

氟胞嘧啶注射液稳定性预测

胡育筑 张奕华 李丰文 江声华 侯秀清

(中国药科大学, 南京)

氟胞嘧啶为 5-氟-4-氨基-2(1H)-嘧啶酮 (简称 5-FC), 系近年来发展起来的新型抗真菌药。Florey⁽¹⁾曾介绍薄层—紫外分光光度法测定氟胞嘧啶的含量, 研究其制剂的稳定性, 但其原文未见公开发表。本文报告应用反相离子对色谱法测定注射液中氟胞嘧啶的含量, 并按照化学动力学方法预测氟胞嘧啶注射液的稳定性。

实验和结果

一. 氟胞嘧啶水解反应

氟胞嘧啶注射液是 1% 氟胞嘧啶和 0.85% 氯化钠的水溶液⁽²⁾, 其 pH 范围为 6.0~8.0。氟胞嘧啶水解反应的详细研究尚未见报道, 仅有文献⁽¹⁾介绍, 氟胞嘧啶水解产物为氟尿嘧啶 (简称 5-FU) 等。而氟尿嘧啶的水解机制和系统的化学动力学研究已有报道⁽³⁾; 氟尿嘧啶水解的可能产物是巴比妥酸、脲嘧啶及尿素等, 水解程度随 pH 增高而增高, 但即使在 pH>10 的氟尿嘧啶水溶液中, 由于巴比妥酸迅速降解为尿素等非发色物质, 未能观察到巴比妥酸等发色团物质的存在。我们曾对在 100°C 恒温加热 252 h 的氟胞嘧啶注射液用纸层析方法两次展开; 展开剂 I: 叔丁醇—丁酮—氨水—水(4:3:2:1); 展开剂 II: 乙酸乙酯—甲酸—水(86:7:7); 254 nm 紫外灯下检测, 仅观察到氟胞嘧啶和氟尿嘧啶两个斑点, 未见有巴比妥酸(图 1), 采用 HPLC 法试验(条件见含量测定方法), 也未见到有杂质峰存在(图 2)。

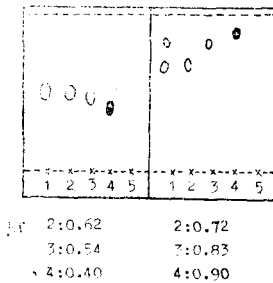


Fig 1. Hydrolysis products of flucytosine injections. 1. Flucytosine injections (100°C, 252 h): 50 μ l; 2. Flucytosine (10 mg/ml): 5 μ l; 3. Fluorouracil (10 mg/ml): 5 μ l; 4. Barbituric acid (10 mg/ml): 5 μ l; 5. Uracil (10 mg/ml): 5 μ l

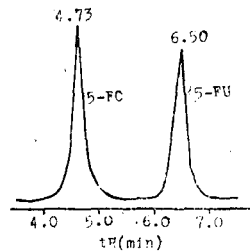
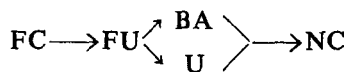


Fig 2. HPLC chromatogram of flucytosine injections (100°C, 252 h).

我们分析在氟胞嘧啶注射液的 pH 条件下, 水解产物主要为氟尿嘧啶及少量非发色团物质, 其水解反应可用下式表示:



式中 FC, 5-FC; FU, 5-FU; BA, 巴比妥酸; U, 脲嘧啶; NC, 非发色团物质。

我们曾用 HPLC 法测定在 100°C 恒温不同时间的氟胞嘧啶注射液中氟脲嘧啶的含量, 结果表明, 在实验条件下氟胞嘧啶的主要分解产物是氟脲嘧啶。应用紫外检测器时其它非发色团物质的存在不干扰测定。故应用 HPLC 法可将氟胞嘧啶和氟脲嘧啶分离、测定氟胞嘧啶的含量, 计算氟胞嘧啶注射液的动力学数据。

二. 反相离子对色谱测定法

(一) 主要仪器、药品和试剂

CX 80-2 型高效液相色谱仪 (附 UV-254 nm 检测器) 南京分析仪器厂产品。氟胞嘧啶 中国药科大学制药厂产品, 经精制后使用; 氟脲嘧啶 南通制药二厂产品, 经精制后使用。试剂均为分析纯。

(二) 色谱条件

色谱柱: $\phi 8 \times 200$ mm; 固定相: YWG-C₁₈H₃₇, 自装柱。流动相: 0.01 mol/L 四乙基氯化铵水溶液 (以 0.05 mol pH 4.0 磷酸盐缓冲液配制), 经过滤后使用; 压力: 55 kg/cm²; 流速: 1.1 ml/min; 检测器: UV-254 nm; 灵敏度 (OD): 0.04; 进样量: 5 μ l。

建立方法的依据已另行发表⁽⁴⁾。本法的回收率试验结果, 氟胞嘧啶为 $100.4 \pm 1.6\%$ (95% 置信水准), 检测下限为 3.2×10^{-8} mg/ml。

(三) 计算方法

采用内加法。计算公式为

$$C_{5-FC}(\%) = \frac{h_{5-FC}/h_{5-FU}}{h'_{5-FC}/h'_{5-FU} - h_{5-FC}/h_{5-FU}} \cdot \frac{\Delta m_{5-FC}}{V_{\#} \times 1.00} \times 100\%$$

式中, h_{5-FC}/h_{5-FU} 为样品中 5-FC 和 5-FU 的峰高比, h'_{5-FC}/h'_{5-FU} 为加入 Δm_{5-FC} (mg) 的样品中 5-FC 和 5-FU 的峰高比。为便于测量减小误差, 在样品液中另加入定量的 5-FU。

三. 有效期预测方法

采用经典恒温法预测有效期。

(一) 将样品分别置 100, 95, 90, 85, 80 ± 0.5 °C 的恒温水浴中贮存, 每隔一定时间分别从各恒温水浴中取样, 立即冷却至室温, 按含量测定方法分别测定氟胞嘧啶的含量, 取三次以上实验值的平均值 (相对标准偏差 < 3%), 结果见表 1。

Tab 1. Relation of relative concentration of 5-FC in flucytosine injections (C*) and time of sampling (t) at various temperatures

100°C		95°C		90°C		85°C		80°C	
t (h)	C (%)	t (h)	C (%)	t (h)	C (%)	t (h)	C (%)	t (h)	C (%)
0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0
24	96.3	24	97.1	72	96.1	144	95.5	144	96.3
60	90.4	72	91.5	144	89.9	216	93.1	336	93.1
120	78.9	132	86.8	228	80.8	312	86.2	552	87.6
180	69.4	200	78.1	324	75.4	456	81.2	792	83.7
252	58.0	300.5	69.5	468	65.8	624	72.6	1056	77.5

* $C = C_t/C_0 \times 100\%$

(二) 按表 1 数据以 $\lg C$ 对 t 作图 (见图 3), 基本为直线, 说明可作一级反应处理, 用线性回归方法求出各温度的降解速度常数 k , 结果见表 2。氟胞嘧啶注射液的 Arrhenius 图见图 4。Arrhenius 方程是 $\lg k = -6060.5 + 13.605/r$ ($r = -0.990$), 由此求得活化能 $E_a = 27.8$

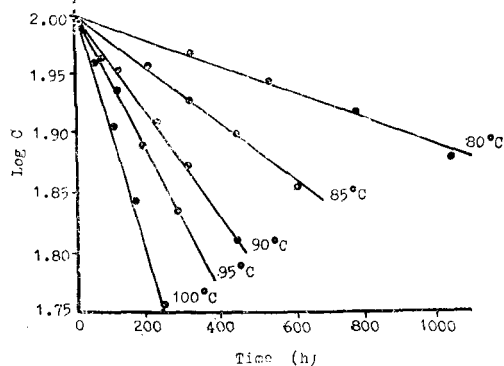
k cal·mol⁻¹.

Fig 3. Hydrolysis of 5-FC in flucytosine injections at various temperatures.

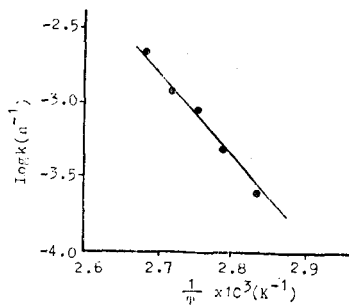


Fig 4. Arrhenius plot of 5-FC in flucytosine injections.

Tab 2. Kinetics data of flucytosine injections

Temp (°C)	$\frac{1}{T} \times 10^3$	Kinetics equation (r)	$k \times 10^4 (h^{-1})$	lgk
100	2.680	$\lg C = 2.0069 - 9.4257 \times 10^{-4} t (-0.998)$	21.71	-2.6633
95	2.716	$\lg C = 2.0009 - 5.2640 \times 10^{-4} t (-0.998)$	12.12	-2.9165
90	2.753	$\lg C = 2.3057 - 4.0024 \times 10^{-4} t (-0.997)$	9.218	-3.0354
85	2.792	$\lg C = 2.0089 - 2.2747 \times 10^{-4} t (-0.991)$	5.239	-3.2808
80	2.831	$\lg C = 2.0005 - 1.0276 \times 10^{-4} t (-0.998)$	2.367	-3.6259

(三) 文献⁽⁵⁾曾提出氟脲嘧啶的存在是氟胞嘧啶具有毒性的主要原因, 故一般都对氟胞嘧啶原料及制剂中的氟脲嘧啶量进行限制, 原料控制在 0.1% 以下^(5~7), 片剂等控制在 0.2% 以下⁽⁶⁾。由于在该注射剂的条件下, 氟胞嘧啶的分解产物主要以氟脲嘧啶的形式存在, 我们以 $t_{0.998}$ 和 $t_{0.999}$ 计算了该制剂的贮存期。按 Arrhenius 方程计算 25, 20, 15°C 及冰箱 (5°C) 中的降解速度常数 k , $t_{0.998}$ 和 $t_{0.999}$, 并按照 Carstensen⁽⁸⁾ 推荐的公式计算出有效期的置信区间, 结果见表 3。

Tab 3. Prediction of shelf life of flucytosine injections (90% confidence)

Temp (°C)	$\lg k \pm g\left(\frac{1}{T}\right)$	Shelf life (a)	
		$t_{0.998}$ (interval)	$t_{0.999}$ (interval)
25	-6.7522 ± 0.0471	1.29(1.16-1.44)	0.65(0.58-0.72)
20	-7.0996 ± 0.0514	2.88(2.55-3.24)	1.44(1.28-1.62)
15	-7.4590 ± 0.0559	6.58(5.78-7.48)	3.29(2.89-3.74)
5	-8.2167 ± 0.0654	37.6(32.4-43.8)	18.8(16.2-21.9)

Tab 4. Results of observation for flucytosine injections at ambient temperature

Storage period (month)	Appearance	pH	Fluorouracil ($\% \times 10^4$)
0	Colorless, transparent liquid	7.55	< 0.2
6	Ditto	—	< 0.2
15	Ditto	7.11	0.2-0.3
18	Ditto	7.01	> 0.3

四. 产品留样观察

结果见表 4。氟脲嘧啶的限量检查方法参照英国药典氟胞嘧啶片⁽⁶⁾采用 TLC 法。

讨 论

一. 氟胞嘧啶注射液的室温有效期若按 $t_{0.998}$ 计算, 可订为一年; 如在 $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 贮存, 可延长至三年。若按 $t_{0.999}$ 计算, 可订为半年; 如在 $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 贮存, 可延长至一年半。瑞士氟胞嘧啶说明书曾指出该制剂应贮存于 $15 \sim 20^\circ\text{C}$, 高于 20°C 可能分解成氟脲嘧啶, 与本文的研究结果一致。

二. 本文以 $t_{0.998}$, $t_{0.999}$ 计算有效期, 仅考虑了主要分解产物氟脲嘧啶, 除依据加速试验样品的氟脲嘧啶含量外, 根据文献⁽³⁾, 氟脲嘧啶的降解速度常数 k_{80} 在 $\text{pH} 5.90 \sim 8.50$ 范围内为 $9 \times 10^{-7} \sim 2.23 \times 10^{-5} (\text{h}^{-1})$, 比本文测得的氟胞嘧啶注射液的 k_{80} 小 1~3 个数量级。

三. 本文未考察 pH 值的变化对氟胞嘧啶注射液水解活化能的影响, 但根据文献⁽³⁾, 在该注射液本身的 pH 范围内, pH 值的变化对水解的影响比较小, 故未做进一步考察。

关键词 氟胞嘧啶; 氟脲嘧啶; 稳定性

参 考 文 献

1. Edward HW and James HJ. Flucytosine. In: Flory K, ed. *Analytical Profiles of Drug Substance*. Vol 5. 1st ed. New York: Academic Press, 1976:115~138.
2. *The Extra Pharmacopoeia*, 1982:723.
3. Garrett EK. Kinetics and mechanisms of hydrolysis of 5-halouracils. *J Org Chem* 1968; **33**:3460.
4. 胡育筑、李启楨. 反相离子对色谱法测定氟胞嘧啶和氟脲嘧啶混合物的方法研究. *药物分析杂志* 1987; **7**:96.
5. Robert DB, et al. Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob Agent Chemother* 1978; **14**:903.
6. *British Pharmacopoeia* 1980 *Addendum*, 1981:65.
7. *The United States Pharmacopoeia*, 1985:430.
8. Carstensen JT. Terminology regarding labeled and contained amounts in dosage forms. *J Pharm Sci* 1976; **65**:311.

PREDICTION OF STABILITY OF FLUCYTOSINE INJECTIONS

HU Yu-Zhu, ZHANG Yi-Hua, LI Feng-Wen, JIANG Sheng-Hua and HOU Xiu-Qing

(China Pharmaceutical University, Nanjing)

ABSTRACT Kinetics of hydrolysis of flucytosine (5-FC) was discussed to predict the stability of flucytosine injections. Reverse phase ion-pair HPLC was used to determine 5-FC in flucytosine injections. The stability of the injections was examined with the classical isothermal method. The use of HPLC made it possible to determine the different contents of 5-FC in the presence of its degradation products. According to Arrhenius rule, the activation energy of 5-FC was $27.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Since its main degradation product—fluorouracil is the factor in flucytosine clinical toxicity, shelf life was calculated in $t_{0.999}$ and $t_{0.998}$. At 25°C it was about half a year ($t_{0.999}$) and 1.5 years ($t_{0.998}$). At $15 \sim 20^\circ\text{C}$ it was about 1.5 years ($t_{0.999}$) and about 3 years ($t_{0.998}$).

Key words Flucytosine; Fluorouracil; Stability