

文章编号: 1672 - 058X(2009)05 - 0462 - 06

# 亚叶酸钙注射液工艺研究

刘成绳

(重庆药友制药有限责任公司, 重庆 401121)

**摘要:**针对亚叶酸钙注射液生产过程中存在的问题,以亚叶酸钙含量、有关物质为考察指标,以配液温度、氮气压力、搅拌时间为考察因素,选用  $L_4(2^3)$  正交表进行试验,优选出药液配制工艺;以样品中有关物质、可见异物为考察指标,对不同的灭菌工艺进行试验,优选出最佳灭菌工艺条件,从而优化了亚叶酸钙注射液的生产工艺条件;经留样观察表明,用优化后的工艺生产的亚叶酸钙注射液,产品质量稳定。

**关键词:**亚叶酸钙注射液;工艺优化;正交试验

**中图分类号:** R943

**文献标志码:** A

亚叶酸钙是四氢叶酸的甲酰化衍生物,于 1964 年首次被合成成功,主要用作氨甲蝶呤过量时的解毒剂,抗贫血剂,与 5-氟尿嘧啶合用可用于治疗晚期结肠癌、直肠癌<sup>[1]</sup>,是临床常用抗肿瘤辅助药。

经质量控制 (Quality control, QC) 留样观察发现,按现行工艺生产出的亚叶酸钙注射液长期存放会出现质量问题,如:有关物质偏高、可见异物不合格等。根据亚叶酸钙理化性质,结合文献资料报道发现<sup>[2-4]</sup>,亚叶酸钙溶液对温度和空气敏感,在高温、有空气条件下易被降解,导致有关物质增加。同时,亚叶酸钙溶解度随温度升高而增加,以离子形式分布于溶液中,易形成过饱和溶液,在溶解不充分的情况下,易析出晶体造成药液可见异物不合格。

## 1 材料与方法

### 1.1 方法

为优化工艺参数,实验以样品中亚叶酸钙含量、有关物质为考察指标,以配液温度、氮气压力、搅拌时间为考察因素,选用  $L_4(2^3)$  正交表进行试验,优选出药液配制工艺;然后以样品中有关物质、药液可见异物为考察指标,选用不同的灭菌工艺进行试验,优选出最佳灭菌工艺。按照筛选出的最佳工艺试制出的样品经留样观察,各项指标均符合亚叶酸钙注射液质量标准要求,确保了产品质量稳定。

### 1.2 试药、仪器和设备

#### 1.2.1 试药及物料

亚叶酸钙原料药 (批号: R0801021, 含量: 98.2%, 干燥失重: 12.4%, 湖州展望药业有限公司); 三羟甲基胺基甲烷 (北京奥博星生物技术责任有限公司, 生化试剂); 盐酸 (重庆川东化工集体有限公司, 分析纯); 盖式滤芯 (0.2  $\mu\text{m}$ , PALL 公司); 玻璃安瓿瓶 (10 mL 棕色, 山东力诺玻璃瓶有限公司)。

#### 1.2.2 仪器及设备

磁力搅拌器 (巩义市浴华仪器有限责任公司); QCA12/1 - 20 安瓿超声波清洗机 (上海远东制药机械总

收稿日期: 2009 - 05 - 31; 修回日期: 2009 - 06 - 28。

作者简介: 刘成绳 (1975 - ), 女, 重庆人, 工程师, 从事药品生产工艺和技术管理。

厂);DGA6/1-20安瓿灌装封口机(上海远东制药机械总厂);XGI.ODD-2.0B双扉机动门安瓿灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);YB-2型澄明度检测仪(天津大学精密仪器厂);BCD-266e冷藏冷冻箱(伊莱克斯电器有限公司);高效液相(Agilent)。

## 2 结果与分析

### 2.1 配料工艺参数的正交试验优化

#### 2.1.1 考察指标的确定与检测方法

考虑到亚叶酸钙注射液在配制过程中会接触高温、空气,造成亚叶酸钙降解,引起有关物质增加。又据文献[2]报道,亚叶酸钙溶于水,溶解度随温度降低而减少。实践中也发现,亚叶酸钙在水温低于 30 时不易溶解,溶解不好会造成含量降低。所以选择亚叶酸钙含量和有关物质为主要考察指标,因药液配制后需先无菌过滤之后才灌装,因此,配料工艺不考察可见异物。参照国家药品监督管理局标准(试行)WS-334(X-304)-2001亚叶酸钙注射液质量标准,采用 HPLC测定样品中亚叶酸钙含量与有关物质。

#### 2.1.2 相关因素与水平的确定

在生产过程中,配制溶液温度越高,亚叶酸钙溶解越完全;但温度过高,不利于主药的稳定。通氮量越多,溶液中的残留空气越少,有利于主药稳定;但通氮量过大,会引起溶液温度迅速下降,不利于主药完全溶解影响其含量。搅拌时间越长,有利于主药溶解完全,但搅拌时间过长,不利于主药稳定。因此,结合原有工艺参数,选取配液温度、氮气压力、搅拌时间为考察因素,采用  $L_4(2^3)$ 正交表进行平行试验。

\*注:在其他条件固定不变的情况下,通氮量和氮气压力成正比,氮气压力越大,单位时间内的通氮量越大。

#### 2.1.3 正交实验设计与极差分析

按正交表设计的试验条件进行配制样品,每个试验配制量为 500 mL,样品配制好后立即过滤,灌装并熔封,按亚叶酸钙注射液质量标准检验亚叶酸钙含量与有关物质。正交试验设计见表 1,试验结果见表 2。

表 1 因素水平

水平	因素		
	配液温度 $T /$	氮气压力 $P/\text{Mpa}$	搅拌时间 $t/\text{min}$
	A	B	C
1	40 $\pm$ 1	0.10	10
2	35 $\pm$ 1	0.05	5

表 2 试验结果

试验序号	A	B	C	有关物质 /%	含量减少量 /%
1	1	1	1	0.90	1.8
2	1	2	2	1.00	0.2
3	2	1	2	0.64	2.7
4	2	2	1	0.75	0.5

对试验得到的数据分别进行极差分析,极差分析见表 3、表 4。

只从有关物质的角度考虑,结合各因子  $K$ 值直观分析得的优化配制工艺条件为:  $A_2B_1C_2$ 。

表 3 有关物质极差分析

水平	A	B	C
$K_1$	1.9	1.54	1.65
$K_2$	1.39	1.75	1.64
$R$	0.51	0.21	0.01

由有关物质极差分析表的  $R$  值可知  $R_a > R_b > R_c$ , 故有关物质影响因素大小顺序为:  $A > B > C$ , 即配液温度对有关物质的影响显著, 其次是氮气压力, 搅拌时间对有关物质的影响可以忽略。

表 4 含量减少量极差分析

水平	A	B	C
$K_1$	2.0	4.5	2.3
$K_2$	3.2	0.7	2.9
$R$	1.2	3.8	0.6

只从含量的角度考虑, 结合各因子  $K$  值直观分析得的优化配制工艺条件为:  $A_1 B_2 C_1$ 。

由含量减少量极差分析表的  $R$  值可知  $R_b > R_a > R_c$ , 故含量影响因素大小顺序为:  $B > A > C$ , 即氮气压力对含量的影响显著, 其次是配液温度, 搅拌时间对含量影响不显著。

综合有关物质和含量的极差分析表, 为确保二者达到较优结果, 做如下筛选: 因配液温度会显著影响有关物质, 而对含量影响不显著, 故配料温度选择水平 2; 氮气压力会显著影响含量, 而对有关物质影响不显著, 故氮气压力选择水平 2; 搅拌时间对含量有一定影响且对有关物质的影响可以忽略, 搅拌时间选择水平 1。

因此综合考虑有关物质和含量的优选工艺条件为  $A_2 B_2 C_1$ , 即配料温度为  $(35 \pm 1)$ , 氮气压力为 0.05 MPa, 搅拌时间为 10 min。

## 2.2 灭菌工艺的筛选

### 2.2.1 因素与水平的确定

亚叶酸钙注射液为水溶液型注射剂, 按照国家药品监督管理局 (State Food And Drug Administration, SFDA) 对注射剂灭菌工艺的要求<sup>[5]</sup>, 首选过度杀灭法 (湿热灭菌 121 恒温 15 min), 如产品不能耐受过度杀灭的条件, 可考虑采用残存概率法 ( $8 F_0 < 12$ , 常用的湿热灭菌工艺为: 121 恒温 8 min, 115 恒温 30 min), 但均应保证产品灭菌后的灭菌保证水平 (Sterility Assurance Level, SAL) 不大于  $10^{-6}$ 。结合目前的工艺选择一些低温的消毒方法。因此研究选择以下的灭菌消毒工艺进行试验研究。灭菌工艺见表 5:

表 5 灭菌工艺

序号	恒温温度 $T/$	时间 $t/\text{min}$
1	121	15
2	121	8
3	115	30
4	100	30
5	80	30
6	60	30

### 2.2.2 考察指标的确定与检测方法

灭菌过程是产品耐受高温的过程, 会影响产品的稳定性, 同时灭菌过程又是产品受热充分溶解的过程。因此选择有关物质和可见异物为考察指标。参照国家药品监督管理局标准 (试行) WS-334(X-304) - 2001

亚叶酸钙注射液质量标准,采用 HPLC 测定样品中有关物质,可见异物在澄明度检测仪下按照《中国药典》2005 版二部附录可见异物检查法的补充规定进行检查。

### 2.2.3 灭菌试验和结果分析

按 2.1 筛选出的配料工艺参数配制样品,配制量为 7 000 mL,样品配制好后立即过滤,灌装并熔封,按表 5 的灭菌工艺进行灭菌工艺试验,每个灭菌工艺样品约 100 支。为了考察样品灭菌前后考察指标的变化情况,同时取未灭菌的样品同步检测。试验结果见表 6。

表 6 灭菌试验结果表

序号	灭菌工艺		结果	
	T/	t/min	有关物质 /%	可见异物
1	121	15	5.50	无
2	121	8	3.70	无
3	115	30	3.50	无
4	100	30	2.00	无
5	80	30	0.90	无
6	60	30	0.84	无
7	不灭菌		0.72	无

根据亚叶酸钙注射液的质量标准,有关物质: $<2.0\%$ ,可见异物:均应无任何可见异物。

由表 4 的试验结果可见:第 1,2,3,4 号试验样品的有关物质均不合格,第 5,6 号试验及未灭菌(7)样品的有关物质和可见异物均合格。

第 1,2,3,4 是按照注射剂灭菌工艺决策树中选择的终端灭菌工艺,因此亚叶酸钙注射液不能采取终端灭菌的方式。试验 5,6,7 的有关物质和可见异物均合格。因现行产品是在贮存过程中出现可见异物不合格,故将 3 个样品按长期留样的要求进行留样(温度: $(6 \pm 2)$ ),考察可见异物。考察结果见表 7。

表 7 可见异物留样考察结果表

试验号	可见异物		
	第 1 月	第 2 月	第 3 月
5	均合格	均合格	均合格
6	均合格	均合格	2%不合格
7	均合格	3.5%不合格	10%不合格

考察到第 2 个月发现第 7 号试验的部分样品内有白点,引起可见异物不合格,继续考察到第 3 个月第 7 号试验的部分样品内出现白点、白块的不合格品大幅增多,第 6 号样品里有 1 支内有几个白点。

按照 SFDA 对注射剂的要求,小容量注射剂应首选终端灭菌工艺,如有充分的依据证明药品不能采用终端灭菌工艺,可考虑采用无菌生产工艺<sup>[5]</sup>。表 6、表 7 的试验结果表明亚叶酸钙注射液不能采取终端灭菌的方式,也不能采取终端不消毒的方式,应采取无菌生产工艺和终端低温消毒相结合的方式。根据试验结果,选择 80 恒温 30 min 的消毒工艺。

### 2.3 稳定性试验考察

为进一步验证筛选出的工艺是否稳定可靠,采用优化工艺试制样品 500 支,并将样品根据药物稳定性试验指导原则<sup>[6]</sup>进行长期留样考察。具体考察方法如下:

样品量:500 支;温度: $(6 \pm 2)$ ;考察时间:1,3,6,9,12 个月;考察项目:有关物质、可见异物。结果见表 8。

表 8 稳定性试验考察结果表

考察时间 /月	有关物质 /%	可见异物合格率 /%
0	0.80	100
3	0.85	100
6	1.02	100
9	1.36	100
12	1.50	100

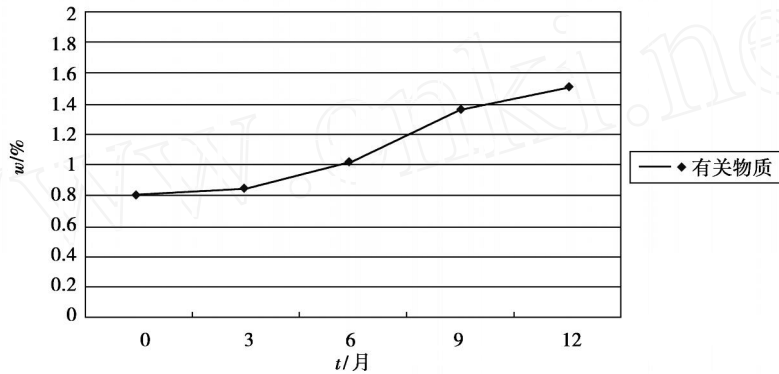


图 1 稳定性试验有关物质结果图

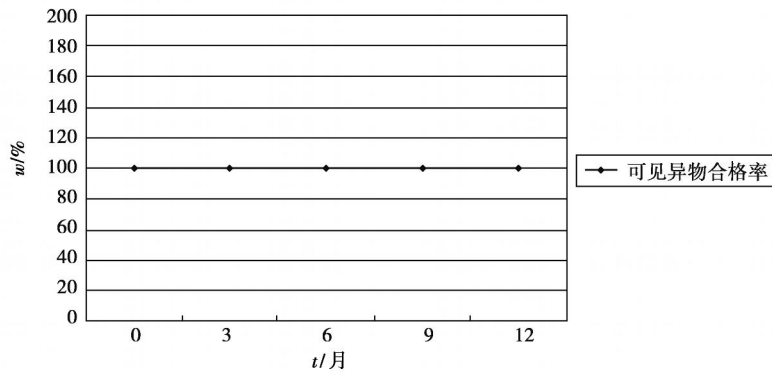


图 2 稳定性试验可见异物合格率结果图

亚叶酸钙注射液的有效期为 12 个月。

由图 1 可直观看出,按筛选出的工艺条件制备出的亚叶酸钙注射液第 0 月样品的有关物质为 0.8%,12 个月留样考察后的有关物质为 1.5%,均好于现行工艺,且低于亚叶酸钙注射液质量内控标准(有关物质应 <2.0%)。由图 2 可直观看出,整个考察期内样品可见异物均合格。证明工艺稳定可靠,可用于指导实际生产。

### 3 结果与分析

通过研究,筛选出亚叶酸钙注射液的工艺参数见表 9。

表 9 确定的最佳工艺参数

工艺参数	指标
配料温度	35 ±1
氮气压力	0.05 MPa
搅拌时间	10 min
消毒工艺	80 恒温 30 min

## 4 结论与讨论

采用正交试验法优选出了亚叶酸钙注射液配料工艺参数,又根据注射剂灭菌工艺筛选原则确定了消毒工艺。按筛选出的工艺条件制备样品并留样考察,样品在有效期内有关物质和可见异物均合格,证明筛选出的工艺稳定可靠,可确保产品质量。

研究仅从优化工艺参数的角度进行了筛选,可及时用于指导实际生产。改善亚叶酸钙注射液的质量指标还可以从筛选处方着手。美国专利报道<sup>[2]</sup>,因亚叶酸钙注射液对温度敏感需冷藏,但在冷藏条件下,当溶液达到一定浓度时会出现结晶,通过加入合适的络合剂就可避免溶液结晶。也有日本专利报道<sup>[3]</sup>,亚叶酸钙溶液不稳定不能长期贮存,通过添加 pH 调节剂和抗氧剂可以明显提高溶液的稳定性。因此,通过对亚叶酸钙注射液的配方和生产工艺进行优化,解决产品在贮存过程不结晶,甚至可以耐受终端灭菌等现实问题,将有利于提高亚叶酸钙注射液的品质。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药品监督管理局标准[S]. 亚叶酸钙注射液 WS-334(X-304)-2001
- [2] NIKERKA J, VERMEER JM P. Aqueous folinate solution stable at refrigerator temperature, as well as process for its preparation[J]. United States Patent, 1993(2): 517-527
- [3] 宫地建明, 城内丰, 佐藤诚. 注射用水溶液制剂及其稳定化方法[P]. 专利申请号: 200510098679.3
- [4] MERCK E A G. Calcium Folate Pure[J]. Version, 2007(2): 10-18
- [5] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典[M]. 化学工业出版社, 2005

## Technological research on calcium folinate injection

**LIU Cheng-sheng**

(Chongqing Yao You Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing 401121, China)

**Abstract:** To resolve the problems existing in the manufacturing process, in this study, we optimized the technology of injection based on the results from orthogonal experiment, and we also determine the influence of temperature of samples, pressure of nitrogen and time of agitation on the content of calcium folinate and relative substances in the mixture of injection. Furthermore, the condition of sterilization was also optimized in our experiments based on the analysis of relative substances and visible particles. The results showed that the products based on the optimizing programs are stable and reliable.

**Key words:** calcium folinate injection; optimization of manufacture; orthogonal experiment

责任编辑:田 静