

帕拉米韦原料药的稳定性研究

甘薇¹, 胡律江², 孙勇兵^{1*}, 孙琪¹, 黄花¹, 金一¹

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西省中医院, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 考察帕拉米韦原料药在不同条件下的稳定性。**方法** 采用高效液相色谱法。Welch ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相水 (含 0.1%冰醋酸) - 乙腈 (90:10); 检测波长 210 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量 10 μL。考察了帕拉米韦原料药在不同温度、光照和不同 pH 值下的稳定性。**结果** 帕拉米韦原料药在 100 °C 条件下 48 h 内是稳定的; 在光照 10 d 的情况下, 帕拉米韦的稳定性良好; 帕拉米韦在碱性和中性环境下稳定性良好, 在酸性条件下不稳定, 随着 pH 值的降低, 稳定性越差, 在 pH 1.0 时, 降解半衰期 ($t_{1/2}$) 是 43.6 h。**结论** 帕拉米韦在酸性环境中极不稳定, 在碱性和中性条件下稳定性良好。

关键词: 帕拉米韦原料药; 帕拉米韦; 稳定性; 高效液相色谱**中图分类号:** R913 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)09-2169-04**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.09.003

Stability of peramivir active pharmaceutical ingredient

GAN Wei¹, HU Lü-jiang², SUN Yong-bing¹, SUN Qi¹, HUANG Hua¹, JIN Yi¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To investigate the stability of peramivir active pharmaceutical ingredient at the different conditions. **Methods** HPLC method was established. The method was performed on Welch ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of water (0.1% glacial acetic acid)-acetonitrile (90:10). The detection wavelength was set at 210 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 25 °C, and volume of injection was 10 μL. The stabilities of peramivir active pharmaceutical ingredient were investigated at the different temperatures, under lighting, and in the buffers with different pH. **Result** Peramivir active pharmaceutical ingredient was stable for 48 h when incubated at 100 °C, and after lighting for 10 d. Peramivir active pharmaceutical ingredient was stable under neutral and alkaline pH, but it was not stable in the acidic environment. The $t_{1/2}$ was 43.6 h when incubated in phosphates buffers with pH 1.0. **Conclusion** Peramivir is extremely unstable in acidic environment, and is stable under alkaline and neutral conditions.

Key words: peramivir active pharmaceutical ingredient; peramivir; stability; HPLC

BioCryst 制药公司 2000 年 9 月首先公布了帕拉米韦的结构和化学性质^[1]。帕拉米韦是流感病毒神经氨酸酶抑制剂, 对病毒感染细胞过程中关键的释放和扩散步骤进行阻断, 与达菲、扎那米韦一起是高致病性禽流感预防和治疗的一线药物, 尤其对 H₇N₉ 病毒有效^[2]。在某些方面, 帕拉米韦表现出比

达菲和扎那米韦更好的抗流感效果^[3,4]。中国食品药品监督管理局 2012 年批准了帕拉米韦氯化钠注射剂的上市。帕拉米韦在不同条件下的稳定性尚未见报道。为了更好地为帕拉米韦制剂尤其是注射剂的制备、储存和运输提供参考和依据, 本研究开展了帕拉米韦原料药在不同条件下的稳定性研究。由

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560577, 81360485)

作者简介: 甘薇 (1995—), 女, 江西宜春人, 硕士研究生。E-mail: ganwei0126@foxmail.com

*通信作者 孙勇兵 (1980—), 男, 安徽池州人, 副教授, 博士, 主要从事生物药剂学和药物动力学的研究。

Tel: (0791)87119650 E-mail: yongbing_sun@hotmail.com

于帕拉米韦没有紫外吸收基团,利用高效液相色谱法(HPLC)测定帕拉米韦的报道较少^[5,6]。本研究首先利用帕拉米韦在 210 nm 处的末端吸收,建立了帕拉米韦原料药的高效液相色谱测定方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,SPD-M20A DAD 检测器,SIL-20A 自动进样器,LabSolution 色谱工作站(日本岛津公司);DHG-9050A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海姚氏仪器设备厂);超声清洗器(洁康超声波清洗设备有限公司);BSA124S 型分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PB-21 型酸度计(赛多利斯科学仪器有限公司);LAC-250 型人工气候箱(上海龙跃机电设备有限公司);超纯水机(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 试剂

帕拉米韦原料药(质量分数>99.0%,批号 20150826,湖北信康化学有限公司);帕拉米韦对照品(质量分数>99.7%,批号 20170123,北京百奥莱博科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);冰醋酸为分析纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

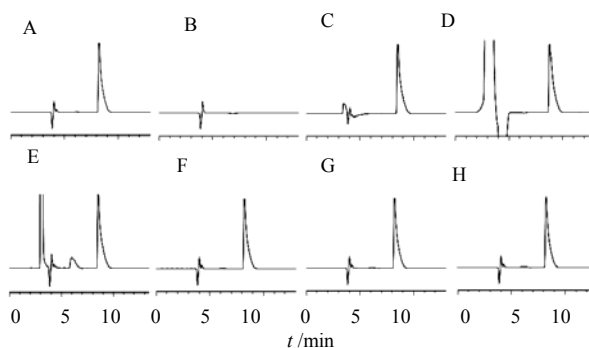
Welch ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相水(含 0.1%冰醋酸)-乙腈(90:10);检测波长 210 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温:25℃;进样量 10 μL。

2.2 系统适用性试验

取 5.0 mg/mL 帕拉米韦对照品溶液进样分析,理论塔板数按帕拉米韦峰计算不低于 5 000,与相邻色谱峰分离度大于 2.0,对称因子、重复性符合要求。

2.3 专属性试验

取帕拉米韦原料药适量,分别在 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、0.1 mol/L 盐酸溶液、氧化(双氧水)、高温(90℃水浴加热 3 d)、高湿(相对湿度 90%±5%下放置 10 d)和光照(照度 4 500±500 lx 下放置 10 d)条件下进行破坏实验,将破坏后的样品分别用水溶解,调整 pH 值至 7,制备 5.0 mg/mL 的样品溶液,进样分析,典型色谱图见图 1。结果表明,帕拉米韦在酸破坏、碱破坏、氧化破坏条件下能产生较多的杂质,各破坏条件下降解产物均与主峰达到良好分离;高温、高湿破坏和光照破坏产生的杂质较少。因此该方法具有良好的专属性。



A-帕拉米韦 B-空白溶剂 C-碱破坏 D-酸破坏 E-氧化破坏
F-高温破坏 G-高湿破坏 H-光照破坏
A-peramivir B-blank solvent C-decomposed by alkali
D-decomposed by acid E-decomposed by oxidation F-decomposed by temperature G-decomposed by humidity H-decomposed by light

图1 专属性试验的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for specificity test

2.4 线性关系考察

分别精密吸取 5.0 mg/mL 帕拉米韦对照品溶液 0.1、0.6、1.2、2.0、3.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,得系列质量浓度的对照品溶液。进样测定,以峰面积作为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=3.429 \times 10^6 X + 4.188 \times 10^4$, $r=0.997 0$,结果表明帕拉米韦在 0.05~1.5 mg/mL 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取 5.0 mg/mL 帕拉米韦对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录色谱图,按帕拉米韦峰面积计算,RSD 值为 0.24%。

2.6 重复性试验

取同一批帕拉米韦原料药 6 份,制备供试品溶液,进样测定,记录色谱图,计算帕拉米韦的质量分数,RSD 值为 0.39%。

2.7 稳定性试验

精密吸取 5.0 mg/mL 帕拉米韦原料药溶液 10 μL,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24、36 h 进样测定,记录色谱峰,以帕拉米韦峰面积计算 RSD 值为 0.37%,结果表明帕拉米韦原料溶液在常温下 36 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取质量约为 40.0 mg 帕拉米韦原料药各 3 份,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,使所配制的溶液质量浓度分别是对照品溶液(5.0 mg/mL)的 80%、100%、120%,分别进样测定,

记录色谱图, 计算得帕拉米韦的平均回收率为 99.6%, RSD 值为 1.1%。

2.9 测定方法

取帕拉米韦原料药, 精密测定, 加水溶解, 制成含帕拉米韦 5 mg/mL 的溶液, 作为供试品溶液。另取帕拉米韦对照品适量, 同法制成含帕拉米韦 5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以帕拉米韦峰面积计算, 即得。

2.10 帕拉米韦原料药在不同条件下的稳定性

2.10.1 温度对帕拉米韦稳定性的影响 取适量帕拉米韦原料药于量瓶中, 用水溶解并定容, 分别置于 10、25、40、60、80、100 $^{\circ}$ C 的封闭环境中, 并于 0、1、2、3、6、12、24、48 h 后分别取样, 经微孔滤膜滤过, 精密吸取 10 μ L 样品溶液进样分析, 记录色谱图, 以外标法计算帕拉米韦原料药在不同温度 and 不同时间点的质量分数, 见表 1。可见当温度从 10 $^{\circ}$ C 升高到 100 $^{\circ}$ C 时, 48 h 内帕拉米韦的稳定性较好。

表 1 温度对帕拉米韦原料药稳定性的影响

Table 1 Effect of temperature on the stability of peramivir active pharmaceutical ingredient

温度/ $^{\circ}$ C	帕拉米韦质量分数/%								
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
10	100	98.6	98.5	98.9	96.2	98.6	96.7	99.3	99.6
25	100	99.5	100.2	99.9	97.6	97.1	97.1	98.4	98.8
40	100	103.1	102.3	101.6	100.7	100.7	99.5	97.6	103.3
60	100	98.2	99.5	98.4	97.3	97.9	99.9	94.5	102.1
80	100	103.2	103.6	102.5	102.1	102.4	101.4	102.2	100.5
100	100	99.8	97.1	98.3	99.6	96.3	98.8	100.4	103.2

2.10.2 强光对帕拉米韦稳定性的影响 取适量帕拉米韦原料药于量瓶中, 用水溶解并定容, 密封置于装有日光灯的稳定性试验箱中, 于第 5、10 天取样, 平行测定 3 组, 经微孔滤膜滤过, 精密吸取 10 μ L 样品溶液进样分析, 记录色谱图, 以外标法计算帕拉米韦原料药在不同时间点的质量分数, 见表 2。数据表明, 光照对帕拉米韦稳定性不会产生影响。

表 2 光照对帕拉米韦原料药稳定性的影响

Table 2 Effect of light on the stability of peramivir active pharmaceutical ingredient

光照时间/d	帕拉米韦质量分数/%
0	100.00
5	99.77
10	99.73

2.10.3 pH 值对帕拉米韦稳定性的影响 分别用 pH 值为 1.0、2.5、6.5、7.4、9.0 的缓冲溶液, 配制 1 mg/mL 帕拉米韦水溶液, 密封置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中, 于 0、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48 h 后分别取样, 经微孔滤膜滤过, 精密吸取 10 μ L 样

品溶液进样分析, 记录色谱图, 以外标法计算帕拉米韦原料药在不同时间点的质量分数, 见表 3。以 $\ln C$ (质量浓度) 对 t (时间) 作图, 结果见图 2。可见帕拉米韦在碱性和中性环境中较稳定, 而在 pH 1.0、2.5 时, 帕拉米韦会发生明显的降解, 尤其在 pH 1.0 时, 48 h 内降解了 53.9%, 降解半衰期 ($t_{1/2}$) 是 43.6 h。

3 讨论

帕拉米韦的分子结构中含有胍基和一个亲脂性侧链, 是一个环戊烷衍生物, 没有紫外发光基团, 仅在 210 nm 处有紫外末端吸收。目前仅有一篇采用 HPLC 法测定帕拉米韦的中文文献^[8]。本研究考察了乙腈-水、乙腈-甲酸水 (含 0.1% 的甲酸)、乙腈-醋酸水 (含 0.1% 的醋酸)、乙腈-磷酸水 (含 0.1% 的磷酸) 等多个流动相体系, 比较了不同色谱峰的保留时间和峰形, 最后将流动相确定为水 (含 0.1% 的醋酸)-乙腈 (10:90), 帕拉米韦的保留时间为 7.74 min, 紫外峰形较好。在此基础上对该方法进行了方法学验证, 结果表明该方法可行性良好, 可以作为已经报道的帕拉米韦 HPLC 测定法的补充^[8]。

表3 pH 值对帕拉米韦原料药稳定性的影响

Table 3 Effect of pH values on the stability of peramivir active pharmaceutical ingredient

pH 值	帕拉米韦质量分数/%										
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h
1.0	100	98.8	96.1	90.6	89.6	87.9	87.1	80.6	65.2	53.1	46.1
2.5	100	98.8	97.3	97.2	97.1	97.0	95.9	98.3	97.4	96.9	94.9
6.5	100	98.1	98.4	100.7	98.8	98.6	98.7	100.1	100.6	98.3	98.3
7.4	100	99.0	99.6	101.5	101.2	101.7	102.1	100.6	101.1	99.6	100.3
9.0	100	98.1	98.0	98.5	97.4	98.1	98.6	97.9	96.7	95.4	96.7

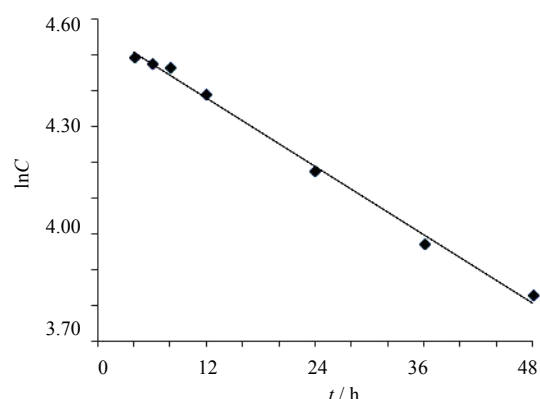


图2 帕拉米韦原料药在 pH 1.0 的酸性条件下质量分数-时间曲线

Fig. 2 Concentration-time curve after incubation of peramivir active pharmaceutical ingredient in phosphate buffers with pH 1.0

当帕拉米韦在 pH 1.0 的磷酸盐缓冲液中孵育时,帕拉米韦的峰形在 12 h 开始出现分叉、双峰的现象,表明帕拉米韦已经开始降解,它在 pH 1.0 的酸性环境中极不稳定。在 pH 2.5 的磷酸盐缓冲液中,帕拉米韦的降解速率明显低于在 pH 1.0 的磷酸盐缓冲液中。在碱性和中性条件下,帕拉米韦的稳定性良好。在 100 °C 高温条件时,帕拉米韦在 48 h 内稳定,至于超过 48 h 的稳定性如何,本实验没有继续进行考察。在光照 10 d 的情况下,帕拉米韦的稳定性良好。

关于帕拉米韦在不同条件下的稳定性尚未见报

道,本研究对帕拉米韦在不同条件下的稳定性研究结果为帕拉米韦制剂的开发、储存和运输提供了依据和参考,尤其要关注帕拉米韦在酸性条件下的稳定性,具有一定的创新性。

参考文献

- [1] Babu Y S, Chand P, Bantia S, *et al.* BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(19): 3482-3486.
- [2] Govorkova E A, Leneva I A, Goloubeva O G, *et al.* Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(10): 2723-2732.
- [3] Barroso L, Treanor J, Gubareva L, *et al.* Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment [J]. *Antivir Ther*, 2005, 10(8): 901-910.
- [4] Gubareva L V, Kaiser L, Hayden F G. Influenza virvs neuramindas einhibitors [J]. *Lancet*, 2000, 355(9206): 827-835.
- [5] 晋 欣, 王志强, 杭太俊, 等. HPLC 法测定帕拉米韦的含量及其有关物质 [J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(2): 140-142.
- [6] 姜 瑛, 吕丽娟, 代 奕, 等. 非水滴定法测定帕拉米韦原料中的帕拉米韦 [J]. *现代药物和临床*, 2013, 28(2): 200-202.