

## 生长抑素在新生产工艺过程中的有关物质分析及稳定性研究

张伟,张 慧,梁成罡

(中国食品药品检定研究院激素室,国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室,北京 102629)

**[摘要]** **目的:**对生长抑素在新生产工艺下产生的有关物质进行分析,并对原料及制剂进行稳定性研究。**方法:**通过 HPLC、制备液相色谱以及超高效液相色谱-飞行时间质谱串联系统等设备对有关物质进行分离、收集、定性及结构解析。此外,对生长抑素及制剂通过高温、光照、氧化以及酸解破坏实验进行了稳定性研究。**结论:**通过稳定性研究,结合生长抑素及其制剂的生产工艺可知,生长抑素在新的生产工艺过程中会产生新的工艺杂质。本研究为药典标准修订提供了依据。

**[关键词]** 生长抑素;新生产工艺;有关物质;稳定性

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)01-0080-06

### Analysis of related substances and stability study of somatostatin in new production process

ZHANG Wei, ZHANG Hui, LIANG Cheng-gang

(Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the related substances produced in new production process of somatostatin, and the stability of raw materials and preparation was studied. **Methods:** The related substances were separated, collected, characterized and analyzed by high performance liquid chromatography, preparative liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry tandem system. In addition, the stability of somatostatin and its preparation was studied under high temperature, light, oxidation and acidolysis destruction conditions. **Conclusion:** Based on the stability study combined with the production process of somatostatin and its preparation, somatostatin will produce new impurities in the new production process. This study provides a basis for revising pharmacopoeia standards.

**[Key words]** somatostatin; new production process; related substances; stability

生长抑素(somatostatin),也被称为生长激素抑制激素(GHIH),是一种肽类激素,由下丘脑分泌,

通过与G蛋白偶联生长抑素受体相互作用从而大量抑制次级激素的释放,调节内分泌系统,影响神经传递和细胞增殖<sup>[1]</sup>。天然生长抑素有2种活性形式,一种由14个氨基酸组成(见图1),另一种由28个氨基酸组成(二聚体)<sup>[2-3]</sup>。目前,生长抑素大多采用多肽固相合成工艺得到,与天然内源性生长抑素作用相同<sup>[4-5]</sup>。临床主要用于治疗严重急性食管静脉曲张出血、严重急性胃或十二指肠溃疡出血、并发性急性糜烂性胃炎、出血性胃炎以及胰、胆和肠瘘的辅助治疗、胰腺手术后并发症的预防和治疗,糖尿

**[基金项目]** 国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2020H012)

**[作者简介]** 张伟,男,副主任药师,主要从事化药、生化药以及重组激素类药物质量控制研究。联系电话:(010)53851619, E-mail: zhangwei125@nifdc.org.cn。

**[通讯作者]** 梁成罡,男,研究员,主要从事激素及生物技术药物质量控制研究。联系电话:(010)53851638, E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn。张慧,女,主任药师,主要从事重组激素类药物质量控制研究。联系电话:(010)53851640, E-mail: zhanghui313@sina.com。

病酮症酸中毒的辅助治疗等<sup>[6-8]</sup>。

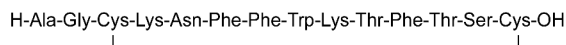


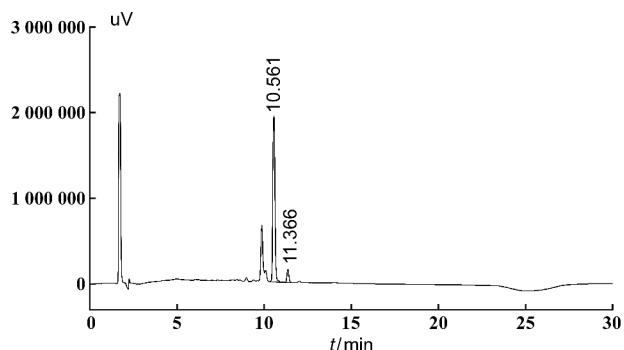
图1 生长抑素结构式

目前,生长抑素仅收载于《中华人民共和国药典》2020年版(ChP 2020)<sup>[9]</sup>和《欧洲药典》10.0版(EP10.0)<sup>[10]</sup>。2001年,生长抑素原料药首次进行进口注册,并于2002年获批。2003年,海南中和药业有限公司成为国内首家获得批准文号批准上市的制药企业。生长抑素于2010年首次载入《中华人民共和国药典》<sup>[11]</sup>,该标准自制定时起一直沿用至今(ChP 2020),从未经过修订。随着生产工艺、技术的不断改进,药品某些关键质量属性也随之发生变化。因此,目前的药典标准已不再适用于生长抑素及制剂的质量控制。

2017年,在国家药品评价性抽验过程中发现,国内某企业生产的注射用生长抑素有关物质检查项

均不合格,杂质总量远超限度要求。在探索性研究过程中,对比国内外生产企业的生产工艺,发现原研企业及国内部分生产企业在生长抑素合成过程中采用固相多肽合成(SSPS)方法,在线性肽链从树脂中切除后,溶解于约5%醋酸溶液中,加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液并加入含有1%碘/乙腈溶液来进行多肽的环合。完成环合后通过HPLC法进行验证。为了防止碘过量,在反应液中加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸(Vc)直至溶液出现黄色,通过颜色变化判断反应终点。经过多年来工艺的改进,目前国内许多企业采用一定浓度的过氧化氢进行氧化环合,通过HPLC进行反应终点监测,虽然该方法操作简便,但过程中会造成局部过氧化反应,使终产物中产生未知工艺杂质。此外,不合格样品色谱图与系统适用性图谱基本一致,见图2。系统适用性溶液是采用生长抑素对照品加30%过氧化氢,室温放置氧化制得。由此认为,在新氧化工艺下生产的生长抑素可能产生新的有关物质。

A 系统适用性色谱图



B 供试品色谱图

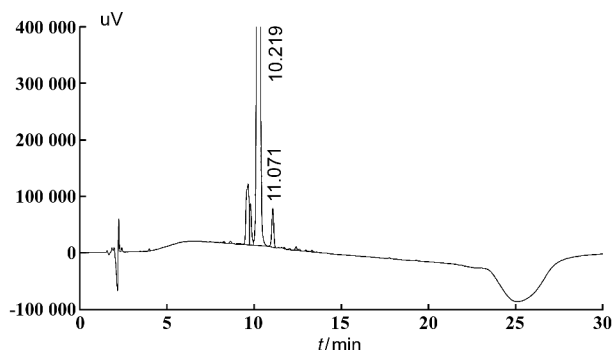


图2 典型色谱图

本研究就上述发现的问题对新生产工艺下产生的有关物质进行研究,对其进行了分离、制备、结构确证。此外,考虑到有关物质有可能是新工艺下生产的生长抑素在储存过程中产生的降解产物,而注射用生长抑素为生长抑素加适量赋形剂制成的无菌冻干品,在制剂工艺、原辅料相互作用以及储存过程等方面均可能产生杂质,因此,本研究对原料及制剂进行了全面的稳定性研究。

## 材 料

### 1 对照品、样品及试剂

生长抑素原料药(国内某企业,批号:1911070);注射用生长抑素来自国内2家生产企业;甘露醇对

照品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.1%,批号:100523-201805);三氟乙酸(Alfa Aesar公司,质谱级);磷酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);盐酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯); $10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液(J. T. Baker公司,分析纯);三乙胺(Fisher公司,分析纯);30%过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);乙腈(Fisher公司,色谱纯);实验所用溶液均用电阻率为 $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 的去离子水配制。

### 2 实验仪器

UPLC I-Class/Synapt G2-Si 超高效液相色谱-飞行时间质谱串联系统(美国Waters公司);Waters2767 Sample Manager 制备液相色谱(美国Waters

公司); Waters e2695 高效液相色谱(美国 Waters 公司); METTLER AG245 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); METTLER S470-K 酸度计(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Spd131ddap1 离心浓缩仪(美国 Thermo 公司); Climacell222 ECO 气候箱(美国 3M 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); Waters symmetry300 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); ACQUITY UPLC peptide BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(300 Å, 100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。

## 方法和结果

### 1 有关物质的分离、制备以及结构确证

#### 1.1 溶液配制

取国内某生产企业生产的注射用生长抑素(批号:17100022)若干瓶,分别加水适量使内容物溶解,合并瓶内溶液,作为样品溶液 A;另取生长抑素原料药适量,加 30% 过氧化氢,室温放置 1 h,加水稀释制成每 1 mL 约含 10 mg 的溶液,作为样品溶液 B。

#### 1.2 色谱条件

HPLC、制备液相色谱条件均在 ChP 2020 二部生长抑素各论有关物质项下色谱条件的基础上进行优化,使图 2 色谱图中主成分峰与相邻杂质峰有更大的分离度。

#### 1.3 分离与制备

取“1.1”项下的样品溶液 A 和样品溶液 B,分别按“1.2”项下色谱条件,在 HPLC、制备液相色谱上进样、分离、接收各杂质组分,后经离心浓缩仪离心、浓缩得到各杂质组分的浓溶液,备用。

#### 1.4 结构确证

将“1.3”项下得到的溶液通过 Waters UPLC I-Class/Synapt G2-Si 超高效液相色谱-飞行时间质谱串联系统以及 UNIFI 分析系统对有关物质进行分析,采用 b/y 离子分析方法对合成肽类进行结构解析,见图 3。

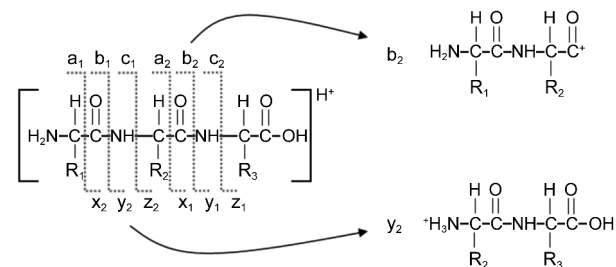


图 3 b/y 离子结构解析原理

**1.4.1 杂质 A** 如图 2A 所示,杂质 A 为保留时间约为 9.8 min 的有关物质,其结构为生长抑素(二硫键未打开)8 位色氨酸的吲哚环被氧化,分子量  $\Delta \text{mass} + 16$ ,见图 4 和图 5。

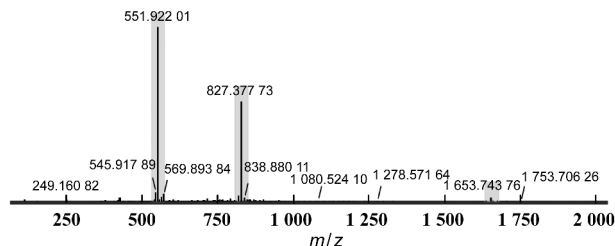


图 4 杂质 A 质谱图

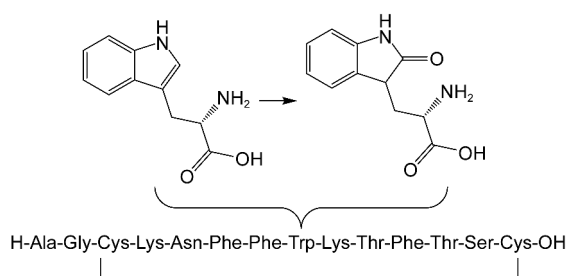


图 5 杂质 A 分子结构

**1.4.2 杂质 B** 如图 2A 所示,杂质 B 的保留时间约为 9.8 min,与杂质 A 为共出峰,结构为生长抑素(二硫键打开)的 3 和 14 位半胱氨酸均被氧化为磺基,分子量  $\Delta \text{mass} + 96$ ,见图 6 和图 7。

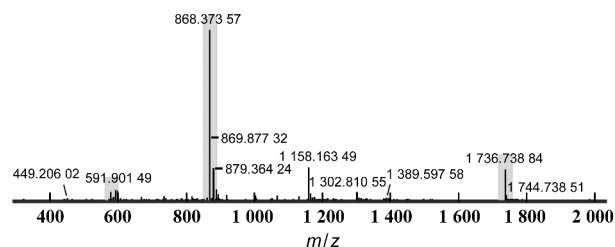


图 6 杂质 B 质谱图

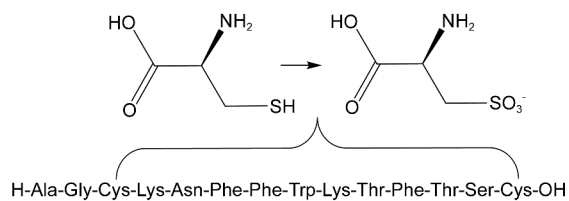


图 7 杂质 B 分子结构

1.4.3 杂质 C 如图 2A 所示,杂质 C 的保留时间约为 11.3 min,为还原型生长抑素,见图 8。

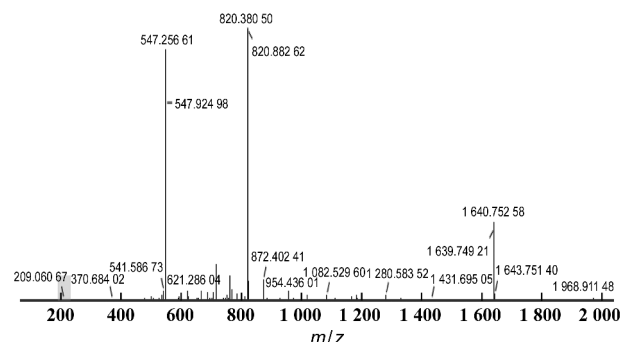


图 8 杂质 C 质谱图

杂质 C 的分子结构为 H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH。

## 2 稳定性研究

### 2.1 生长抑素原料药稳定性实验

取生长抑素对照品适量,置于气相顶空瓶中,加盖密封,分别置于 60 °C 气候箱(避光)和(4 500 ± 500) lx 光照条件下放置,分别在 0 h, d 5 和 d 10 取样测定。

### 2.2 加速降解实验

取生长抑素原料药适量,用水溶解并稀释制成 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液作为储备液,按以下方案配制溶液。

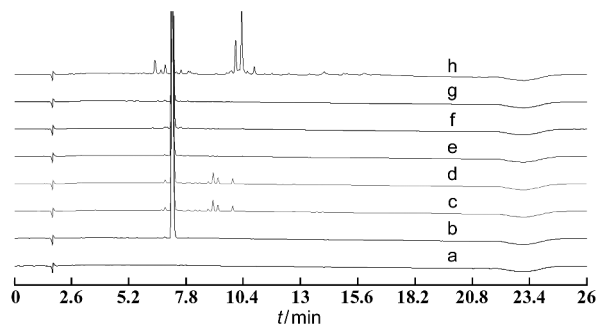
酸降解 A:取储备液 800 μL,加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 100 μL,振摇,室温放置 2 h,加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 100 μL 中和,混匀,测定。

酸降解 B:取储备液 800 μL,加入冰醋酸 100 μL,振摇,室温放置(进样盘温度设为室温),动态进样(时间间隔 2 h)。

碱降解:取储备液 800 μL,加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 100 μL,振摇,室温放置 2 h,加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 100 μL 中和,混匀,测定。

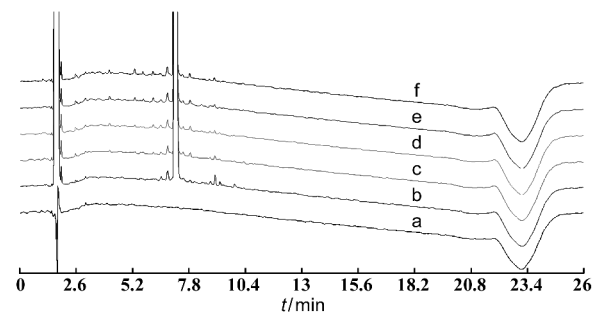
氧化降解:取生长抑素原料药,按照 ChP 2020 二部生长抑素有关物质项下系统适用性溶液配置方法配制溶液,室温放置(进样盘温度设为室温),动态进样(时间间隔 2 h)。

按照 ChP 2020 二部生长抑素项下有关物质方法测定,见图 9 ~ 图 11。



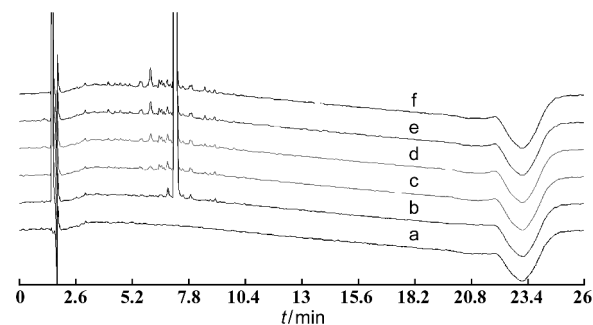
a:空白(水);b:0 h;c:60 °C,5 d;d:60 °C,10 d;e:4 500 lx,5 d;f:4 500 lx,10 d;g:酸降解 A;h:碱降解

图 9 生长抑素原料药稳定性、加速降解色谱图



a:空白(水);b:8 h;c:6 h;d:4 h;e:2 h;f:0 h

图 10 生长抑素原料药酸降解 B 色谱图



a:空白(水);b:0 h;c:2 h;d:4 h;e:6 h;f:8 h

图 11 生长抑素原料药氧化降解色谱图

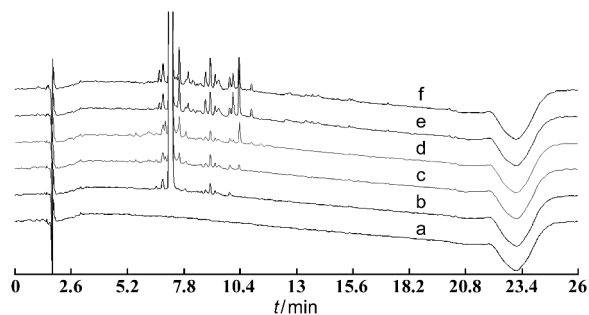
通过上述色谱图比较可知,生长抑素在室温、光照 10 d 内以及约 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液中 2 h 等条件下较为稳定;在约 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液中 2 h 内有很大程度降解;在室温、约 10% 冰醋酸溶液中放置 6 h 较稳定,8 h 开始有部分降解;在 60 °C 条件下放置 5,10 d,生长抑素均有一定程度的降解;在室温、过氧化氢溶液中,8 h 内逐渐降解。

### 2.3 注射用生长抑素及辅料稳定性研究

取国内不同生产企业生产的注射用生长抑素(批号:1223161201,规格:2 mg · 支<sup>-1</sup>;批号:17100022,规

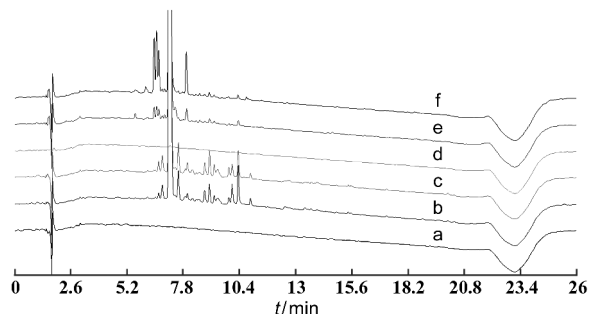
格:3 mg·支<sup>-1</sup>),按照“2.1”和“2.2”项下条件进行处理;另取甘露醇对照品按照制剂处方工艺配制成药5 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,按照“2.2”项下氧化降解实验方法进行处理。

按照 ChP 2020 二部生长抑素项下有关物质方法测定,见图 12 ~ 图 17。



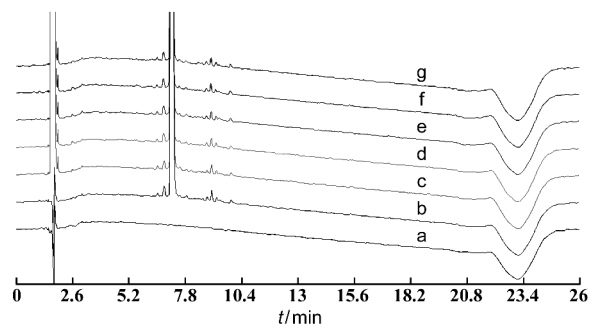
a:空白(水);b:0 h;c:4 500 lx,5 d;d:4 500 lx,10 d;  
e:60 °C,5 d;f:60 °C,10 d

图 12 注射用生长抑素(批号:1223161201)稳定性、加速降解色谱图



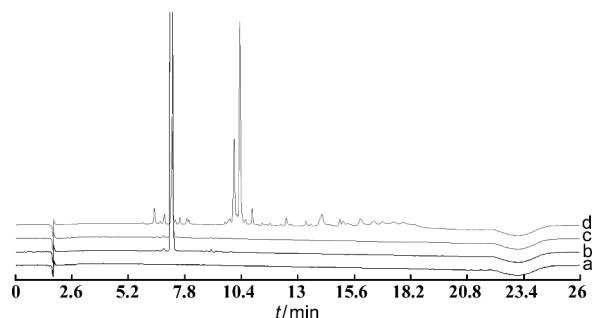
a:空白;b:60 °C,10 d;c:60 °C,5 d;d:4 500 lx,10 d;  
e:4 500 lx,5 d;f:0 h

图 13 注射用生长抑素(批号:17100022)稳定性、加速降解色谱图



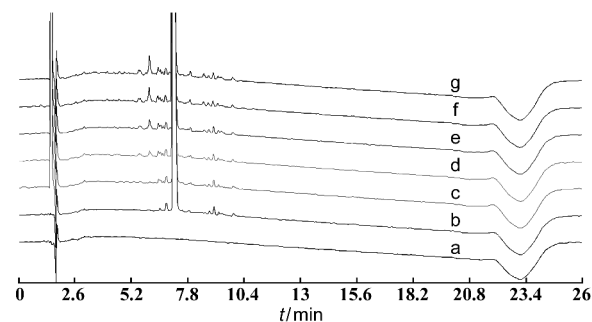
a:空白(水);b:0 h;c:2 h;d:4 h;e:6 h;f:8 h;g:8 h

图 14 注射用生长抑素(批号:1223161201)酸降解 B 色 谱图



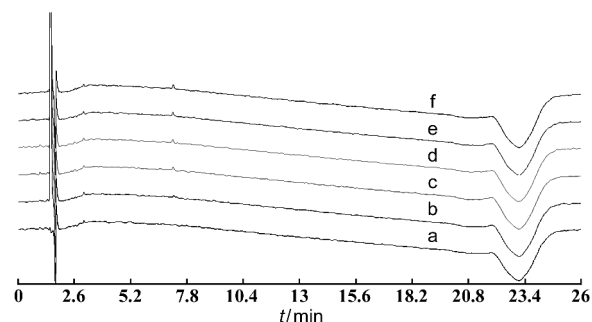
a:空白;b:0 h;c:酸降解 A;d:碱降解

图 15 注射用生长抑素(批号:1223161201)加速降解色谱图



a:空白;b:0 h;c:2 h;d:4 h;e:6 h;f:8 h;g:10 h

图 16 注射用生长抑素(批号:1223161201)氧化降解色谱图



A:空白;b:0 h;c:2 h;d:4 h;e:6 h;f:8 h

图 17 5 mg·mL<sup>-1</sup>甘露醇溶液氧化降解色谱图

通过上述色谱图比较可知,注射用生长抑素在室温、光照 10 d 内以及 60 °C 放置 10 d 内等条件下均有一定程度的降解;不合格制剂(批号:17100022)在室温、光照 10 d 内有关物质逐渐减少,甚至消失,在 60 °C 下放置 10 d 内有一定程度的降解,新杂质逐渐消失;制剂在室温、约 10% 冰醋酸溶液中放置 8 h 较稳定;在约 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液中 2 h 条件下较稳定;在约 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液中 2 h 有很大限度降解;在室温、过氧化氢溶液中,10 h 内逐渐降解;

甘露醇溶液在室温、过氧化氢溶液中较稳定。

## 讨 论

通过上述研究,本研究对不合格制剂中的有关物质进行了定性及结构确证,从两方面分析这些有关物质究竟是工艺杂质还是降解杂质。

首先,通过稳定性实验对比图谱可知,生长抑素在高温、光照以及酸碱破坏条件下不会产生杂质 A 和杂质 B;只有在过氧化氢氧化条件下 3 种杂质均有不同程度的增加;在高温、酸破坏条件下杂质 C 均可产生;对于制剂的稳定性,杂质 A 和杂质 B 在高温、光照以及酸碱破坏条件下均未增加,相反,3 种杂质在光照和高温条件下会发生降解,甚至消失;辅料甘露醇在上述实验中具有较好的稳定性。

其次,通过对原料的合成工艺进行分析,在形成还原型生长抑素后,要按一定比例加入过氧化氢,形成二硫键。同样,系统适应性溶液是通过生长抑素加过氧化氢氧化得到(见图 2),3 种杂质均可产生。

通过上述分析,可以得知 3 种杂质均为工艺杂质,是由于生长抑素合成过程中氧化反应控制不当产生;杂质 C 既是工艺杂质,也是降解产物。

通过查阅文献资料<sup>[12-13]</sup>,对还原型生长抑素氧化形成二硫键进一步分析。目前通过氧化形成二硫键的方法主要有 3 种:国内某企业采用空气来发生氧化反应,但是反应程度、效果不明确;早期国内外企业,包括原研企业均采用碘/乙腈氧化的方法,通过颜色判断终点,加入 Vc 来终止反应,但反应程度不易控制且具有一定的毒性;多年来经过工艺改进,目前国内企业大都采用加入一定比例的过氧化氢,且通过 HPLC 监测反应程度,已经成为主流工艺且毒性小。

此外,考虑到纯化工艺,通过检验结果比对可以看出,杂质 C 能够较好地控制,且大多企业生产的制剂中均未检出;然而基于目前的合成工艺,杂质 A

和杂质 B 在国内一些生产企业的制剂中均存在。

最后是质量标准方面,国内外药典中系统适用性只对生长抑素主成分峰和还原型生长抑素峰(相对保留时间约为 1.1)之间的分离度进行要求,通过色谱图(见图 2)可以看出,新生产工艺下产生的杂质在生长抑素主峰之前且距离较近,与主峰不能达到基线分离的要求;标准限度要求也只控制单个杂质和杂质总量。因此,目前的药典标准已不再适用于生长抑素及制剂的质量控制,亟待修订。

综上所述,本文对生长抑素在新生产工艺下产生的杂质进行了定性及结构确认,并进行了全面的稳定性研究,为药典标准修订提供了依据。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] ROBERT D. Somatostatin [EB/OL]. (2016). <http://www.britannica.com/science/somatostatin>.
- [2] Medical College of Georgia. Structure, Synthesis, and Secretion of Somatostatin [M]//Endocrinology: The Endocrine Pancreas. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001: 16.
- [3] NCBI. Somatostatin preproprotein [M]. NCBI Reference Sequence, 2008.
- [4] 周逸明. 固相多肽合生长抑素的制备方法: CN1923851A [P]. 2007-03-07.
- [5] 崔学云, 杨平, 杨勇. 一种生长抑素的合成工艺: 中国, 104311639B [P]. 2018-02-23.
- [6] 韩晓红, 田静, 邢学勇, 等. 不同剂量胰岛素配合生长抑素对糖尿病酮症酸中毒患者伴急性胰腺炎的疗效及安全性评价 [J]. 抗感染药学, 2019, 16(1): 160-162.
- [7] 周玉梅. 生长抑素治疗肝硬化食管胃底静脉曲张出血的有效性和安全性 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(24): 56.
- [8] 希日莫, 赵立新. 生长抑素在治疗恶性肠梗阻及术后早期炎性肠梗阻中的应用效果分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(38): 65.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2020 年版. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 278-279.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia [S]. 10.0. 2020: 3853-3854.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2010 年版. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 166-167.
- [12] 赵东明, 方专, 余帮学, 等. 生长抑素及其制备方法: CN103265620A [P]. 2013-08-28.
- [13] 周逸明. 一种生长抑素的合成方法: CN1552728A [P]. 2004-12-08.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2022-07-08