

促性腺激素释放激素 Buserelin 稳定性的研究

吕睿 谢云 杨灵红 于烽 陈五岭[△]

(西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

摘要 目的 研究 Buserelin 原料药的性质在温度、湿度、光线等条件的影下随时间变化的规律,为该原料药的生产、包装、储存、运输及有效期的制定提供依据。方法 根据中国药典 2005 版二部附录 XIX C 药物稳定性试验指导原则及化学药物稳定性研究技术指导原则进行强光照射、高温(60℃、40℃)、高湿(RH92.5%±5%、RH75%±5%)影响因素试验,加速试验(40℃±2℃、RH75%±5%; 25℃±2℃、RH60%±10%) 按 Buserelin 原料药标准规定的质量指标及相关的检验方法对产品试验条件下的主要质量指标进行检测。结果 强光照射、高温、高湿等影响因素对 Buserelin 的稳定性有明显影响,故应密封、于干燥、阴凉处保存。在加速试验中,Buserelin 原料药的各项质量指标发生了小的变化,但均在质量标准规定的范围内。结论 强光照射、高温、高湿等影响因素对 Buserelin 的稳定性有明显影响,应在阴凉干燥处避光密封保存和运输。加速试验结果证明 在此条件下,它的各项质量指标变化均在质量标准范围内,符合 Buserelin 原料药质量标准规定的要求 故将其保质期暂定为两年。

关键词 促性腺激素释放激素 稳定性

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)18-3483-04

Study on the Stability of the API Buserelin

LV Rui, XIE Yun, YANG Ling-hong, YV Feng, CHEN Wu-ling[△]

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an Shaanxi, 710069, China)

ABSTRACT Objective: To study the influence of temperature, humidity and light on the quality of API buserelin with time change, and to make the basis of the formulation for this bulk drugs' production, the packaging, storage, transportation and the term of validity. **Methods:** According to the XIX C medicine stability test guiding principle and chemistry medicine stability technical guidance principle in the appendix of Chinese pharmacopoeia 2005 edition, the hard light, high temperature (60℃, 40℃), high humidity (RH92.5%±5%, RH75%±5%) influence factor experiment and the acceleration test (40℃±2℃, RH75%±5%; 25℃±2℃, RH60%±10%) were tested. Based on the prescribed standards for Buserelin API quality indicators and related test method for products, the main qualitative index under experimental condition was detected. **Results:** Hard light, high temperature, high humidity and other factors had significantly affect on the stability of Buserelin, so it should be sealed in a dry, cool place. In the acceleration test, the API Buserelin's each qualitative index had little change, but still in the scope of quality standards. **Conclusion:** Hard light, high temperature, high humidity and other factors had significantly affect on the stability of Buserelin, so it should be sealed and transported in a dry, cool and dark condition. The acceleration test results showed that the API Buserelin's each qualitative index was in the scope of quality specification stipulation under this condition, and it met the quality specification stipulation requirement for API Buserelin; Therefore the guarantee period was tentatively scheduled for two-year.

Key words: Conadorelin; Stability

Chinese Library Classification(CLC): R917 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)18-3483-04

前言

Buserelin 是由 10 个氨基酸组成的小分子多肽,是黄体激素释放素(LHRH)通过改构后获得了一种多肽促性腺激素释放激素。用药初期会刺激垂体分泌促性腺激素-黄体生成素和卵泡刺激素,促进排卵以治疗女性不孕症。持续用药可使睾丸酮或雌激素降低至去势水平,用于性早熟和性激素依赖型癌症的治疗,2004 年 FDA 批准用于前列腺癌的治疗。依据临床前新药研究的需要,对 Buserelin 原料药进行了稳定性试验研究,主

要内容为影响因素、加速试验和长期试验^[1,2]。既为该原料药的生产、包装、储存、运输及有效期的制定提供试验依据,又为原料药的安全、有效和制剂的制备提供保障。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂

设备:美国贝克曼(BECKMAN)公司产 SYSTEM GOLD 高效液相色谱仪;色谱柱 Kromasil C18 250*4.6mm P/N 4c18254F, SN 08032506,江苏汉邦科技有限公司;电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);水分测定仪 METTER TOLEDO DL31 Karl Fischer Titrator 1/ 万天平 METTLER AE 200 pH 计 METTLER TOLEDO 320 型试剂:氯化钠,AR,西安化学试剂厂;硝酸钾,AR,西安化学试剂厂;蔗糖,AR,上海试剂

作者简介:吕睿(1987),男,硕士研究生

[△]通讯作者:陈五岭,男,教授,博士生导师,主要从事应用微生物学研究。Tel: 029-88303700, E-mail: wuling.chen.@263.net

(收稿日期 2011-11-24 接受日期 2011-12-18)

一厂,葡萄糖,AR,西安化学试剂厂;乙腈,HPLC 级,Fischer Scientific;三氟乙酸,上海诚心化工有限公司;其余各种试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 质量指标的检测方法 1) 外观形态检测方法:目测观察其颜色及状态进行判断。

2) 水分测定法 采用费休氏法测定用卡氏试剂预标定后加入约 40 mL 无水甲醇预滴定,取 1 瓶供试品去皮称重后,迅速加入滴定瓶内,充分搅拌供试品使之溶解后开始滴定,每批样品测 2 次求平均值作为检测结果^[3-5]。

3) 有关物质的检测方法:取 Buserelin 配制成 5.0 mg/mL 的溶液作为供试品,取供试品适量,精密稀释 100 倍作为对照品。取对照品 20 μ L 注入色谱仪,记录色谱图;再取供试品 20 μ L 注入色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2.5 倍,除主峰以外,如有其它杂峰,单个最大杂峰面积不得超过对照品主峰面积(即供试品主峰面积的 1%),各杂峰面积总和不得超过对照品主峰面积的 2 倍(供试品主峰面积的 2%,即杂峰面积总和不得超过主峰面积的 0.02 倍)。有关物质的含量测定同 Buserelin 的测定,新增有关物质的百分含量小于 1%。

4) 含量测定法 利用高效液相色谱采用外标测定^[6-8]。

5) 纯度测定 按照高效液相色谱法,以 Buserelin 主峰占全部峰面积的百分比计算。采用 C18 反相色谱柱,流动相 A 为含 0.1%三氟乙酸的水溶液,流动相 B 为含 0.1%三氟乙酸的色谱乙腈溶液;用流动相 A:B (95:5) 平衡色谱柱,流速 1 mL/min,检测波长 215 nm;用大于 20 μ L 的进样器吸取试样 20 μ L,注入色谱仪,二元线性梯度洗脱 20 分钟,记录色谱图,以 0.1%的三氟乙酸(水/乙腈=10/90)溶液洗柱。

1.2.2 稳定性的研究 在影响因素试验及加速试验中,主要检测产品的性状(颜色)、含量、有关物质等项目。影响因素试验一般包括强光照射、高温、高湿试验。它是在比加速实验更激烈条件下,探讨药物的固有稳定性,了解影响稳定性的因素,为制剂工艺筛选、包装材料和容器的选择、贮存条件的确定等提供依据,同时为加速试验应采用的温度和湿度等条件及分析方法的选择提供依据^[9,10]。加速试验是在超常条件下进行的,目的是通过加快市售包装中药品的化学或物理变化速度来考察药品稳定性,对药品在运输、保存过程中可能会遇到的短暂的超常条件下的稳定性进行模拟考察,并初步预测样品在规定的贮存条件下的长期稳定性^[11]。

强光照射的方法 取 Buserelin 样品适量,分别置于两个开口扁形称量瓶中,摊成 ≤ 5 mm 厚的薄层,置于照度 4500 Lx 下光照十天,分别于第 5、第 10 天取样检测规定指标,与零天结果相比较,考察其变化。

高温实验 将 Buserelin 置于密封洁净容器中,在 60℃条件下放置 10 天,于第 5、10 天取样,检测有关指标。如 60℃时供

试品无显著变化,则不必进行 40℃试验。如供试品发生显著变化,则在 40℃下依同法进行试验。具体操作为:取 Buserelin 样品适量,分别置于两个开口扁形称量瓶中,摊成 ≤ 5 mm 厚的薄层,置于 60℃恒温干燥箱内 10 天,分别于第 5、10 天取样检测规定指标,与零天结果相比较,考察其变化。

高湿实验 取 Buserelin 样品置恒湿密闭容器中,于 25℃、湿度为 RH92.5% $\pm$ 5%条件下放置 10 天,在第 5 天和第 10 天取样检测。检测项目应包括吸湿增重项。若吸湿增重 5%以下,且其他考察项目符合要求,则不再进行此项试验;若吸湿增重 5%以上,则应在 25℃、RH75% $\pm$ 5%下同法进行试验。鉴于样品为小分子多肽,用量小,称重结果由于样品与瓶重比例大而变化不明显,掩盖了样品吸湿的真实性,故采用灵敏度较高的水分测定方法考察样品吸湿变化^[13]。具体步骤为:取 Buserelin 样品适量,分别置于两个开口扁形称量瓶中,摊成 ≤ 5 mm 厚的薄层,分别置于盛有饱和硝酸钾溶液(RH92.5%)的密闭干燥器中于 25℃下,存放 10 天。分别于第 5、10 天取样检测规定指标,与零天结果相比较,考察其变化。

Buserelin 在高湿(RH92.5%)的条件下外观明显变化,有关物质增加,水分增加,表明高湿(RH92.5%)对样品的稳定性有明显影响。按指导原则规定要求,应在 25℃、RH75% $\pm$ 5%下同法进行试验。

加速实验 根据相关加速实验规定,在较高温度和湿度条件下加速实验结果不稳定时可在较低温度和湿度条件下重复试验^[14]。由于 Buserelin 是由氨基酸组成的多肽,一般情况下多肽及蛋白质都对温度比较敏感,因此,在进行 40℃ $\pm$ 2℃、RH75% $\pm$ 5%的条件下的加速试验时,同时进行 25℃ $\pm$ 2℃、RH60% $\pm$ 10%的条件下的加速实验,以免在首选条件下加速试验结果不理想时再开始进行较低温度条件下试验而耽误时间。

取 Buserelin 样品制备四份模拟上市包装(100 mg/瓶),放入底部盛有氯化钠饱和溶液(RH75% $\pm$ 5%)的干燥器内,在 40℃ $\pm$ 2℃的恒温箱中存放 6 个月,以该批产品的入库全检报告单为对照,分别于第 1、2、3、6 个月的月末取样,进行颜色、百分含量及有关物质等项目的检测,与零天结果相比较,考察其变化^[15]。同时进行的 25℃ $\pm$ 2℃、RH60% $\pm$ 10%的条件下的加速实验除了放入底部盛有氯化钠饱和溶液(RH75% $\pm$ 5%)和蔗糖饱和溶液(RH84% $\pm$ 5%)的干燥器内,在 25℃ $\pm$ 2℃的恒温箱中存放 6 个月这 3 个条件变化外,其余过程和上述一样。

2 结果

2.1 影响因素试验

2.1.1 强光照射试验 经光照 10 天后,Buserelin 的外观发生了变化、有关物质大量增加、含量降低,表明强光照射对 Buserelin 稳定性有影响,故应遮光保存。检测分析结果见表 1。

表 1 Buserelin 原料药光照试验测定结果

Table 1 Determination result of illumination experiment of API buserelin

Time (d)	Colour	Retention Time (min)	Peak Area	Area Percent (%)	Related Substances (%)	Content (mg)
0	White	9.653	171.4597	98.743		1.000
5	White	9.470	160.0751	75.055	23.688	0.934
10	Light yellow	9.766	164.4348	71.217	27.526	0.959

2.1.2 高温试验 Buserelin 在高温 60℃ 下存放 10 天后,样品的 60℃对样品的稳定性有显著影响(表 2)。
外观、有关物质、含量等各项指标均有一定变化,表明高温

表 2 Buserelin 原料药高温试验(60℃)测定结果
Table 2 Determination result of API buserelin under high temperature(60℃)condition

Time (d)	Colour	Retention Time (min)	Purity (%)	Related Substances (%)	Content (mg)
0	White	9.653	98.74		1.000
5	White	10.183	92.04	6.706	1.084
10	Light yellow	9.844	91.22	7.517	1.044

Buserelin 在高温 40℃ 下存放 10 天后,样品的外观、有关 降低,对样品的影响随之减小,因此,Buserelin 宜存放于阴凉处
物质、含量等各项指标均略有变化,结果表明高温 40℃对 (表 3)。
Buserelin 的稳定性略有影响。与 60℃的结果相比,随着温度的

表 3 Buserelin 原料药高温试验(40℃)测定结果
Table 3 Determination result of API buserelin under high temperature(40℃)condition

Time (d)	Colour	Purity (%)	Related Substances (%)	Content (mg)
0	White	98.32		1.000
5	White	97.07	1.246	1.031
10	White	94.65	3.674	1.051

2.1.3 高湿实验 Buserelin 在高湿 (RH92.5 %) 的条件下外观明 品的稳定性有明显影响(表 4)。
显变化,有关物质增加,水分增加,表明高湿 (RH92.5 %) 对样

表 4 Buserelin 原料药高湿试验(RH92.5%)测定结果
Table 4 Determination result under high humidity(RH92.5 %)condition

Time (d)	Colour	Appearance	State moisture content (%)	Purity (%)	Related Substances (%)	Content (mg)
0	White	Solid	<3	98.74		1.000
5	Light yellow	Semisolid	>3	96.44	2.298	1.042
10	Light yellow	Semiliquid	>3	93.98	4.766	1.136

在高湿 (RH75 %) 条件下,Buserelin 的外观、含量、有关物 的降低,对样品的影响也随之减小,故应将样品置于密封、干燥
质等各项指标均有一定变化,表明高湿 (RH75 %) 对样品的稳 处保存。测定统计结果见表 5。
定性有影响,与高湿 (RH92.5 %) 条件下的结果相比,随着湿度

表 5 Buserelin 原料药高湿试验(RH75%)测定结果
Table 5 Determination result of API buserelin under high humidity(RH75 %)condition

Time (d)	Colour	Appearance State	Purity (%)	Moisture content (%)	Related Substances (%)	Content (mg)
0	White	Solid	98.32	<3		1.000
5	Light yellow	Solid	97.57	>3	0.75	1.044
10	Light yellow	Solid	97.11	>3	1.213	1.213

2.2 加速试验

Buserelin 样品模拟上市包装的原料样品在 40℃± 2℃、
RH75 %± 5 %条件下进行加速试验。经过 6 个月后,Buserelin
样品的纯度有所下降、有关物质有所增加,接近于质量标准规
定的质量标准下线,但皆在质量标准规定的范围内。测定统计
结果见表 6。

加速试验 (25℃± 2℃、RH 60%± 10%) Buserelin 样品模
拟上市包装的原料样品在 25℃± 2℃、RH60 %± 10 %条件下
进行加速试验,经过 6 个月后,Buserelin 样品的含量略有变化、
有关物质略有增加,但均在质量标准的规定范围内 其它所
检项目无明显变化,符合质量标准的规定(表 7)。

表 6 Buserelin 原料药加速试验 (40℃) 检测结果

Table 6 Test result of the acceleration test of the sample(40℃)

Time (d)	Colour	Related Substances (%)	Content (%)
0	White		98.743
30	White	0.443	98.500
60	White	0.496	98.447
90	White	0.542	98.303
180	White	0.603	98.14

表 7 Buserelin 原料药加速试验 (25℃) 检测结果

Table 7 Test result of the acceleration test of the sample(25℃)

Time (d)	Colour	Related Substances (%)	Content (%)	HPLC Number
0	White		98.687	23005138
30	White	0.241	98.331	4073513
60	White	0.22	98.352	18065337
90	White	0.279	98.293	25020258
180	White	0.429	98.143	24165204

3 讨论

3.1 影响因素试验

对 Buserelin 进行强光照射、高温、高湿试验,结果表明 经光照 10 天后,外观变化明显,含量有所下降,有关物质增加,提示强光照射对样品稳定性有影响,故应遮光保存 Buserelin 在 60℃ 高温下存放 10 天后,样品的外观、含量、有关物质等各项指标均有一定变化,表明高温 60℃ 对样品的稳定性有明显影响,样品在 40℃ 高温下存放 10 天后,其外观、含量、有关物质等各项指标略有变化,表明高温 40℃ 对样品的稳定性略有影响,与 60℃ 的结果相比,随着温度的降低,对样品的影响随之减小,因此,Buserelin 宜存放于阴凉处 在高湿 (RH92.5 %± 5 %,25℃) 条件下,样品的外观变化明显,水分增加,有关物质增加,含量下降,表明高湿 (RH92.5 %± 5 %,25℃) 对样品的稳定性有明显影响,在高湿 (RH75 %± 5 %,25℃) 条件下,样品的外观、有关物质、含量等各项指标均有一定变化,表明高湿 (RH75 %± 5 %,25℃) 对样品的稳定性有影响。对两种高湿 (RH92.5 %± 5 %和 RH75 %± 5 %) 条件下的试验结果比较发现,虽然两种高湿条件对 Buserelin 原料药均有影响,但影响程度有所不同,即随着湿度的降低,对样品的影响随之减小,故应密封、干燥处保存。以上的影响因素试验结果显示 Buserelin 原料药应在避光、密封、干燥阴凉处保存。

3.2 加速试验

采用模拟上市包装的 Buserelin 原料药样品在 40℃± 2℃、RH75 %± 5 %,条件下进行加速试验,样品经 6 个月后,单一杂峰面积均小于 1 %的主峰面积,样品的有关物质有所增加、纯度有所下降,接近质量标准的下线,但均在质量标准的范围内^[7]。模拟上市包装的 Buserelin 原料药样品在 25℃± 2℃、RH60 %± 10 %条件下进行加速试验,样品经 6 个月后,有关物质略有增加、含量略有变化,纯度略有下降,但均符合质量标准

的标准。

综上,强光照射、高温、高湿等影响因素对 Buserelin 原料药的稳定性有明显影响,应在阴凉干燥处避光密封保存和运输。加速试验结果证明 在此条件下,样品的各项质量指标变化均在 Buserelin 原料药质量标准规定的范围内。

参考文献 (References)

[1] 合成多肽药物药学研究技术指导原则课题研究组.合成多肽药物药学研究技术指导原则[J].指导原则编号 [(H)GPH11-1],2007:14-16
The Subject research group of Guidance on Studies for Synthetic Peptide Drugs. Guidance on Studies for Synthetic Peptide Drugs [J]. Guidance serial number [(H)GPH11-1],2007:14-16

[2] 化学药物稳定性研究技术指导原则课题研究组.化学药物稳定性研究技术指导原则[J].指导原则编号 [(H)GPH6-1],2005:1-3
The Subject research group of Guidance on Stability Testing for Drug Substances. Guidance on Stability Testing for Drug Substances [J]. Guidance serial number [(H)GPH6-1],2005:1-3

[3] 化学药物稳定性研究技术指导原则课题研究组.化学药物稳定性研究技术指导原则[J].指导原则编号 [(H)GPH6-1],2005:4-6
The Subject research group of Guidance on Stability Testing for Drug Substances. Guidance on Stability Testing for Drug Substances [J]. Guidance serial number [(H)GPH6-1],2005:4-6

[4] Zhang Xing-yi. Concerns about the design and evaluation in drug stability tests [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2010,(14):1209-1211

[5] FDA. Guidance for Industry :Q1D bracketing and matrixing designs for stability testing of new drug substances and products[J]. 2003

[6] Guo Li-an. The theory and technology for protein purification by HPLC [M]. Shaanxi: Shaanxi Science Press, 1993

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.2005 年版[M].北京:化学工业出版社,2005 年:附录 172-173,28-31
State Pharmacopoeia Committee of China. The pharmacopoeia of the People's Republic of China 2005 [M]. Peking: Chemical Industry Press, 2005: addendum172-173,28-31

(下转第 3510 页)

- [2] Niskanen L K, Laaksonen D E, Nyyss-sonen K, et al. Uric acid level as a risk factor for cardiovascular and all-cause mortality in middle-aged men: a prospective cohort study[J]. Arch Intern Med, 2004, 164(14): 1546-1551
- [3] Meisinger C, Koenig W, Baumert J, et al. Uric acid levels are associated with all-cause and cardiovascular disease mortality independent of systemic inflammation in men from the general population: the MONICA/KORA cohort study [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6):1186-1192
- [4] Chen JH, Chuang SY, Chen HJ, et al. Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a Chinese cohort study [J]. Arthritis Rheum, 2009, 61(6): 856-857
- [5] Braunwald. 心脏病学 (第 5 版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:226
Braunwald. Heart Disease (5th edition) [M]. Beijing: People's Health Press, 2000:226
- [6] Gertler MM, Garn SM, Levine SA. Serum uric acid in relation to age and physique in health and coronary heart disease[J]. Ann Intern Med, 1951, 34(6):1421
- [7] Short RA, Johnson RJ, Tuttle KR. Uric acid, microalbuminuria and cardiovascular events in high-risk patients[J]. Am J Nephrol, 2005, 25(1):36
- [8] Jelic-Ivanovic Z, Memon L, Spasojevic-Kalimanovska V. Independent association of high serum uric acid concentration with angiographically defined coronary artery disease [J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 211(4): 369
- [9] Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, et al. Uric acid and inflammatory markers[J]. EUR Heart J, 2006, 27(10):1174
- [10] Hashemi M, Yavari M, Amiri N, et al. Uric acid: a risk factor for coronary atherosclerosis[J]. Cardiovasc J S Afr, 2007, 18(1):16
- [11] Rorbert A Short, Richard J. Johns on, Katherine R Tuttle. Uric acid, microalbuminuria and cardiovascular events in high - risk patients[J]. Am J Nephrol, 2005, 25: 36-44
- [12] Wannamethee SG, A Gerald Shater, Peter H Whincup. Serum urate and the risk of major coronary heart disease events[J]. Heart, 1997, 78: 147-153
- [13] Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, et al. Elevated uric acid increases the risk for kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2251-2253
- [14] Kanbay M, Ozkara A, Selcoki Y, et al. Effect of treatment of hyperuricemia with allopurinol on blood pressure, creatinine clearance, and proteinuria in patients with normal renal functions [J]. Int Urol Nephrol, 2007, 39:1227-1233
- [15] Edwards NL. The role of hyperuricemia in vascular disorders[J]. Curr Opin Rheumatol, 2009, 21(2):132-137
- [16] Tatli E, Aktoz M, Buyuklu M, et al. The relationship between coronary artery disease and uric acid levels in young patients with acute myocardial infarction [J]. Cardiol J, 2008, 15(1): 21

(上接第 3486 页)

- [8] Huang Yong-long, Han Yan-li. The analysis of RP-HPLC in the chemical synthesis of Thymosin al [J]. The Research Brief of Chemical Analysis, 2004, 7(32): 927-929(In Chinese)
- [9] The Subject research group of Chemical drug preparation technology research basic guiding principles. Chemical drug preparation technology research basic guiding principles [J]. Guidance serial number (H) GPH4-I) 2005
- [10] State Food and Drug Administration (SFDA). Traditional Chinese medicine, natural medicine stability studies technology guiding principle [J]. 2006
- [11] FDA, Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substance and Drug Products, CDER/CBER, draft guidance [J]. June 1998
- [12] Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for Synthetic Peptide Substances [J]. FDA, 1994
- [13] NING Li-li, LI Xue-mei. Design and performance on stability testing of drug substances [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2010, (12): 1013-1016
- [14] Guidance for Industry Drug Product. Chemistry, Manufacturing, and Controls Information [J]. FDA January 2003 ICH, Q1A (R2) Stability Testing for New Drug Substance and Products, Feb. 2003
- [15] Ye Xiao-xia, Yu xiong. Studies for Synthetic Peptide Drugs [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2003, 34(7): 347-361