

# 体积排阻色谱法用于注射用重组人白介素-11 的纯度分析

LC-174

**摘要：**本文参考 2015 年版《中国药典》注射用重组人白介素-11 品种的质量标准，采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法对注射用重组人白介素-11 样品进行了纯度分析。本实验采用岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱，考察了流速、上样量和空白溶剂对样品纯度测定的影响。结果表明空白溶液对纯度测定无明显影响，在 1.0 mL/min 的流速及 20  $\mu$ g 上样量的条件下，重组人白介素-11 主峰与相邻杂质峰分离效果良好且能有效检出样品中所含的杂质。样品经 6 次重复测定，重组人白介素-11 主峰保留时间 RSD 为 0.052%，主峰、最大单杂及总杂含量的 RSD 分别为 0.065%、0.670% 和 0.910%，测定重复性良好。经标准蛋白质 SEC 分析测定，以标准曲线计算分子量，推测待测样品中最大单杂为重组人白介素-11 的二聚体。

**关键词：**体积排阻色谱 生物液相 注射用重组人白介素-11 纯度

重组人白介素-11 是 90 年代初研究发现的一种血小板生长因子，能诱导巨噬细胞成熟，升高血小板数量，调节肠道上皮细胞生长、破骨细胞增殖、神经生成等。注射用重组人白介素-11 是由高效表达人白介素-11 基因的大肠杆菌，经发酵、分离和高度纯化后获得的重组人白介素-11 冻干而成，由 178 个氨基酸残基组成的多肽链，分子量为 19.2 kDa。

体积排阻色谱法 (SEC) 是利用多孔凝胶固定相的独特特性产生的一种主要依据分子尺寸大小的差异来进行分离的方法。2015 年版《中国药典》规定注射用重组人白介素-11 的纯度分析需采用三种方法进行控制，包括电泳法、反相高效液相色谱法及体积

排阻色谱法。其中体积排阻色谱法主要用于分子量为 5 ~ 150 kDa 范围内的杂质测定。岛津生物液相系统 Nexera Bio 采用了耐高压的 Peek 管，不仅耐腐蚀且能降低生物大分子的吸附有效地保障了良好的分析重复性。用于清洗柱塞的蠕动泵可以定时地对附着在柱塞表面的盐和缓冲液进行清洗，能有效降低盐析现象，实现输液泵的稳定送液。

本实验参考 2015 年版《中国药典》注射用重组人白介素-11 的质量标准，采用 SEC 法对其进行纯度分析。另外，本实验通过 SEC 法以标准曲线计算分子量，对 SEC 纯度分析的主要杂质峰进行了初步定性。

## 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 试剂

水：超纯水

磷酸二氢钾：国药集团

氢氧化钠：北京化学试剂厂

氯化钠：Alfa Aesar

蛋白质分子量标准品：核糖核酸酶 A 1.37 kDa、碳酸酐酶 29 kDa、牛血清白蛋白 66 kDa、 $\beta$ -淀粉酶 200 kDa、脱铁蛋白 443 kDa、甲状腺球蛋白 669 kDa，均为粉末，购自 Sigma Aldrich。

#### 1.1.2 仪器

本实验采用岛津 Nexera Bio 生物液相系统，包括 CBM-20A 系统控制器，Nexera Bio LC-20AD<sub>XR</sub> 输送泵，Nexera Bio SIL-20AC<sub>XR</sub> 自动进样器，Nexera Bio CTO-20AC 柱温箱，SPD-M20A 检测器，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。图 1 为岛津 Nexera Bio 生物液相系统。



图 1 岛津 Nexera Bio 生物液相系统

## 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-Sen SEC-H 300 (7.8 mm i.d.×300 mm L, 3 μm, 300 A)

流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 -0.1 mol/L 氯化钠, pH=7.0

流速: 1.0 mL/min

柱温: 25°C

检测波长: 280 nm

进样体积: 4 μL

## 1.2 样品处理

5 mg/mL 注射用重组人白介素 -11 样品溶液, 直接进样分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 流速考察

本实验考察了不同流速对重组人白介素 -11 理论塔板数和分离度的影响, 以面积归一化法计算样品纯度, 分析结果如表 1 所示。

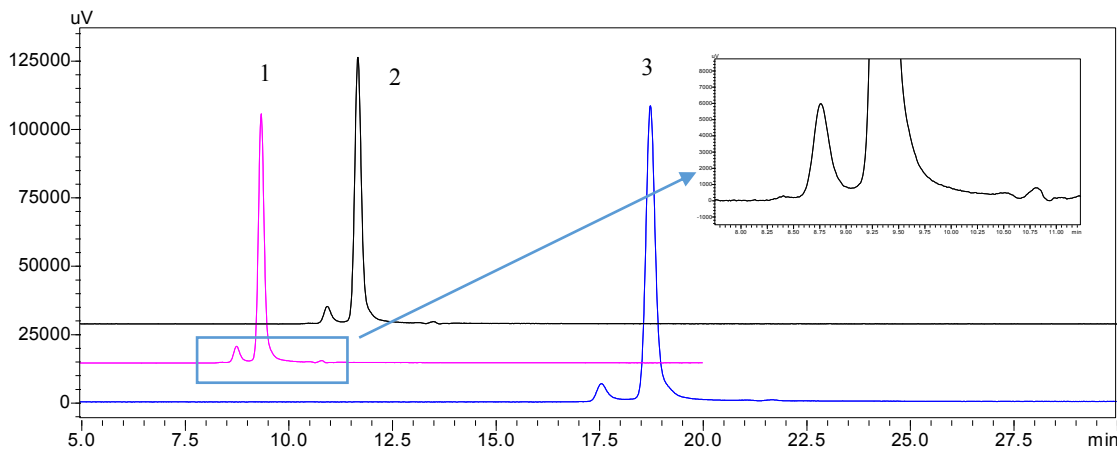


图 2 不同流速下样品溶液色谱图 (1: 1.0 mL/min, 2: 0.8 mL/min, 3: 0.5 mL/min)

表 1 不同流速下重组人白介素 -11 纯度分析结果

流速 (mL/min)	保留时间 (min)	主峰面积 (%)	理论塔板数	分离度	杂质峰个数
0.5	18.749	93.495	30652	2.625	2
0.8	11.689	93.340	23152	2.299	2
1.0	9.356	93.373	19515	2.121	2

从上述实验结果可知, 流速越大, 保留时间提前, 重组人白介素 -11 的理论塔板数和分离度逐渐下降。在不同流速的色谱条件下, 所有结果均符合 2015 年版《中国药典》对重组人白介素 -11 理论塔板数不低于 1500 的规定, 重组人白介素 -11 主峰与相邻杂质的分离度均符合要求, 主峰的纯度结果无明显差异, 且杂质峰数量一致, 为缩短分析时间, 故本实验选择 1.0 mL/min 的流速为实验流速。

### 2.2 进样量考察

2015 年版《中国药典》规定人白介素 -11 上样量不得低于 20 μg, 本实验考察了 20 μg、30 μg 和 50 μg 不同的上样量对样品纯度分析的影响, 结果如表 2 所示。

表 2 不同上样量下样品纯度分析结果

上样量 (μg)	主峰面积 (%)	最大杂质面积 (%)	总杂质面积 (%)	主峰分离度	杂质峰个数
20	93.373	6.029	6.627	2.121	2
30	93.085	6.264	6.915	2.119	2
50	93.130	6.254	6.870	2.148	2
RSD (%)	0.166	2.144	2.277	---	---

从上述实验结果可知，在上样量不小于 20 μg 的条件下，上样量 20 μg、30 μg 和 50 μg 对杂质峰和人白介素 -11 主峰的纯度分析结果无明显影响。

### 2.3 空白考察

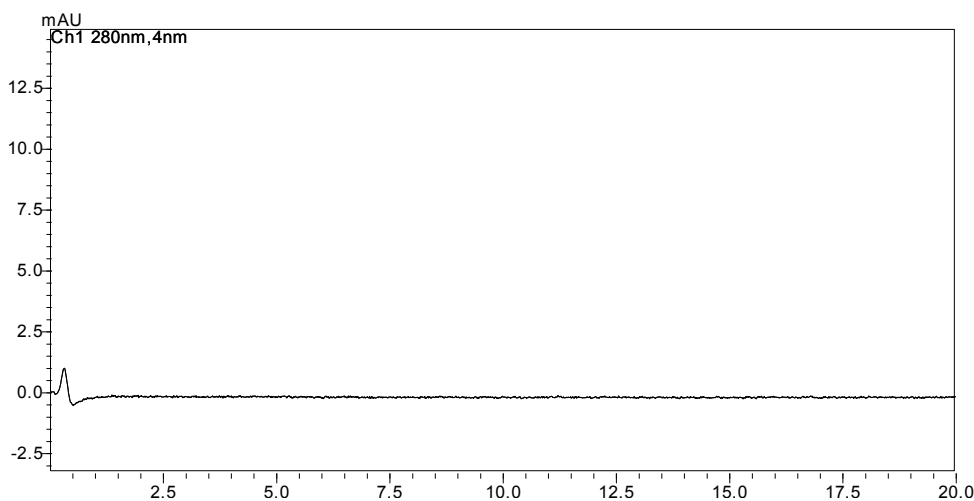


图 3 空白溶液色谱图

由上图可知，空白溶剂在人白介素 -11 主峰和杂质峰出峰位置均无明显色谱峰，不影响样品纯度的测定。

### 2.4 重复性考察

在 1.0 mL/min 的流速、上样量 20 μg 的条件下，对 5 mg/mL 的样品溶液重复测定 6 次，重复性样品典型色谱图及结果如图 4 和表 3 所示。重复测定 6 次，杂质峰数量一致，主峰与杂质峰分离度无明显变化，重组人白介素 -11 主峰保留时间 RSD 为 0.052%，主峰、最大单杂及总杂含量的 RSD 分别为 0.065%、0.670% 和 0.910%，重复性良好。

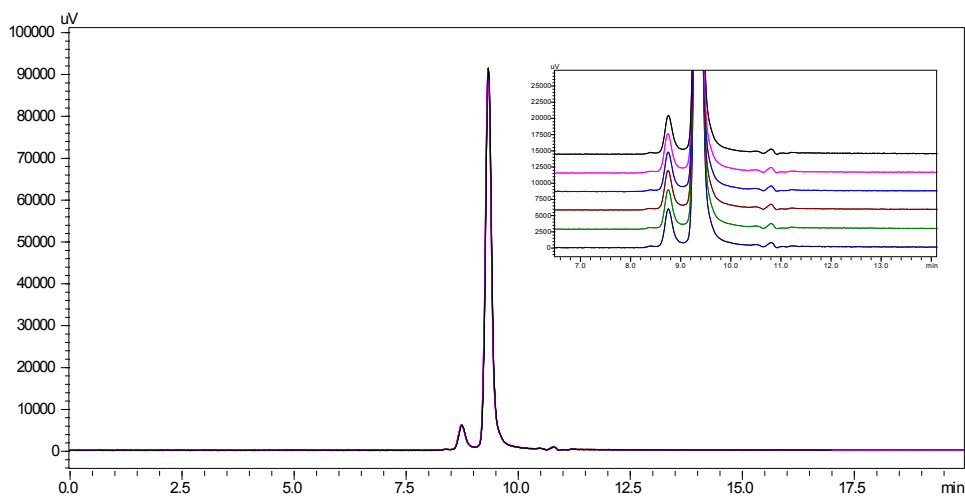


图 4 重复性样品色谱图 (n=6)

表 3 重复性实验结果 (n=6)

No.	主峰保留时间 (min)	主峰面积 (%)	最大杂质面积 (%)	总杂质面积 (%)	分离度	杂质峰个数
1	9.356	93.373	6.029	6.627	2.121	2
2	9.347	93.355	6.012	6.645	2.132	2
3	9.352	93.254	6.110	6.746	2.126	2
4	9.350	93.218	6.106	6.782	2.122	2
5	9.354	93.340	6.040	6.660	2.133	2
6	9.361	93.299	6.063	6.701	2.130	2
RSD (%)	0.052	0.065	0.670	0.910	---	---

### 2.5 主要未知杂质分析

2015年版《中国药典》规定以 SEC 方法进行纯度分析时，以面积归一化法计，重组人白介素 -11 主峰峰面积不得低于总峰面积的 95%。从上述实验结果可知，测试样品中分子量在 5 ~ 150 kDa 的杂质峰面积大于总峰面积的 5%，主要原因是主峰前的杂质峰含量较高。本实验以 6 种标准蛋白进行 SEC 测定，绘制标准曲线，通过分子量校准曲线计算重组人白介素 -11 主峰和杂质峰分子量。

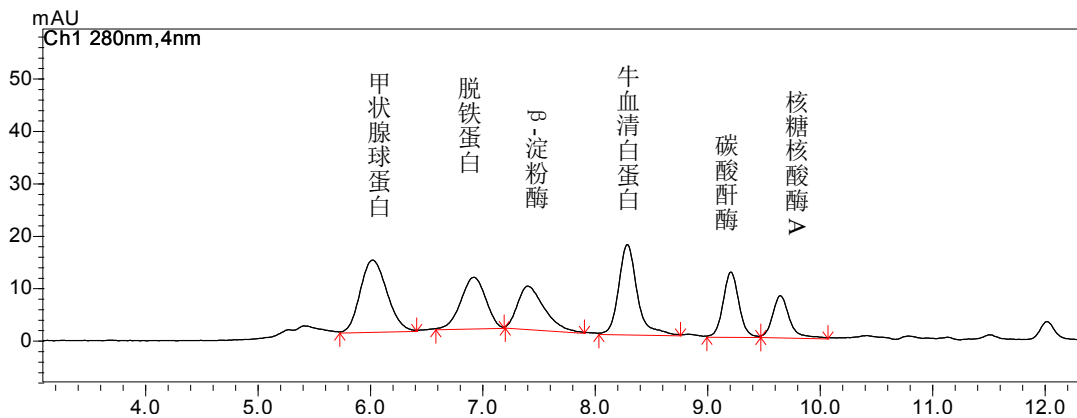


图 5 标准蛋白 SEC 色谱图

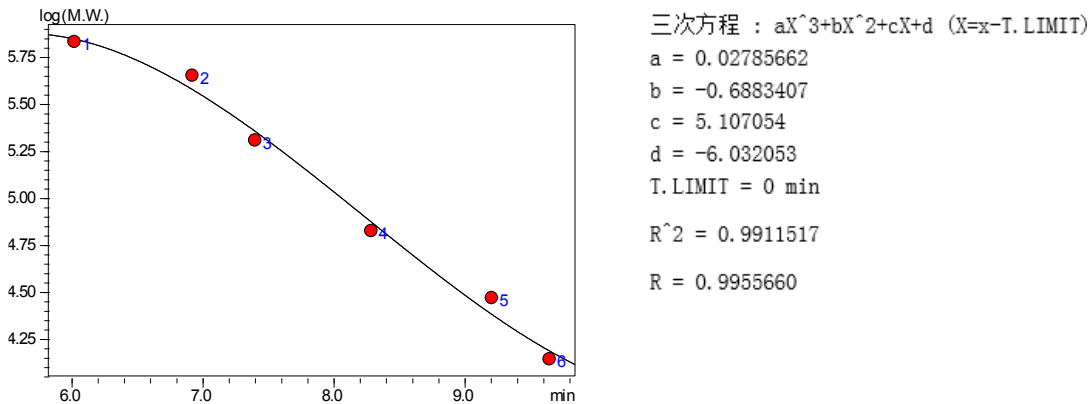


图 6 标准蛋白 SEC 标准曲线图及方程

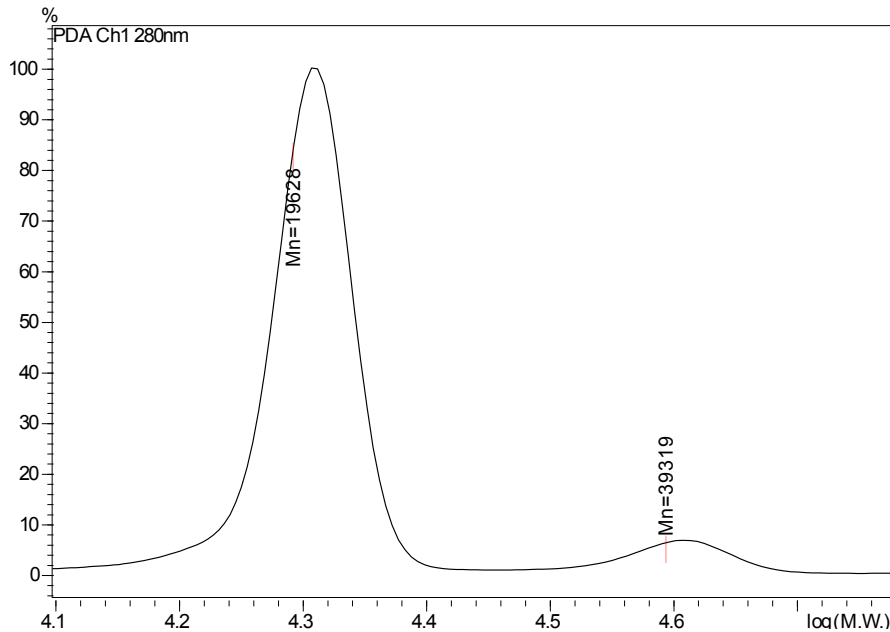


图7 重组人白介素 -11 主峰及最大杂质峰分子量测定结果

从上述结果可知，在本实验条件下 6 种蛋白质均能较好地分离。用标准蛋白以三次方程进行拟合并绘制标准曲线，得到重组人白介素 -11 的数均分子量为 19628Da，符合 2015 年版《中国药典》分子量项下的规定，即分子量为 19.0 kDa $\pm$ 1.9 kDa。同时，主峰前的最大杂质峰分子量计算结果为 39319 Da，由此推测样品中最大杂质为人白介素 -11 的二聚体峰。

## ■ 结论

本实验采用岛津生物液相系统 Nexera Bio 以体积排阻色谱法对注射用重组人白介素 -11 进行了纯度分析。以岛津 Shim-Sen SEC-H 300 体积排阻色谱柱为色谱柱，考察了流速、上样量和空白溶液对样品纯度测定的影响。结果表明空白溶剂对纯度测定无明显影响，在 1.0 mL/min 的流速及 20  $\mu$ g 上样量条件下，重组人白介素 -11 主峰与相邻杂质峰分离效果良好且能有效检出样品中所含的杂质。样品经 6 次重复测定，重组人白介素 -11 主峰保留时间 RSD 为 0.052%，主峰、最大单杂及总杂含量的 RSD 分别为 0.065%、0.670% 和 0.910%，测定重复性良好。经标准蛋白质 SEC 分析测定，以标准曲线计算分子量，推测待测样品中最大单杂为重组人白介素 -11 的二聚体。