收稿日期: 2022-11-09

(本文责编: 沈倩)