

药物杂质研究中风险控制的几个关键问题

张哲峰

(国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

摘要: 目的 分析探讨化学药物杂质研究中风险控制的相关问题。**方法** 通过分析、梳理杂质研究的目的、内容及其一般过程, 探讨药物杂质研究的基本规律和相关要素。**结果** 科学的分析方法、严格的杂质限度、严谨的过程控制是药物杂质研究中风险控制的关键要素。**结论** 通过选择合适的分析方法, 准确分辨与定量杂质, 综合药理学、毒理学及临床研究的结果, 确定合理的杂质限度, 通过对原辅料的源头控制措施、制备工艺的过程控制措施、包装材料、贮藏条件及有效期的确立等终端控制措施, 将杂质控制在安全合理的范围内, 正是杂质研究的最终目的。

关键词: 杂质研究; 风险控制; 杂质限度; 质量标准; 用药安全

中图分类号: TQ460.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5515 (2010) -05-0000-00

Several key factors in the risk control of drug impurity

ZHANG Zhe-feng

(Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective To analyze and discuss the related factors in the risk control of chemical drug impurity. **Methods** The basic rule and related factors of drug impurity control were discussed, and the purpose, content and general process of the impurity study were analyzed. **Results** Scientific analytical method, strict impurity limit and critical process control are the key factors in the risk control of drug impurity. **Conclusion** Appropriate analytical method, reasonable impurity limit, accurate impurity identification and determination are very important in the control of drug impurity. In addition, pharmacological, toxicological and clinical studies should be combined at the same time. Through source control measures of raw materials and excipients, process control measures of preparation process and terminal control measures in packing materials, storage condition and shelf life, impurity can be well controlled within safe and reasonable range.

Key words: impurity study; risk control; impurity limit; quality standards; safety

词源诠释“杂质”是指物质中所夹杂的其他成分, SFDA《化学药物杂质研究技术指导原则》中将药物杂质定义为任何影响药物纯度的物质。杂质研究的对象是与药物具渊源关系的物质, 如因生产工艺、起始原料、药物降解等因素而存在于药物中的其他物质, 对于正常情况下本不应存在的生产过程中产品间的交叉污染、外源性污染物(如灰尘等)、人为加入的毒物等不属于杂质研究范畴, 而是通过 GMP 等管理措施予以控制。药品临床使用中的不良反应除了与药品本身的药理活性有关外, 有时还与

药品中的杂质有关, 须严格控制。如葡萄糖输液中的 5-羟甲基糠醛对人体横纹肌和内脏有损害; 普罗布考中微量杂质会导致严重的眼毒性, 其杂质 A、B、C 限量分别为 5×10^{-6} 、 5×10^{-5} 和 0.5%。因此杂质研究及控制是药品安全保证的关键要素, 是药品研发中风险控制意识的重要体现。

从杂质来源分析, 完全除去产品中的杂质几乎不可能, 有时也没有必要。通过选择合适的分析方法, 准确分辨与定量杂质, 综合药理学、毒理学及临床研究的结果, 确定杂质的合理限度, 通过对起始

原料、原料药辅料的源头控制、制备工艺的过程控制、包装材料的优选、贮藏条件及有效期的确立等终端控制措施,将杂质控制在安全合理的范围内,正是杂质研究的最终目的。

由此可见,杂质研究涉及杂质分析方法的建立与验证、杂质确认、杂质限度的确定及杂质控制诸方面。即结合杂质的不同特点对分析方法进行系统研究和验证,使建立的分析方法适合于相应检测的要求;通过对特定杂质与非特定杂质的确认、毒性(生物活性)杂质与一般杂质的确认和杂质谱分析等研究工作,为杂质控制及限度确定提供依据;在综合杂质的特性、可接受水平、大生产能达到的水平基础上制订安全合理的限度;根据杂质研究结果,通过原辅料的源头控制、制备工艺的过程控制、稳定性控制(贮藏条件、有效期确定)等措施使杂质控制在安全合理范围。

1 杂质研究的基本现状与面临的挑战

随着人们对于药物研发规律认识的不断深入和分析技术的不断发展,杂质研究的理念逐渐系统化,监管措施也日臻成熟。人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)在 1995 年及 1996 年即颁布了新药原料药及新制剂的杂质研究技术指导原则,并在 2002 年及 2003 年进行了修订;美国 FDA 在 1999 年及 1998 年公布了仿制原料药及制剂杂质研究指导原则;加拿大、澳大利亚的药品监管当局在其药品主文件(drug master files, DMF)和药品质量研究指导原则中均对杂质研究做出明确技术要求。

我国 SFDA 首版杂质研究指导原则于 2005 年颁布,对于规范我国药物研发中的杂质研究起到了重要作用,使注册申请人对杂质控制在药物研发中的重要性有了一定的认识,初步确立了药品的杂质控制意识,基本掌握了分析方法选择与验证的基本要素。但是,从目前的药品的注册申报情况看,我国药物杂质研究水平仍处于起步阶段,研究者尚未全面准确地把握杂质研究的基本理念,与国际前沿的杂质研究不断吸纳当今分析科学新成就和药物研发规律新认识的趋势相比,呈现相对滞后的态势。

1.1 杂质研究理念亟待提升

目前国内杂质研究仍多拘泥于提供准确分析数据的传统思维。而世界前沿的杂质研究以杂质谱为主线,以安全性为核心,将杂质研究与药品的化学、生产与控制(CMC)各项研究、药理毒理及临床安

全性研究等环节密切联系,通盘考量,绝非一项孤立的化学分析工作。

创新药的杂质研究缺乏系统性和整体思考,药理毒理研究和临床研究未考虑样品杂质情况,大生产时的新增杂质和超量杂质缺乏安全性验证,增加了新药研究的风险;仿制品种未进行与原研厂产品杂质情况对比研究,或未进行杂质种类、数量和含量的对比,新增杂质和超量杂质的存在带有一定风险,桥接上市产品安全性缺乏科学支持。

对遗传毒性杂质的控制未给予足够重视。此类杂质可对细胞 DNA 产生损伤,国外对杂质的遗传毒性越来越重视。欧洲医药评价署(EMA)在 2007 年正式颁布《遗传毒性杂质限度指导原则》(Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities),以“可引起遗传毒性的结构”数据库为依据,对含有相同结构单元的杂质研究提出了明确要求。目前,国内仅对主成分进行遗传毒性研究,申请人很少会主动对相关杂质进行此项研究。

1.2 杂质检测手段尚需及时跟进

目前的杂质检测手段、定量方式单一,难以控制多样化的杂质。而国际上杂质研究不断吸纳分析科学成熟的新成就,色谱仪器越来越专业化(凝胶色谱、离子色谱、逆流分溶色谱等相继用于有关物质检测),色谱与光谱联用技术越来越成熟(HPLC-UV、HPLC-MS、HPLC-NMR、GC-MS、GC-IR 等联用仪器正在普及应用中),各类数据库越来越丰富,联机智能化解析系统越来越普及,为杂质研究提供了更为完善的利器。新型色谱填料和不同类型检测器不断出现在药品的杂质控制中,《美国药典》(USP)自第 26 版开始,每版都有新类型的色谱柱增加,USP 第 31 版已增加至 63 种固定相填料,使得采用多样化的色谱条件和检测手段(HPLC-UV/ECD/ELSD/RID)有效控制不同类型杂质成为可能。杂质检测逐步呈现出全面检出(梯度洗脱,多检测手段互补、明确灵敏度要求)、有效分离(规定最难分离物质对峰间的分离度)、目标明确(特定杂质、非特定杂质)、准确定量(外标、校正因子、归一法相结合)的趋势。反观国内杂质研究情况则基本沿用着十几年一贯制的反相 HPLC-UV 组合的检测方法,色谱柱仍局限于 C₈、C₁₈ 及 -CN 等填料,洗脱方式基本采用简单的等度洗脱法,对杂质定量也多为自身对照法,差距较为明显。

1.3 风险控制意识有待于进一步增强

杂质控制是药品研发中风险控制的重要内容之一,但申报中杂质未能有效控制的情况时有发生:检测方法的研究和验证不规范,导致不能有效控制产品杂质;对单个特定杂质重视不够;杂质质控的缺失;杂质限度确定的程序不规范,依据不充分等等,使得药物安全性的风险控制面临严峻挑战。

杂质研究的滞后不仅成为公众安全用药的隐患,而且越来越成为制约我国药品走向世界的瓶颈因素。这种情况需引起我们的深刻思考。

2 杂质研究要突出系统性、阶段性与针对性

药物研究是一项系统工程,各环节之间相互关联。杂质研究也不是一项孤立的工作,与制备工艺、稳定性、质量研究中其他项目、药理毒理及临床研究之间存在着密切关系。综合考虑并正确处理其间的关系才能有效地控制杂质,降低安全性风险。

制备工艺研究和药品稳定性研究是杂质研究的两个主要渠道,通过分析工艺过程与杂质间的关系可以优化工艺过程、控制工艺条件,使杂质降到更低,使研究工作有的放矢。质量标准中杂质检查与药物外观色泽、含量等项目密切联系,通过联动性和互补性,共同把握产品质量。稳定性研究中杂质检查是重要的考察指标,一方面根据杂质的变化情况确定药品的上市包装、贮藏条件和有效期;另一方面如果稳定性考察表明含量发生明显变化,而杂质基本不变,根据杂质与含量间的物料平衡关系,反观杂质检测方法的可行性,反之亦然。因此,从某种程度上讲,杂质研究与其他质量项目间存在相互验证的关系。

杂质的过程控制对保证药品质量尤为重要。通过系统翔实的杂质研究,求证药品生产的过程控制要素与终产品杂质含量间的关联性,确认杂质含量在正常工艺条件下的波动范围,据此制订有效的控制措施和生产参数,可使药品杂质控制在安全合理的范围。在某些情况下杂质检测难以实现,须依靠有效的过程控制措施实现杂质控制的目标。如水溶性复合维生素含近十种药物成分,其中有些成分稳定性的确欠佳,但用杂质检查法控制产品质量具有很高难度,只能从原料的源头和处方工艺着手限制原料药杂质含量、优化处方工艺、确保产品质量和稳定性,同时用质量标准控制其中的特定杂质,以

共同把握产品质量。可见,标准控制不是杂质控制的唯一手段,过程控制与标准控制的有机结合是确保产品质量的有力措施。

杂质研究也不是一项单纯的 CMC 研究,药物杂质的控制更应该根据其临床应用中的毒副反应溯源到产品质量而确定,通过相关研究,求证药物临床毒副反应究竟是药物本身药理作用的延伸,还是杂质引起的,从而有针对性地进行杂质控制。创新药物药理毒理和临床研究所用样品本身包含了一定种类与数量的杂质,如果这些研究中并未明显反映与杂质有关的毒副作用,可认为其杂质状况(种类、个数及含量)已经过了安全性验证,质量标准杂质限度一定不能超出安全性试验允许的范围,也不能超出临床试验样品中的杂质情况,上市产品如果出现新的杂质或超量杂质,需通过优化工艺等措施将杂质降低在相应范围内,否则需对超出情况进行相应研究,寻求安全性支持。

杂质研究是药品研究的重要环节,贯穿于药品研究的始终,杂质研究系统性的特征也反映了其明显的阶段性,不同研究阶段,具有相应的研究目标,同时也是下一阶段的研究基础。杂质研究的系统性和阶段性是其科学性的体现,也是我们做好研究工作的认知基础。

3 科学可行的分析方法是杂质研究与控制的基石

分析方法是获取杂质信息的手段,直接关系到对药物杂质把握的准确性,因此,杂质研究的首要问题是选择合适的分析方法。杂质检测的实质是根据药物杂质的化学结构和特点,采用物理或化学等手段将杂质信号放大,易于辨认和定量。杂质的微量性和复杂性,使得检测方法的专属性和灵敏度十分关键。杂质检测方法的选择和研究,需要从其结构特征、理化性质、剂型特征、工艺过程、标准要素等方面综合设计、严谨研究、规范验证。分析方法各有局限,需关注不同原理分析方法间的相互补充和验证。

3.1 客观认识紫外检测器与 HPLC 组合的局限性

在杂质的检测和控制中,HPLC-UV 组合曾经发挥了重要的作用,在杂质研究中普遍采用,但随着研究的不断深入,该方法的局限性逐步显现,其致命弱点就是得到的色谱图不一定能真实反映实际情况,有时出现杂质漏检。原因是:1)极性比目标物大得多

的化合物可能与溶剂峰重叠而被掩盖;极性比目标物小得多的化合物则难以被洗脱,甚至滞留在色谱柱上。2)通常只用一个检测波长,无紫外吸收或在检测波长处吸收较差的化合物不能被有效检出。

3.2 充分重视梯度洗脱法的重要作用

药物杂质的情况通常比较复杂,既有工艺和原料引入的杂质和中间体,也可能包含各种因素的降解物、副产物等共存物质,通常都是未知物,其极性、油或水分配特性有时相差较大。等度洗脱法难以在较短时间完全洗脱所有杂质;梯度洗脱则往往可以通过调节不同分析时间流动相组成,在较短时间内有效检出极性相差悬殊的系列物质,同时,还可以改善峰形、提高检测灵敏度、取得良好效果。图 1 是某产品中几种杂质对照品混合溶液等度洗脱和梯度洗脱的效果对比。因此,梯度洗脱法在国外的杂质研究中广为应用,呈现出逐步取代等度洗脱的趋势。

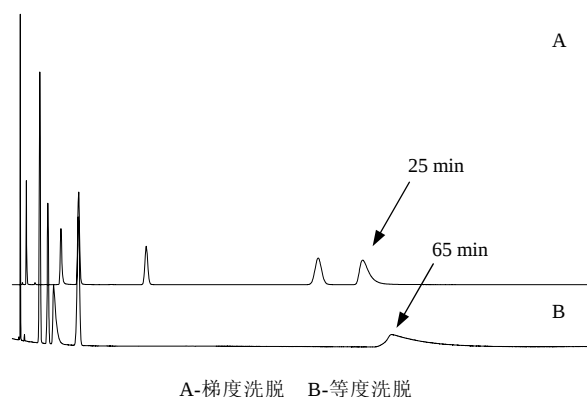


图 1 梯度洗脱法和等度洗脱法的对比

梯度洗脱法的另一重要作用为验证等度洗脱法的可行性。与等度洗脱法相比,梯度法操作复杂,并可引起色谱基线漂移,影响结果精密度。因此,如果等度洗脱可以有效检出所有相关杂质,可作为首选的检测方法,但在研究过程中最好采用适当的梯度洗脱法予以验证,明确拟定的等度洗脱法是否全面检出了产品中的杂质。

3.3 充分关注检测波长的针对性、色谱系统的适用性和检测手段的互补性

药物中杂质情况的复杂性凸显了检测波长选择的重要性。图 2 中的 A 图是某注射液稳定性考察中 286 nm 波长检测有关物质的色谱图, B 图为同一样品改用 230 nm 波长检测的色谱图,显示此时主药已降解殆尽,原 286 nm 波长检测到的主峰并非

主成分,说明失当的检测波长可误导杂质研究的结果,影响剂型合理性的评价和选择。事实上该主药并不适于制成注射液。

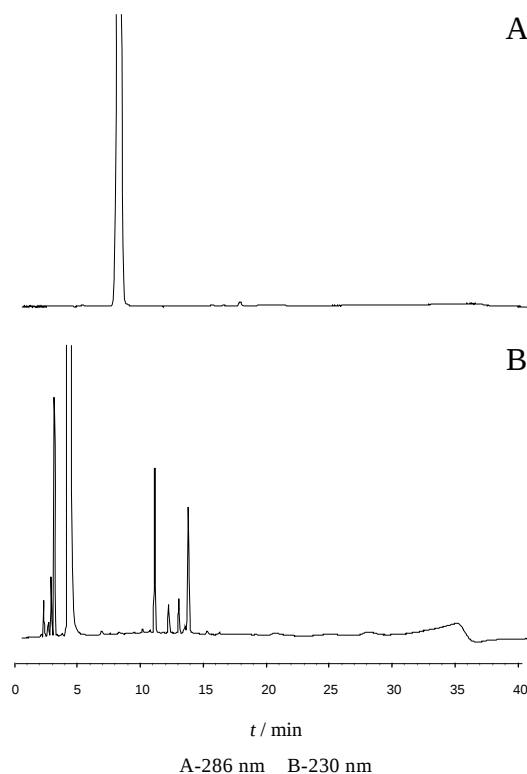


图 2 不同检测波长对相关杂质检测效果对比

检测波长应兼顾待测物中各杂质的吸收情况而确定,或在特定波长下检测特定杂质,而不能仅仅考虑主药的 UV 吸收特性。对于已知杂质,可选择各杂质均有较大吸收的波长;对于非特定杂质(未知杂质)可根据强制降解试验中 DAD 检测情况或比较几种不同检测波长处色谱峰的数量和大小等综合考虑确定检测波长。如产品包含无紫外吸收的杂质,可改用其他类型检测器,流动相许可时,蒸发光散射检测器的灵敏度高于示差折光检测器,已在无紫外吸收的氨基糖苷类抗生素组分及其杂质控制中得到较好应用。ECD 检测器对于无紫外吸收的杂质控制在灵敏度方面更具优势,如阿奇霉素相关物质的控制在 USP30 中在原 UV-HPLC 方法基础上增加 ECD-HPLC 方法,并作为检测结果的仲裁方法。

一般来讲,原研厂对药物杂质经过了比较系统深入的研究,针对杂质的特点有时采用不常用的色谱填料或组成复杂的流动相系统,或方法的分析时间较长,有时规定了最难分离物质对的分离度要求

来确保有关杂质的有效检出,在仿制研究时,需要透彻理解原研厂分析方法的这些“缺憾”,谨慎思考新建方法的“优势”,规范进行方法改变前后分析结果的可比性研究。如图3为某药品有关物质在原研厂色谱柱与通用型 C_{18} 柱上色谱峰对比,表明有时分析方法具备了普及性,却不能有效检出相关杂质。

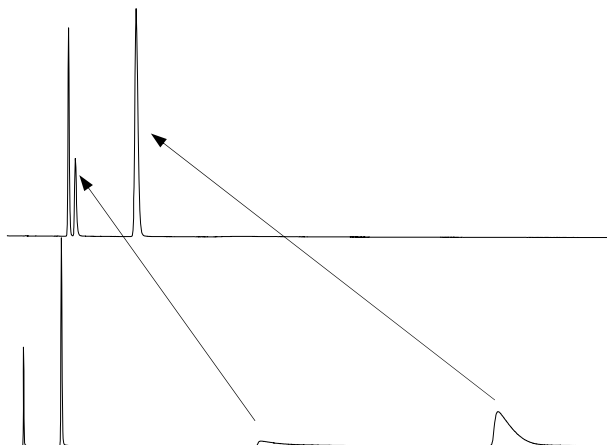


图3 不同色谱柱上杂质色谱峰的对比

由于各种分析方法均具有一定的局限性,因此在进行杂质分析时,应注意不同原理的分析方法间的相互补充与验证,如 HPLC 与 TLC 的互相补充,反相 HPLC 系统与正相 HPLC 系统的互相补充, HPLC 不同检测器的互相补充等。药物杂质的物质多样性决定了有时以现有技术难以使用单一检测手段同时检测所有杂质,如硝呋太尔的杂质检查就采用 TLC 法检测无紫外吸收且极性过大的杂质 3-氨基-5(甲硫基)甲基-2-唑烷酮硫酸盐,用 HPLC 法检测其他杂质。

4 杂质研究关乎风险控制

杂质控制是药品质量控制的核心内容之一,药品在临床使用中产生的不良反应往往与产品中的杂质有关,因此杂质研究及控制是药品安全保证的关键要素,是确保药品研发中风险控制意识的重要体现。

4.1 杂质限度的确定是综合权衡的结果

确定杂质限度的基本原则是“在合理可行情况下,控制在最低”(As Low As Reasonable Practicable, ALARP),考虑要素包括:1) 杂质的活性或毒性,这是评估杂质可接受水平的首要依据,其他考虑因素均不可背离其安全性要求;2) 生产工艺,大生产中的正常波动和制备工艺耐用性反映出的产品

质量批内一致性和批间重复性;3) 分析方法,能达到的检测水平和可接受的误差和精密度;4) 稳定性,产品储运过程中控制降解的方法和措施,以及在拟定贮藏条件下能够使产品保持其规定质量指标的有效期。

在质量标准的制订过程中应充分论证是否载入某一杂质及其限度制订的合理性,这一论证过程应包括安全性、临床研究用样品的杂质概况,工艺稳定的具有一定代表性批次大生产产品的杂质概况汇总和分析。当杂质有特殊的药理活性或毒性时,须作为特定杂质进行控制。大生产的可行性及检测方法分析能力应与安全性数据所能支持的杂质水平相匹配,否则,需优化工艺、改进分析方法;如果安全性数据所能支持的杂质水平远宽松于大生产的可行性及检测能力,尚需结合药品注册中 CMC 的一般技术要求、指导原则中质控限度要求以及 GMP 要求等相关考虑,将杂质限度控制在较严格的水平。

创新药杂质限度的确定需要综合药学、药理毒理及临床研究结果来判定,除了上述用含有一定量杂质的样品进行毒理试验外,也可以直接采用该杂质进行相应的毒理试验,为杂质限度的确定提供安全性方面的依据,这对于含可能具有遗传毒性结构单元的杂质是必须的,通过体外点突变和染色体畸变试验进行安全性考查,如果出现阳性结果,需通过优化工艺过程,消除其生成,否则,需在质量标准中严格控制。如果某已知杂质的毒性已有权威文献报道,也可作为杂质限度确定的依据之一。

通常情况下,确定杂质限度的思路包括如下过程:通盘考虑、综合设计,明晰拟进行动物安全性试验样品杂质谱→比较动物安全性试验用样品中特定杂质含量与临床最大剂量下该杂质的暴露量,确定该杂质的安全窗→根据动物安全性试验结果,控制临床研究样品的杂质谱→根据临床研究结果,确认样品可接受的杂质谱范围→考虑生产工艺与分析方法的正常波动、产品的稳定性,选择工艺相对成熟、多批次、批量接近工业化具有一定代表性的样品考查杂质情况→确定杂质限度(如: $\bar{x} + 3 \times s$)。

国内研究单位普遍对此未给予足够重视,安全性试验及临床试验样品纯而又纯或根本不了解其杂质情况,导致上市产品的杂质情况缺乏充分的安全性验证与评估,安全性风险得不到有效控制。

仿制药的杂质研究是求证与上市产品物质基础

是否“一致”的过程，可基于杂质对比研究、文献资料、安全性研究资料确定杂质限度。通过对比研究，如果产品中的杂质种类与上市产品相同，含量不高于上市产品，一般可桥接上市产品的安全性，对于新出现杂质或超量杂质，需参照创新药研发思路。其他类别新药需要分析与其研发基础——上市产品的异同，相同之处，可桥接其安全性基础，不同之处，需分析这种不同和改变，对杂质安全性将产生何种影响，并进行相应研究，使产生的风险处于可控状态。

4.2 杂质谱分析是杂质控制的重要路径

杂质谱包括药物中所有杂质的种类（研究初期可为色谱保留值等 IP 信息）、含量、来源及结构等信息。通过杂质谱分析较为全面地掌握杂质概貌；有针对性地选择合适的分析方法，以确保杂质的有效检出和确认；跟踪杂质谱对安全性试验或临床试验结果产生的影响，评估杂质的可接受水平；结合规模化生产时杂质谱的变化，评估杂质安全性风险，确立安全的杂质控制水平。

从制备工艺和产品结构分析入手，评估、预测产品中可能存在的副产物、中间体、降解物以及试剂、催化剂等大体的杂质概况，考证建立的分析方法是否能够将它们逐一检出，并进行相应的验证工作，是杂质研究的主动行为；而传统的被动行为仅从建立的一种检测方法所检出的有关物质归属其来源情况，容易出现杂质漏检的情况，难以全面掌握杂质谱。如，杂质谱分析表明抗禽流感药物磷酸奥司他韦所采用的合成路线会产生具有遗传毒性的双叠氮杂质 RO64-1637，经有针对性的分析考查，确实在产品中检测到该杂质，尽管该杂质的含量极低，但考虑到其毒副作用，质量标准中仍作为特殊杂质予以严格控制（不得大于 1×10^{-4} ）。因此杂质谱分析对于降低杂质安全性风险具有重要意义。

4.3 对比研究是杂质研究的重要手段

对比研究是桥接上市药物安全有效性信息的基础，获取上市产品杂质信息的重要途径，通过“类比思维”可以减少研发工作的疏漏和复杂性。对比研究已成为仿制药研发的重要手段，但目前多数注册申请人仅进行了杂质总量的对比，未从杂质种类、数量和含量进行详细对比，但药品某些不良反应的发生往往与某（些）特定杂质相关，仅仅关注总杂质是不够的。《英国药典》（BP）中收录了克林霉素磷酸酯的 5 种杂质的化学结构，毒性相差几个数量

级，国内制剂与原研厂使用的无菌灌装生产工艺不同，多改成了剧烈的终端灭菌过程，而主药水溶液高温不稳定，杂质总量较原研厂产品的高，但具体为何种杂质、毒性如何、与原研厂产品杂质是否相同，未进行这些方面的对比研究，很难获得桥接上市产品的安全性信息，未进行临床试验或动物安全性试验直接上市，其安全性风险可想而知。

杂质对比研究时，除杂质色谱保留时间属性外，及时采纳分析科学的新技术，多属性把握其物质一致性非常必要，可以避免结构类似杂质仅通过保留时间确定其物质一致性产生的偏差。如采用 LC-MS、LC-DAD 等手段通过杂质色谱行为、相对分子质量、碎片信息、UV 吸收特征等属性共同把握杂质一致性，以提高对比研究结果的准确性。

4.4 杂质的有效控制是临床用药的安全屏障

就当前药品质量控制发展趋势而言，杂质控制是掌控药品安全性风险的有效手段，为质量标准中必设项目。但目前仍存在杂质质控缺失或不能有效检测的情况。如硫酸特布他林氯化钠注射液的申报中即有因主药浓度低，检测有关物质存在方法局限性而未进行杂质检查的情况，但本品特点为高活性、不稳定、临床静脉给药用于危重疾病的治疗，且存在诱发心率失常的严重副作用，不对有关物质进行有效控制，则难以把握其安全性风险；有申请人在制备供试液时采用了萃取或固相萃取的方法，以提高其浓度，但对此过程是否把所有杂质均转移到供试液中无法进行科学验证。从某种角度来看，如果一个剂型难以进行有效的杂质控制，该剂型就是一种风险较大的选择。

对于耐用性欠佳的检测方法，在质量标准中需作出规范限定，才能保证对杂质的有效检出。如色谱系统适用性试验中规定最难分离物质对的分离度要求，或特定条件降解后，主峰与杂质峰分离度要求等措施保证杂质的有效分离；检测灵敏度是杂质检查的一个重要参数，FDA《色谱方法验证原则》建议制订标准时，在方法定量限浓度水平用另一外加的参考标准溶液进样，并要求能检出。而现行标准中多数只强调调节记录仪的量程，使杂质峰能显示，而未要求色谱峰的积分阈，会出现微量杂质峰不被积分的情况。《欧洲药典》6.0 版中有采用规定小于 0.05% 供试液度或相当规定限度一半量的峰面积能被积分的要求固化在标准中，以保证检测方法的灵敏度。（下转第 344 页）