

## 奥沙利铂杂质研究进展

牛冲<sup>1</sup>,刘桂花<sup>2</sup>,张中湖<sup>1</sup>(1. 山东省食品药品检验所,山东 济南 250101;2. 山东瑞中医药有限公司,山东 济宁 272000)

**[摘要]** 以近年来国内外研究文献为基础,对奥沙利铂及其制剂杂质来源、杂质控制、制剂的稳定性等进行综述。奥沙利铂及其制剂的主要杂质为草酸、杂质 B、C、D 以及杂质 E。杂质由合成工艺带入,同时原料及制剂在放置过程中均可降解产生上述杂质。为确保临床用药的安全有效,奥沙利铂及其制剂的杂质需要分别进行控制。

**[关键词]** 奥沙利铂;杂质;有关物质;抗癌药物

**[中图分类号]** R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)06-0412-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.004

## Progress on the impurities in Oxaliplatin

NIU Chong<sup>1</sup>, LIU Gui-hua<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-hu<sup>1</sup> (1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Shandong Ruizhong Medicine Co. LTD, Jining 272000, China)

**[Abstract]** The research progress on the preparation and impurities of Oxaliplatin were summarized based on the recent documents, which generalize the impurity organization, impurity controlling and preparation stability. The principal impurities in Oxaliplatin were oxalic acid, impurity B, impurity C, impurity D and impurity E. All of the impurities were produced during the syntheses and also could be degraded from Oxaliplatin and its preparation. The impurities in Oxaliplatin and its preparation must be controlled respectively to ensure the security and effect of the drugs.

**[Key words]** Oxaliplatin; impurity; relative substance; anti-cancer drug

奥沙利铂是继顺铂、卡铂之后的第 3 代铂类抗癌药物,主要通过产生烷化结合物作用于 DNA,形成链内和链间交联,从而抑制 DNA 的合成及复制。临床主要用于氟脲嘧啶治疗失败后的结(直)肠癌转移患者以及胃癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等癌症。1996 年在法国批准上市,2002 年得到美国 FDA 的认可。奥沙利铂收载于欧洲药典 7.0 版(EP 7.0),国内标准 WS<sub>1</sub>-(X-104)-2003Z。剂型有注射用奥沙利铂、奥沙利铂注射液及奥沙利铂甘露醇注射液,其中注射用奥沙利铂收载于国家标准 WS<sub>1</sub>-(X-090)-2003Z,杂质检验方法同原料。为给奥沙利铂甘露醇注射液在线监控示范生产线提供技术支持,完善我国奥沙利铂原料及制剂的质量标准,本文综述了奥沙利铂及其制剂的杂质研究进展,为下一步开展实验室研究奠定基础。

### 1 奥沙利铂杂质来源分析

奥沙利铂经典的合成工艺以四氯铂酸钾为起始

原料,与反式环己二胺反应得二氯环己二胺合铂,加入硝酸银溶液反应、过滤除去氯化银沉淀,母液中加入草酸钾或草酸钠反应,减压浓缩后制得奥沙利铂粗品,经过重结晶精制得成品<sup>[1]</sup>。或者直接以二氯(碘)环己二胺合铂为起始原料,经类似的处理方法制得奥沙利铂<sup>[2-5]</sup>。何健等人提供了一种无银合成奥沙利铂的新工艺,由四氯铂酸盐与反式环己二胺反应得二氯环己二胺合铂,再与草酸盐反应得目标化合物,不引入对人体有害的重金属 Ag<sup>[6]</sup>。

由合成工艺可见,奥沙利铂原料的杂质主要有起始原料草酸(杂质 A)、合成中间体二氯二胺环己烷合铂。在合成反应中,可能生成的副产物二水合二胺环己烷合铂(杂质 B)及其聚合物(杂质 E)和二羟合奥沙利铂(杂质 C)。工艺所用反式环己二胺为反式-1R,2R-环己二胺,其中混有的反式-1S,2S-环己二胺杂质也可参与反应生成奥沙利铂的左旋异构体(杂质 D)。另外由于合成中用到硝酸银溶液,可能引入重金属 Ag。各杂质结构见图 1。

### 2 奥沙利铂杂质控制

EP 7.0 采用不同的色谱条件,选择不同的波长,分别对奥沙利铂杂质 A(草酸)、杂质 B(二水合二氯环己烷铂)、杂质 E(杂质 B 二聚体)、杂质 C(二羟合

**[基金项目]** 国家重大科技专项重大新药创制——输液生产线关键工艺在线监控技术平台建设课题(2009ZX09313-023)。

**[作者简介]** 牛冲(1978-)男,硕士,主管药师。Tel: (0531) 81216516, E-mail: nemilan@126.com。

**[通讯作者]** 张中湖。Tel: 15969719370, E-mail: zhangzh6@hotmail.com。

奥沙利铂) 以及杂质 D( 奥沙利铂左旋异构体) 进行控制。国家标准仅采用一个色谱条件( 见表 1) 对杂质总和进行了控制, 且限度远高于 EP 7.0。国家标准检测波长 250 nm, 此检测波长与草酸 205 nm、杂质 B

215 nm、杂质 C 210 nm 及杂质 E 215 nm 的检测波长相差较大, 各杂质与奥沙利铂结构上亦有很大差异, 其响应值相差甚远, 按国家标准检验不能真实反映各杂质总量, 无法有效控制其中的杂质。

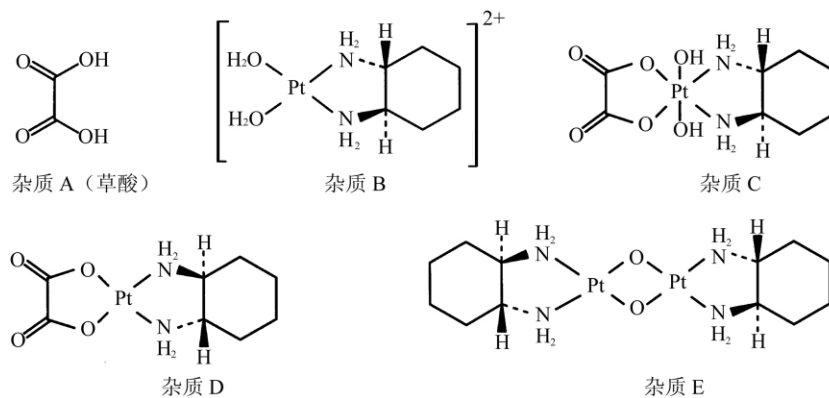


图 1 奥沙利铂各杂质结构图

表 1 欧洲药典( EP 7.0) 与中国卫生部标准对奥沙利铂杂质控制的比较

| 检测项目         | EP7.0   |              |           | WS <sub>1</sub> -(X-04)-2003Z |              |                 |
|--------------|---|--------------|-----------|-------------------------------|--------------|-----------------|
|              | 流动相   | 检测波长<br>(nm) | 限度<br>(%) | 流动相                           | 检测波长<br>(nm) | 限度<br>(%)       |
| 杂质 A<br>(草酸) | 乙腈-溶液( 10 ml 320 g/L 四丁基氢氧化铵溶液, 加 1.36 g 磷酸二氢钾, 用水稀释至 1 000 ml, 用磷酸调 pH 至 6.0) ( 20 : 80) | 205          | 0.1       |                               |              |                 |
| 杂质 B         | 乙腈-溶液( 1.36 g 磷酸二氢钾和 1 g 庚烷磺酸钠溶解与 1 000 ml 水中, 用磷酸调 pH 至 3.0 ± 0.05) ( 20 : 80)           | 215          | 0.1       | 甲醇-水 = 10 : 90                | 250          | 杂质总和<br>不得过 1.0 |
| 杂质 C         | 溶液( 取 0.6 ml 稀磷酸溶液, 用水稀释至 1 000 ml, 用氢氧化钠溶液或磷酸调 pH 至 3.0 ± 0.05) - 乙腈( 99 : 1)            | 210          | 0.1       |                               |              |                 |
| 其他单一杂质       |   |              | 0.1       |                               |              |                 |
| 其他杂质总和       |   |              | 0.1       |                               |              |                 |
| 异构体          | 乙醇-甲醇( 3 : 7)   | 254          | 0.1       | 乙醇 : 甲醇 = 3 : 7               | 250          | 0.1             |
| Ag           | 原子吸收  |              | 5 ppm     |                               | 无            |                 |

### 3 奥沙利铂杂质研究状况

目前国内对奥沙利铂研究主要侧重于临床及不良反应, 杂质研究文献较少。黄毅岚等人采用 HPLC 法对奥沙利铂及注射用奥沙利铂的有关物质进行了研究。采用甲醇 : 水( 5 : 95) 为流动相, 对波长的选择进行了考察, 紫外吸收显示 200 ~ 400 nm 波长范围内奥沙利铂无明显吸收峰, 但在 230 ~ 260 nm 的波长范围内吸收较强且曲线平缓, 同时, 通过对 255、250、240 nm 波长处的有关物质的测定比较, 在 250 nm 波长处检出杂质质量最大, 因此选用 250 nm 波长检测有关物质, 方法与国家标准基本一致<sup>[7]</sup>。傅萍等人对注射用奥沙利铂有关物质检查法中发现问题进行了探讨研究, 参照 EP 6.0 和英国药典( BP) 2010 年版奥沙利铂杂质 C 的方法对检出波长、色谱柱进行了筛选, 并进行了方法学研究, 同时将检测结果与现行国家标准方法进行比较。研

究表明, 奥沙利铂在 200 ~ 250 nm 波长范围内吸收较强, 草酸与杂质 C 在 200 ~ 220 nm 波长范围内有最大吸收, 而破坏性杂质在 210 nm 波长附近的吸收值可满足检测要求。在杂质检出方面, 参照 EP 6.0 的方法均能检出杂质 A、杂质 C, 而国家标准方法不能检出草酸。在杂质检出数量上, 参照 EP 6.0 的方法检出的杂质数较国家标准方法的多<sup>[8]</sup>。有研究表明, 奥沙利铂的代谢产物草酸盐作用于感觉和运动神经原细胞膜上的 Na<sup>+</sup> 通道, 使 Na<sup>+</sup> 内流幅度及动作电位减弱, 导致其急性神经毒性的发生<sup>[9, 10]</sup>。刘颖等人参照 EP 5.0 奥沙利铂草酸的检验方法对注射用奥沙利铂中的草酸进行了研究<sup>[11]</sup>。刘祝东等人对奥沙利铂手性异构体进行了分析。通过对色谱柱固定相类型、使用范围、适应溶剂及流动相极性等方面的对比研究, 选择 Chiralcel OD-RH 手性色谱柱。国家标准采用水作为溶剂, 易造成色谱峰的变形, 采用甲醇为溶剂, 峰形正常<sup>[12]</sup>。

#### 4 奥沙利铂制剂稳定性研究

临床上注射用奥沙利铂在用水或 5% 葡萄糖溶液配置成溶液后立即使用,一般不超过 8 h。如误用 0.9% 氯化钠溶液稀释,则奥沙利铂立即转换为高生物活性的单氯、二氯或二水合二胺环己烷合铂<sup>[13]</sup>。奥沙利铂的水溶液不稳定,在水中会逐渐降解为杂质 B、杂质 C 及杂质 E<sup>[14]</sup>。基于粉针剂在临床应用的各种缺点,科研人员对临床易于使用的奥沙利铂水溶液进行了研究。Ibrahim 通过研究表明浓度在 1 ~ 5 mg/ml 的奥沙利铂水溶液在 pH 4.5 ~ 6 的范围内 3 个月稳定<sup>[15]</sup>。随后的研究表明,这种简单的奥沙利铂水溶液不够稳定<sup>[16]</sup>。Andre 研究了聚烯烃袋装保存的 0.7 mg/ml 的奥沙利铂 5% 葡萄糖溶液,在低温(3 ~ 7 °C)和室温(20 ~ 24 °C)储藏条件下,30 d 内稳定<sup>[17]</sup>。Audrey 研究了 0.25 mg/ml 的奥沙利铂 5% 葡萄糖溶液在 PVC 包装袋中的稳定性,在低温(4 °C)和室温储藏条件下,90 d 内稳定<sup>[18]</sup>。5 mg/ml 奥沙利铂水溶液在催化量(0.001% ~ 0.005%)的糖(乳糖、葡萄糖、蔗糖)存在的情况下,40 °C 温度及 70% 湿度下 3 个月内稳定。同时研究表明,加入 0.001% ~ 0.02% 糖的奥沙利铂溶液在含量的降低、杂质的增加等方面要优于加入 0.05% 以上(特别是 5%)糖的奥沙利铂溶液<sup>[19 20]</sup>。草酸及草酸盐<sup>[14]</sup>、乳酸-乳酸盐<sup>[16]</sup>、丙二酸-丙二酸盐<sup>[21]</sup>、酒石酸-酒石酸盐<sup>[22 23]</sup>、丙二醇、甘油、麦芽糖醇、蔗糖以及肌醇<sup>[24]</sup>等,均可作为 pH 调节剂和稳定剂提高奥沙利铂水溶液的稳定性。目前国内上市的奥沙利铂注射液中,均加入甘露醇,作为渗透压调节剂及稳定剂。Michaela 发明了一种专门用于贮存奥沙利铂注射液的环境共聚合物密封塑料瓶。玻璃瓶中,奥沙利铂水溶液与玻璃瓶表面之间的作用力比塑料瓶大,而且玻璃瓶释放出的痕量的金属离子能加快奥沙利铂的降解,使之降解为草酸、杂质 B 及杂质 E,而塑料瓶在储存及高温灭菌过程中,均不释放金属离子<sup>[25]</sup>。基于上述原因,EP 7.0 在奥沙利铂杂质 B 的检验中,溶液的配制及进样瓶均选用聚丙烯材料。

#### 5 结语

奥沙利铂及其制剂的主要杂质为草酸、杂质 B、C、D、E,草酸为奥沙利铂的合成原料,杂质 B、C、D 及 E 均为反应副产物,同时原料及制剂在放置过程中均可能降解产生上述杂质。建议奥沙利铂甘露醇注射液在线监测示范生产线采用无银生产工艺,使用聚丙烯材料内包装,增加外层不透光

包装,储存条件改为 10 °C 低温保存。内部质控标准采用 EP 7.0 标准,对 5 个杂质分别控制。建议国家标准由单一波长对杂质总和进行控制,改变为对各杂质分别控制,并制定合理的限度,确保奥沙利铂及其制剂的安全。

#### 【参考文献】

- [1] Erdem W, Christen MG. Current status of platinum-based anti-tumor Drugs [J]. Chem Rev, 1999, 99: 2451.
- [2] Yoshinori K, Kenji I. Cis-platinum( II) complex of trans-L-4, 2-diaminocyclo-hexane [P]. USA. 4169846. 1979-08-02.
- [3] Koji O, Yuko H, Chihiro N. Platinum compound and process of preparing same [P]. USA. US5290961. 1994-03-01.
- [4] Frantiske Z, Anna CP. Oxaliplatin with a low content of accompanying impurities and a method for preparation thereof [P]. USA. 7351846B2. 2008-04-01.
- [5] Kidani Y. Oxaliplatin [J]. Drugs of the Future, 1989, 14(6): 529.
- [6] 何健,刘伟平,李永年,等. 抗癌药奥沙利铂的一种新合成工艺 [P]. 中国专利. CN1837223A. 2006-09-27.
- [7] 黄毅岚,张丹. HPLC 法测定奥沙利铂有关物质的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(1): 50.
- [8] 傅萍,兰婉玲,张蕾. 关于注射用奥沙利铂有关物质检查方法的探讨 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 1850.
- [9] 马艺,王鑫. 草酸铂周围神经毒性机制研究进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2005, 32(3): 234.
- [10] Lara MP, Mario RD, Elena R, et al. Oxaliplatin-related neurotoxicity: How and Why? [J]. Oncology Hematology, 2006, 59: 159.
- [11] 刘颖,赵俊,张爽,等. 高效液相色谱法测定注射用奥沙利铂中草酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1565.
- [12] 刘祝东,栾春芳,普绍平. 奥沙利铂及其手性异构体的高效液相色谱分析 [J]. 贵金属, 2007, 28(2): 49.
- [13] Chris HT, Martin AG, Graham L, et al. Oxaliplatin Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Adult Cancer Patients with Impaired Renal Function [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16): 4832.
- [14] Nicholas H, Ross B, Stephen B, et al. Oxaliplatin formulations [P]. USA. US 6306902 B1. 2001-10-23.
- [15] Houssam I, Rolland YM. Pharmaceutically stable preparation of oxaliplatin [P]. USA. 5716988A. 1998-02-10.
- [16] Sara L, Alessandro M, Cristina C. Platinum Derivative Pharmaceutical Formulations [P]. USA. US6476048. 2002-11-05.
- [17] Andre A, Cisternino A, Roy AL, et al. Stability of oxaliplatin in infusion bags containing 5% dextrose injection [J]. Am J Health Syst Pharm, 2007, 64: 1950.
- [18] Audrey J, Sandrine R, Marie CD, et al. Stability of oxaliplatin solution [J]. The Annals of Pharmacotherapy, 2009, 43: 390.
- [19] Satish CU, Manoj K, Ajeet KS, et al. Stable oxaliplatin formulation [P]. USA. US2007/0054957A1. 2007-03-08.
- [20] Schridde E, Merbach BD. Concentrated solution of oxaliplatin [P]. Europe. EP1466599. 2004-10-13.

相中加入一定比例的冰醋酸。知母皂苷 B、E1、BII 为呋甙皂苷,知母皂苷 A III 为螺甙皂苷,两类皂苷极性相差较大,用等度洗脱无法同时保证 4 种皂苷的合适保留时间和较好的分离。经过反复试验,采用水(醋酸调至 pH 3.3)和乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,使极性较大的呋甙皂苷不致出峰过早,极性较小的螺甙皂苷也不会因保留时间过长而峰形展宽,4 个成分均能够分离良好,保障了测定的准确性。

**3.3 ELSD 工作参数的确定** 在 ELSD 实验中,为了获得更高的灵敏度,需要调节载气压力和漂移管温度这 2 个最关键的仪器参数。它们的通用参数为载气压力(3.5 Bar)和漂移管温度(40 °C),但在本梯度条件下,由于实验采用了乙腈-水系统,初始梯度含有高比例的水,色谱图中会由于溶剂的挥发不完全而导致毛刺峰的产生,通过对仪器的通用参数进行优化,逐渐提高载气压力,当载气压力到达至 4.0 Bar 时,色谱图中的毛刺峰基本消失,再增加载气压力,不能得到更优化的结果,在此载气条件下逐渐调节漂移管温度,当温度逐渐上升时,色谱图中毛刺峰也有一定的优化,当设为 55 °C 后,基本达到最佳。故最终确定的 ELSD 检测参数:漂移管温度 55 °C;载气压力 4.0 Bar。另外,设定增益值为 7,可以使信号相应较高,且基线的噪音不会对检测产生任何影响。特别值得注意的是,由于 ELSD 独特的散射光检测原理,物质的响应与浓度不成线性关系,而是对数关系,在制定标准曲线时,对峰面积以及样品浓度均采用双对数进行运算,得到的标准曲线也不会经过原点,在进行样品含量测定时,也采用同样的计算方式。

**3.4 药材之间的质量差异** 对 13 个不同产地(批号)的知母药材测定结果表明,与文献中知母皂苷含量在 6% 左右的结果相符,但药材中所含的 4 种皂苷,其含量间的差异较大,其中以知母皂苷 B 的含量差异最大,安徽亳州产地的(A2009080303)与河北赤城产地的(H2011081904)相差高达 13.52

倍,其他成分的含量最大与最小含量之间差异在 1.62 ~ 5.87 倍不等。虽然单个成分的差异较大,但药材中总皂苷的含量差别相对较小,仅为 1.37 倍,充分说明在药材种植过程中,由于影响药材生长的诸多因素等的作用,导致次生代谢产物的产量发生不同变化,也证明需要具体分析药材中的活性成分的含量,而一般仅仅水解皂苷,分析蒽萜皂苷元的做法或者仅仅测定其中的紫外吸收部位对知母的质量控制是不完全的,本文建立的色谱方法能够对知母药材作更加严格的质量控制,从而能够为进一步研究知母活性成分的药理药效提供基础。

### 【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版.一部[S]. 2010:196.
- [2] Zhang JY, Meng ZY, Zhang MY, *et al.* Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood[J]. *Clim Chim Acta*, 1999, 289(1): 79.
- [3] Zhang JY, Zhang MY, Sugahara K, *et al.* Effect of steroidal saponins of *Anemarrhenae rhizome* on superoxide in human neutrophils[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(3): 636.
- [4] 韩兵,李春梅,李敏,等.知母皂苷的降脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(11): 68.
- [5] Takeda Y, Togashi H, Matsuo T, *et al.* Growth inhibition and apoptosis of gastric cancer cell lines by *Anemarrhenae asphodeloides* Bunge[J]. *J Gastroenterol*, 2001, 36(2): 79.
- [6] 吉星,冯毅凡.知母中皂苷类成分研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(4): 12.
- [7] Lee B, Jung K, Kim DH. Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhenae asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice[J]. *Pharmacol, Biochem and Behav*, 2009, 93(2): 121.
- [8] 沙东旭,刘兆妍,张满来,等. HPLC-ELSD 测定知母中知母皂苷 B II 的含量[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(12): 2106.
- [9] 陈千良,孙小明,王文全,等. HPLC-ELSD 法同时测定知母药材中 2 种皂苷含量[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(4): 474.
- [10] 原源,陈万生,孙连娜,等.不同产地知母中皂苷类成分的测定[J]. *中草药*, 2006, 37(10): 1574.

[收稿日期]2012-05-18

[修回日期]2012-06-26

(上接第 414 页)

- [21] Sara L, Alessandro M, Crestina C. Pharmaceutical formulation of a platinum derivative[P]. USA. US2003/0109515 A1. 2003-06-12.
- [22] Darryl VW, Aikun L. Oxaliplatin Formulations[P]. USA. US2005/0090544 A1. 2005-03-08.
- [23] Darryl VW, Aikun L. Oxaliplatin Formulations[P]. USA. US2007/0155833 A1. 2007-04-05.

- [24] Ibrahim H, Bayssas M. Pharmaceutical stable oxaliplatin preparation for parenteral administration[P]. Europe. EP1207875B1. 2002-05-29.
- [25] Michaela R, Katrin W. Plastic bottle for oxaliplatin solution[P]. USA. US2008/0208141 A1. 2008-8-28.

[收稿日期]2011-09-09

[修回日期]2012-05-09