

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.09.017

罗库溴铵注射液水解降解杂质含量预测研究

付强^{1,2}, 柯锐¹, 朱柄甲¹, 徐兴志¹, 刘君洋¹, 王志云¹, 陆伟跃²

(1. 浙江华海药业股份有限公司, 浙江 台州 317000; 2. 复旦大学药学院, 上海 201303)

摘要:目的 为罗库溴铵注射液的产品开发和申报提供参考。方法 根据 Arrhenius 方程, 设计不同温度条件下注射液的加速试验, 考察水解降解杂质的增长情况, 计算杂质生成反应活化能, 预测产品长期稳定条件下的有效期。结果 杂质 V 能生成所需活化能为 81 191.2 J/mol, (5±3)℃ 条件下长期储存, 其生成反应速率常数最高为 5.96×10^{-7} mol/(L·h), 至少需要 60 个月才达到 2015 年版《中国药典(二部)》规定的限度值(≤2.0%), 且 24 个月长期稳定性试验结果与预测结果基本一致。结论 杂质 V 含量是罗库溴铵注射液限度标准中超标风险最高的检测项, 其水解降解杂质的降解速率决定产品的有效期, 其稳定性预测结果足够支持药品说明书规定的 36 个月有效期。该方法适用于罗库溴铵注射液水解降解杂质含量的预测研究。

关键词: 罗库溴铵注射液; Arrhenius 方程; 稳定性预测; 有效期; 杂质

中图分类号: R971⁺.2; R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)09-0059-04

Content Prediction of Hydrolytic Degradation Impurities in Rocuronium Bromide Injection

FU Qiang^{1,2}, KE Rui¹, ZHU Bingjia¹, XU Xingzhi¹, LIU Junyang¹, WANG Zhiyun¹, LU Weiyue²

(1. Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou, Zhejiang, China 317000; 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai, China 201303)

Abstract: **Objective** To provide a reference for the development and registration of Rocuronium Bromide Injection. **Methods** According to the Arrhenius equation, the accelerated test of injection at different temperatures was designed to investigate the growth of hydrolytic degradation impurities, calculate the activation energy of impurity formation reaction, and predict the validity period of the product under long-term stable conditions. **Results** The activation energy required for the formation of impurity V was 81 191.2 J/mol, and its highest reaction rate constant was 5.96×10^{-7} M/(L·h) under the long-term storage condition at (5±3)℃, which meant that it took at least 60 months to reach the limitation(≤2.0%) specified in the Chinese Pharmacopoeia(2015 Edition, Volume II). The 24-month long-term stability test results were consistent with the predicted results. **Conclusion** The content of impurity V is the highest risk item in the limit standard of the product. The degradation rate of hydrolytic degradation impurity determines the validity period of the product. The stability prediction results of the product are enough to support the 36-month validity period specified in the drug package inserts. This method is suitable for predicting the content of hydrolytic degradation impurities in Rocuronium Bromide Injection.

Key words: Rocuronium Bromide Injection; Arrhenius equation; stability prediction; validity period; impurity

罗库溴铵注射液是荷兰 N. V. Organon 公司开发的全身麻醉辅助用药, 用于常规诱导麻醉期间的气管插管, 以及维持手术中骨骼肌的神经肌肉阻滞, 是临床常用的手术辅助用药^[1]。本研究中将经典恒温法应用于罗库溴铵注射液稳定性预测中, 评估稳定性试验中降解杂质增长情况和有效期, 以辅助产品开发和申报。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SevenMultiS400 型 pH 计(梅特勒-托利多公司); e2695/2489 型高效液相色谱仪/紫外检测器(沃特世公司); XS105DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多国际有限公司, 精度为十万分之一); Million-Reference 型超纯水机(默克化工技术有限公司); DHG-9076A 型恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); SHH-220SD 型药品稳定性试验箱(重庆永生实验仪器厂)。

1.2 试剂

罗库溴铵注射液为实验室自制, 批号为 20180501, 规格分别为每支 50 mg: 5 mL, 100 mg: 10 mL, 于 2~8℃ 条件下保存。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

取 5 支注射液, 置干燥玻璃器皿中, 混匀, 精密移取 2.0 mL, 用乙腈稀释 10 倍, 即得供试品溶液, 其中活性成分罗库溴铵的浓度为 1.64 mmol/L。

2.2 含量与有关物质分析

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate® SiO₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 缓冲液: 50 mmol/L 四甲基氢氧化铵缓冲液, 用磷酸调 pH 至 7.4; 流动相: 缓冲液-乙腈(10:90, V/V); 流速: 1.5 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μL。

2.2.2 含量和有关物质分析

分别采用质量浓度为 1.00, 0.02 mg/mL 的罗库溴铵供试品溶液作为对照品溶液, 各杂质的相对响应因子以 1.00 计算。含量和有关物质分析高效液相色谱法参照 2015 年版《中国药典(二部)》^[2]。分离度溶液典型图谱见图 1。各已知杂质分离度均 ≥ 1.5 。经方法学考察确认, 专属性良好, 线性关系好 ($R^2 = 0.9999$), 样品加样回收率介于 99.5% ~ 101.2% ($n = 6$), 精密度试验结果的 RSD 为 0.90% ($n = 6$), 均符合要求。

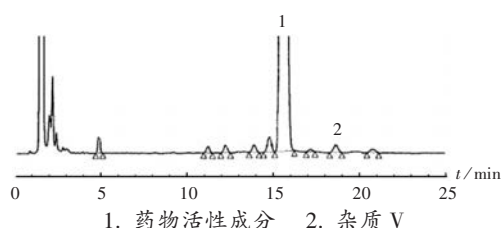


图 1 罗库溴铵注射液分离度溶液的高效液相色谱图

1. Active ingredients 2. Impurity V

Fig. 1 HPLC chromatograms of the separation solution of Rocuronium Bromide Injection

2.3 加速和影响因素试验评估

根据国内仿制药开发和稳定性研究要求, 在本品稳定性研究中, 对产品性状、澄清度与颜色、细菌内毒素、可见异物、不溶性微粒、无菌、pH 值、含量、有关物质 9 个检测项进行控制。所有检测项的限度标准均与 2015 年版《中国药典(二部)》要求一致。详见表 1。上述任何一个检测项超出既定控制标准均会导致产品的稳定性超出有效期。

为评估本品稳定性放置过程中各检测项的超标风险, 取样品, 置 40 °C 稳定性试验箱中, 分别于放置 0, 5, 10, 15, 30 d 后取出, 按成品稳定性标准进行检测。结果见表 1。随着在 40 °C 条件下放置时间的延长, 杂质 V 含量从 0.39% 迅速增加至 1.33%, 增长明显, 而其他杂质限度均低于限度标准且无超标趋势。将样品置 60 °C 稳定性试验箱中, 分别于放置 0, 5, 10 d 后取出, 杂质 V 含量从 0.39% 迅速增加至 3.00%, 放置 10 d 后明显超出限度标准 ($\leq 2.0\%$), 罗库溴铵含量从 100.4% 降至 95.7%, 发生明显变化, 但未超出稳定性限度标准。pH 值等其他检测结果在 40 °C 和 60 °C 加速试验条件下, 均符合成品稳定性标准且无超标趋势。表明杂质 V 为主要增长的降解杂质, 在所有质量控制项目中超标风险最高, 故预测杂质 V 的含量可推测产品的稳定性和有效期。

2.4 包装规格与放置方式影响考察

罗库溴铵注射液中的杂质 V 是罗库溴铵分子中甾体母核 17 位乙酸酯水解为羟基的降解产物, 该降解反应为典型的水解降解反应, 反应速率与温度的关系符合 Arrhenius 方程^[4-7]。通过预测该杂质含量可评估产品的杂质增长情况, 推测产品的稳定性和有效期。

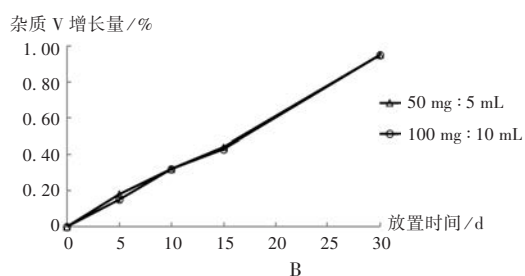
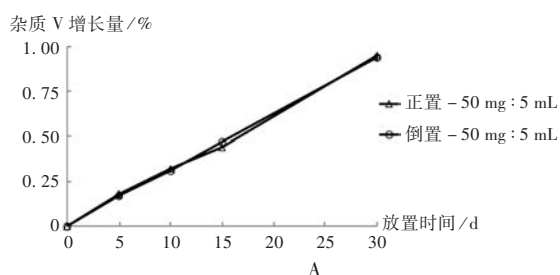
罗库溴铵注射液为西林瓶包装, 开发规格为每支 50 mg : 5 mL 或 100 mg : 10 mL, 注射液开发中需对每个规格试验批次进行正置和倒置稳定性研究。为评估包装规格和正/倒置对杂质 V 降解速率的影响, 取样品置 (25 ± 2) °C 试验条件, 分别于放置 0, 5, 10, 15, 30 d 后取出, 检测有关物质。正/倒置和不同规格罗库溴铵注射液的杂质 V 增长速率基本一致, 且杂质 V 和未知杂质

表 1 罗库溴铵注射液 40 °C 加速试验结果

Tab. 1 Results of the accelerated test of Rocuronium Bromide Injection at 40 °C

检测项目	限度标准	0 d	5 d	10 d	15 d	30 d	标准制定依据
性状	无色至微黄色的澄明液体	均为无色澄明液体					2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
溶液澄清度与颜色	本品应澄清无色	均为澄清无色					2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
细菌内毒素	< 2.2 EU/mg	均符合规定					2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
可见异物	符合药典规定	均符合规定且无明显变化					2015 年版《中国药典(四部)》通则 0904 ^[3] 116-118
不溶性微粒	符合药典规定	均符合规定且无明显变化					2015 年版《中国药典(四部)》通则 0904 ^[3] 114-115
无菌	符合药典规定	均符合规定					2015 年版《中国药典(四部)》通则 0904 ^[3] 136-140
含量(%)	93.0 ~ 107.0	100.4	100.0	99.6	99.7	99.8	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
pH 值	3.8 ~ 4.2	3.9	4.0	4.0	4.0	4.0	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质 I (%)	≤ 0.2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质 II (%)	≤ 0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质 III (%)	≤ 0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质 IV (%)	≤ 0.3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质 V (%)	≤ 2.0	0.39	0.57	0.71	0.86	1.33	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
其他单个最大杂质含量(%)	≤ 0.2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]
杂质总量(%)	≤ 0.5	0.39	0.57	0.71	0.86	1.33	2015 年版《中国药典(二部)》罗库溴铵注射液 ^[2]

含量也未见明显差异,表明包装规格和正/倒置对杂质V增长速率的影响较小。详见图2。



A. 正置与倒置 B. 50 mg: 5 mL 与 100 mg: 10 mL

图2 (25±2)℃长期试验条件下样品杂质V含量

A. upright - set vs. upside - down B. 50 mg: 5mL vs. 100 mg: 10 mL

Fig. 2 The content of impurity V in the sample under the long-term test condition at (25±2)℃

2.5 经典恒温试验

参照 Arrhenius 方程 $-\ln K = E_a/R \times (1/T) - \ln A$ 。式中, K 为反应速率常数 [$\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$]; A 为频率因子常数 [$\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$]; E_a 为反应活化能 (J/mol); R 为摩尔气体常数 [$8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$]; T 为绝对温度 (K)。

通过测定不同温度条件下杂质V的生成速率,求得 Arrhenius 方程中的未知数,预测长期稳定条件下的杂质V含量。取样品若干支,分别在 25~71℃条件下正置放置 720 h 后取出,进行含量和有关物质分析。

2.6 反应速率常数K值及活化能确定

不同温度条件下的放置时间和杂质V含量检测结果见表2。罗库溴铵注射液为水溶液注射剂,不同温度条件下的加速试验中,活性成分含量在 95.8%~98.8%之间,表明水和罗库溴铵2种反应物的浓度变化均很小,生成杂质V的酯水解反应可近似认为是零级反应,反应符合方程 $C = Kt + C_0$ 。式中, C 为杂质V的实时浓

度; C_0 为杂质V的初始浓度; K 为杂质V生成反应的反应速率常数; t 为反应时间。在不同温度条件下,以杂质V的浓度 $C(\%)$ 对反应时间 $t(\text{h})$ 作线性回归曲线,方程的斜率即为杂质V的生成速率。由表2可知,所有线性回归方程的回归系数均良好。将表2中的百分比浓度数值转换为摩尔浓度数值,以反应速率的负对数 ($-\ln K$) 对反应温度的倒数 ($1/T$) 作线性回归方程,得 $-\ln K = 9765.60174 \times (1/T) - 24.51196$, $R^2 = 0.9994$, 方程的斜率为 E_a/R , 截距为 $-\ln A$ 。求得 E_a 为 $81191.2 \text{ J}/\text{mol}$, A 为 $7.25 \times 10^8 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。

2.7 产品有效期计算

罗库溴铵注射液长期稳定性储存条件为 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$, 根据 Arrhenius 方程, 5°C 和 8°C 长期稳定性储存条件下,杂质V生成反应速率常数 K 分别为 $4.10 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 和 $5.96 \times 10^{-7} \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。求得 8°C 最差条件下,杂质V含量达到 2015 年版《中国药典(二部)》规定的限度值 ($\leq 2.0\%$) 所需时间至少为 60 个月,足够支持上市产品药品说明书规定的 36 个月有效期。

2.8 预测与实测结果对比

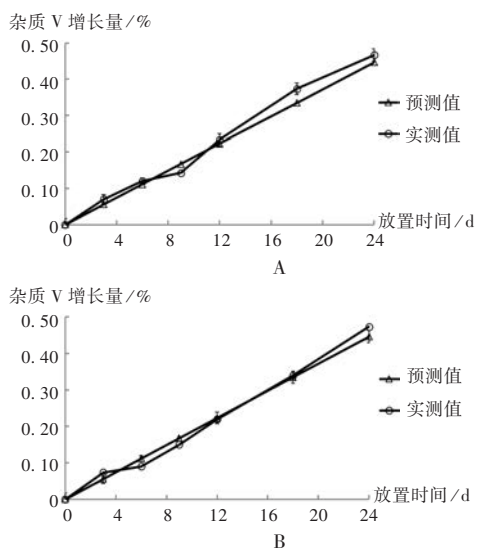
分别选择 3 批每支 50 mg: 5 mL 规格正置生产批次和 3 批每支 100 mg: 10 mL 规格倒置生产批次,开展长期稳定性研究。以杂质V预测增长量或 3 批注射液杂质V平均实测增长量对放置时间作图。详见图3。同一规格生产批次不同放置时间杂质V含量的实测值标准偏差均 $\leq 0.02\%$, 表明不同批次间杂质V含量差异较小。50 mg: 5 mL 规格正置生产批次杂质V含量从 0 个月的 $(0.39 \pm 0.02)\%$ 增加到长期 24 个月的 $(0.86 \pm 0.02)\%$, 平均增加 $(0.47 \pm 0.02)\%$; 100 mg: 10 mL 规格倒置生产批次杂质V含量从 0 个月的 $(0.41 \pm 0.02)\%$ 增加到长期 24 个月的 $(0.88 \pm 0.02)\%$, 平均增加 $(0.47 \pm 0.02)\%$ 。不同批次间杂质V增长速率基本一致,增长情况的实测值和预测值基本吻合,表明通过稳定性预测研究评估本品杂质V的增长情况是可行的。

同时,对生产批次所有检测项的实测结果进行分析,除杂质V外的其他检测项均未发生明显变化,暂无超标风险。包装规格和正、倒置对杂质V的增长速率无

表2 不同温度条件下杂质V含量对反应时间的线性回归方程及反应速率常数

Tab. 2 The linear regression equation of impurity V content on reaction time and the reaction-rate constant at different temperatures

温度(℃)	回归方程	不同放置时间对应的杂质含量	K(% /h)	R ²
25	$C = 0.00025 \times T + 0.41291$	0, 120, 264, 480, 720 h 时分别为 0.42%, 0.44%, 0.47%, 0.53%, 0.60%	0.0002517	0.98810
30	$C = 0.00047 \times T + 0.41959$	0, 120, 264, 480, 720 h 时分别为 0.42%, 0.48%, 0.54%, 0.64%, 0.76%	0.0004682	0.99903
40	$C = 0.00130 \times T + 0.41286$	0, 120, 264, 480, 720 h 时分别为 0.42%, 0.56%, 0.75%, 1.03%, 1.35%	0.0012962	0.99963
47	$C = 0.00244 \times T + 0.41820$	0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h 时分别为 0.42%, 0.48%, 0.53%, 0.57%, 0.66%, 0.72%, 0.76%, 0.83%	0.0024362	0.99228
60	$C = 0.00866 \times T + 0.42138$	0, 24, 36, 48, 72, 96, 120 h 时分别为 0.42%, 0.62%, 0.73%, 0.86%, 1.05%, 1.23%, 1.47%	0.0086625	0.99842
71	$C = 0.02014 \times T + 0.42459$	0, 12, 24, 36, 48, 72, 84, 96 h 时分别为 0.42%, 0.65%, 0.91%, 1.15%, 1.40%, 1.93%, 2.11%, 2.32%	0.0201433	0.99857



A. 50 mg : 5 mL 正置 B. 100 mg : 10 mL 倒置

图3 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ 长期试验条件下3批样品实测平均值及预测值

A. 50 mg : 5 mL (upright - set) B. 100 mg : 10 mL (upside - down)

Fig.3 Measured average values and predicted values of three batches of samples under the long-term test condition at $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$

明显影响。表明通过 Arrhenius 方程计算杂质 V 的增长情况,可以预测罗库溴铵注射液的有效期,是辅助产品开发和申报的有效数据。

3 讨论

注射液开发通常需要根据原研药药品说明书开展为期数年的长期稳定性研究^[8],长期稳定性试验中任一检查项结果超出限度标准均会导致产品开发风险,故评估产品的有效期是注射液开发的重点。为降低产品开发和稳定性研究的风险,通常会开展为期 5~30 d 的影响因素研究,以评估不同处方工艺产品的稳定性差异。但影响因素条件过于剧烈,与产品有效期关联性较弱,往往需要开展 6~12 个月的加速试验,才能更好地评估产品长期储存条件下的有效期,耗时较长;另外,加速试验结果超标未必表示长期稳定性试验失败。

目前,文献[9-13]报道了经典恒温法或初均速加速法在药品主成分稳定性预测方面的应用,采用 Arrhenius 方程测定药品主成分降解反应的活化能,进一步计算长期稳定性条件下的主成分降解情况。经典恒温法可通过 1 个月的加速试验来预测主成分数年内的降解情况,时间短,可靠性高,缺点在于仅通过预测主成分的降解来评估药物的有效期,缺乏对药物杂质降解情况等其他质量控制指标的评估。首先,通过加速试验评估罗库溴铵注射液每个稳定性研究检测项的超标风险,认为罗库溴铵注射液水解产生的杂质 V 增长明显,超标风险最高,其他控制项目超标风险较低,故对杂质 V 含量增长情况的预测可预估产品的有效期。本研究中根据 Arrhenius

方程设计不同温度条件下的注射液加速试验,计算杂质 V 生成反应活化能,预测产品长期稳定性条件下的有效期。

加速试验结果表明,罗库溴铵注射液杂质 V 含量是产品稳定性研究中超标风险最高的指标,预测其含量增长情况可评估产品的有效期。经典恒温法主要用于预测药物活性成分的降解速率^[8-10]。根据 Arrhenius 方程,采用经典恒温法测定罗库溴铵注射液中杂质 V 的生成反应活化能,预测长期稳定性条件下该杂质的增长情况。通过 Arrhenius 方程预测的结果与生产批次长期 24 个月稳定性实测结果基本一致,包装规格和正置、倒置对杂质 V 的增长速率无明显影响。表明方法准确、可靠,适用于本品水解降解杂质含量和有效期的预测研究。本方法有望应用于其他符合 Arrhenius 方程的水解降解杂质的含量预测研究,以辅助产品的开发和申报。

参考文献

- [1] 胡一青. 罗库溴铵在全麻诱导插管的应用[J]. 内蒙古医学杂志,2010,42(S4):127.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:655.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015.
- [4] 张久恺,刘 耘. 水解产物的判断与水解机理[J]. 山东轻工业学院学报(自然科学版),1999,13(1):1-4.
- [5] 张凯龙,沈婷婷,谭志文,等. 乙酰水杨酸水解动力学研究[J]. 实验室研究与探索,2017,36(5):32-35.
- [6] 蔡 莉,解庆龙,吴振宇,等. 甘油酯化反应动力学研究[J]. 中国油脂,2017,42(9):117-120.
- [7] 张竹修,汤吉海,陈幸福,等. 醋酸环己酯催化水解动力学[J]. 化学反应工程与工艺,2017,33(5):437-442.
- [8] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products. Q1A(R2) [EB/OL]. (2003-02-06)[2020-01-20]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A_R2_Guideline.pdf.
- [9] FAN ZW, ZHANG LJ. One - and Two - Stage Arrhenius Models for Pharmaceutical Shelf Life Prediction[J]. Journal of Biopharmaceutical Statistics,2014,25(2):307-316.
- [10] 彭其胜. 经典恒温法考察咪唑西林溶液的稳定性[J]. 中国药业,2011,20(20):20-21.
- [11] 张燕琴,许晓红. 经典恒温法预测托拉塞米注射液的有效期[J]. 药学实践杂志,2016,34(4):357-358.
- [12] 何 宁,孙贺春,代苗苗. 初均速加速试验法研究温度和湿度对药物稳定性的影响[J]. 中南大学学报(医学版),2014,39(5):501-510.
- [13] 李 容. 经典恒温法和初均速法考察氯麻滴鼻液的稳定性[J]. 中国药业,2012,21(3):8-9.

(收稿日期:2020-03-08;二次修回日期:2020-11-19)