



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108938626 B

(45)授权公告日 2020.04.10

(21)申请号 201810846580.4

C07D 209/30(2006.01)

(22)申请日 2018.07.27

A61P 7/04(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 30/02(2006.01)

申请公布号 CN 108938626 A

审查员 李毅

(43)申请公布日 2018.12.07

(73)专利权人 四川联成迅康医药股份有限公司

地址 610000 四川省成都市青羊区敬业路

229号6栋5楼1号

(72)发明人 张海 杨勇 徐海英 万树伦

罗丹 谢克梅

(74)专利代理机构 成都高远知识产权代理事务

所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 全学荣

(51)Int.Cl.

A61K 31/404(2006.01)

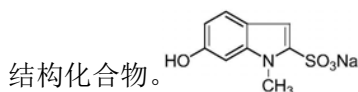
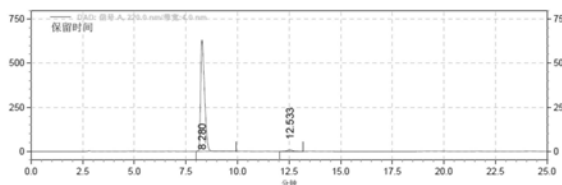
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种稳定性好和安全性高的卡络磺钠药物组合物及其制备方法和应用

(57)摘要

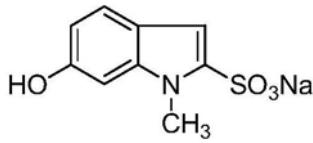
本发明提供一种稳定性好和安全性高的药物组合物及其制备方法和其应用,所述药物组合物含有卡络磺钠和含量不超过0.5%的式Ⅲ所示



式(Ⅲ)

1. 一种稳定性好和安全性高的注射剂,其特征在於,它是由如下成份制成:含有卡络磺钠的药物组合物80重量份,氯化钠900重量份,亚硫酸氢钠1-100重量份,依地酸二钠10重量份,注射用水加至100体积份,氢氧化钠调pH至5.5-6.0;

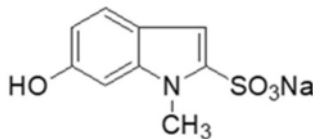
所述含有卡络磺钠的药物组合物含有含量不低于98%的卡络磺钠、含量不高于0.5%的式III化合物、含量不高于0.5%的肾上腺色胺,余量为其它有关物质;



式III。

2. 一种稳定性好和安全性高的片剂,其特征在於,它是由如下成份制成:含有卡络磺钠的药物组合物30重量份,乳糖120重量份,玉米淀粉20重量份,微晶纤维素28重量份,二氧化硅1重量份,硬脂酸镁1重量份;

所述含有卡络磺钠的药物组合物含有含量不低于98%的卡络磺钠、含量不高于0.5%的式III化合物、含量不高于0.5%的肾上腺色胺,余量为其它有关物质;



式 III。

3. 根据权利要求1所述的注射剂或根据权利要求2所述的片剂,其特征在於,所述含有卡络磺钠的药物组合物的制备方法为:在氮气保护下,在肾上腺色胺中加入亚硫酸氢钠溶液,升温搅拌,至反应完全,过滤,浓缩滤液,冷藏,析出晶体,过滤,用丙酮洗涤,干燥后得。

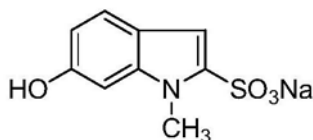
4. 一种检测式III化合物的方法,其特征在於,用高效液相色谱法,用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以0.12%磷酸二氢铵溶液-乙腈为流动相;用296nm、280nm、220nm波长检测。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在於,用220nm波长检测。

6. 式III化合物在制备卡络磺钠药物或其制剂的对照品中的应用。

7. 权利要求1所述的注射剂或权利要求2所述的片剂在制备止血药物中的应用。

8. 一种式III所示化合物,其特征在於,化学名:1-甲基-6-羟基吲唑-2-磺酸钠,分子式: $C_9H_8NNaO_4S$ ,其结构式如下:



式III。

## 一种稳定性好和安全性高的卡络磺钠药物组合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及稳定性好和安全性高的卡络磺钠药物组合物及其制备方法和其用途。

### 背景技术

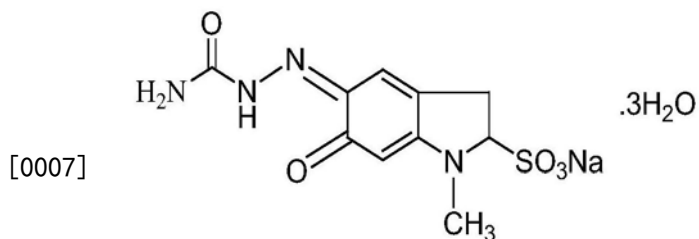
[0002] 现有技术已知,生理止血机制包括:凝固因子、血小板因子、血管因子和纤溶因子,4个因子密切相关,其中任何一个不足都会引起出血。按临床常用止血药分类,可分为促凝血功能药、抗纤溶药、作用于血管药。

[0003] 第一类,促凝血功能药主要有酚磺乙胺类、血凝酶类、维生素K1等。第二类,抗纤溶药,主要有氨甲环酸、二乙酰氨乙酸乙二胺、氨甲苯酸及氨基己酸等。第三类,作用于血管的止血药主要有肾上腺色腓(卡巴克洛)及卡络磺钠等。肾上腺色腓片及卡络磺钠注射液主要是降低毛细血管通透性,促进受损毛细血管端回缩而止血,临床主要用于治疗小血管破裂出血、咯血、鼻血、视网膜血等毛细血管渗透性增加所致的出血。

[0004] 肾上腺素(Adrenaline,Epinephrine)作为经典的抗休克血管活性极强的药,通过收缩血管等产生作用,临床上除用于抢救过敏性休克、心脏骤停等外,也可用于局部止血。但肾上腺素存在不稳定的问题,易氧化成肾上腺素红(Adrenochrome),被比利时列日大学的Derouaux和Roskam等发现其止血作用,但肾上腺素红仍存在不稳定问题。经对肾上腺素化学结构改造的肾上腺色腓(Adrenochrome monosemicarbazone,Adrenoxyl,Carbazochrome,卡巴克洛,肾上腺色素缩氨脲)因稳定性提高做到了商品化,适用于因毛细血管损伤及通透性增加所致的出血,如鼻衄、视网膜出血、咯血、胃肠出血、血尿、痔疮及子宫出血等,也用于血小板减少性紫癜,可口服和注射,但用于注射时只能肌注。

[0005] 直至日本田边制药株式会社再对肾上腺色腓的化学结构进一步改造成磺酸钠盐,在1956~1967年开发上市了多个规格的卡络磺钠注射液(Carbazochrome Sodium Sulfonate Hydrate,ADONA,AC-17),因其水溶性进一步提高才可用于静脉注射途径。卡络磺钠注射液的上市规格有2ml:10mg(皮下或肌注)、5ml:25mg、10ml:50mg和20ml:100mg(后三种均为静脉使用),在日本上市至今,日本也有口服的卡络磺钠片(10mg、30mg)、散剂(100mg:1g)、细粒剂(100mg:1g)上市,日服剂量为30~90mg分三次服用。与国内的规格计算不同,原研中的卡络磺钠以水合物计,国内则以无水物计,100mg卡络磺钠水合物约相当于85.6mg的无水物。

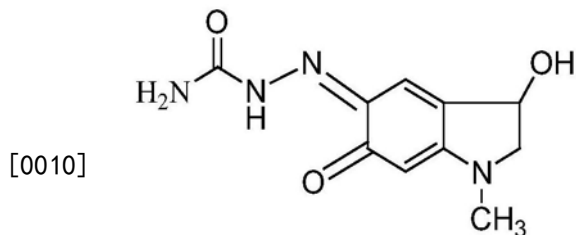
[0006] 卡络磺钠化学名:1-甲基-6-氧代-2,3,5,6-四氢吡啶-5-缩氨脲-2-磺酸钠盐三水合物,分子式 $C_{10}H_{11}N_4NaO_5S \cdot 3H_2O$ ,其结构式如式I所示:



式 (I)

[0008] 卡络磺钠临床主要用于下述病症：用于毛细血管阻力的减弱和渗透性的增强引起的出血倾向（例如紫癜等）；用于由于毛细血管阻力的减弱而从皮肤或粘膜和内膜渗出的眼底出血、肾出血和子宫出血；用于毛细血管阻力的减弱引起的手术期间和手术后异常出血。国内主要用于泌尿系统、上消化道、呼吸道和妇产科出血疾病。对泌尿系统疗效较显著，亦可用于手术出血的预防及治疗等。

[0009] 为提高卡络磺钠的质量并降低其副作用，国内外的学者做了很多研究工作，例如日本药典规定卡络磺钠的含量为不低于98.0%，不高于102.0%，除肾上腺色腓（卡巴克络，下同，其结构式如式II）外的有关物质的含量不超过1.0%（高效液相色谱法，360nm）。国内药品标准规定卡络磺钠的含量为不低于98.5%，肾上腺色腓的含量不超过2.0%，其它有关物质的含量不超过1.0%（高效液相色谱法，363nm）。

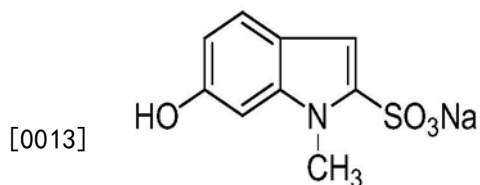


式 (II)

[0011] 为更好地控制卡络磺钠的质量，提高卡络磺钠的用药安全性、有效性和稳定性，有必要深入研究。

### 发明内容

[0012] 本发明人在采用高效液相法对卡络磺钠进行全波长扫描时，意外发现在低于360nm或363nm的波长下有新的色谱峰检出，通过进一步分离、纯化，发现式III所示结构的新化合物。



式 (III)

[0014] 通过实验发现，卡络磺钠自身不稳定，极易被氧化、降解等，其式III化合物将随着卡络磺钠放置时间的延长等而逐渐增加。因此，通过控制式III所示结构化合物的含量来实

现提高卡络磺钠药物稳定性和安全性的目的。

[0015] 本发明的目的在于提供一种卡络磺钠药物组合物,所述药物组合物含有卡络磺钠和含量不高于1%的式III所示结构化合物(又称式III化合物)。

[0016] 进一步,所述药物组合物中卡络磺钠不低于90%,优选不低于95%,更优选不低于98%。

[0017] 进一步,式III所示结构化合物的含量优选不高于1%,优选不高于0.75%,更优选不高于0.5%。

[0018] 进一步,卡络磺钠与式III所示结构化合物之间的重量比不低于1000:10,优选不低于1000:7.5,更优选不低于1000:5。

[0019] 进一步,所述药物组合物含有含量不低于98%的卡络磺钠、含量不高于0.5%的式III所示结构化合物、含量不高于1.0%的肾上腺素,余量为其他有关物质。

[0020] 进一步,所述药物组合物中肾上腺素的含量不高于0.5%。

[0021] 进一步,所述的式III化合物由下述方法制备得到,将卡络磺钠与碱进行加热破坏反应得到,在特定波长下用高效液相色谱方法能检测到。

[0022] 进一步,所述反应是将卡络磺钠与碱置于溶剂内发生的。

[0023] 进一步,所述制备式III化合物的溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇、水的任一种或其组合。

[0024] 进一步,所述制备式III化合物的碱选自三乙胺、氨水、吡啶、氢氧化钠、氢氧化钾、磷酸氢二钠的任一种或其组合。

[0025] 进一步,所述的式III化合物的制备方法包括加热破坏、分离、纯化,优选所述纯化方法选自柱层析、制备型液相分离精制的一种或组合。

[0026] 进一步,所述的制备式III化合物的液相分离精制条件为,流动相为甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水的任一种或其组合,进行等度或梯度洗脱,收集产品流份,蒸干或冷冻干燥,即得。

[0027] 进一步,所述检测式III化合物的液相色谱方法的流动相,为甲醇-盐缓冲液、乙腈-盐缓冲液、甲醇-乙腈-盐缓冲液的任一种或其组合,进行等度或梯度分离,盐缓冲液由磷酸、三乙胺、醋酸钠、冰醋酸、磷酸二氢铵任一种或其组合与水配制而成。

[0028] 进一步,所述检测式III化合物的液相色谱方法的检测波长,为296nm、280nm、220nm,优选220nm。

[0029] 采用本发明的分离、纯化方法,所得式III化合物的含量不低于90%,优选不低于95%,更优选不低于98%。

[0030] 本发明的目的在于提供一种上述卡络磺钠(组合物)的制备方法,主要包括以下步骤:在氮气保护下,在肾上腺素中加入亚硫酸氢钠溶液,升温搅拌,至反应完全,过滤,浓缩滤液,冷藏,析出晶体,过滤,用丙酮洗涤,干燥后得。

[0031] 为了清楚的表述本发明的内容,本发明对下列术语作如下界定:

[0032] 本发明所述的“有关物质”是指卡络磺钠之外的杂质,如肾上腺素、式III化合物及卡络磺钠中含有的其他检测不到的物质,“其它有关物质”是指卡络磺钠中含有的其它检测不到的物质。

[0033] 除非另有说明,本发明所述的百分含量均为质量百分含量。

[0034] 本发明的式Ⅲ化合物,可用作对照品用于控制卡络磺钠及其制剂的质量,并用于检测卡络磺钠及其制剂的有效期。因此,本发明的另一目的在于提供式Ⅲ化合物用于制备卡络磺钠药物或其制剂的对照品中的应用。

[0035] 本发明的目的之一提供一种检测式Ⅲ化合物的方法,用高效液相色谱法,用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以0.12%磷酸二氢铵溶液-乙腈为流动相;用296nm、280nm、220nm波长检测,优选220nm。

[0036] 本发明的另一目的在于提供一种药物制剂,所述制剂由本发明的药物组合物与药学上可接受的载体组成。

[0037] 本发明的药物制剂可为本领域熟知的各种剂型。适合于本发明的剂型选自口服制剂、外用制剂或注射剂,优选为口服制剂或注射剂,更优选为注射剂。所述口服制剂选自口服溶液、片剂、胶囊、颗粒剂、丸剂、散剂、糖浆剂,优选为散剂、片剂、颗粒剂;所述片剂系指药物与适宜的辅料:混匀压制而成的圆片状或异形片状的固体制剂,可选自口服普通片、含片、舌下片、口腔贴片、咀嚼片、分散片、泡腾片、缓释片、控释片或肠溶片等;所述颗粒剂选自可溶颗粒(通称为颗粒)、混悬颗粒、泡腾颗粒、肠溶颗粒、缓释颗粒、控释颗粒等;所述外用制剂选自凝胶剂、膏剂、搽剂、洗剂、涂抹剂,优选所述膏剂选自贴膏剂、凝膏剂或软膏剂;所述注射剂选自注射液、冻干粉针或无菌分装制剂,优选为注射液。可采用本领域熟知的制剂技术手段制备得到本发明的药物制剂。

[0038] 本发明所述的药学上可接受的载体为本领域熟知的用于制备所述制剂的常用赋形剂或辅料。口服制剂或外用制剂常用的赋形剂或辅料包括但不限于填充剂(稀释剂)、润滑剂(助流剂或抗粘着剂)、分散剂、湿润剂、粘合剂、增溶剂、抗氧剂等。粘合剂,例如糖浆、纤维素及其衍生物、明胶浆、淀粉浆、聚乙烯吡咯烷酮、PVP-K30、羟丙基纤维素、甲基纤维素、预胶化淀粉,优选聚维酮和纤维素衍生物,纤维素衍生物为微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、乙基纤维素或羟丙甲基纤维素;填充剂,例如乳糖、糖粉、糊精、淀粉及其衍生物、纤维素及其衍生物、无机钙盐、山梨醇、甘氨酸、硫酸钙二水物、微晶纤维素、预胶化淀粉、甘露醇,优选乳糖、糊精;润滑剂,例如微粉硅胶、硬脂酸镁、滑石粉、氢氧化铝、硼酸、氢化植物油、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,优选硬脂酸镁、二氧化硅;崩解剂,例如淀粉或其衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素,优选淀粉衍生物为羧甲基淀粉钠、预胶化淀粉、改良淀粉、羟丙基淀粉、玉米淀粉;湿润剂,例如十二烷基硫酸钠、水或醇等。

[0039] 所述注射剂常用的赋形剂或辅料包括但不限于:抗氧剂,例如含硫化合物如亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠;有机酸/醇/酯类如维生素C、枸橼酸、苹果酸、山梨醇、甘油、丙二醇、抗坏血酸棕榈酸酯,酯类如氢醌、羟基香豆素、维生素E;渗透压调节剂,例如氯化钠、葡萄糖、氯化钾、氯化镁、氯化钙、山梨醇、甘露醇等,优选为氯化钠或山梨醇;金属络合剂,如依地酸二钠、依地酸四钠、依地酸钙钠任一种或其组合;pH调节剂,例如盐酸、酒石酸、氢氧化钠、氢氧化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸、醋酸钠、乳酸、枸橼酸、枸橼酸钠、碳酸氢钠、碳酸钠任一种或其组合;增溶剂,例如吐温-80、甘油、丙二醇等;填充剂或赋形剂,例如乳糖、甘露醇、山梨醇、右旋糖酐、甘氨酸等。

[0040] 所述注射剂选自注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液,可用于肌肉注射、静脉注射、静脉滴注等。本发明注射剂的规格选自有1mL、2mL、5mL、10mL、20mL、50mL、100mL、

200mL、250mL或500mL。

[0041] 本发明的药物制剂可为单位制剂,以卡络磺钠三水合物计,含有10mg~100mg的本发明药物组合物作为必需的活性成分,优选为10mg、25mg、30mg、50mg、100mg。以卡络磺钠无水物计,含有5mg~90mg的本发明药物组合物作为必需的活性成分,优选为20mg、40mg、60mg、80mg。

[0042] 本发明的另一目的在于提供一种制备注射液的方法,其特征在于,在一定温度和pH值范围下,无氧保护条件下,将本发明的药物组合物与药学上可接受的注射液载体混合而成。

[0043] 进一步,所述的药学上可接受的注射液载体选自抗氧化剂、渗透压调节剂、增溶剂、金属络合剂、pH调节剂的任一种或其组合。

[0044] 进一步,所述的抗氧化剂如含硫化合物如亚硫酸盐、亚硫酸氢盐,亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠;有机酸/醇/酯类如维生素C、枸橼酸、苹果酸、山梨醇、甘油、丙二醇、抗坏血酸棕榈酸酯,酯类如羟基香豆素、维生素E;渗透压调节剂,例如氯化钠、葡萄糖、氯化钾、氯化镁、氯化钙、山梨醇、甘露醇等;金属络合剂,如依地酸二钠、依地酸四钠、依地酸钙钠任一种或其组合;pH调节剂,例如盐酸、酒石酸、氢氧化钠、氢氧化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸、醋酸钠、乳酸、枸橼酸、枸橼酸钠、碳酸氢钠、碳酸钠任一种或其组合;增溶剂,例如吐温-80、甘油、丙二醇等;填充剂或赋形剂,例如乳糖、甘露醇、山梨醇、右旋糖酐、甘氨酸等。

[0045] 本发明的另一目的在于提供本发明所述的药物组合物或其药物制剂用于制备止血的药物中的应用。

[0046] 进一步,所述的止血选自毛细血管阻力的减弱和渗透性的增强引起的出血倾向(例如紫癜等)、由于毛细血管阻力的减弱而从皮肤或粘膜和内膜渗出的眼底出血、肾出血和子宫出血的任一种或其组合。

[0047] 进一步,所述的止血选自由于毛细血管阻力的减弱引起的手术期间和手术后异常出血的任一种或其组合。

[0048] 进一步,所述的止血选自泌尿系统、上消化道、呼吸道和妇产科出血疾病和手术出血的预防及治疗的任一种或其组合。

[0049] 与现有技术相比,本发明具有下述优点:

[0050] 1) 本发明分离、纯化新的式III化合物,并对其进行了结构确证。

[0051] 2) 本发明分离、纯化了卡络磺钠在存放过程中可能产生的有关物质,得到式III化合物、肾上腺色胺和其他有关物质。

[0052] 3) 本发明通过深入研究,得到了一种稳定性高的卡络磺钠药物组合物,即将制备卡络磺钠及其制剂的各个环节控制在一定温度和pH值范围,无氧保护条件下,并通过有效控制卡络磺钠原料和制剂中式III化合物的含量,以提高卡络磺钠原料和制剂的安全性、有效性和稳定性。

[0053] 4) 本发明还提供了式III化合物的制备方法,并将制备所得的式III化合物作为对照品用于控制卡络磺钠及其制剂中式III化合物的含量。

## 附图说明

[0054] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0055] 图1式III所示结构化合物的HPLC图。

[0056] 图2式III所示结构化合物的 $^1\text{H}$ -NMR图。

[0057] 图3式III所示结构化合物的质谱图。

## 具体实施方式

[0058] 以下实施例是对本发明的进一步说明,但绝不是对本发明范围的限制。下面参照实施例进一步详细阐述本发明,但是本领域技术人员应当理解,本发明并不限于这些实施例以及使用的制备方法。而且,本领域技术人员根据本发明的描述可以对本发明进行等同替换、组合、改良或修饰,但这些都包括在本发明的范围内。

## [0059] 实施例1式III化合物的制备

[0060] 取卡络磺钠10g,加入50%乙醇水溶液500ml,加热搅拌溶解,加三乙胺10ml,水浴回流60分钟,回流液用制备型高效液相分离,流动相为乙腈-磷酸二氢铵缓冲液,接收产品流份,即得0.1g式III化合物。HPLC峰面积归一法,测得其含量不低于98%。MS(高分辨质谱)为271.9961 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )。

## [0061] 表1 HPLC测定结果表

[0062]

保留时间(分钟)	峰面积	峰面积(%)
8.280	1109907760	98.61
12.533	15674886	1.39
总计	1125582646	100.00

[0063] 表2  $^1\text{H}$  NMR和 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY测定解析表

[0064]

质子序号	化学位移(ppm)	多重性	质子数	偶合常数(Hz)	质子归属	H-H 相关序号
1	3.73	s	3	-	8位H	-
2	6.37	d	1	0.6	3位H	-
3	6.55	dd	1	8.4, 2.4	5位H	4位H
4	6.65	d	1	2.4	7位H	-
5	7.28	d	1	8.4	4位H	5位H
6	9.07	s	1	-	-OH	-

## [0065] 实施例2式III化合物的制备

[0066] 取卡络磺钠10g,加入50%乙醇水溶液500ml,加热搅拌溶解,加三乙胺10ml,水浴回流60分钟,加入层析硅胶50g,减压干燥,再上层析柱,用甲醇-乙酸乙酯洗脱,接收产品流份,减压蒸干溶剂,得到粗品,加入75%的乙醇水溶液100ml,加热至固体全部溶解,趁热过滤,冷却滤液,析出晶体,得0.1g式III化合物。HPLC峰面积归一法,测得其含量不低于98%。



MS (LC-MS) 为226.2 ( $[M-H]^-$ )。

[0067] 表3  $^{13}C$ NMR、HSQC和HMBC测定数据表

碳序号	化学位移 (ppm)	HSQC	HMBC	碳归属
1	30.4	8 位 H	-	8 位 $CH_3$
2	94.7	7 位 H	5 位 H, 6 位 OH	7 位 CH
3	100.5	3 位 H	4 位 H	3 位 CH
[0068] 4	110.0	5 位 H	4 位 H, 6 位 OH, 7 位 H	5 位 CH
5	118.5	-	3 位, 4 位, 5 位和 7 位 H	3a 位 C
6	121.5	4 位 H	3 位 H	4 位 CH
7	138.4	-	3 位, 4 位, 7 位和 8 位 H	7a 位 C
8	142.6	-	3 位和 8 位 H	2 位 C
9	153.8	-	4 位, 5 位和 7 位 H, 6 位 OH	6 位 C

[0069] 实施例3式III化合物的毒性研究

[0070] 采用L929细胞株(ATCC CCL1[NCTC clone 929(小鼠成纤维细胞)]),将卡络磺钠(由江苏汉斯通药业有限公司提供,精制成纯度99.9%,不含式III化合物)和式III化合物(本发明,纯度99.9%),分别与L929细胞孵育24h、48h、72h(终浓度分别为10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125mg/ml),采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT Assay)测得不同时间点各供试品的细胞存活率,用Bliss法推算出各时间点的半数抑制浓度IC50值。结果:卡络磺钠的IC50值为3.87mg/ml,式III化合物的IC50值为0.02mg/ml。结果可见卡络磺钠的IC50值约是式III化合物的194倍,式III化合物的细胞毒性远大于卡络磺钠,由此提示控制卡络磺钠原料药中式III化合物的含量对于提高产品的安全性具有重要意义。

[0071] 实施例4卡络磺钠及其组合物的毒性研究

[0072] 采用L929细胞株,受试药物卡络磺钠(由江苏汉斯通药业有限公司提供,精制成纯度99.9%,不含式III化合物)和式III化合物(本发明,纯度99.9%)的重量比分别为1:0.1%、1:0.25%、1:0.5%、1:0.75%、1:1%、1:1.5%和1:2%的组合物组(下称“组合物”),给药前,受试药物经注射用水溶解,并按剂量要求稀释至所需浓度(其中卡络磺钠的终浓度为1mg/ml),采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT Assay)测得不同时间点各供试品的细胞存活率。

[0073] 表4细胞毒性反应分级判定表

级别	相对存活率(%)
0	$\geq 100$
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

[0075] 表5含卡络磺钠和式Ⅲ化合物组合物的细胞毒性反应分级判定结果

组合物	相对存活率(%)	判定级别
1:0.1%	83.53	1
1:0.25%	78.36	2
1:0.5%	69.14	2
1:0.75%	62.78	2
1:1%	56.22	2
1:1.5%	45.35	3
1:2%	33.41	3

[0077] 由表5可见,组合物在式Ⅲ化合物含量 $\leq 1\%$ 时,细胞毒性反应均不大于2级,属可接受范围;而当Ⅲ化合物含量在1.5%时,细胞毒性反应为3级,属阳性反应;Ⅲ化合物含量在2%时,细胞相对存活率仅为33.41%,细胞毒性反应虽为3级,但接近4级反应范围值。

[0078] 结果可见Ⅲ化合物含量不高于1%时,理论上属于比较安全的。但是为了进一步确保用药的安全性,组合物中Ⅲ化合物的含量优选不应高于0.5%。

[0079] 实施例5

[0080] 卡络磺钠的制备(下称组合物1)

[0081] 在氮气保护下,将500g的肾上腺色腙置三口瓶中,再加入亚硫酸氢钠溶液(亚硫酸氢钠400g溶于1000ml水),升温至50℃搅拌6小时,过滤浓缩滤液至800ml,冷冻,析出晶体,过滤,800ml丙酮洗涤,50℃干燥后得564g。

[0082] 在氮气保护下,将卡络磺钠560g,加入75%的乙醇水溶液2000ml,加热至固体全部溶解,加入12g活性炭搅拌30分钟,趁热过滤,冷却滤液,析出晶体,过滤,250ml乙醇洗涤,50℃烘干后得卡络磺钠425.6g。得本发明的卡络磺钠组合物1。

[0083] 实施例6制备药物制剂

[0084] 注射液处方1

组合物 1            80g (以卡络磺钠无水物计)

氯化钠            900g

亚硫酸氢钠        100g

[0085] 依地酸二钠        10g

氢氧化钠           适量

注射用水           加至 100L

共制备            1000 瓶

[0086] 注射液处方2

	组合物 1	80g (以卡络磺钠无水物计)
	氯化钠	900g
	亚硫酸氢钠	10g
[0087]	依地酸二钠	10g
	氢氧化钠	适量
	注射用水	加至 100L
	共制备	1000 瓶
[0088]	注射液处方3	
	组合物 1	80g (以卡络磺钠无水物计)
	氯化钠	900g
	亚硫酸氢钠	5g
[0089]	依地酸二钠	10g
	氢氧化钠	适量
	注射用水	加至 100L
	共制备	1000 瓶
[0090]	注射液处方4	
	组合物 1	80g (以卡络磺钠无水物计)
	氯化钠	900g
	亚硫酸氢钠	2.5g
[0091]	依地酸二钠	10g
	氢氧化钠	适量
	注射用水	加至 100L
	共制备	1000 瓶
[0092]	注射液处方5	
	组合物 1	80g (以卡络磺钠无水物计)
	氯化钠	900g
	亚硫酸氢钠	1g
[0093]	依地酸二钠	10g
	氢氧化钠	适量
	注射用水	加至 100L
	共制备	1000 瓶
[0094]	1、制备工艺	

[0095] (1) 向浓配罐中注入处方量50%的注射用水,在充氮气保护下,温度不超过40℃,先后向浓配罐中投入处方量的氯化钠、亚硫酸氢钠、依地酸二钠搅拌溶解,加入处方量0.05%的针用炭,搅拌30分钟后,用钛滤棒过滤脱炭,滤入稀配罐。

[0096] (2) 向稀配罐中补加至处方量80%的注射用水,继续充氮气保护,温度不超过40℃,加入处方量的卡络磺钠搅拌溶解,用2mol/L氢氧化钠溶液调节pH值,再加入处方量0.02% (g/ml) 针用炭,补加注射用水至全量,搅拌30分钟,用钛滤棒过滤脱炭。

[0097] (3) 中间品检测;

[0098] (4) 用0.22μm微孔滤膜精滤,灌装,加塞,轧盖;

[0099] (5) 115℃热压灭菌30分钟,喷淋热水快速降温至60℃,出柜,自然降温至室温。

[0100] (6) 灯检;

[0101] (7) 包装入库,成品全检。

[0102] 片剂处方6

组合物 1            30g (以卡络磺钠水合物计)

乳糖                120g

玉米淀粉           20g

[0103] 微晶纤维素        28g

二氧化硅           1g

硬脂酸镁           1g

共制备             1000 片

[0104] 制备工艺:

[0105] (1) 将卡络磺钠、乳糖、玉米淀粉、微晶纤维素和适量水加入到制粒机中,搅拌,制粒。

[0106] (2) 将制成的湿颗粒置于烘箱中,干燥温度60℃,干燥终点控制水分在5%以下。

[0107] (3) 干燥完成后将颗粒用24目筛网整粒。

[0108] (4) 整粒,按处方比例加入硬脂酸镁和二氧化硅,置于混合机中,混合后测定颗粒含量、水分。

[0109] (5) 压片,用铝塑泡罩或玻璃瓶作内包装。

[0110] (6) 用纸箱作外包装后入库,成品全检。

[0111] 实施例7在药物制剂中检测式III化合物

[0112] 照高效液相色谱法测定,用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以0.12%磷酸二氢铵溶液-乙腈(91:9)为流动相;检测波长为220nm。

[0113] 精密量取样品适量(注射液为直接量取用,片剂为取适当样品,研细,精密称取适量,用流动相超声溶解后的滤液),加流动相定量稀释制成每1ml中约含卡络磺钠0.4mg的溶液,作为供试品溶液;精密量取1ml,置100ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。另取肾上腺色腺对照品、式III化合物适量,加流动相溶解并定量稀释分别制成每1ml中约含8μg肾上腺色腺对照品和2μg式III化合物的溶液,作为对照品溶液。再精密量取供试品溶液、对照溶液与对照品溶液各10μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留

时间的3倍。其中肾上腺色脞对照品、式III化合物按外标法以峰面积计算。

[0114] 表6本发明制剂的稳定性考察

[0115]

贮存时间	组合物	式III化合物 (%)	肾上腺色脞 (%)	其他有关物质 (%)
0 个月	处方 1	0.23	0.06	0.33
	处方 2	0.24	0.00	0.39
	处方 3	0.22	0.00	0.35
	处方 4	0.24	0.08	0.40
	处方 5	0.26	0.03	0.36
	处方 6	0.11	0.02	0.22
3 个月	处方 1	0.29	0.06	0.36
	处方 2	0.25	0.00	0.42
	处方 3	0.27	0.00	0.39
	处方 4	0.30	0.07	0.42
	处方 5	0.28	0.03	0.40
	处方 6	0.12	0.02	0.24
6 个月	处方 1	0.32	0.05	0.40
	处方 2	0.33	0.00	0.45
	处方 3	0.31	0.00	0.42
	处方 4	0.32	0.08	0.44
	处方 5	0.30	0.03	0.43
	处方 6	0.21	0.03	0.35

[0116]

9 个月	处方 1	0.34	0.06	0.45
	处方 2	0.35	0.00	0.48
	处方 3	0.32	0.00	0.46
	处方 4	0.32	0.08	0.47
	处方 5	0.30	0.03	0.48
	处方 6	0.23	0.03	0.38
12 个月	处方 1	0.36	0.06	0.50
	处方 2	0.35	0.00	0.52
	处方 3	0.34	0.00	0.56
	处方 4	0.36	0.07	0.53
	处方 5	0.34	0.04	0.55
	处方 6	0.23	0.02	0.37
18 个月	处方 1	0.38	0.06	0.59
	处方 2	0.39	0.00	0.61
	处方 3	0.37	0.00	0.62
	处方 4	0.39	0.08	0.65
	处方 5	0.37	0.03	0.62
	处方 6	0.25	0.05	0.38
24 个月	处方 1	0.41	0.05	0.65
	处方 2	0.43	0.00	0.68
	处方 3	0.44	0.00	0.67
	处方 4	0.42	0.08	0.70
	处方 5	0.43	0.03	0.66
	处方 6	0.28	0.06	0.48

[0117] 由表6可见,本发明的药物组合物存放24个月,能将有关物质的含量控制在安全范围内,尤其是能将药物组合物中的式Ⅲ化合物含量控制在0.5%以内。

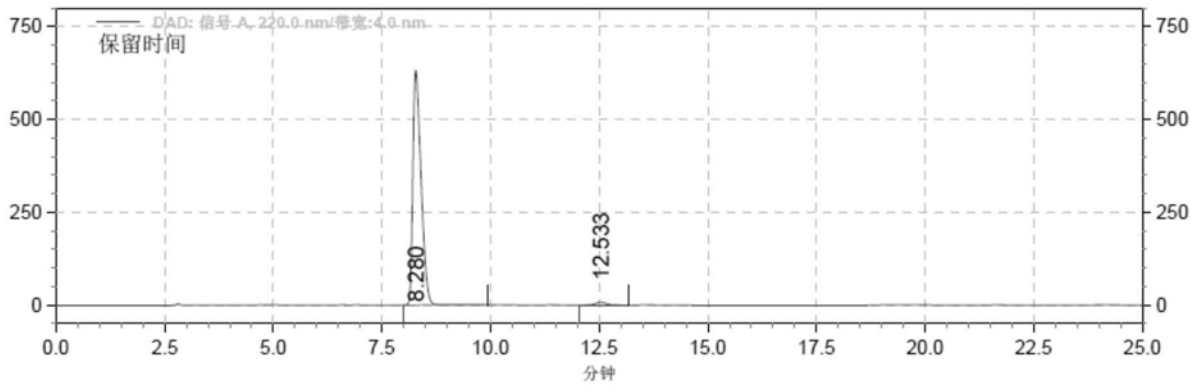


图1

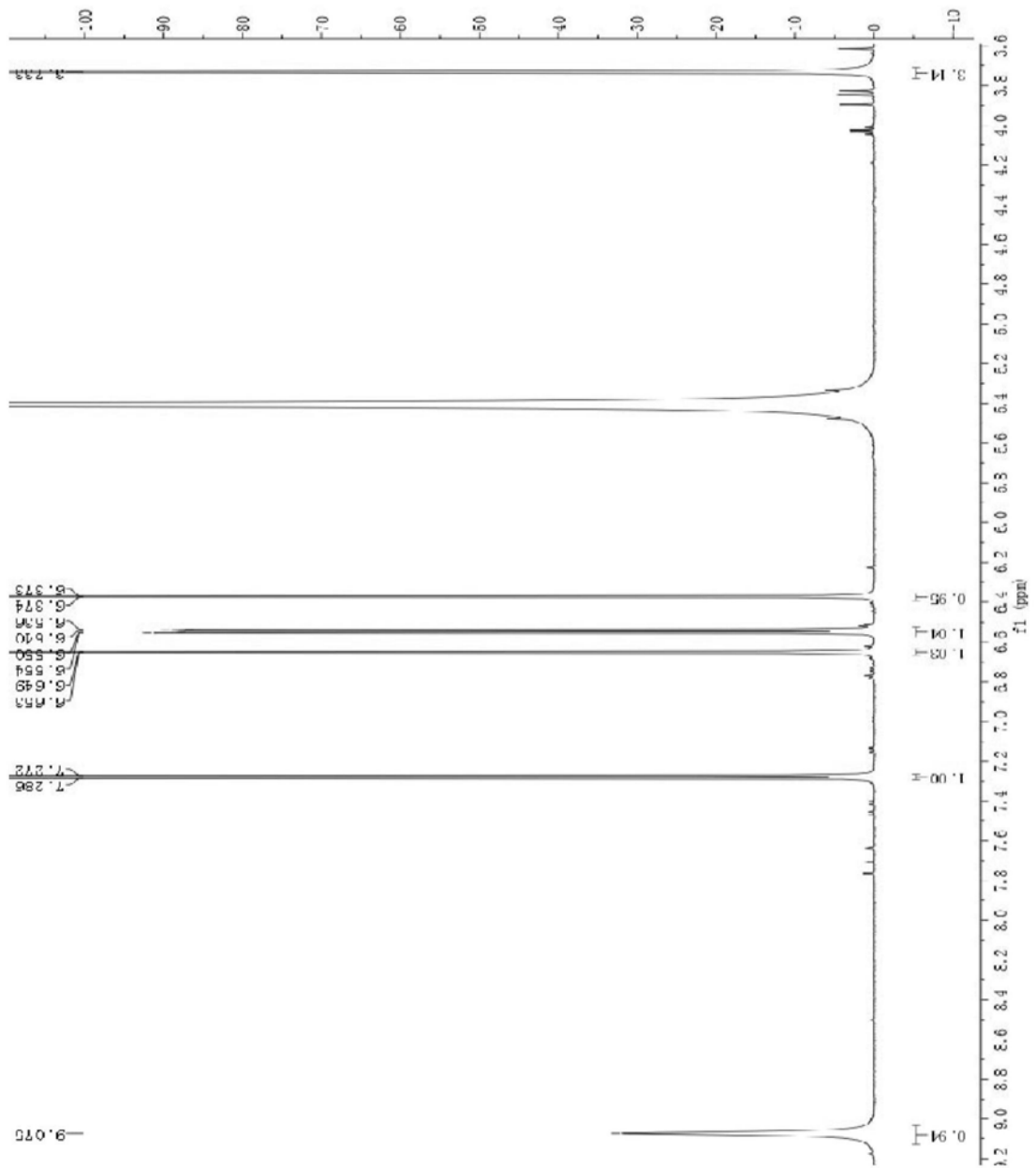


图2



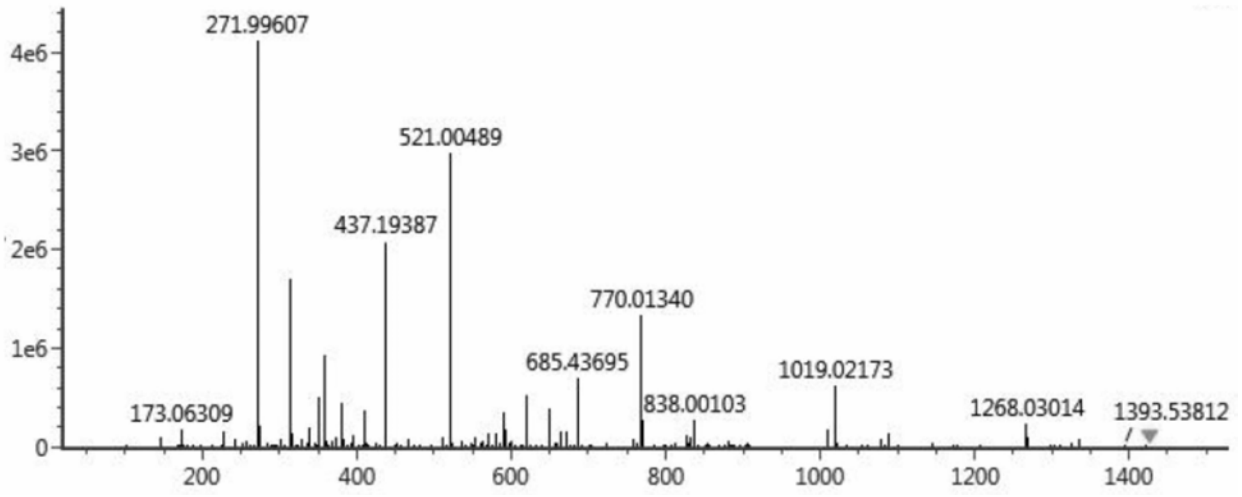


图3