

氨甲喋呤(MTX)多相脂质体化学稳定性的研究

戚 洪 李焕秋 苏德森 顾学裘

(沈阳药学院)

提要 以多相脂质体为载体能增强 MTX 的化学稳定性。在避光条件下, MTX 多相脂质体注射液, 25°C 时贮存期为 4.2 年。

pH 7 的磷酸盐缓冲溶液中的 MTX, 25°C 避光条件下, 是以一种新的途径降解。磷酸盐对该反应有特殊的催化作用; 而在高温或多相脂质体的存在能防止该反应的发生。

关键词 多相脂质体; 氨甲喋呤; 化学稳定性

MTX 在水溶液中的化学稳定性已有文献报道^(1,2)。本文是在对 MTX 多相脂质体的物理稳定性及分析方法的研究基础上, 研究了 MTX 在多相脂质体中的化学稳定性。

材 料 与 方 法

一. 仪器与药品

荧光分光光度计 (日立 650-60 型); 紫外分光光度计 (WFZ 800-D 型); 照度计 (53 型)。

氨甲喋呤(MTX) (上海第十二制药厂); 氨甲喋呤(MTX)多相脂质体 自制;
磷酸盐缓冲液 1/15 M NaH_2PO_4 30 ml + 1/15 M Na_2HPO_4 70 ml, pH 7.2。

二. 实验方法

(一) MTX 的热稳定性

样品于不同温度下加热, 间隔不同时间取样, 按下述的“分析方法 A”测定 MTX 浓度。

(二) MTX 光化学稳定性

光照箱为 $90 \times 70 \times 70 \text{ cm}^3$, 在距底面 17 cm 的平面内, 水平安装 8 只高压水银灯, 两两相对。顶部装有电扇降温。底部放一白色法蓝盘以使盘内各处光强相同。用普通照度计测定光强。

样品置于不同强度的光照下 (25°C), 间隔一定时间取样, 按“分析方法 A”测定其中 MTX 浓度。

(三) MTX 的降解途径

样品在不同条件下, 避光放置三个月, 分别测定放置前后样品中 MTX 浓度。水溶液中, MTX 浓度大于 0.5 mg/ml 的样品, 采用“分析方法 B”进行测定; 其余样品用“分析方法 A”测定。并观察放置后样品纸层析谱上降解物的荧光斑点 (详见“分析方法”)。

(四) 分析方法

1. 纸层析—荧光法

取样品 30 μl 以乙醚—异丙醇—水—1 N 氢氧化钠溶液—36% 醋酸 (20:40:35:5:3 V/V) 为展开剂进行纸层析分离, 可观察到 MTX 荧光点 (R_f 0.5) 及新降解物荧光点 (R_f 0.8)。将

MTX 斑点剪下,以 0.5 M 醋酸盐缓冲液(pH 5.6) 20 ml 进行洗脱,洗脱液中加 5% KMnO_4 溶液 20 μl , 3 min 后,加入 5% H_2O_2 溶液 20 μl , 测定该溶液的荧光强度,激发与发射波长分别为 368 nm 及 505 nm。标准品与样品平行处理,进而测出样品中 MTX 的含量。

2. 纸层析—紫外法⁽³⁾

取样品 150 μl ,以 0.5% Na_2CO_3 为展开剂进行纸层析分离,观察 MTX 荧光点(Rf 0.6) 及新降解物荧光点(Rf 0.3)。剪下 MTX 斑点,以 0.1 N NaOH 溶液 25 ml 洗脱,洗脱液在 303 nm 处测定吸收度,以摩尔吸收系数 $e = 2.24 \times 10^4$ 计算 MTX 的浓度。

结果与讨论

一. MTX 热稳定性

文献报道⁽²⁾,在 pH 大于 6.5 的水溶液中,MTX 热降解产物只有 10-甲基叶酸,并且反应为表观一级反应。

多相脂质体(pH 7.2)中不同浓度的 MTX,在 85°C 高温下,间隔一定时间取样测定 MTX 浓度,以浓度的对数对时间在半对数纸上作图,可得斜率相同的直线(如图 1),表明反应仍为表观一级反应。

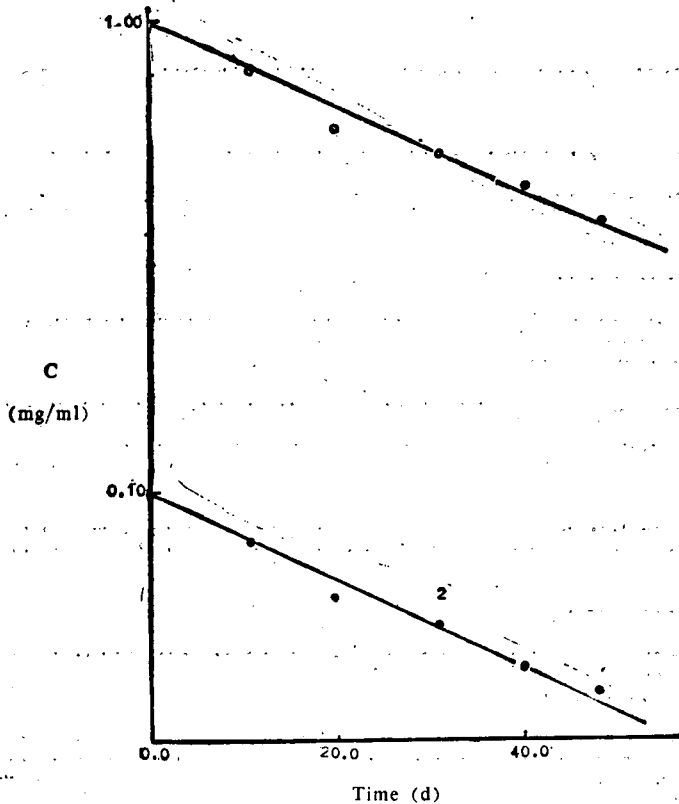


Fig 1. Apparent first-order plots for the degradation of MTX in polyphase liposome suspension in the absence of light, 85°C. 1. 1.0 mg MTX/ml; 2. 0.1 mg MTX/ml

MTX 在两种介质中热解反应的 Arrhenius 曲线(图 2)及动力学参数(表 1)表明,多相脂质体与磷酸盐缓冲溶液中相比,多相脂质体对该反应有一定的抑制作用。但只是减小了频

率因子, 而几乎未改变活化能, 这可能是由于脂质体颗粒增加了空间障碍, 减少了反应分子的碰撞机会, 使反应速度减慢。

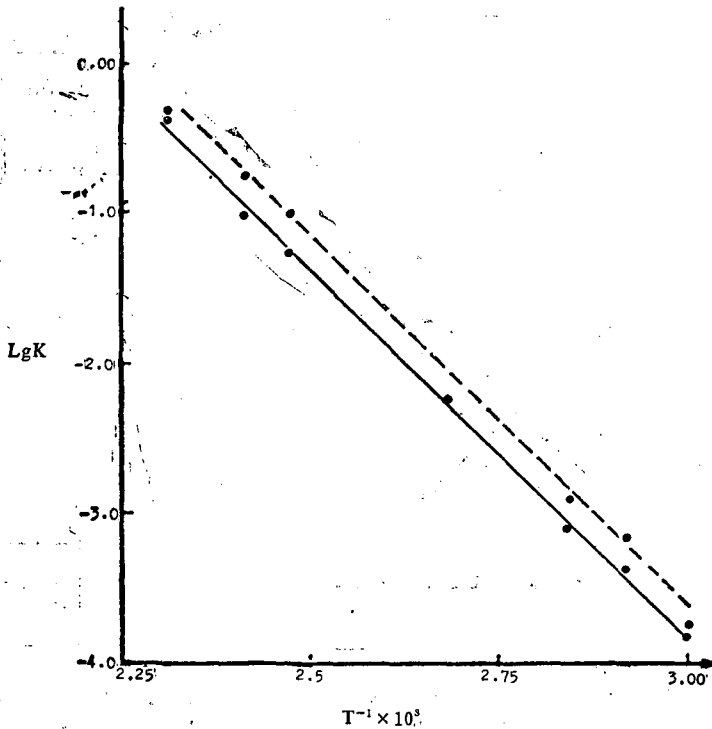


Fig 2. Arrhenius plots for thermal degradation of MTX in polyphase liposomes suspension (•—•) and phosphate buffer solution, the same one as that used in the suspension (•...•), in the absence of light

Tab 1. Some kinetic parameters for thermal degradation of MTX in the absence of light

Medium	Regression equation	r	$A \times 10^{-10}$ (h^{-1})	E(KJM ⁻¹)	$t_{0.5}^{37^\circ C}$ (year)
Buffer	$LgK = -4992/T + 11.26$	0.9984	19.05	95.3	3.5
Liposome	$LgK = -4882/T + 10.83$	0.9983	6.67	93.2	4.2

二. 光分解反应

文献报道⁽¹⁾, MTX 水溶液受光照后发生表观零级光化降解反应。本实验结果表明 MTX 在多相脂质体中受光照后, 也发生表观零级光化降解反应(图 3)。其动力学参数列于表 2。

由表 2 可见, 与相应的磷酸盐缓冲溶液相比, 多相脂质体对 MTX 的光化降解反应也具有一定的抑制作用。不仅延长了链引发阶段, 而且减小了反应速度常数。这可能是由于脂质体能引起光化反应的紫外光的反射、散射及吸收作用, 使其中 MTX 实际受光照射强度减弱, 所以反应速度减慢。

三. MTX 的新降解途径

文献报道⁽²⁾, MTX 在 pH 6.5 以下, 热解过程很复杂, 产物很多。而在 pH 6.5 以上,

热解产物只有一种, 即 10-甲基叶酸。但在 25°C 避光条件下, MTX 在 pH 7.0 (>6.5) 的磷酸盐缓冲溶液中, 降解物却是另一种物质。其纸层析结果如图 4。(层析条件按“分析方法 B”)。

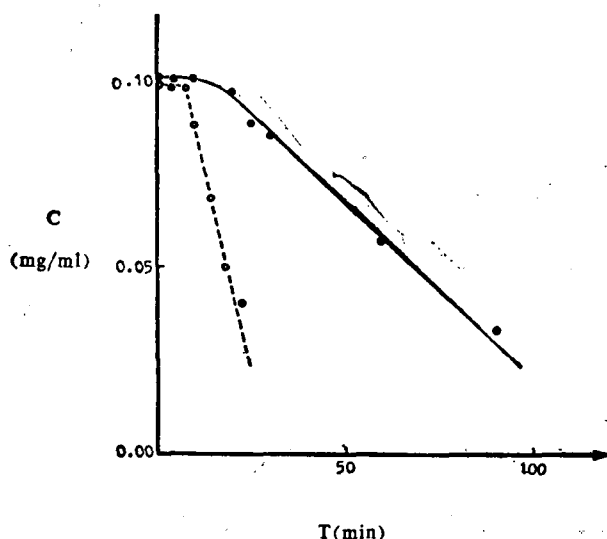


Fig 3. Apparent zero-order plots for the photolytic degradation of MTX at 25°C in polyphase liposome suspension (—•—) and phosphate buffer solution, the same one as that used in the suspension (•••••), under light of intensity of 330 LUX

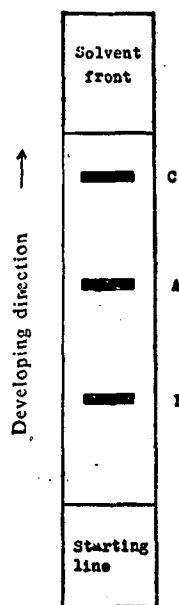


Fig 4. Paper chromatographic behaviors of MTX (A, Rf 0.6), unknown degradation product (B, Rf 0.3) and thermal degradation product of MTX, N¹⁰-methylpteroylglutamic acid (C, Rf 0.9). The developing solvent system is given in the text

Tab 2. Photolytic rate constants and lag periods of MTX in buffer solution and in liposome suspension in 2-ml amples, under the shiners with various intensities of light, at 25°C

Light intensity of shiners(Lux)	In buffer lag(min)	K(FI*·min ⁻¹)	In liposome lag (min)	K(FI·min ⁻¹)
430	6	3.157	15	0.5337
330	8	2.389	20	0.4176
230	9	1.356	39	0.2199
150	35	0.6994	90	0.1377

* FI: Fluorescence intensity, which is directly proportional to the concentration of MTX in the system

MTX 的这种新降解途径在文献中未见过报道, 此新的降解物是何种物质以及生成的规律尚未研究清楚, 有待进一步研究。本文只对其发生的条件进行了考查, 结果如下:

1. 缓冲盐种类的影响

在 25°C 避光条件下, 考查了几种离子对未知新降解物生成的影响, 结果如表 3 所示, 只有在磷酸盐缓冲液中的 MTX 才能生成新降解产物。这可能是由于磷酸盐对此反应有特殊的催化作用。

Tab 3. Effect of some species of ions on formation of unknown degradation product(UDP) at 25°C $\mu=0.232$, in the absence of light

Species of ions	Concentration ^a of MTX (mg/ml)		pH ^b		Molar concentration of ions	FIO"UDP" S ^c
	Initial	Final ^d	Initial ^d	Final		
Phosphate	1.94	0.00	6.99	7.03	0.10	Strong
Bicarbonate	1.84	1.85	8.82	9.23	0.20	No
Acetate	1.51	1.45	6.08	6.23	0.17	No

a. Each datum represents the mean of 3 measurements with the largest SD equal to 0.05; b. pH is measured with pH meter; c. FIO"UDP" S means "Fluorescence intensity of UDP spot on the paper chromatogram. The developing solvent system is given in the text; d. Initial and final are the time at the beginning and end of 3 months' storage at 25°C

2. 温度的影响

在避光条件下, 考查了温度对磷酸盐缓冲溶液中 MTX 生成新降解物的影响, 其结果如表 4 表明, 在低温区域 (4~25°C) MTX 新降解物生成速度随温度升高而加快。而在 60°C 时, 该反应几乎不发生, 此时 MTX 是按生成 10-甲基叶酸的途径降解, 原因有待研究。文献^(1,2) 所报道的 MTX 化学动力学研究均在 60°C 以上高温下进行, 因此未能观察到该新降解物的生成。

Tab 4. Effect of temperature on formation of the unknown degradation product (UDP) in phosphate buffer solution, 1/10M, initial pH 6.93, $\mu=0.232$, in the absence of light

Temperature (°C)	pH ^a	Concentration of MTX(mg/ml)		FIO"UDP" S ^c
		Initial ^c	Final ^c	
60	7.12	1.94	1.36	Non
25	7.03	1.94	0.00	Strong
4	7.00	1.94	1.71	Medium

a. pHs are measured with pH meter 3 months after the storage; b. Each datum represents the mean of 3 experiments with the largest SD equal to 0.05; c. Final means at the time 3 months after of the storage; d. FIO"UDP" S means "Fluorescence intensity of UDP spot on the paper chromatogram. The developing solvent is given in the text

Tab 5. Effect of polyphase liposome on formation of the unknown degradation product (UDP) at 25°C The phosphate buffer solution appearing in the table is the same as that in the liposome(1/15 M,pH 7.2)

Medium	Concentration ^a of MTX(mg/ml)		FIO"UDP" S ^b
	Initial	Final	
Liposome	0.121±0.004	0.118±0.005	No
Buffer	0.108±0.003	0.000±0.000	Strong

a. Each datum represents the mean of 4 measurements; b. FIO"UDP" S means "Fluorescence intensity of UDP spot" on the paper chromatogram. The developing solvent system is given in the text

3. 脂质体的影响

多相脂质体的分散介质就是磷酸盐缓冲溶液, 但包封于脂质体中的 MTX 即使在 25°C 下也不生成新降解物(表 5)。说明脂质体对该反应有抑制作用, 这可能是抑制了磷酸盐的催化作用。

总之, MTX 的这种新降解途径对其制剂的稳定性影响很大, 因此其反应机理、反应类型、降解物的结构等有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Dulal CC, et al. Thermal and photolytic decomposition of methotrexate in aqueous solution. *J Pharm Sci* 1978; **67**:526.
2. Jens H, et al. Kinetics of degradation of methotrexate in aqueous solution. *Int J Pharm* 1983; **18**: 141.
3. Balazs MK, et al. Rapid assay method for the determination of methotrexate. *J Pharm Sci* 1968; **57**: 2002.

STUDY ON CHEMICAL STABILITY OF MTX POLY PHASE LIPOSOMES

QI Hong, LI Huan-Qiu, SU De-Sen, and GU Xue-Qiu

(Pharmaceutical Research Laboratory, Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

ABSTRACT It was observed that the polyphase liposomes(PL), as drug carriers, were able to stabilize MTX chemically. The shelf lives of MTX in PL and in phosphate buffer solution were 4.2 and 3.5 years, respectively.

A new route of MTX degradation was found when MTX was kept in phosphate buffer solution at 25°C for 3 months in the absence of light. The reaction was catalyzed by phosphate, but inhibited by PL and high temperature (60°C).

Key words Polyphase liposome; MTX; Chemical stability