

替曲朵辛注射液稳定性的初步考察

康宇红(南宁枫叶药业有限公司,广西 南宁 530003)

摘要:目的 考察不同温度和光照对替曲朵辛(tetrodotoxin)注射液稳定性的影响。方法 替曲朵辛注射液在不同温度或光照下存放一定时间后,用小鼠生物测定法检测注射液的毒性,由标准曲线计算替曲朵辛的含量,并运用初均速法和 Q_{10} 法预测其有效期。结果 替曲朵辛注射液的稳定性受温度影响,预测在 25℃ 和 4℃ 的有效期分别为 2~6 个月和 2 年;在 3500lx 强光照射下,替曲朵辛注射液的外观和含量没有明显变化。结论 替曲朵辛注射液对热不稳定,但对光照稳定性较好,宜存放在阴凉处。

关键词:替曲朵辛注射液;稳定性;有效期

中图分类号:R282.74;R927.13

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2003)06-0485-03

Preliminary study on the stability of tetrodotoxin injection

KANG Yu hong(Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., LTD, Nanning 530003, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the effect of temperature and light on the stability of tetrodotoxin(TTX) injection. **METHOD**

TTX injection samples were incubated at different temperatures and light for various times. The toxicity was determined using mouse bioassay. TTX content was calculated by the standard curve prepared at the same time. The expiration date was predicted using the initial velocity and the Q_{10} method. **RESULTS** The studies showed that the shelf life of TTX injection was 2~6 and 24 months when stored at 25℃ and 4℃ respectively. The studies also indicated that strong lighting at 3500lx had no significant effect on the physical appearance of TTX injection as well as TTX content. **CONCLUSION** TTX is sensitive to heat but stable under light. The expiration date of TTX injection is 2 years when stored at 4℃.

KEY WORDS:tetrodotoxin injection; stability; period of validity

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是重要的海洋毒素之一,存在于河豚的睾丸、卵巢、卵、肝、脾、眼球和血液内。是选择性极高的 Na^+ 通道阻断剂,有很强的生理活性,具有镇痛作用,对钝痛及锐痛均有明显的缓解作用,但未见成瘾报道,故可替代吗啡、杜冷丁成瘾性镇痛药,治疗肌肉、关节、神经痛及癌痛^[1]等。河豚毒素是一种氨基全氢喹唑啉化合物,微溶于水, $pH > 7$ 或 < 3 不稳定,在碱性条件下易降解为喹唑啉化合物^[2]。据文献报道^[3],河豚毒素对高温较敏感,经长时间高温加热被破坏,如把河豚卵巢毒素煮沸 2h 后,能使其失去一半之毒性。通过反复的处方筛选,我们以河豚毒素开发出替曲朵辛(tetrodotoxin)注射液,为考察制剂的稳定性,本实

验用小鼠生物测定法监测其含量,运用初均速法和 Q_{10} 法对替曲朵辛注射液进行热稳定性考察,并对有效期进行了预测;同时考察了强光照射对替曲朵辛注射液的影响。

1 实验材料

1.1 仪器

电热恒温水浴槽,LSY 型,北京市医疗设备厂,温度精度 $\pm 1^\circ C$ 。

1.2 试药

替曲朵辛注射液(30 μg /2 mL),批号:990114,本公司实验室制。

1.3 动物

2 实验方法与结果

2.1 热稳定性实验

2.1.1 初均速法^[4]:取替曲朵辛注射液(初始浓度 $C_0 = 2.98 \mu\text{g}/\text{mL}$) 分别在 55,60,65,70,75,80,85,90℃ 恒温静置 9,8,7,6,5,4,3,2h,定时取样测定试样中河豚毒素的剩余含量 C_t 。结果见表 1。

表 1 根据初均速法设计实验得结果处理列表 ($C_0 = 2.98 \mu\text{g}/\text{mL}$)

Tab 1 Result of the test on the basis of the initial velocity method ($C_0 = 2.98 \mu\text{g}/\text{mL}$)

N	实验温度 ℃	T (K)	1/T × 10 ³	t (h)	C _t (μg/mL)	V ₀ = (C ₀ - C _t)/t lg V ₀
1	55	328.2	3.047	9	2.94	0.00444 - 2.353
2	60	333.2	3.001	8	2.90	0.01000 - 2.000
3	65	338.2	2.957	6.7	2.82	0.02388 - 1.623
4	70	343.2	2.914	6.1	2.72	0.04262 - 1.370
5	75	348.2	2.872	5	2.48	0.10000 - 1.000
6	80	353.2	2.831	4	2.31	0.16750 - 0.776
7	85	358.2	2.792	3	2.21	0.25667 - 0.591
8	90	363.2	2.753	2	2.19	0.39500 - 0.403

用 $\lg V_0$ 对 $1/T$ 做一元线性回归,得方程为:

$$\lg \frac{C_0 - C_t}{t} = -6680.4 \frac{1}{T} + 18.0820$$

相关系数 $|r| = 0.9900$

推算室温 25℃ 的贮存期为:

$$\lg \frac{0.1 C_0}{25.9} = 4558.9 \text{h} \approx 190 \text{d} \approx 6.3 \text{月}$$

2.1.2 Q_{10} 法^[5]:取替曲朵辛注射液分别在 60,70℃ 恒温静置 15,14h,定时取样测定试样中河豚毒素的剩余含量 C_t 。结果见表 2。

表 2 根据 Q_{10} 法设计实验得结果列表 ($C_0 = 2.98 \mu\text{g}/\text{mL}$)

Tab 2 Result of test on the basis of the Q_{10} method ($C_0 = 2.98 \mu\text{g}/\text{mL}$)

N	实验温度(℃)	实验时间(h)	C _t (μg/mL)
1	60	15	2.81
2	70	14	2.50

求两种温度下药物一级分解反应速度常数:

$$K_{60^\circ\text{C}} = \frac{2.303}{t} \lg \frac{C_0}{C_t} = \frac{2.303}{15 \times 3600} \lg \frac{2.98}{2.81} = 1.088 \times 10^{-6}$$

$$K_{70^\circ\text{C}} = \frac{2.303}{t} \lg \frac{C_0}{C_t} = \frac{2.303}{14 \times 3600} \lg \frac{2.98}{2.50} = 3.485 \times 10^{-6}$$

根据 Vant Hoff 经验规律:

求 Q_{10} 值

$$Q_{10} = \frac{K_{70^\circ\text{C}}}{K_{60^\circ\text{C}}} = \frac{3.485 \times 10^{-6}}{1.088 \times 10^{-6}} = 3.203$$

推算室温 25℃ 贮存期:

$$K_{25^\circ\text{C}} = \frac{K_{60^\circ\text{C}}}{Q_{10}^{0.1(60-25)}} = \frac{1.088 \times 10^{-6}}{3.203^{3.5}} = 1.850 \times 10^{-8}$$

$$\tau_{0.9}^{25^\circ\text{C}} = \frac{0.1054}{K_{25^\circ\text{C}}} = \frac{0.1054}{1.850 \times 10^{-8}} = 5697297 \text{s} \approx 65.9 \text{d} \approx 2.20 \text{月}$$

推算冰箱(4℃)贮存期

$$K_{4^\circ\text{C}} = \frac{K_{60^\circ\text{C}}}{Q_{10}^{0.1(60-4)}} = \frac{1.088 \times 10^{-6}}{3.203^{5.6}} = 1.605 \times 10^{-9}$$

$$\tau_{90}^{4^\circ\text{C}} = \frac{0.1054}{K_{4^\circ\text{C}}} = \frac{0.1054}{1.605 \times 10^{-9}} = 65669781 \text{s} \approx 2.11 \text{年}$$

2.2 光照实验

在注射剂澄明度测定仪下,调节光照强度为 3500 lx,光照距离 20 cm,实验温度 20℃,将替曲朵辛注射液在上述实验条件下放置 10 d,分别于 0,1,3,5,10 d 定时取样测定试样中河豚毒素的剩余含量 C_t 。

在 3500 lx ($\pm 500 \text{lx}$, 20℃) 强光照射实验条件下观察,结果表明,该注射液的外观、澄明度与含量均无明显变化。

2.3 生物测定法^[6]

采用小鼠剂量——死亡时间曲线法测定含量。

2.3.1 原理:河豚毒素最小致死量 MLD 与死亡时间的倒数呈线型关系,在一定浓度范围内,浓度(C)与死亡时间的倒数(t)呈正比关系。

2.3.2 测定方法(1)标准曲线的绘制:预先分别配制 1.5,2,3,4,5,10($\mu\text{g}/\text{mL}$)共 5 个剂量的河豚毒素对照液。取小鼠 50 只,体重 16~24 g,雌雄皆可,随机分成 5 组,按体重每 10 g 快速腹腔注射上述对照液 0.2 mL,并准确记录每只小鼠由注射至死亡时间(完全停止呼吸判断为死亡),绘制浓度与死亡时间(即 C 对 $1/T$)的相关曲线。(2)样品测定:精密吸取上述实验样品各 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得样品溶液。按小鼠体重每 10 g 快速腹腔注射样品溶液 0.2 mL,并准确记录每只小鼠由注射至死亡的时间,根据标准曲线计算出各样品的含量(浓度)。

3 讨论

3.1 实验结果表明,该注射液对热不稳定,与文献报道的一致,因此在其生产工艺的设计中应用注意温度对其的影响,避免受热操作。但光照对该注射液的稳定性影响不大,在 3500 lx 强光照射 10 d,各项指标均无明显改变。故在生产操作及贮存、运输过程中无需避光,但应避免高温受热。

3.2 本实验运用初均速法和 Q_{10} 法预测了替曲朵辛注射液的有效期,实验中选择的温度和加温时间是根据该方法的要求和初步预试结果确定的。结果均推算出本制剂在常温下放置不稳定,在 4℃ 条件下冷藏,有效期可达 2 年。由高温数据估计低温贮存期,其结果仅供参考,应以实际留样考察的结果为准。用初均速法预测室温 25℃ 的贮存期结果与 Q_{10} 法预测结果有差异,可能是由于小鼠的个体差异等因素的影响导致的实验误差,但均显示出该温度下放置的不稳定性。

3.3 经加速试验(25℃)及长期留样(4℃)实验观察,结果表明:替曲朵辛注射液在两种实验温度条件下,实际有效期分别为 3 个月和 2 年(HPLC 监测含量)。

3.4 小鼠生物测定法检测河豚毒素的含量是一个较常用的方法,但由于检测结果易受小鼠个体差异、实验室温度及操作人员等因素的影响,会出现误差。由于在进行本实验时,尚未找到较理想的检测方法,故择其选用。由上述实验结果可看出,在工艺摸索实验中,用小鼠生物测定法对河豚毒素

进行含量监测仍不失为一种比较可靠且简便易行的方法。

参考文献

- [1] 杜普, 阎应举. 河豚毒素对钠通道的影响及其药理作用[J]. 中国海洋药物, 1998, 1-2: 49.
- [2] 许鸿举, 蔡树深. 河豚中毒与河豚毒素[J]. 汕头大学医学院学报, 1992, 1: 160.
- [3] 伍汉霖, 金鑫波, 倪勇. 中国有毒鱼类和药用鱼类[J]. 上海科

技出版社, 1978: 36.

- [4] 庞贻慧, 鲁纯素. 药物稳定性预测方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 76.
- [5] 庞贻慧, 鲁纯素. 药物稳定性预测方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 90.
- [6] 陈玉仁, 程军, 侯丽娟. 河豚毒素含量测定的三种不同方法及比较[J]. 海洋药物, 1986, 19(3): 8.

收稿日期: 2002-12-25