

文章编号: (2006)04-0159-05

温度、pH值及保护剂对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响

刘锐¹, 徐建宽², 何仲贵¹, 高峰²

(1.沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 天士力集团 生物技术和生物制品研究开发中心, 天津 300402)

摘要: **目的** 考察温度、pH值及保护剂(甘露醇、人血白蛋白、PEG、吐温等)对胸腺素 $\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$) 稳定性的影响。**方法** 利用 HPLC 测定水溶液中胸腺素 $\alpha 1$ 的含量, 从而得到各因素对其稳定性的影响。**结果** 4、pH=4 时溶液的稳定性最好, 甘露醇的质量分数在 5%~10% 内胸腺素 $\alpha 1$ 较稳定, 并且优于其他几种保护剂。**结论** 上述结果为胸腺素 $\alpha 1$ 的制剂学研究提供了依据。

关键词: 药剂学; 稳定性; 高效液相色谱法; 胸腺素 $\alpha 1$

中图分类号 R94 **文献标识码** A

胸腺素 $\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$) 是 Goldstein 等最早从牛胸腺组织中分离出来的一种酸性多肽, 由 28 个氨基酸组成, 分子质量 3 108 u, 等电点 4.2。它是一种具有多种生物活性的免疫调节剂, 已被广泛用于治疗乙型肝炎与丙型肝炎^[1~3]、癌症和免疫缺陷等疾病^[4~6]。目前国内外市售的只有冻干粉针一种剂型。为了加深对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的认识, 并为从事其溶液制剂研究提供依据, 作者从制剂学的角度出发, 对影响胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的因素进行了较全面的研究, 以期明确影响胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的主要因素, 指导胸腺素 $\alpha 1$ 的制剂学的研究。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司 1100), DGG-101-3 电热鼓风干燥箱(天津天宇机电有限公司)。

胸腺素 $\alpha 1$ (纯度质量分数大于 98%, 天津天士力生物中心), 胸腺素 $\alpha 1$ 对照品(日达仙, 美国 SciClone 公司), 人血白蛋白(成都蓉生药业有限责任公司), 甘露醇(天津苏庄化学试剂厂), Tween80(上海大众药业有限公司), PEG4000(天津大茂化学仪器供应站), 色谱乙腈(德国 Merck 公司), 其余试剂(分析纯, 市售)。

2 方法与结果

2.1 样品测定

2.1.1 色谱条件选择与系统适应性试验

色谱柱: C₁₈ Agilent 1100 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: A 乙腈-水(体积比为 10 : 90), B 乙腈-水(体积比为 50 : 50), 磷酸盐缓冲液(用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 5.7); B 相在 18 min 内梯度洗脱 2%~8%; 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ; 胸腺素 $\alpha 1$ 质量浓度为

收稿日期: 2006-02-21

作者简介: 刘锐(1980-), 女(汉族), 吉林梅河口人, 硕士研究生, E-mail liur7049@126.com; 高峰(1968-), 男(汉族), 北京人, 博士, 主要从事蛋白多肽类药物的研究, Tel. 022-26736525, Fax. 022-26736526, E-mail gaofeng1@tasly.com。

$1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 进样 $20 \mu\text{L}$ 。见图 1、2。

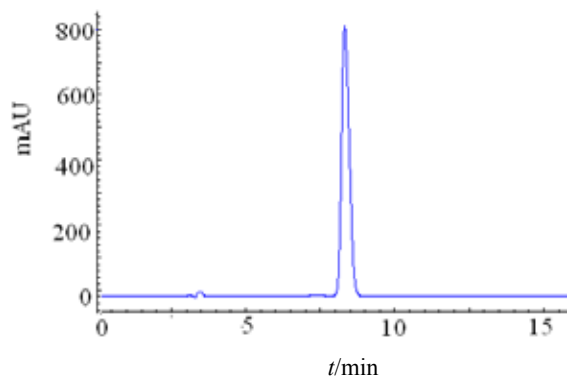


Fig.1 Chromatograms of Zadaxin

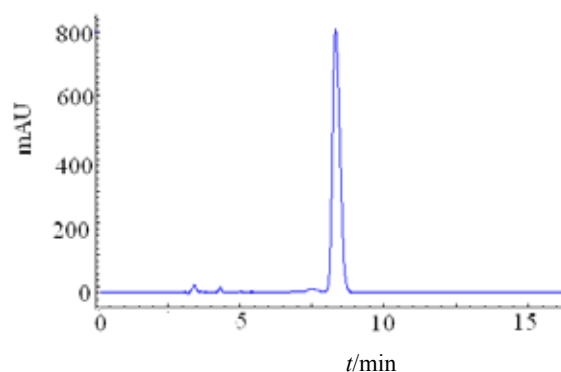


Fig.2 Chromatograms of thymosin $\alpha 1$

理论塔板数按胸腺素 $\alpha 1$ 峰计算应不得低于 2 000。

2.1.2 方法学验证

精密称取胸腺素 $\alpha 1$ 对照品适量, 用水溶解并稀释至质量浓度为 $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。精密量取贮备液适量, 用流动相溶液分别稀释至质量浓度为 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 1.2 、 $1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 各进样 $20 \mu\text{L}$, 记录峰面积。结果回归方程为 $Y=12\ 932X+18$, $r=0.999\ 9$, 线性范围为 $0.1\sim 1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.2.1 精密度试验

精密称取标准溶液 ($1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, RSD 为 0.7%, 可见色谱系统精密度良好。

2.1.2.2 重复性试验

取同一批供试品, 在上述色谱条件下平行测定 5 次, 测定胸腺素 $\alpha 1$ 含量, RSD=1.4%, 表明重现性良好。

2.1.2.3 回收率试验

采用加样回收测定方法, 取已知含量的样品, 按高、中、低浓度分别添加一定量的对照溶液, 同法测定, 测得平均回收率为 99.23%, RSD=1.8%。结果见表 1。

Table 1 Results of recovery test of thymosin $\alpha 1$ by HPLC ($n=3$)

$\rho_{\text{add}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{mes}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	Mean recovery /%	RSD/%
0.8	0.779 8	97.48		
1.0	1.009	100.86	99.23	1.8
1.2	1.192	99.34		

结果表明, 本文中所建立的方法准确、可靠。

2.2 温度和 pH 对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响

分别用 pH 1.0、4.0、7.0、12.0 的缓冲液制备质量浓度约为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胸腺素 $\alpha 1$ 水溶液, 经微孔滤膜过滤, 置于 4、20、37 条件下保存, 定时取样, HPLC 测定样品中胸腺素 $\alpha 1$ 的含量。

温度和 pH 对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响分别见图 3、4。由图 3 可知, 当 pH 为 4 时, 温度分别为

4、20、30 的胸腺素 $\alpha 1$ 溶液放置 30 d 后, 胸腺素 $\alpha 1$ 的含量的质量分数分别下降了 1.5%、6.3%、41.2%。由图 4 可知, 当温度为 4 时, pH 分别为 1、4、7、12 的胸腺素 $\alpha 1$ 溶液放置 30 d 后, 胸腺素 $\alpha 1$ 的含量的质量分数分别下降了 3.6%、1.5%、1.8%、15.3%。因此, 低温和中性、弱酸的环境下有利于胸腺素 $\alpha 1$ 的稳定, 而过高的温度、强酸、强碱均对胸腺素 $\alpha 1$ 的稳定不利。

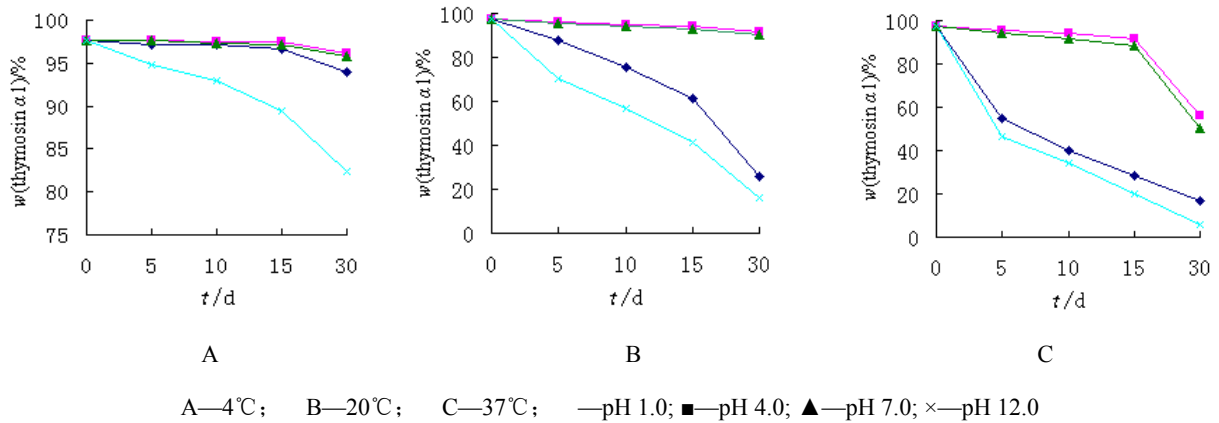


Fig. 3 Effect of temperature on stability of thymosin $\alpha 1$

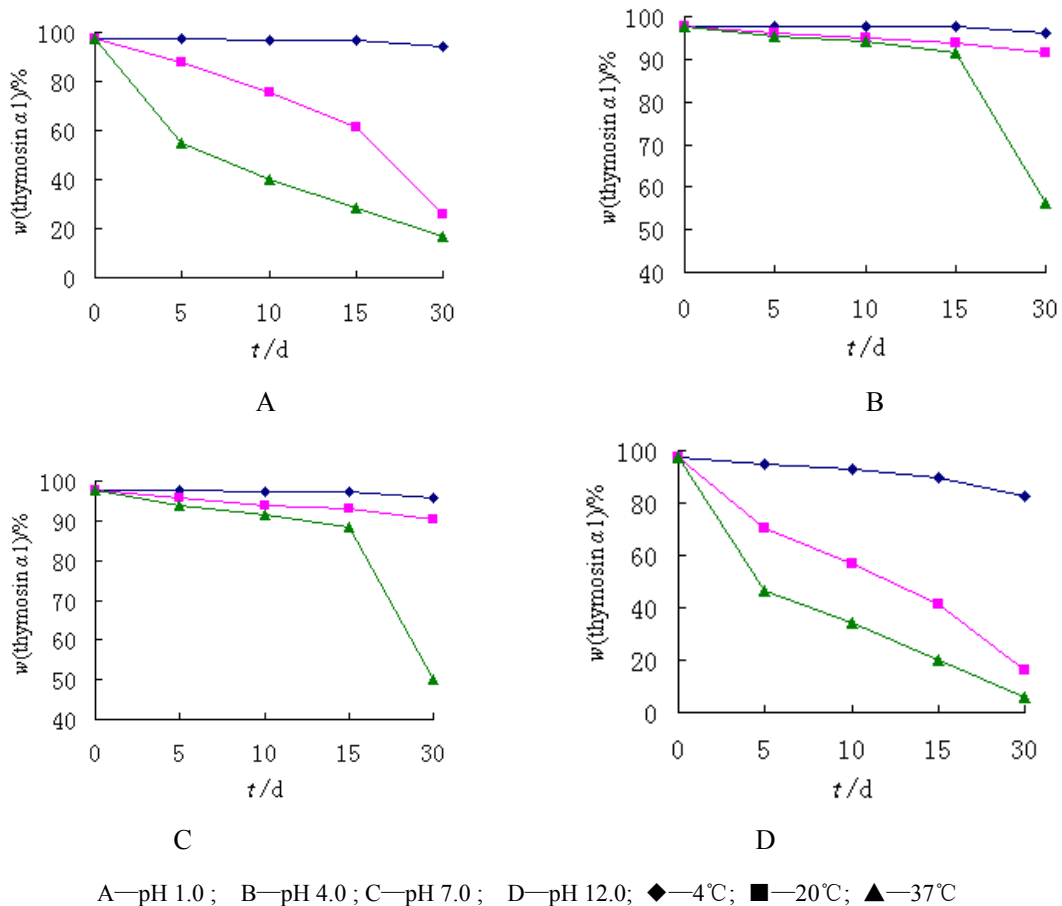


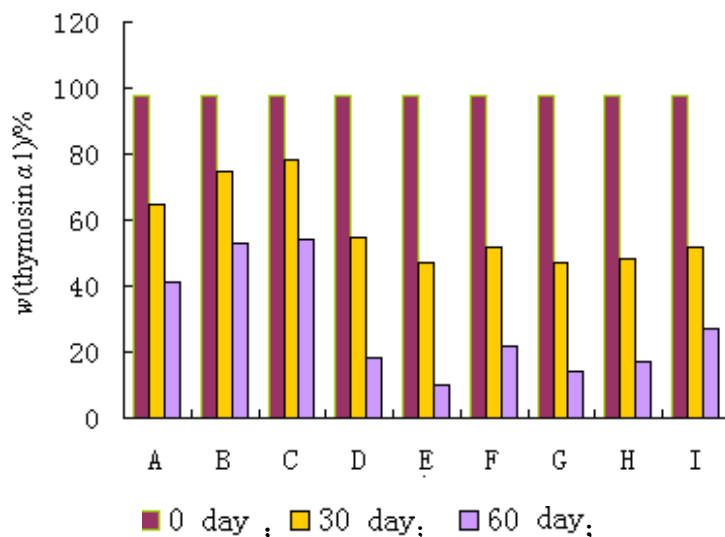
Fig.4 Influence of pH on stability of thymosin $\alpha 1$

2.3 不同保护剂对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响

取胸腺素 $\alpha 1$ 原料药适量, 精密称定, 并加入不同种类和浓度的保护剂, 用 pH 7.0 磷酸盐缓冲

液稀释至约 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 40 °C 保存观察保护剂对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响。所考察的保护剂包括甘露醇、人血白蛋白、PEG4000 和 Tween80。

各种保护剂对胸腺素 $\alpha 1$ 稳定性的影响见图 5。由图 5 可知, 质量分数为 5%~10% 的甘露醇保护作用最好, 与 0 d 相比, 30 d 后胸腺素 $\alpha 1$ 的质量分数降低了 22%。而加入人血白蛋白、Tween80、PEG4000 的胸腺素 $\alpha 1$, 30 d 后其质量分数分别下降了 43%、45%、45%。



A— φ (mannitol)=1%; B— φ (mannitol)=5%; C— φ (mannitol)=10%; D— φ (BSA)=0.1%; E— φ (BSA)=1%;
F— φ (tween80)=0.1%; G— φ (tween80)=1%; H— w (PEG4000)=0.1%; I— w (PEG4000)=1%

Fig.5 Effect of different protectants on stability of thymosin $\alpha 1$

3 讨论

温度和 pH 值是影响胸腺素 $\alpha 1$ 水溶液稳定性的两个重要因素。药物在制备成制剂时注意低温贮藏; 在中性和弱酸性的环境中稳定性良好; 处在强酸或强碱的条件下, 其稳定性差, 作为胸腺素 $\alpha 1$ 的保护剂, 质量分数为 5% 的甘露醇对此肽的保护作用明显优于人血白蛋白、Tween80 和 PEG4000。

上述稳定性试验结果对于今后开展胸腺素 $\alpha 1$ 的溶液制剂研究工作具有较大的参考价值。

参考文献:

- [1] LAN G K, NANJI A, HOU J, *et al.* Thymosin alpha 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase [J]. *J Viral Hepat*, 2002, 9(4):280-283.
- [2] MOSCARELLA S, BUZZELLI G, ROMANELLI RG, *et al.* Interferon and thymosin combination therapy in naïve patients with chronic hepatitis C: preliminary results [J]. *Liver*, 1998, 18:366-370.
- [3] SHERMAN K E, SJOGREN M, CREAGER R L, *et al.* Combination therapy with thymosin $\alpha 1$ and interferon for the treatment of chronic hepatitis C infection : a randomized, placebo controlled double-blind trial [J]. *Hepatology*, 1998,27:1128-1132.
- [4] GARACI E, LOPZ M, BONSIGNORE G, *et al.* Sequential chemoimmunotherapy for advanced non-small cell lung

cancer using cisplatin, etoposide, thymosin $\alpha 1$ and interferon- $\alpha 2a$ [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A(13/14):240-243.

[5] RASI G, TERZOLI E, IZZO F, *et al.* Combined treatment with thymosin $\alpha 1$ and low-dose interferon-alpha after dacarbazine in advanced melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2000, 10(1):1-4.

[6] GARACI E, ROCCHIM G, PERRONI L, *et al.* Combination treatment with zidovudine, thymosin alpha 1 and interferon-alpha in human immunodeficiency virus infection [J]. *Int J Clin Lab Res*, 1994, 24(1):23-27.

Effect of pH, temperature and protectants on stability of thymosin $\alpha 1$

LIU Rui¹, XU Jian-kuan², HE Zhong-gui², GAO Feng¹

(1. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;*

2. *Biotech-Pharm R&D Center, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China*)

Abstract: **Object** To study the effect of pH, temperature and protectants (mannitol, human serum albumin, PEG, tween etc.) on the stability of thymosin $\alpha 1$ solution. **Method** HPLC method was established for determining the contents of the T $\alpha 1$ aqueous solution. **Result** Thymosin $\alpha 1$ aqueous solution was relatively stable at 4 °C, pH =4 and the effect of 5%-10% mannitol was superior to any other protectants.

Conclusion The results provide an important basis for the pharmaceutical research of thymosin $\alpha 1$.

Key words pharmaceutics; stability ; HPLC ; thymosin $\alpha 1$

(责任编辑 高明)