

有机金属抗癌原料药二氯二茂钛的稳定性试验

李云兰, 宁美英, 李青山* (山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要:目的 考察二氯二茂钛原料药的稳定性, 并预测其有效期。方法 采用正相高效液相色谱法测定原料药含量和有关物质, 以正己烷-二氯甲烷 (50:50) 为流动相考察加速和长期稳定性试验, 经典恒温法预测其有效期。结果 含量和有关物质测定方法的平均回收率为 99.9% ($n=9$), RSD 为 0.45%。拟市售包装, 40℃加速试验 6 个月, 长期室温试验 24 个月, 有关物质稍有增加, 其他各考察指标无明显变化。经典恒温法预测本原料药在 25℃贮存时有效期大于 10 年。结论 拟市售包装条件下二氯二茂钛稳定性较好, 有效期暂定 2 年。

关键词: 二氯二茂钛; 高效液相色谱法; 稳定性

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)01-0022-04

Stability of Organometallic Antitumor Crude Drug Titanocene Dichloride

LI Yun-lan, NING Mei-ying, LI Qing-shan (School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the stability of titanocene dichloride crude drug, and predict its validity duration. **METHODS** A normal-phase high performance liquid chromatography system was adopted with Lichrosorb-CN column to determine the content of titanocene dichloride and its relative impurities. The mobile phase consist of hexane-dichloromethane (50:50). The appearance character, content of relative impurities and titanocene dichloride, clarity, melting point and pH were investigated through the periods of accelerating and long-term tests. Classical isothermal method was used to predict the validity duration of titanocene dichloride. **RESULTS** The average recovery of titanocene dichloride was 99.9% ($n=9$, RSD=0.45%). No obvious changes were found after the samples were accelerated under 40℃ for 6 months and then tested for 2 years at room temperature (25℃), excepting slightly increase of relative impurities. The validity duration of titanocene dichloride was more than 10 years at 25℃, which was predicted using classical isothermal method. **CONCLUSION** The titanocene dichloride had good stability under marketed package conditions, and the useful life could be arranged for 2 years.

基金项目: 国家教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0258); 山西省重点科技攻关项目 (No. 051105-2); 山西省首批青年学科带头人基金 (晋教科 No. 200413); 山西省青年科技研究基金 (2007021035); 山西省研究生教育创新项目 (20061038); 太原市大学生创新基金 (07010729)

作者简介: 李云兰, 女, 在读博士, 副教授 * 通讯作者: 李青山, 男, 博士, 教授, 博士生导师 Tel: 0351 (4690322) E-mail: qingshan1@yahoo.com

KEY WORDS: titanocene dichloride; normal-phase high-performance liquid chromatography; stability

二氯二茂钛是一种新型有机金属抗癌化合物,对实体瘤有很强的抑制作用,已进入Ⅱ期临床研究^[1]。目前国内外对其作用机制进行了大量研究^[2-3],然而由于分析方法的困难,这些机制研究大多局限于体外,体内作用机制、代谢和结构转化研究有待于首先建立二氯二茂钛及其代谢物的分析方法。目前对二氯二茂钛的检测常采用差示分光光度法^[4]、分光光度法^[5-6]、电势滴定法^[4]和氧瓶燃烧法^[7]等,这些方法灵敏度低,操作烦琐,缺乏专属性,有关物质干扰其测定。笔者首次采用正相氨基 HPLC 同时测定二氯二茂钛原料药的稳定性,方法专属性强,为该类药物制剂的含量测定、质量标准和体内研究奠定基础。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪;SPD-10A 紫外检测器;CTO-10A 柱温箱;N2000 色谱数据处理仪。Wa-

ters2695 高效液相色谱仪,Waters2999 二极管阵列检测器。CS-501 型超级恒温仪(重庆试验设备厂)。二氯二茂钛对照品购自 Aldrich 公司(批号:A012352201,含量 99.9%);内标 ω -溴代苯乙酮由国药集团化学试剂有限公司提供(批号:T20041103,纯结晶后含量大于 99.0%);二氯二茂钛原料药由本课题组合成(批号:990315,990321,990328,纯度大于 98.0%);正己烷和二氯甲烷均为色谱纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

氨基 Lichrosorb-CN 色谱柱(4 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m, 购于 Merck KGaA, Darmstadt 公司);流动相:正己烷-二氯甲烷(50:50);流速:1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:254 nm;灵敏度为 0.05 AUFS。杂质测定灵敏度为 0.02 AUFS。此色谱条件下样品、对照品和有关物质测定色谱图见图 1。

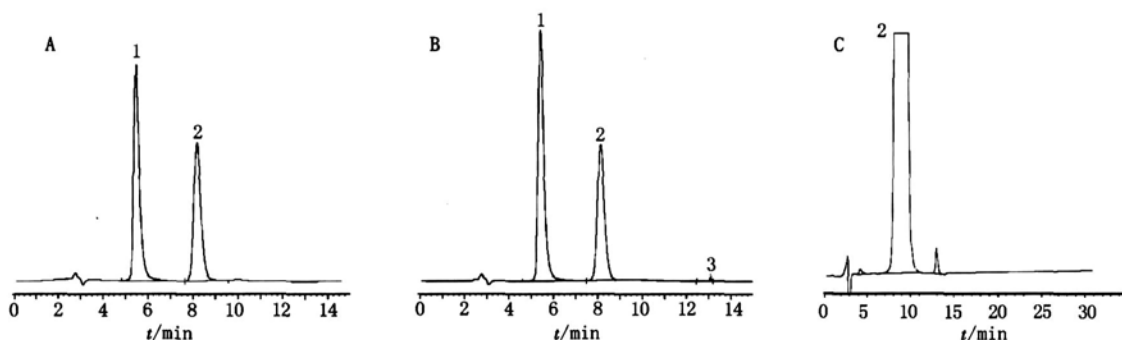


图 1 高效液相色谱图

A - 对照品和内标溶液色谱图($q_{\text{对照品}} = 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $q_{\text{内标}} = 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); B - 样品溶液色谱图($q_{\text{内标}} = 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C - 有关物质测定色谱图($q_{\text{样品}} = 1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $q_{\text{内标}} = 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 1 - 内标 ω -溴代苯乙酮; 2 - 二氯二茂钛; 3 - 杂质

Fig 1 HPLC chromatographs

A - chromatogram of standard sample for titanocene dichloride and internal standard; B - chromatogram of sample; C - chromatography of related substances in sample; 1 - internal standard: ω -bromophenyl ethanone; 2 - sample: titanocene dichloride; 3 - impurity

2.2 线性关系和检测限试验

精密称取干燥至恒重的二氯二茂钛对照品 25 mg,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 $0.25 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液。精密量取此溶液 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 mL 置于 100 mL 量瓶中,并分别加入 10 mL 内标贮备液(浓度为 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),用流动相稀释至刻度,摇匀。在选定的色谱条件下进样 20 μ L,记录样品和内标峰面积。以样品与内标峰面积之比(f)对浓度(c)进行线性回归,得到回归方程为 $f = 0.0710c + 0.0562$ ($r = 0.9999$)。结果表明,浓度在 $2.5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内,样品与内标峰面积之比与浓度呈良好的线性关系。

精密吸取上述对照品贮备液适量,用流动相稀释成含二氯二茂钛 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,进样,通过信噪比($S/N = 3$)检验,确定检测限为 2 ng。

2.3 重复性和回收率试验

取同一批号样品,配制成浓度约为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,平行测定 6 次, RSD 为 0.3%。表明重复性良好,能够满

足定量分析的要求。

精密称取已知含量的二氯二茂钛样品适量,配制成高($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)三个浓度的供试品溶液,各测定 3 次,根据工作曲线计算回收率。二氯二茂钛平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.9% ($n = 9$)。

2.4 方法专属性

2.4.1 破坏性实验 取本品适量,分别置于 5 个 50 mL 量瓶中,加入 $6 \text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氢氧化钠 5 mL, $6 \text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸 5 mL, 30% 的过氧化氢,用 1×500 强光照,置 100 $^{\circ}$ C 水浴中加热 10 h,分别用酸碱中和处理后用流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 有机微孔滤膜过滤,取续滤液。5 个样品分别进样 20 μ L,记录色谱图。结果表明本品经强酸、碱、氧化剂、强光以及高温破坏后,产生的杂质峰能有效地与主峰完全分离,方法专属性好,能够满足有关物质测定的要求。

2.4.2 检测方法专属性 取二氯二茂钛合成过程中的起始原料、中间体及原料药粗品适量,加流动相溶解并稀释成适宜浓度的溶液,用 0.45 μ m 有机微孔滤膜过滤,取续滤液,分

别进样 20 μL ,记录色谱图。结果表明起始原料、中间体及粗品中的杂质均能有效地与主峰分离,方法专属性能满足有关物质测定的要求。

2.5 样品含量测定 取本品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释成每 1 mL 中约含二氯二茂钛 25 μg 和内标 ω -溴代苯乙酮 10 μg 的溶液,按前述方法测定。以样品和内标峰面积之比计算含量,测定 3 批(批号: 990315, 990321, 990328)。平均含量分别为 100.2%, 99.7%, 99.7%; RSD 分别为 0.1%, 0.3%, 0.2%。

2.6 有关物质测定

取本品适量,加流动相溶解并稀释成每 1 mL 中含二氯二茂钛 1 mg 的溶液作为供试品溶液;精密量取适量,用流动相稀释成每 1 mL 中含 10 μg 的溶液,作为对照溶液。照含量测定的色谱条件,取对照溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的 20% ~ 25%。精密量取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2.5 倍。供试品溶液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(0.5%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 1 倍(1%)。三批样品的有关物质含量分别为 0.1%, 0.2%, 0.1%,符合规定。

2.7 稳定性试验

2.7.1 长期试验 本品 3 批(批号: 990315, 990321, 990328),拟市售包装(玻璃安瓿,避光),在 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, RH (60 $\pm$ 5) % 条件下放置 24 个月,分别于 0, 6, 9, 12, 24 个月取样,按照按稳定性重点考察项目进行检测。结果表明,长期试验 24 个月,三批样品的外观性状、pH 值、澄明度、熔点、含量均未发生显著性变化,有关物质稍有增加,但均未超过 0.22%。

2.7.2 加速试验 本品 3 批(批号: 990315, 990321, 990328),市售包装,在 (40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 (75 $\pm$ 5) % 条件下放置 6 个月,分别于 0, 1, 3, 6 个月取样,按照按稳定性重点考察项目进行检测。结果表明,加速条件下,三批样品有关物质略有增加,但均未超过 0.2%,其他项目如外观性状、pH 值、澄明度、熔点、含量等均未发生显著性变化。

2.7.3 经典恒温法 将分装的 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二氯二茂钛原料药分别置于 100 $^{\circ}\text{C}$, 110 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}\text{C}$ 和 130 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中,避光加热,按设计时间点取样,照“2.5”项下方法测定含量,结果见表 1。其含量对数 $\lg c$ 与加热时间 t 按照最小二乘法进行线性回归,求出各温度下的回归方程、相关系数 (r) 及斜率 B ,并由 $K = 2.303 \times B$ 计算出各温度的反应速率常数 K ,在 100, 110, 120 和 130 $^{\circ}\text{C}$ 下的 $\lg c$ 分别为 - 4.014, - 3.697, - 3.246, - 2.985。

由 Arrhenius 指数定律 $\lg K = \lg A - E / (2.303RT)$,以各温度 $\lg K$ 与相应的 $1/T$ 进行回归得到回归方程: $\lg K = 10.1417 - 5.287 \times 1/T$, $|r| = 0.9971$,由回归方程外推至室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 求出分解速率常数 K ,并计算有效期 $t_{0.9}$ 。结果 $K_{25^{\circ}\text{C}} = 2.5 \times 10^{-8}$, $t_{0.9} \geq 10$ 年,活化能 E 为 5.62 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。结合加速试验和长期试验结果,有效期可暂定为 2 年。

表 1 经典恒温法试验结果

Tab 1 Results for the test of classical isothermal method

温度 / $^{\circ}\text{C}$	时间 /h	$c / \%$	$\lg c$
100	0	100.2	2.000 9
	16	100.0	2.000 0
	24	99.9	1.999 6
	48	99.7	1.998 7
	72	99.5	1.997 8
110	0	100.2	2.000 9
	16	99.6	1.998 3
	24	99.4	1.997 4
	48	99.0	1.995 6
	72	98.8	1.994 3
120	0	100.2	2.000 9
	16	98.5	1.993 4
	24	97.6	1.989 4
	48	96.4	1.984 1
	72	94.9	1.977 5
130	0	100.2	2.000 9
	16	97.5	1.989 0
	24	96.1	1.982 7
	48	95.6	1.980 5
	72	92.2	1.964 7

3 讨论

3.1 色谱条件选择

二氯二茂钛极性大,溶解性特殊,非极性 ODS 柱与硅胶柱上均难以保留。本研究选择了氰基键合色谱柱,利用氰乙基取代硅胶的羟基与化合物形成诱导极化作用而得以保留。流动相采用正己烷:二氯甲烷 = 50:50 时,方法专属性强,各组分能完全分离,样品中降解产物对测定无干扰。经过强酸、碱、氧化剂、强光以及高温破坏后的样品进行二极管阵列检测,结果表明:破坏后的降解产物与原药的紫外吸收光谱相似,均在 (254 $\pm$ 2) nm 范围有最大吸收波长,故确定含量测定和有关物质检查的波长在 254 nm。

3.2 流动相的选择

本研究选用以饱和烷烃正己烷为底剂,先后分别与氯仿、二氯甲烷、乙醚等配成二元溶剂作为流动相进行比较研究,结果表明:二氯甲烷和正己烷为流动相时峰形和分离度均符合要求,当正己烷:二氯甲烷 = 50:50 时,方法专属性强,样品中降解产物对测定无干扰。

3.3 有关物质测定波长的选择

经过强酸、碱、氧化剂、强光以及高温破坏后的样品进行二极管阵列检测,结果表明:破坏后的降解产物与原药的紫外吸收光谱相似,均在 (254 $\pm$ 2) nm 范围有最大吸收波长,故确定含量测定和有关物质检查的波长均在 254 nm。

3.4 内标的选择

选择了丹皮酚、厚朴酚、TMP、邻苯二甲醛、二茂铁以及 ω -溴代苯乙酮等不同的内标物质,研究结果表明, ω -溴代苯乙酮作为内标物可以与二氯二茂钛主峰达到完全分离 ($R =$

2),且保留时间适宜,故选做内标。

3.5 药物有效期的确定

采用经典恒温法^[8]预测药物有效期需要按一级反应方程处理数据,本实验温度在 110℃以上时,原料药逐渐分解,其含量对数对时间作图近似为一条直线,表明为一级反应。而 Weibull分布拟合法^[9]预测贮存期不需要知道反应级数,本试验曾对经典恒温法实验数据,采用 Weibull分布拟合法进行处理,两种方法预测室温贮存期结果基本一致。

REFERENCES

- [1] KORFEL A, SCHEULEN M E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(11): 2701-2708.
- [2] O'CONNOR K, GILL C, TACKE M, *et al.* Novel titanocene anti-cancer drugs and their effect on apoptosis and the apoptotic pathway in prostate cancer cells [J]. Apoptosis, 2006, 11(7): 1205-1214.
- [3] FICHTER I, PAMPILLON C, SWEENEY N, *et al.* Anti-tumor activity of Titanocene Y in xenografted caki-1 tumors in mice [J]. Anti Cancer Drugs, 2006, 17(3): 333-336.
- [4] LI W Y, YANG Y, LI T T, *et al.* Synthesis of titanocene dichloride and determination of titanium chlorinity [J]. Chem Agent (化学试剂), 1983, 5(6): 363.
- [5] SHEN H X, WANG Z Q, YUE L. Determination of microtitanium with nonionic wetting agent - salicylfluorone spectrophotometry [J]. Chem Bull (化学通报), 1983, 10: 23.
- [6] LI Z B, WANG J L, XU Q T, *et al.* Determination of microtitanium with phosphonium molybdenum titanate acid-naïerlan-polyvinyl alcohol system spectrophotometry [J]. Anal Chem (分析化学), 1994, 22(2): 150.
- [7] Ch. P (2005) Vol II (中国药典·2005年版·二部) [S]. 2005: appendix 38.
- [8] PANG Y H, LU C S. Anticipation Method of Medicine Stability (药物稳定性预测方法) [M]. Beijing: Public health of the people Press, 1984: 35.
- [9] OKUSA N. Predication of stability of drug, application of Weibull probability paper to predication of stability [J]. Chem Pharm Bull, 1975, 23: 794.

收稿日期: 2006-08-16