



制药

## 作为多功能质量控制工具的台式NMR： 以泊洛沙姆药典测试为例

文：Michal Stricker、Barbara Czarniecki、Clemens Anklin、  
Fabrice Moriaud、Victor Beaumont、Anna Codina和Valentin Poirier  
2024年6月

Innovation with Integrity

泊洛沙姆在药物制剂中是不可或缺的非离子表面活性剂。其成分会显著影响其功能特性，因此，需要进行NMR分析，以符合其《美国药典》和《欧洲药典》各论的合规性要求。布鲁克Fourier 80台式核磁共振波谱仪是进行这类测试的理想解决方案：它满足药典规定的所有技术要求，同时将NMR功能集成在紧凑、无制冷剂冷却的系统中，非常适用于质量控制实验室。布鲁克GxP工具包集布鲁克的多年经验于一身，能够在不影响易用性和自动化功能的前提下，帮助实现法规要求的全面合规。

泊洛沙姆是一类三嵌段共聚物，由一个中心聚氧丙烯（PPO）嵌段和两个聚氧乙烯（PEO）链组成（见图1）。其中PPO核心是疏水性的，PEO链是亲水性的，这使得泊洛沙姆成为非离子表面活性剂的典型代表。在20世纪50年代，泊洛沙姆首次作为洗涤剂，由BASF申请专利，后来却在药物制剂领域愈发受到关注<sup>1</sup>：最初以商品名Pluronic<sup>®2</sup>问世，这些合成聚合物因能够通过降低表面和界面张力，稳定药物制剂，而崭露头角。这一特性对于防止蛋白质聚集和变性特别重要。在各种市售产品中，泊洛沙姆188和泊洛沙姆407因其在药物增溶和稳定方面的有效性，而特别受到重视，这证明了它们在多种药物制剂中的安全性和有效性。<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kabanov等人，Journal of Controlled Release, **2002**, 82, 189-21

<sup>2</sup> 后来还出现了一些商品名称，例如 Lutrol<sup>®</sup>、Kolliphor<sup>®</sup>、Antarox<sup>®</sup>和 Synperonics<sup>®</sup>。

<sup>3</sup> Thomas等人，Acta Biomaterialia, **2020**, 110, 37-67; Muniz等人，Biomaterials Advances, **2023**, 151, 213484

泊洛沙姆在基于蛋白质的治疗药物或生物制剂中特别重要，这是因为后者容易不稳定和聚集。对此，泊洛沙姆不仅能增强这些敏感分子的物理稳定性，还能提高它们的生物利用度和疗效。<sup>4</sup>相比传统的药物表面活性剂，例如，聚山梨酯，泊洛沙姆更有优势，这是因为，聚山梨酯在强化条件下，可能降解，并形成颗粒。<sup>5</sup>因此，在易受氧化强化影响，或有严格储存条件要求的制剂中，泊洛沙姆愈发受到青睐。<sup>3</sup>

多年来，泊洛沙姆的重要性已为药典所认可，泊洛沙姆也被归类到赋形剂/试剂类别中。两大药典《美国药典/国家处方集（USP-NF）》和《欧洲药典（Ph. Eur.）》均对多种泊洛沙姆制定了各论<sup>6</sup>，如表1所示，《中国药典》则重点关注常见的泊洛沙姆188和407，规格相同。不过，值得注意的是，这些各论中列出的参考文献仅代表了一小部分市售泊洛沙姆。

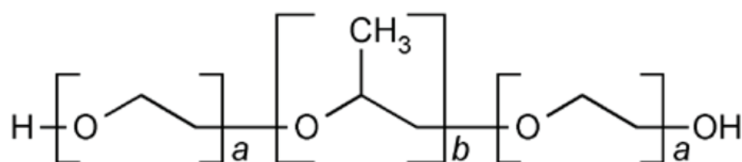


图1 《美国药典》中报告的泊洛沙姆结构示意图。

| 泊洛沙姆 | 物理形态 | 平均分子量         | 氧乙烯重量 (%)  | a   | b  |
|------|------|---------------|------------|-----|----|
| 124  | 液体   | 2090 - 2360   | 46.7 ± 1.9 | 12  | 20 |
| 188  | 固体   | 7680 - 9510   | 81.8 ± 1.9 | 80  | 27 |
| 237  | 固体   | 6840 - 8830   | 72.4 ± 1.9 | 64  | 37 |
| 338  | 固体   | 12700 - 17400 | 83.1 ± 1.7 | 141 | 44 |
| 407  | 固体   | 9840 - 14600  | 73.2 ± 1.7 | 101 | 56 |

表1 《美国药典》各论的泊洛沙姆规格。《欧洲药典》各论的规格与此相同，只是在a和b值上有所不同。

由于泊洛沙姆的自组装和热凝胶特性与每个嵌段的长度和比例密切相关<sup>7</sup>，对这些特性进行控制，对于确保给定的药品批次符合药品用途至关重要。在《美国药典》和《欧洲药典》的各论中，这是通过组合使用两种方法来实现的<sup>8</sup>：

- 专门的滴定法，测量整体平均分子量。
- 核磁共振（NMR）法，测定氧乙烯的重量百分比（也称为PEO含量，或EO/PO比），这直接与a和b嵌段之间的比率相关。

<sup>4</sup> Lamprecht等人, *Pharmaceutics*, **2022**, 14, 2575

<sup>5</sup> Wang等人, *J. Pharm. Sci.* **2019**, 3, 1264-1271; Grapentin等人, *J. Pharm. Sci.*, **2020**, 109, 2393-2404

<sup>6</sup> 《欧洲药典》编号1464

<sup>7</sup> 在各论中，使用“xyz”数字表示实际的比例和长度。数字xy乘以100相当于氧化丙烯中心的近似分子量，z乘以10表示氧乙烯含量的百分比。但并非所有商品名称都使用相同的命名法。

<sup>8</sup> 《欧洲药典》还使用另一种红外鉴定法。

NMR波谱分析技术，是一种非常成熟的结构表征方法。在聚合物方面，NMR是唯一能够提供详细的组成表征，并研究其微观结构的分析技术，它具有定量分析和非破坏性的显著优势。因此，使用NMR，可以轻松测定嵌段共聚物中重复单元的比例，这是其他技术几乎无法实现的，或者需要很大的工作量（例如，产品完全变性），才能实现。对于明确定义结构的聚合物，通常也可以利用链端共振，来测定平均链长（从而测定平均分子量）。使用扩散有序光谱（DOSY）等现代NMR法，也可以直接获取聚合物的统计分布信息，类似于体积排阻色谱（SEC）。

然而，药典的方法倾向于在设备和专业知识方面采用最“易于获得”的程序。长期以来，由于高系统成本和高专业知识水平要求，人们普遍认为，应当避免在药典程序中采用NMR技术。尽管NMR已迅速成为学术界的基本分析技术之一，但在私营企业的普及却非常有限，符合GMP的系统更是稀缺。然而，这一观念正在迅速改变。由于用户界面的显著改进、全自动化的程序和简化的维护操作，如今的波谱仪变得更易于使用，即便非专家人员也可以进行日常操作。最近NMR波谱仪在GMP合规性方面取得的进展，以及台式系统的推出，进一步加速了这一进程，正如ICHQ2(R2)中对NMR的引入，以及USP<761>和<1761>的修订所证实的那样。<sup>9</sup>

在这种历史背景下，在泊洛沙姆各论中，整体平均分子量的控制过程是一个典型的例子：长久以来，人们选择了冗长繁琐的化学滴定法，而不是NMR或SEC——因为滴定法只需少量的化学品和玻璃器皿。如果我们重新审视这个选择，对于氧乙烯的重量百分比的测定，从一开始就没有找到比NMR更好的替代方法，而NMR也确实成为了药典工具。因此，可以将历史上的泊洛沙姆各论，看作是药典采纳现代技术的先驱之举。

利用NMR对泊洛沙姆进行氧乙烯重量百分比测定十分简单，它包括简单的样品制备（将泊洛沙姆溶解在氘代溶剂中）、波谱获取和数据分析。因此，《美国药典》和《欧洲药典》中描述的分析程序在细节上非常相似。唯一的明显区别在于，《欧洲药典》仅指定使用CDCl<sub>3</sub>作为溶剂，而《美国药典》则允许使用D<sub>2</sub>O和CDCl<sub>3</sub>，但要求使用化学位移标准物质（DDS或TMS），更令人惊讶的是，它还要求在使用CDCl<sub>3</sub>时加入一滴D<sub>2</sub>O。后面的这一条指示可能被许多实验室忽略了，但在本地标准操作程序中必须提供正式的理由。在这两种情况下，都可以使用<sup>1</sup>H NMR谱的积分比，来直接测定氧乙烯的重量百分比。由于NMR是一种绝对方法，共振面积与相关核数成正比，因此，可用于测定摩尔比。在本例中，A<sub>2</sub>区域（3.8-3.2 ppm）对应于嵌段共聚物的两个重复单元（氧化丙烯和氧乙烯单元的CH<sub>2</sub>/CH信号），而A<sub>1</sub>区域（约1.08 ppm）对应于氧化丙烯单元的CH<sub>3</sub>基团（见图2）。<sup>10</sup>各论直接提供了公式（见下），将这些原始相对积分值转换为最终的氧乙烯重量百分比结果，以便与规格进行比较：<sup>11</sup>

$$\%W_{oxyethylene} = \frac{3300 \alpha}{33 \alpha + 58} \text{ where } \alpha = \frac{A_2}{A_1} - 1$$

公式1

<sup>9</sup> 截至2024年6月。

<sup>10</sup> 各区域按各论中规定的方式报告。

<sup>11</sup> 有关公式的详细说明，请参阅应用指南《使用Fourier 80全自动定量分析泊洛沙姆中的氧乙烯》。

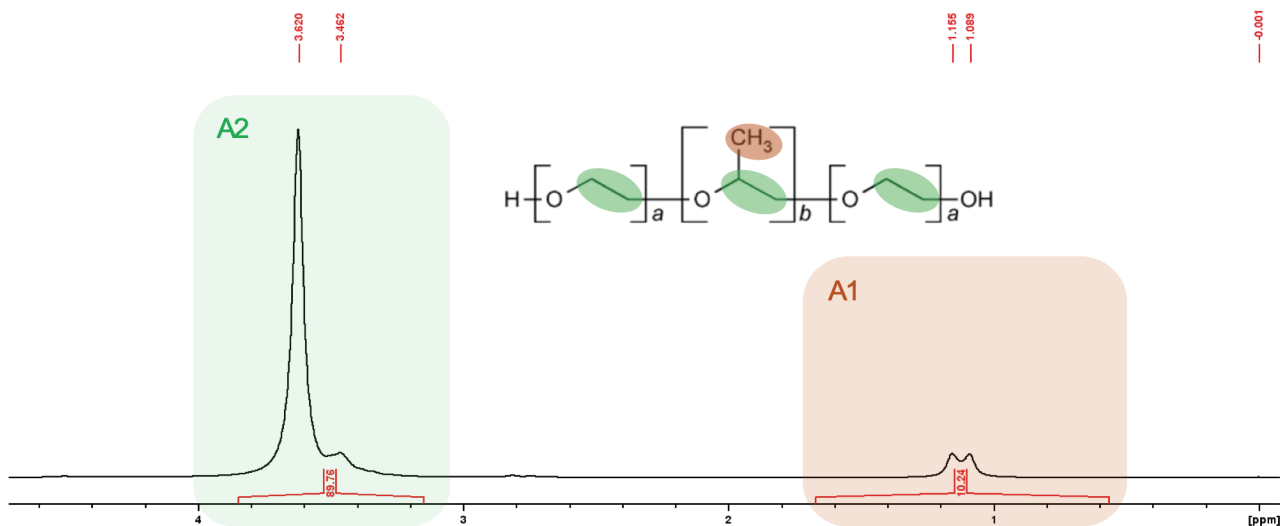


图2: 根据《美国药典》和《欧洲药典》使用Fourier 80记录的、在CDCl<sub>3</sub>中的典型泊洛沙姆188的<sup>1</sup>H谱示例。各论中定义的A1和A2区域以彩色显示, 并表明了结构归属。

如谱图(图2)所示, 两个兴趣区域A1和A2是明显分开的, 台式核磁共振波谱仪(例如, 布鲁克Fourier 80)的分辨率明显超过了这些区域单独积分所需的要求。尽管Fourier 80波谱仪的灵敏度和分辨率本质上不如高场NMR波谱仪, 但其性能非常适用于这类药典测试。该系统在满足了常规测试所需的简便性和稳健性的同时, 在很大程度上缓解了质量控制实验室部署高场NMR波谱仪的挑战。表2和图3展示了Fourier 80成功应用于验证多种市售泊洛沙姆(根据《美国药典》和《欧洲药典》各论在CDCl<sub>3</sub>中进行测试)的一致性, 包括表1中指定的两种泊洛沙姆。

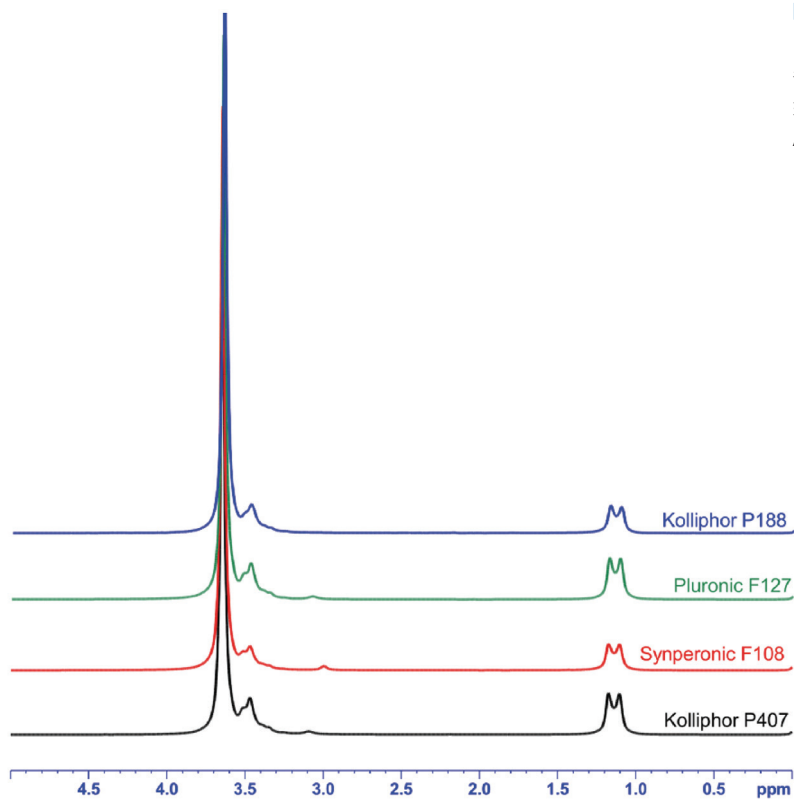


图3 使用Fourier 80, 根据《美国药典》和《欧洲药典》各论记录的4种市售泊洛沙姆的<sup>1</sup>H NMR谱(放大A1和A2区域)。

| 泊洛沙姆             | POE编号 | 测定的POE含量(%w/w) | 发布的POE含量(%w/w) |
|------------------|-------|----------------|----------------|
| Kolliphor® P188  | P188  | 80.4           | 80.3           |
| Kolliphor® P407  | P407  | 72.7           | 72.5           |
| Synperonic® F108 | P308  | 80.2           | approx. 80     |
| Pluronic® F127   | P367  | 72.6           | approx. 70     |

表2:使用Fourier 80,根据《美国药典》和《欧洲药典》对市售泊洛沙姆进行PEO含量测试的示例。

为了进一步突显NMR法在低场下的精度,表3展示了一项重复性研究结果,该研究针对泊洛沙姆188的一个批次中的8种单独制备的样品进行了测试。该研究得出的标准偏差为0.2%,完全符合《美国药典》对药物物质(而非赋形剂)精度不超过1%的最严格标准。

| 样品   | 测定的POE含量(%w/w) |
|------|----------------|
| #1   | 80.1           |
| #2   | 80.4           |
| #3   | 80.6           |
| #4   | 80.3           |
| #5   | 80.5           |
| #6   | 80.4           |
| #7   | 80.3           |
| #8   | 80.6           |
| 平均值  | 80.4           |
| %RSD | 0.2%           |

表3:使用Fourier 80,根据《美国药典》和《欧洲药典》各论,进行POE含量测试的精度研究结果(泊洛沙姆188的一个批次中的8种单独制备的样品)。

此外,为了进一步证明NMR法的总体稳健性,我们仍然使用Fourier 80在明显较低的浓度下(稀释到60倍,相当于在0.6 mL CDCl<sub>3</sub>中溶解1 mg样品),测定了氧乙烯的重量百分比。这些浓度远低于各论规定的最低浓度,但测定值(表4)仍在可接受的范围内,仅略微超过上述重复性结果的3σ区间。虽然在纯产品测试中并不会在定量限附近进行操作,但这个例子展示了NMR法在分析中有很大的操作范围。

| Kolliphor® P188 | 测定的POE含量(%w/w) | 信噪比   |
|-----------------|----------------|-------|
| 4 mg            | 80.3           | 47.89 |
| 2 mg            | 80.1           | 27.55 |
| 1 mg            | 79.8           | 11.83 |

表4:使用Fourier 80,根据《美国药典》和《欧洲药典》进行POE含量测试时稀释产生的影响(示例)。SNR指的是,使用2 ppm噪声区域确定的A1区域信号的信噪比。

借助最新的硬件和软件技术,Fourier 80台式核磁共振波谱仪为执行本文示例的药典分析,提供了理想的解决方案。这个系统非常适合QC实验室,提供了一个紧凑、无制冷剂冷却的设置,维护需求极低,同时仍具备实验室环境中的NMR波谱仪的优势

和性能。作为目前最通用和最耐用的分析技术之一，该系统可用于一系列基于NMR的药典测试或定制的定性和定量分析。<sup>12</sup>此外，它还可以作为一种强大的工具，用于调查其他分析方法的不合格和异常趋势的结果，能够快速检查混合物或识别未知产品。

最后，必须强调的是，与所有药典程序一样，在进行氧乙烯重量百分比测试，以产生可报告的数值时，必须严格遵守药品法规。这不仅包括系统地执行各论规定的要求，还包括相关药典总章节的要求，以及更广泛的本地药品测试法规，例如《动态药品生产管理规范(cGMP)》。虽然测试实验室中已经确定了这些一般框架，但人们并不熟悉其与NMR相关的细微差别。在泊洛沙姆各论方面，《美国药典》和《欧洲药典》都提供了简略的NMR方法描述，这需要测试实验室查阅相应的NMR<sup>13</sup>总章节，以确保程序符合预期目的。这个过程还包括在使用之前，确定用于程序验证的协议和标准。<sup>14</sup>对于非专家实验室来说，这些总章节中的技术细节可能显得令人生畏。布鲁克GxP Readiness Kit (适用于Fourier 80) 可以减轻这一潜在障碍，帮助实验室实现完全合规：提供支持文档，帮助完成初始仪器资格鉴定，包括其计算机化系统；随后，提供全面的工具，帮助用户设计和维护持续的性能鉴定。该软件可确保数据的完整性，并支持常规测试的全自动化，同时提供所需的灵活性，以便多应用和多用户的同时操作。为了说明这一点，图4展示了使用布鲁克Fourier 80 NMR波谱仪和布鲁克GxP Readiness Kit Enterprise进行泊洛沙姆NMR测试的全自动工作流程。

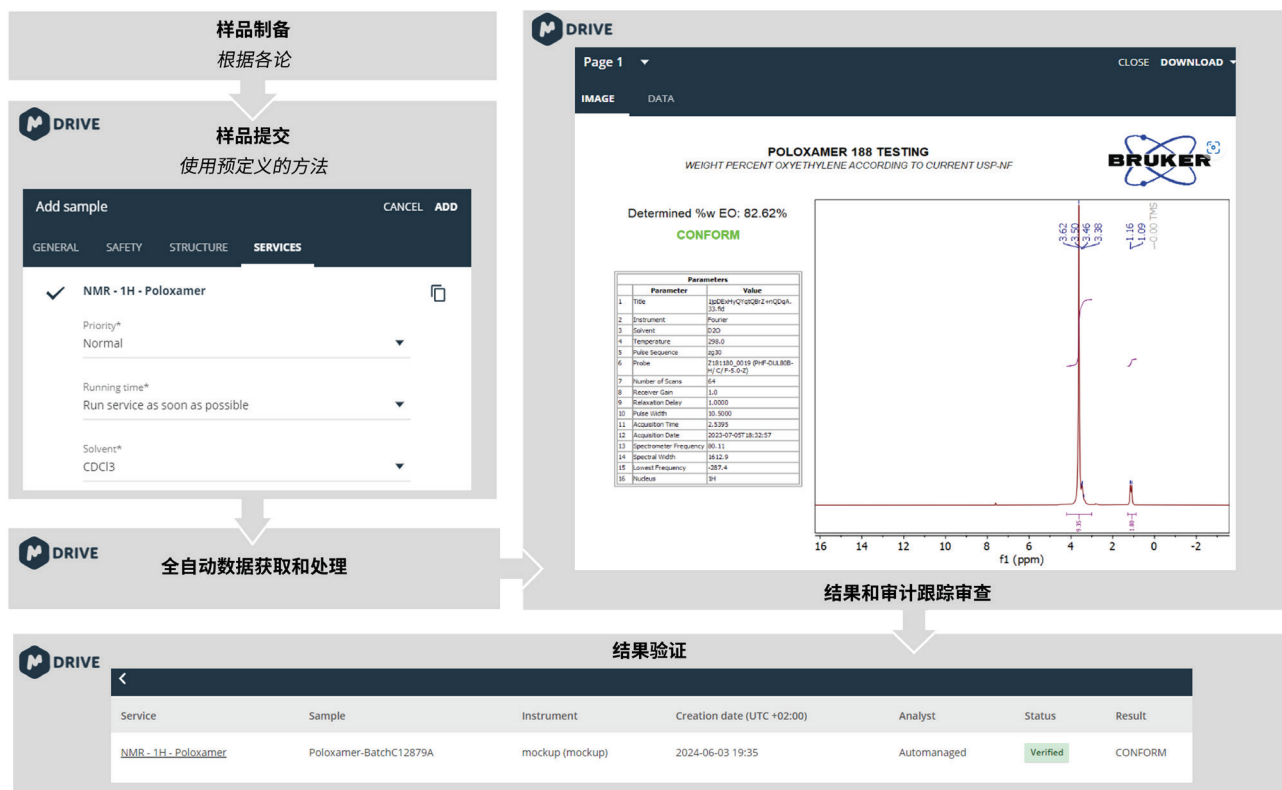


图4:使用Fourier 80和Bruker GxP Readiness Kit Enterprise,按照《美国药典》和《欧洲药典》进行泊洛沙姆全自动NMR测试的工作流程。整个分析周期在Web界面(Mdrive)执行。数据和审计跟踪保存在服务器数据库中,确保数据完整性。

<sup>12</sup> 截至2024年6月的<761>和<1761>的当前草案很好地概述了NMR在QC应用中的应用范围。

<sup>13</sup> 《美国药典》<761>;《欧洲药典》2.2.33。

<sup>14</sup> 根据《美国药典》<1226>的要求。



布鲁克磁共振微信公众号

● **布鲁克 (北京) 科技有限公司**

网址: [www.bruker.com](http://www.bruker.com)  
E-mail: [sales.bbio.cn@bruker.com](mailto:sales.bbio.cn@bruker.com)  
布鲁克应用技术咨询:  
400-898-5858  
布鲁克售后技术支持:  
400-898-1088

布鲁克 (北京) 科技有限公司  
北京市海淀区西小口路66号  
中关村东升科技园B-6号楼C座8层  
邮编: 100192  
电话: (010) 58333000  
传真: (010) 58333299

上海办公室  
上海市闵行区合川路  
2570号1号楼9楼  
邮编: 200233  
电话: (021) 51720800  
传真: (021) 51720810

广州办公室  
广州市海珠区新港东路  
618号南丰汇6楼A12单元  
电话: (020) 22365885/  
(020) 22365886