

注射用雷替曲塞的稳定性试验研究

居靖*(安徽医科大学附属安庆医院,安徽安庆 246003)

中图分类号 R944.4; R979.1² 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3513-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.21

摘要 目的:考察注射用雷替曲塞的稳定性,为临床贮存、使用药品提供科学依据。方法:按2010年版《中国药典》药物制剂稳定性试验指导原则进行影响因素试验[60、40℃高温试验,25℃、相对湿度92.5%高湿度试验和(4 500±500)lx强光照试验]、加速试验(40℃、相对湿度75%和30℃、相对湿度65%)和长期试验(25℃、相对湿度60%,12个月),考察注射用雷替曲塞在不同试验条件下的外观性状、pH、有关物质和主成分含量变化,采用高效液相色谱法测定有关物质和主成分含量。结果:影响因素试验显示,样品在60℃及强光照条件下含量降低,有关物质明显增加;而加速试验和长期试验考察结果显示各项质量指标未见明显变化。结论:注射用雷替曲塞在高温及强光照条件下不稳定,建议在20℃避光、密闭条件下贮存。

关键词 注射用雷替曲塞;稳定性试验;高效液相色谱法

Study on Stability of Raltitrexed for Injection

JU Jing (Anqing Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Anqing 246003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the stability of Raltitrexed for injection, and to provide scientific basis for storage and utilization of drugs. METHODS: The appearance, pH, related substances and contents of Raltitrexed for injection were investigated by influential factor test [high temperature test (60℃ and 40℃), high humidity test (25℃, relative humidity 92.5%) and (4 500±500)lx strong light test], accelerated test [40℃(relative humidity 75%), 30℃(relative humidity 65%)] and long-term test [25℃(relative humidity 60%) for 12 months], according to the guidance for stability test of preparation stated in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). HPLC was used to determine its contents and its related substances. RESULTS: Results of influential factor tests showed that the contents of raltitrexed decreased and related substances increased markedly under 60℃ and strong light conditions. Results of accelerated test and long-term test showed that no significant change was observed in quality specifications. CONCLUSIONS: Under the condition of strong light and high temperature, Raltitrexed for injection is not stable. It should be kept in light-resistant, sealed container at 20℃.

KEY WORDS Raltitrexed for injection; Stability tests; HPLC

雷替曲塞(Raltitrexed)为高选择性抗代谢药,是新一代水溶性胸苷酸合成酶抑制剂,为喹唑啉叶酸盐类似物。其在体内被细胞主动摄取后很快被叶酸基聚谷氨酸合成酶代谢为一系列多聚谷氨酸类化合物,这些代谢物比雷替曲塞具有更强抑制胸苷酸合成酶的作用,从而抑制细胞DNA合成,且能留在细胞内长时间发挥细胞毒作用^[1-2]。临床用于治疗晚期结直肠癌、胃癌、恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌、头颈癌等^[3]。注射用雷替曲塞1996年在英国上市,国内由南京正大天晴制药有限公司在2009年上市。鉴于雷替曲塞的临床应用日益广泛,但在我国南方高温、高湿环境下贮存、使用过程中可能会受外界环境因素的影响导致发生分解变质。为减少因此而导致的药物疗效降低或副作用增加,本文根据2010年版《中国药典》药物制剂稳定性试验指导原则要求^[4],考察了注射用雷替曲塞在不同温度、湿度、光线影响下,其杂质、含量等项目随时间变化的规律,为贮存及临床使用注射用雷替曲塞提供科学依据。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); LHH-500SD 加速稳定性试验箱、LHH-500SD 长期稳定性试验箱(上海蓝豹试验设备有限公司); XP205 型电子分析天平(瑞

士 Mettler-toledo 公司); PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

注射用雷替曲塞(批号:111219、111222、111226,规格:每支2mg)、雷替曲塞对照品(批号:110902,纯度:99.6%)均由南京正大天晴制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 有关物质检查及含量测定

2.1.1 色谱条件^[5-6]。色谱柱:Inersil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:0.005 mol/L 氢氧化四丁基铵溶液(取10%氢氧化四丁基铵溶液13 ml,加水900 ml,用10%磷酸调节pH值为7.0,加水稀释至1 000 ml)-乙腈(70:30, V/V);流速:0.8 ml/min;柱温:25℃;检测波长:226 nm;进样量:10 μl。

2.1.2 溶液的制备。(1)供试品溶液的制备:取注射用雷替曲塞5 mg,置于10 ml量瓶中,加流动相温热溶解,冷却后用流动相稀释到刻度,摇匀,作为供试品溶液。(2)对照溶液的制备:精密量取供试品溶液适量,加流动相制成5 μg/ml的溶液,作为对照溶液。(3)对照品溶液的制备:精密称取雷替曲塞对照品51.05 mg,置于50 ml量瓶中,加入适量流动相使溶解后,用流动相稀释至刻度摇匀,作为标准贮备液。取标准贮备液适量,置于50 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,即得。

2.1.3 系统适用性试验。雷替曲塞合成反应步骤较多,可能存在的中间体及副反应产物也较多,如L-氨基物、雷替曲塞二

*副主任药师,硕士。研究方向:临床药理学与新制剂研发。电话:0556-5542019。E-mail:ju051205@126.com

乙酯等。雷替曲塞中的有关物质系合成过程中带入的原料、中间体、副反应产物及贮存过程中可能产生的降解产物,雷替曲塞R-对映异构体等,故需采用分离度及灵敏度较高的高效液相色谱法进行有关物质检查及含量测定。取供试品溶液和对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样,色谱见图1。

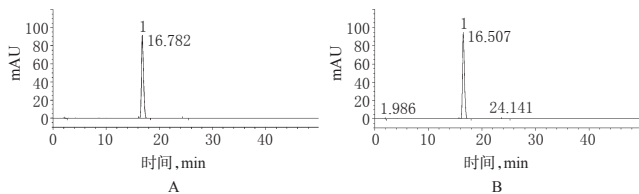


图1 高效液相色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. 雷替曲塞

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution; B. sample solution; 1. raltitrexed

从图1可见,各杂质峰与主成分峰的分离度 >1.5 ,理论板数按雷替曲塞峰计不低于2000。

2.1.4 线性关系考察。分别精密量取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml标准贮备液,置于5个50 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。照“2.1.1”项下色谱条件,分别精密量取10 μ l进样,记录色谱图。以峰面积(y)为纵坐标,以雷替曲塞质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标,建立标准曲线,并进行线性回归,得线性回归方程: $y=3782.7x-1013.1$ ($r=0.9999, n=5$)。结果表明雷替曲塞检测质量浓度在20.4~102 μ g/ml范围内与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.1.5 精密性试验。取20.4 μ g/ml对照品溶液10 μ l,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样6次,分别记录保留时间和峰面积。结果,RSD=0.15%($n=5$),表明精密性良好。

2.1.6 稳定性试验。取20.4 μ g/ml供试品溶液1份,分别在室温放置0、2、4、6、8 h后进样10 μ l,按“2.1.1”项下色谱条件下分别测定,记录峰面积。结果,RSD=1.16%($n=5$),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.1.7 回收率试验。取雷替曲塞供试品适量,用流动相溶解并稀释得到3个浓度的样品,再分别加入对照品溶液,稀释定容,摇匀后进样分析。结果,平均回收率为100.1%,RSD=0.56%($n=9$)。

2.1.8 重复性试验。取同一批样品(批号:111219)适量,用流动相制成80 μ g/ml的溶液作为供试品溶液,共6份。分别按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,RSD=0.51%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.9 含量测定。取供试品适量,精密称定,用流动相制成80 μ g/ml的溶液作为供试品溶液,照“2.1.1”项下色谱条件,进样10 μ l;另取雷替曲塞对照品同法测定,按外标法(扣除对照品水分)以峰面积计算。

2.1.10 有关物质的检查。量取对照溶液10 μ l进样,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的20%~30%,再精密量取供试品溶液和对照溶液各10 μ l进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的2.5倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的1/2(单个杂质限量0.5%),各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的1.5倍(杂质总限量1.5%)。

2.2 稳定性试验考察

取3批样品(批号:111219、111222、111226)适量,依照2010年版《中国药典》药物制剂稳定性试验指导原则^[4],重点考察样品在高温、高湿、光照贮存条件下性状、pH、有关物质、主成分含量的变化。pH的检查方法为:取供试品适量,加水制成每1 ml中含雷替曲塞0.5 mg的溶液,测定pH值,应为7.0~9.0。

2.2.1 影响因素试验。(1)高温试验:取样品(批号:111219)适量,除去外包装,置于适宜的开口容器中,在60 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C温度下分别放置,分别于0、5、10 d时取样,按稳定性重点考察项目要求检测。(2)高湿度试验:将去掉外包装的供试品(批号:111219)在25 $^{\circ}$ C温度下于相对湿度92.5%(硝酸钾饱和溶液)条件下放置10 d,分别于0、5、10 d取样,按稳定性重点考察项目要求检测。(3)强光照试验:将去掉外包装的供试品(批号:111219)于照度为(4500 \pm 500) lx的条件下放置10 d,分别于0、5、10 d时取样,按稳定性重点考察项目要求检测,特别注意观察样品的外观变化。

2.2.2 加速试验。取3批样品各适量,于温度(40 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(75 \pm 5)%和温度(30 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(65 \pm 5)%的条件下放置6个月,分别于第0、1、2、3、6个月末取样1次,按稳定性重点考察项目要求检测。结果,因40 $^{\circ}$ C、相对湿度75%条件下加速试验2个月检测时发现有关物质质量显著增加,故结束该试验并改为在30 $^{\circ}$ C、相对湿度65%的更为温和的条件下考察。此做法符合《中国药典》2010年版药物制剂稳定性试验指导原则的要求。

2.2.3 长期试验。取3批样品各适量,于温度(25 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(60 \pm 10)%的条件下,并分别在0、3、6、9、12个月时取样,按稳定性重点考察项目要求检测。

考察结果见表1~表5。

表1 高温试验考察结果(60 $^{\circ}$ C)

Tab 1 Results of high temperature tests(60 $^{\circ}$ C)

温度, $^{\circ}$ C	时间,d	性状	pH	有关物质,%		含量,%
				单一杂质	杂质总量	
60	0	白色疏松块状物	7.62	0.26	0.59	99.3
	5	白色疏松块状物	7.68	0.30	1.40	98.9
	10	白色疏松块状物,略有萎缩	7.64	1.17	1.97	97.8
40	0	白色疏松块状物	7.62	0.26	0.59	99.3
	5	白色疏松块状物	7.71	0.22	0.64	98.8
	10	白色疏松块状物,略有萎缩	7.63	0.24	0.65	99.1

表2 高湿试验考察结果(25 $^{\circ}$ C,相对湿度92.5%)

Tab 2 Results of high humidity tests(25 $^{\circ}$ C, relative humidity of 92.5%)

时间,d	性状	pH	有关物质,%		含量,%
			单一杂质	杂质总量	
0	白色疏松块状物	7.62	0.26	0.59	99.3
5	白色疏松块状物	7.68	0.27	0.62	99.1
10	白色疏松块状物	7.61	0.27	0.63	99.0

表3 强光照试验考察结果

Tab 3 Results of strong light tests

时间,d	性状	pH	有关物质,%		含量,%
			单一杂质	杂质总量	
0	白色疏松块状物	7.62	0.26	0.59	99.3
5	白色疏松块状物	7.50	1.58	4.22	95.7
10	浅黄色疏松块状物	7.32	3.88	8.74	87.9

表4 加速试验结果

Tab 4 Results of accelerated tests

温湿度	批号	时间, 个月	外观	pH	有关物质, %		含量, %	
					单一杂质	杂质总量		
40 ℃, 相对湿度 75%	111219	0	白色疏松块状物	7.65	0.12	0.37	97.4	
		1	白色疏松块状物	7.60	0.26	0.55	97.0	
		2	白色疏松块状物	7.61	0.32	0.81	96.7	
	111222	0	白色疏松块状物	7.71	0.13	0.38	97.3	
		1	白色疏松块状物	7.65	0.27	0.56	97.2	
		2	白色疏松块状物	7.68	0.33	0.81	96.3	
	111226	0	白色疏松块状物	7.74	0.13	0.34	98.0	
		1	白色疏松块状物	7.67	0.29	0.58	98.4	
		2	白色疏松块状物	7.69	0.34	0.94	97.6	
	30 ℃, 相对湿度 65%	111219	0	白色疏松块状物	7.65	0.12	0.37	97.4
			1	白色疏松块状物	7.61	0.16	0.38	98.0
			2	白色疏松块状物	7.66	0.19	0.49	97.2
			3	白色疏松块状物	7.60	0.15	0.55	97.6
			6	白色疏松块状物	7.67	0.23	0.62	97.8
			111222	0	白色疏松块状物	7.71	0.13	0.38
		111222	1	白色疏松块状物	7.69	0.17	0.38	97.6
			2	白色疏松块状物	7.70	0.19	0.52	98.1
			3	白色疏松块状物	7.68	0.15	0.56	97.7
111226		6	白色疏松块状物	7.71	0.23	0.62	97.6	
		0	白色疏松块状物	7.74	0.13	0.34	98.0	
		1	白色疏松块状物	7.69	0.17	0.35	98.5	
		2	白色疏松块状物	7.75	0.19	0.50	98.1	
		3	白色疏松块状物	7.70	0.16	0.56	98.5	
		6	白色疏松块状物	7.78	0.23	0.63	98.1	

表5 长期试验结果(25 ℃, 相对湿度 60%, 12个月)

Tab 5 Results of long-term tests(25 ℃, relative humidity of 60%, 12 months)

批号	时间, 个月	外观	pH	有关物质, %		含量, %
				单一杂质	杂质总量	
111219	0	白色疏松块状物	7.65	0.12	0.37	97.4
	3	白色疏松块状物	7.58	0.34	0.65	97.6
	6	白色疏松块状物	7.63	0.30	0.62	96.4
	9	白色疏松块状物	7.67	0.12	0.43	98.0
	12	白色疏松块状物	7.62	0.27	0.60	98.2
111222	0	白色疏松块状物	7.71	0.13	0.38	97.6
	3	白色疏松块状物	7.67	0.34	0.67	97.8
	6	白色疏松块状物	7.70	0.31	0.64	97.0
	9	白色疏松块状物	7.75	0.14	0.46	97.5
111226	12	白色疏松块状物	7.68	0.21	0.69	97.6
	0	白色疏松块状物	7.74	0.13	0.34	98.0
	3	白色疏松块状物	7.70	0.35	0.68	98.3
	6	白色疏松块状物	7.75	0.32	0.66	97.4
	9	白色疏松块状物	7.80	0.12	0.38	98.3
	12	白色疏松块状物	7.73	0.16	0.57	98.7

由表1~表3可见, 60 ℃放置10 d后, 供试品pH未见明显改变, 但供试品略有萎缩, 含量略有下降, 有关物质明显增加; 40 ℃放置10 d后, 供试品外观形态保持良好, pH、含量和有关

物质未见明显改变。由此可知, 本品在较高温度下不太稳定, 不宜在较高温度下存放。在高湿条件下供试品外观形态保持良好, pH、含量和有关物质未见明显改变, 说明本品的内包装(胶塞)密封情况良好, 外界湿度环境不会对本品造成影响。在强光照条件下, 供试品外观颜色由白色变成浅黄色, pH也有较为明显的变化, 含量降低, 有关物质明显增加, 说明本品在强光照条件下不稳定, 建议避光放置。

由表4可见, 本品在较低温度下相对稳定。

由表5可见, 3批样品经12个月的长期留样考察, 各项质量指标与0个月比较, 未见显著变化, 说明本品在25 ℃贮存条件下12个月内能保持较好的稳定性。

3 讨论

流动相选择时, 有报道^[5]使用甲醇-0.02 mol/L Na₂HPO₄溶液(42:58, V/V, 用磷酸调pH 2.5)时pH值愈低, 峰形愈好, 分离度较好。但另有报道^[6], 在偏酸性的pH条件下, 雷替曲塞分子中羧基和氨基的电离存在着一种动态平衡, 且随着缓冲液pH或流动相比例的变化而不断变化, 从而无法得到稳定可靠的色谱图; 当缓冲液pH达到7.2时, 溶液中所有样品分子的电离情况趋于一致, 此时才能得到色谱主峰不发生裂分的稳定色谱图。经反复试验最终确定0.005 mol/L 氢氧化四丁基铵溶液-乙腈(70:30, V/V)作为流动相, 结果分离度较好, 分析效果较为满意。

综合影响因素试验、加速试验和长期试验的结果, 提示注射用雷替曲塞不宜在高温或强光下放置, 宜在密闭、凉暗、避光且不超过20 ℃处贮存。

参考文献

- [1] Jarmula A. Antifolate inhibitors of thymidylate synthase as anticancer drugs[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2010, 10(13):1 211.
- [2] Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis[J]. *Cancer Manag Res*, 2010, 2:293.
- [3] 于丽萍, 李斌. 多西他赛联合雷替曲塞治疗晚期胃癌的疗效观察[J]. *中国药房*, 2012, 23(32):3 009.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录199-201.
- [5] 金慧钮, 张根元. 高效液相色谱法测定雷替曲塞的含量[J]. *抗感染药学*, 2008, 5(1):19.
- [6] 黄滔敏, 高敏洁, 沈顺, 等. 反相高效液相色谱法测定雷替曲塞的含量和有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(9): 1 046.

(收稿日期: 2013-08-02 修回日期: 2013-08-14)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅