

文章编号:1674-2869(2013)08-0027-07

三磷酸胞苷二钠注射液生产工艺筛选

张存国^{1,3}, 孙 平², 胡方锋³

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 山东鲁抗中和环保科技有限公司, 山东 济宁 272000;
3. 山东希尔康泰药业有限公司, 山东 济宁 272100)

摘 要:为了筛选更稳定的三磷酸胞苷二钠注射液处方, 解决上市制剂有关物质偏高的问题, 采用高效液相的方法对相应处方的含量及有关物质进行了分析。从稳定剂(包括磷酸盐、碳酸盐和 L-精氨酸)、pH 值(范围为 6.0~9.0)、活性炭用量(范围为 0.02%~0.5%)和灭菌条件(包括过滤和加热)等方面对有关物质和含量的影响进行了研究考察。稳定性研究结果表明最佳配方及条件是:以 L-精氨酸为稳定剂, 用量的质量分数为 4%; pH 在 8.2~8.5 之间; 活性炭用量的质量分数为 0.1%; 用过滤除菌的方法; 贮藏条件为 4~8℃, 凉暗处保存。该条件下制剂处方最稳定, 其有关物质的质量分数为 5% 以下, 远低于现行标准(上市样品标准为不得大于 12%), 对工业应用有一定的价值。

关键词:三磷酸胞苷二钠注射液; pH 有关物质; L-精氨酸 过滤除菌

中图分类号: TQ46

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2013.08.006

0 引 言

三磷酸胞苷二钠注射液为核苷酸类药物制剂, 它的有效成分是三磷酸胞苷, 能够对抗由自由基和兴奋性氨基酸引起的神经细胞损伤^[1]。还有利于改善和调节神经胶质细胞、神经细胞和血管壁细胞膜性结构的合成与构建, 临床上主要用于治疗多种原因引起的神经系统疾病及血管硬化症^[2]。由于具有这些独特的药理作用和治疗机制, 使它在防治脑血管病方面独树一帜^[3]。

根据有关文献报道^[1], 影响三磷酸胞苷二钠注射液稳定性的影响因素很多, 但主要有温度、所添加的稳定剂和溶液的酸碱度。三磷酸胞苷二钠(CTP)注射液不稳定是由于三磷酸胞苷二钠分子中的两个磷酸酯键在水溶液中易水解, 其水解速度受到温度、pH 的影响更甚, 因此该注射液在生产 and 贮存过程中很容易脱掉磷酸键, 降解成二磷酸胞苷(CDP)及一磷酸胞苷(CMP)而使有关物质升高。

可见有关物质是个比较难控制的问题, 因此从有关物质和制剂稳定性方面考虑, 在制剂工艺处方筛选研究中, 分别考察了不同稳定剂、溶液的 pH、L-精氨酸用量、活性炭用量、灭菌条件等因素对制剂含量和有关物质的影响, 而且对制剂的稳

定性进行了同步考察, 根据实验结果选择最佳处方及工艺。

1 实验部分

1.1 材料

材料:三磷酸胞苷二钠(杭州澳亚生物技术有限公司), 参照标准:国家标准 WS1-XG-012-2001, L-精氨酸(石家庄精晶药业有限公司), 检验标准:中国药典 2010 版^[4]二部。上市样品:三磷酸胞苷二钠注射液(济南利民制药有限公司), 批号 12030611, 检验标准:WS1-XG-013-2001。试制样品(自制), 批号 120906。

1.2 仪器

仪器:HH-S 电热恒温水浴锅(东台市跃进电器厂), Water1525 高效液相色谱仪, 日本岛津 2450 紫外-分光光度仪, LHU-213 恒温恒湿箱(ESPEC ENVIRONMENTAL EQUIPMENT 公司), YG-4 药物光照试验仪(中国制剂国家工程研究中心), FE20K 梅特勒酸度计(上海梅特勒公司), BCM-1000/BCM-1300 型净化台(苏州尚田洁净技术有限公司), YB-II 型澄明度检测仪(天津市拓普仪器有限公司), BA-80 型台式蒸汽灭菌器(上海人和科学仪器有限公司), ZX-10 型半自动注射液液体灌装机(广州世峰电器有限公司)。

收稿日期:2013-05-14

作者简介:张存国(1976-), 男, 山东兖州人, 高级工程师, 硕士。研究方向:化学药品研发、注册、GMP 认证。

2 处方筛选

2.1 稳定剂的筛选

根据关于三磷酸胞苷二钠注射液的有关稳定性研究中的处方^[3],对 $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 +$

$\text{EDTA} - 2\text{Na})$ 、(无水 $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 + \text{EDTA} - 2\text{Na})$ 、L-精氨酸和不加任何稳定剂的几种情况进行了考察,比较加热前和 100 ℃水浴加热

20 min 后主药含量变化的幅度,结果如表 1 所示.

表 1 不同稳定剂对制剂稳定性的影响

Fig. 1 Effect of different stabilizers on the stability of preparation

不同稳定剂	pH 值	制剂质量分数/%		有关物质质量分数/%	
		加热前	加热后	加热前	加热后
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{EDTA} - 2\text{Na}$	8.37	110.9	101.3	3.14	13.48
无水 $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 + \text{EDTA} - 2\text{Na}$	8.62	107.8	98.7	3.14	13.26
L-精氨酸	8.16	108.4	100.6	3.10	10.99
不加任何稳定剂	8.12	107.4	93.4	3.12	18.33

从表 1 中数据可以看出,L-精氨酸作为稳定剂加热前后含量下降的幅度最小,有关物质较少,故选择 L-精氨酸作为稳定剂.

2.2 L-精氨酸用量的影响

根据 L-精氨酸在水中的溶解性能,考察了 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%,L-精氨酸用量对制剂稳定性的影响,结果如表 2 所示.

表 2 L-精氨酸用量对制剂稳定性影响

Fig. 2 Effects of L- arginine content on the stability of preparation

精氨酸用量 质量分数/%	pH 值		制剂质量分数/%		有关物质质量分数/%		可见异物	
	加热前	100 ℃×15 min	加热前	100 ℃×15 min	加热前	100 ℃×15 min	加热前	100 ℃×15 min
0.5	8.28	7.86	112.3	102.3	3.40	14.78	合格	合格
1.0	8.25	8.02	111.1	102.3	3.17	14.16	合格	合格
2.0	8.30	8.18	113.5	103.8	3.18	13.43	合格	合格
4.0	8.31	8.27	111.6	102.6	3.18	12.40	合格	合格
6.0	8.26	8.28	112.2	101.8	3.15	12.80	合格	合格

从表 2 中数据可以看出,精氨酸用量>4%时,加热前后 pH 值基本无变化;精氨酸用量<4%时,加热后 pH 值降低.精氨酸用量为 4%时,加热前后含量下降幅度最小,有关物质最小,故选择精氨酸用量为 4%.

2.3 溶液 pH 的影响

国家药品标准中三磷酸胞苷二钠注射液的 pH 值规定为 7.5~9.0,在相同条件下 100 ℃进行加热,考察不同 pH 值对制剂稳定性的影响,结果如表 3 所示.

表 3 pH 值对制剂稳定性影响

Fig. 3 Effect of pH value on the stability of the preparation

pH	pH 值		制剂质量分数/%		有关物质质量分数/%		可见异物	
	加热前	100 ℃×20 min	加热前	100 ℃×20 min	加热前	100 ℃×20 min	加热前	100 ℃×20 min
6.0	无色	无色	107.6	89.7	3.51	22.34	合格	合格
7.0	无色	无色	107.9	94.5	3.61	17.91	合格	合格
7.5	无色	无色	107.3	94.1	3.59	17.78	合格	合格
8.0	无色	无色	107.4	94.6	3.52	17.39	合格	合格
8.3	无色	无色	108.5	98.6	3.44	14.25	合格	合格
8.5	无色	无色	108.2	97.7	3.42	15.23	合格	合格
9.0	无色	无色	110.1	99.9	3.20	13.37	合格	合格

从表 3 中数据可以看出 pH 值越高对本品的稳定性越好,但考虑到临床使用的刺激性和安全性,最终选择调节溶液 pH 在 8.2~8.5 之间。

2.4 活性炭用量的影响

考察了加入质量分数为 0.02%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5% 活性炭在静置 40 min 和煮沸 15 min 后的含量变化情况,结果如表 4 所示。

表 4 不同活性炭用量对制剂含量影响

Fig. 4 Effect of different active carbon dosage on preparation content

编号	活性炭用量质量分数/%	pH 值		外观色泽	制剂质量分数/%	
		加热前	加热后		加热前	加热后
1	0.02	8.50	8.47	无色澄明液体	108.7	97.7
2	0.05	8.50	8.45	无色澄明液体	108.1	97.9
3	0.1	8.50	8.52	无色澄明液体	108.5	97.8
4	0.3	8.51	8.48	无色澄明液体	108.5	97.6
5	0.5	8.49	8.46	无色澄明液体	107.3	96.4

从表 4 中数据可以看出,活性炭不会对本品的 pH 值产生不良影响;当活性炭用量质量分数>0.5%时对本品的制剂质量分数基本无影响。因此,在本品的制备过程中,选择了加入质量分数 0.1% 活性炭,静置 40 min。

2.5 灭菌条件的影响

由于三磷酸胞苷二钠原料对热非常敏感,对本品考虑了 121 ℃ 15 min 加热除菌和 0.22 μm 滤膜过滤除菌两种方式灭菌,并且进行了灭菌前后的比较,对外观、总有关物质、无菌检查进行了比较,结果如表 5 所示。

表 5 灭菌条件影响

Fig. 5 Effect of sterilization conditions

条件	外观色泽		制剂质量分数/%		有关物质质量分数/%		无菌检查	
	灭前	灭后	灭前	灭后	灭前	灭后	灭前	灭后
过滤除菌	无色	无色	100.8	100.7	3.72	3.52	不合格	合格
加热除菌	无色	无色	100.8	89.5	3.72	18.5	不合格	合格

从表 5 中数据可以看出,本品对热非常敏感,采用过滤除菌可保证无菌检查合格的同时,保持样品的稳定。

葡萄糖注射液和 100 mL 氯化钠注射液中,检查有关物质和含量,结果如表 6 所示。

从表 6 中数据可以看出,本品与葡萄糖注射液、氯化钠注射液配伍,6 h 内稳定,没有配伍禁忌,符合注射液及输液对稳定性的要求。

3 试制样品的配伍稳定性

取本品 2 支,批号:120906,分别加入 100 mL

表 6 试制样品与葡萄糖注射液的配伍稳定性结果

Fig. 6 Results the compatible stability of sample and glucose injection

	0 h		2 h		4 h		6 h	
	制剂质量分数/%	有关物质质量分数/%	制剂质量分数/%	有关物质质量分数/%	制剂质量分数/%	有关物质质量分数/%	制剂质量分数/%	有关物质质量分数/%
葡萄糖注射液	99.7	3.37	99.5	3.35	99.6	3.36	99.5	2.34
氯化钠注射液	99.7	3.36	99.7	3.36	99.5	3.38	99.7	2.35

4 稳定性考察

根据以上研究结果的工艺及处方,制备了合格产品(1 000 支量),批号:120906。称取 L-精氨酸 80.0 g,溶解于 1 600 mL 注射用水中;称取三磷酸

胞苷二钠 40.0 g,加入上述溶液中,搅拌溶解;用盐酸调节溶液 pH 值至 7.5~9.0,加注射用水至全量;加入质量分数 0.1% 针用活性炭,搅拌后静置约 40 min;先用滤纸粗滤,再用 0.22 μm 微孔滤膜精滤两次,测定中间体含量和 pH 值合格后安

瓶灌装,包装即得。

为了研究产品制剂的稳定性,确定影响其稳定性的因素及可能的降解产物,为制剂工艺、包装和贮藏条件提供可行性依据,本实验研究采取了比文献中稳定性考察方法^[4]更加苛刻的试验条件。根据中国药典 2010 版药物制剂稳定性指导原则,本品为对温度敏感的药物,所以分别在温度 60 ℃、40 ℃、30 ℃、20 ℃、4 ℃和(4 500±500) lx 强光照射条件下第 0 d、5 d、10 d 取样对含量和有

关物质进行了检测分析,并且与上市制剂作了质量对比。

4.1 高温考察试验

将供试品于 60 ℃下放置 10 d,于第 5 d 和第 10 d 取样,按重点考察项目进行检测。结果供试品第 5 d 质量分数下降超过 5%,则在 40 ℃、30 ℃、20 ℃条件下分别同法进行试验。结果如表 7~10 所示。

表 7 高温试验(60 ℃)测定结果

Fig. 7 Test of high temperature (60 ℃) results

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.44	8.46
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	89.9	86.2
	有关物质质量分数/%	3.35	14.2	20.4
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	89.5	82.2
	总有关物质质量分数/%	11.5	24.2	33.4

表 8 高温试验(40 ℃)测定结果

Fig. 8 Test of high temperature (40 ℃) results

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.46	8.48
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	93.6	88.3
	有关物质质量分数/%	3.35	12.4	14.9
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	94.6	87.5
	有关物质质量分数/%	11.5	21.8	26.4

表 9 高温试验(30 ℃)测定结果

Fig. 9 Test of high temperature (30 ℃) results

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.42	8.44
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	94.4	91.3
	有关物质质量分数/%	3.35	9.8	12.6
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	95.6	89.6
	有关物质质量分数/%	11.5	20.2	22.4

表 10 高温试验(20 ℃)测定结果
Fig. 10 Test of high temperature (20 ℃) results

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.42	8.44
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	95.4	92.4
	有关物质质量分数/%	3.35	6.8	8.9
	上市样品	99.4	97.6	91.5
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	97.6	91.5
	有关物质质量分数/%	11.5	17.2	20.4

从表 7~10 中数据可以看出,本品对温度特别敏感,60 ℃、40 ℃、30 ℃、20 ℃条件下放置 10 d,供试品含量下降均超过 5%,有关物质均明显升高,表明本品不宜在室温贮藏。

4.2 强光照试验
将供试品于照度为(4 500±500) lx 条件下放置 10 d,于第 5 d 和第 10 d 取样,按重点考察项目进行检测,结果如表 11 所示。

表 11 强光照试验测定结果
Fig. 11 Determination results of glare test

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.42	8.46
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	97.4	96.3
	有关物质质量分数/%	2.35	2.79	3.24
	上市样品	99.4	98.6	97.5
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	98.6	97.5
	有关物质质量分数/%	11.5	12.2	12.8

从表 11 中数据可以看出,在光照(4 500±500)lx 条件下,本品基本稳定,但是光照对本品有关物质有一定的影响,所以本品应该在暗处保存。

4.3 低温试验
将供试品于 4 ℃下放置 10 d,于第 5 d 和第 10 d 取样,按重点考察项目进行检测,结果如表 12 所示。

表 12 低温(4 ℃)试验测定结果
Fig. 12 Low temperature (4 ℃) experimental results

		取样时间/d		
		0	5	10
试制样品	性 状	无色澄明液体	无色澄明液体	无色澄明液体
	pH 值	8.44	8.44	8.44
	可见异物检查	合格	合格	合格
	制剂质量分数/%	98.3	98.4	98.3
	有关物质质量分数/%	3.35	3.38	3.39
	上市样品	99.4	99.6	99.5
上市样品	制剂质量分数/%	99.4	99.6	99.5
	有关物质质量分数/%	11.5	11.2	11.3

从表 12 中数据可以看出,本品在低温环境下放置 10 d,供试品含量和有关物质基本无变化,比较稳定,说明本品宜在低温条件下贮藏。

4.4 结果

根据以上影响因素试验考察结果,本产品为对温度特别敏感的药物,并且参照中国药典 2010 版,确定本品最佳保存条件应在低温 4~8℃左右,凉暗处贮藏。

5 结果与讨论

在本品工艺筛选的同时,还分析了上市制剂,发现其总有关物质达到了 10%左右(标准为不得大于 12%),这是由于三磷酸胞苷二钠不稳定,加热后会分解生成一磷酸胞苷钠、二磷酸胞苷二钠所致。可以推测上市制剂是采用加热的方法除菌,为了使含量达到质量标准,三磷酸胞苷二钠几乎 110%投料,这样既损失原料而且有关物质也偏高。而在本品工艺的筛选过程中,对稳定剂、pH 值、活性炭等因素进行考察,重点考察了各个因素条件加热后有关物质的变化,在灭菌条件的考察过程中,考虑到本品对热的敏感,采取了过滤除菌,相比上市制剂,有关物质减少了很多,并且增加了原料的利用率,制备简单,在 4~8℃,凉暗处保存条件下稳定,只是在制备过程中,对环境提出了很高的要求,要求在无菌条件下操作,这些在 GMP 车间完全可以达到。

三磷酸胞苷二钠注射液是一种规格为 2 mL:40 mg 的辅酶类药物,属于已有国家标准药物,收载于国家药品监督管理局颁布的国家药品标准 WS1-XG-013-2001,参照上市制剂三磷酸胞苷二钠注射液的生产厂家是济南利民制药有限公司。经过专利查新,在不侵犯专利权权利的前提下,根据筛选不同的稳定剂、活性炭、灭菌条件等因素筛选出最佳处方,按照处方制备出合格的制剂,对其影响因素项进行了考察,得到了制剂的稳定性结果及贮藏条件。对于所得制剂的含量及有关物质分析方法参照了三磷酸腺苷二钠的质量标准(中

国药典 2010 版^[6]),经过方法学验证具有很高的精确性和可行性。

致 谢

本课题实验得到了山东大学和山东希尔康泰药业有限公司的资助以及相关同事的帮助,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 黄行铁. 三磷酸胞苷二钠注射液的稳定性研究[J]. 医药工业,1985,16(1):6-12.
HUANG Xing-tie. Stability study of Cytidine Disodium Triphosphate Injection [J]. Journal of Pharmaceuticals, 1985,16(1):6-12.
- [2] 徐菁. HPLC 法测定三磷酸胞苷二钠注射液的含量[J]. 湖北中医学院学报,2008,10(3):57-58.
XU Jing. HPLC method for determining the content of Cytidine Disodium Triphosphate Injection [J]. Journal of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 2008,10(3):57-58
- [3] 柳翠敬. 三磷酸胞苷二钠注射液的稳定性研究[J]. 药学通报,1984,19(1):37-40.
LIU Cui-jing. Stability study of Cytidine Disodium Triphosphate Injection [J]. Chinese Pharmaceutical Bulletin, 1984,19(1):37-40.
- [4] 周爱军. 遇油膨胀丁苯橡胶的配方设计与性能研究[J]. 武汉工程大学学报,2012,34(7):41-44.
ZHOU Ai-jun. Preparation and properties of oil swelling polymerized styrene butadiene rubber [J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2012,34(7):41-44.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:28-29.
- [6] 周建华. 注射用三磷酸胞苷二钠的处方设计及稳定性考察[J]. 上海医药,2008,30(5):224-226.
ZHOU Jian-hua. Prescription design and stability test of Cytidine Disodium Triphosphate Injection [J]. Shanghai Medical and Pharmaceutical Journal, 2008, 30(5):224-226.

Screening of recipe and process of cytidine disodium triphosphate injection

ZHANG Cun-guo^{1,3}, SUN Ping², HU Fang-feng³

(1. School of Pharmaceutical sciences, Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Shandong Lukangzhonghe Environmental and Technical Co.,Ltd. Jining 272000, China;

3. Shandong Xierkangtai Pharmaceutical Co.,Ltd. Jining 272100, China)

Abstract: To screen a more stable recipe for cytidine triphosphate injection, and solve the problem of high impurity of agent on the market, high performance liquid chromatographic method was used to explore the content and related substances of corresponding recipe, which are stabilizer including phosphate, carbonate and L-arginine, pH value from 6.0 to 9.0, dosage of active carbon from 0.02% to 0.5% and the sterilization including filtering and heating. The optimum results are L-Arginine of 4%, pH from 8.2 to 8.5, active carbon of 0.1%, filtration sterilization, and storage in shady and cool place at 4 to 8 °C. Under above conditions the related impurity of this recipe is less than 5%, which is far lower than the current standard below 12% on the market. It is valuable for industrial applications.

Key words: cytidine triphosphate injection; pH; related impurity; L-Arginine; filtration sterilization

本文编辑:陈小平



(上接第 22 页)

Quality standard of jackfruit aromatic extract

LIU Yong-qiong¹, YU Pei¹, CHEN Ya-fen², WANG Zhao¹, LI Jin¹

(1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Hubei Key Laboratory of Novel Chemical Reactor & Green Chemical Technology, Wuhan 430074, China; 2. The Pharmaceutical Company of Mayinglong, Wuhan 430064, China)

Abstract: The aromatic extractum of jackfruit was prepared by solvent extraction to provide necessary guidance for the industrialization. The quality standard for aromatic extractum of jackfruit was studied out by analyzing the sensory indicators and physical and chemical indicators combined with the national quality standard of food additives. The sensory indicators include fragrance and flavor; the physical and chemical indicators include acid value, ester value relative density, ethanol insoluble matter, arsenic content, the total number of Escherichia coli and the colony count. The same batches of extractum of jackfruit smell like durian sweet and fruity with the jackfruit fruit, whose sensory indicators (fragrance) have no difference; the same batches of extractum of physical and chemical indicators are as follows: acid value is less than or equal to 20, ester value is more than or equal to 135, relative density is more than or equal to 1.24, arsenic content is less than or equal to 3 mg/kg, coliform count is less than or equal to 30 MPN per 100 g, the total number of colonies (number/g) is less than or equal to 1 000. The results show that the sensory indicators and physiochemical indicators have good stability which meets the requirements of similar extractum in different batches. Indicators of jackfruit extractum can be controlled, which has guiding significance for industrial production.

Key words: jackfruit; aromatic extractum; quality standard

本文编辑:张 瑞