

## 药物中杂质对照品的标定项目与纯度测定方法研究进展

苏倩<sup>1</sup>, 雷勇胜<sup>2</sup>, 刘小琳<sup>3</sup>, 蒋庆峰<sup>2</sup>

1. 河南大学 药学院, 河南 开封 475000

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

3. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** 药物中的杂质是否能被全面准确地控制, 直接关系到药品的质量可控与安全性。《中国药典》多采用主成分自身对照法规定有关物质的限度, 而国外药典中多用到杂质对照品进行检测, 这也就要求杂质对照品符合一定的质量标准后方可使用。对照品的标定中常涉及的项目包括纯度测定、结构确证、含量测定等, 考虑到杂质对照品的微量性, 标定时选择合适的分析方法十分重要, 如进行纯度测定可使用高效液相色谱法、差示扫描量热法等试样用量少的分析仪器。

**关键词:** 杂质; 对照品; 标定; 纯度测定; 分析方法选择

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)02-0150-05

## Progress in study on calibration and purity determination method of impurity reference substance in drugs

SU Qian<sup>1</sup>, LEI Yong-sheng<sup>2</sup>, LIU Xiao-lin<sup>3</sup>, JIANG Qing-feng<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475000, China

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract:** Whether the impurity in the drug can be fully comprehensive and accurately controlled, directly related to the quality of the drug safety and controllability. The principal component self-control method used in *Chinese Pharmacopoeia* to regulate material limit, and foreign methods used impurity reference, which requires the impurity reference substance to achieve a certain quality standard. Standard calibration usually includes purity determination, structure analysis, determination, and so on. Considering the impurity reference substance is traceful, so appropriate analysis method is very important. Less sample analysis instrument, such as high performance liquid chromatography, differential scanning calorimetry can be used for purity determination.

**Key words:** impurity; reference substance; calibration; purity determination; analysis methods selection

药物杂质的控制是药品质量控制的关键, 因为药品中的杂质可能降低药物的疗效, 甚至对人体健康产生危害<sup>[1]</sup>。因此, 对来源于原材料、药品贮藏与运输过程中产生的杂质, 要进行科学、严谨的分析与研究, 特别注意对临床有毒理作用的杂质进行控制, 如对可能引起基因毒性杂质的量必须控制到  $1 \times 10^{-6}$  水平<sup>[2]</sup>。

在杂质研究中, 使用杂质对照品进行检测是科学有效的方法。杂质对照品除具有一般对照品的特点外, 还具有自身特点: 制备困难, 样品量少且价格昂贵。如欧洲药典委员会提供的杂质对照品的量一般在 10 mg 左右或更少。所以标定杂质对照品时,

要选择专属性强、灵敏度高、进样量需求少的检测方法, 如高效液相色谱法、毛细管电泳法、核磁共振法等。本文对杂质对照品及其来源进行介绍, 并简要总结了杂质对照品的标定项目和标定方法, 希望对杂质对照品的研究工作提供帮助, 进而推动药品质量标准的建立。

### 1 杂质对照品简介

杂质对照品属于对照品的一种。《中国药典》2010 年版二部凡例中没有专门提到杂质对照品, 但对对照品有明确定义: “对照品系指用于鉴别、检查、含量测定的标准物质”<sup>[3]</sup>。化学对照品 (包括杂质对照品) 还可称为化学标准物质、化学对照物质<sup>[4-5]</sup>。

收稿日期: 2011-11-24

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2009ZX09313-026)

作者简介: 苏倩 (1986—), 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: (022)23006881 E-mail: suqian0393@163.com

《美国药典》34 版中将化学对照品定义为用于相应原料药或制剂的鉴别、检测以及性能验证试验的标准物质,当对照品未给出量值时,其量按 100.0% 计<sup>[6]</sup>。

《欧洲药典》<sup>[7]</sup>与《英国药典》<sup>[8]</sup>中也仅提到化学对照品。《欧洲药典》化学对照品即满足药典各论或附录中规定用途的物质或混合物,除以国际单位定值的标准物质外,药典化学对照品是基准标准物质<sup>[8]</sup>。《英国药典》中除少量使用本国的标准物质外,主要使用《欧洲药典》的标准物质(包括化学对照品)<sup>[4]</sup>。

杂质对照品的来源途径包括制备液相富集及定向合成两种。世界卫生组织规定用于已知杂质测定的杂质对照品,其纯度应不低于 95%;如果杂质对照品的纯度低于 95%时,要注明其纯度。如定向合成利洛司酮<sup>[9]</sup>中两个微量杂质单去甲基利洛司酮、氢化利洛司酮,经多次柱色谱分离,含量均可达到 97%。当某个杂质对照品的量不能满足标准物质制备需要时,可以有其他几种替代方法<sup>[10]</sup>:(1)将杂质(单个或多个杂质)和其他化合物(一般是主成分或中间体)混合;(2)将多个已知杂质混合;(3)改变分装方式<sup>[11]</sup>,由以往常规的用户精密称取,定量稀释使用改为定量分装后用户定量稀释、直接使用。

## 2 杂质对照品的标定项目

参照对照品的标定项目,杂质对照品的标定项目一般包括:采用有效方法确定其纯度,并用其他方法进行验证;确定水分含量,包括表面水和结晶水;确定残留溶剂;确定无机杂质总量;确定有关物质。首批杂质对照品还须做相应的化学、理化鉴定试验,如质谱、核磁共振谱等。

标定方法的选择直接关系到测定结果的专属性与准确性,标定时应重点关注检测方法的选择与验证等方面<sup>[12]</sup>。David 等<sup>[2]</sup>对可以用到的检测方法进行了客观评价,其中大气压化学电离质谱法,包括电喷雾电离法对于检测微量杂质灵敏度高,选择性好,氮化学发光检测器法亦可用于检测微量杂质,但其在分析上的使用还有待考证。对电感耦合等离子体发射光谱<sup>[13]</sup>来说,由于其等离子体火焰能达到 6 000 °C 以上的高温,使得金属元素的 M-O 键很容易被破坏,可以检出纳克级,在测定微量的金属元素方面有得天独厚的优势。

此外,一些方法的联用也可以有效进行微量样

品的分析,弥补了单个方法上使用的不足。如 Lee 等<sup>[14]</sup>成功建立起一种高效液相色谱法及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法联用对微量杂质进行定性、定量分析。

### 2.1 纯度测定

常用方法有高效液相色谱(HPLC)法、薄层色谱(TLC)法等。使用 HPLC 法进行测定,需用 3 种不同流动相或检测波长,应尽可能做到主峰为平头峰,扣除溶剂峰后,以归一法计算含量。使用 TLC 法时,同样需使用 3 种不同展开剂对杂质对照品进行鉴别,并且至少在一种条件下的斑点足够大到稍有拖尾,如果 3 次都只得到一个斑点,说明其基本为纯物质。

### 2.2 结构确证

杂质对照品需要进行鉴别分析<sup>[8,15]</sup>。可采用红外分光光度(IR)法、核磁共振(NMR)法、质谱(必要时采用高分辨质谱)法、差示扫描量热(DSC)法等确证杂质的化学结构,X 粉末衍射(XRD)法可用于测定手性构型。

多种结构检测方法的联用也是很好的选择。查月珍<sup>[16]</sup>采用收集馏分的方法,收集到愈创木酚甘油醚中的微量杂质,再使用液-质联用法确定了杂质相对分子质量,试验结果与实验室标样结果一致。在研究微量杂质时还可使用大气压化学电离飞行时间质谱仪<sup>[17]</sup>,此法对分子中含极性基团但整个分子无较大极性的化合物响应较强,如甾体类药物氢化可的松;而电喷雾离子化的方式对极性大的物质响应效果较好。

### 2.3 含量测定

要求用两种方法测定含量,一般为容量法和色谱法。容量法要求两人分别测定 3~5 份,每人的平行实验结果以及两人的实验结果的相对偏差均应小于 0.3%。色谱法如 HPLC 法需用 3 种浓度作校正因子,精密度的要求小于 1.5%,一般用面积归一法计算含量。

气相色谱(GC)法用于定量微量样品时,对色谱柱的筛选也很重要,周洪柱等<sup>[18]</sup>检测丙烯腈中可能存在的微量有机物丙烯醛、乙腈、丙酮、噻唑、丙腈时,比对填充柱与毛细管柱的区别,结果毛细管柱可检测到含量低于  $1 \times 10^{-6}$  的组分,比填充柱的精确度要高。

此外 NMR 法<sup>[19]</sup>也可用于样品的定量。Jenny 等<sup>[20]</sup>在研究泊洛沙姆中的醛类杂质时使用 NMR 法

进行定量, 试验结果灵敏、准确, 证明此法可在微量样品定量中进行应用。NMR 法特别适用于对新物质的含量确定, 测定时无需专用的样品基准物质, 而仅以含量已知的普通化学物质为参比。确定好溶剂和内标, 选择合适的定量峰用于计算, 就可测得样品的绝对含量, 方法专属、快速、简便。但应注意使用此方法的前提是图谱不能过于复杂而难以解析, 各吸收峰归属清楚, 用于定量的共振峰无其他峰影响其积分值的测定。

#### 2.4 水分测定

杂质对照品可用库仑滴定法或干燥失重法测定水分<sup>[21]</sup>。另外必须指出, 《中国药典》通常在干燥失重测定时规定了干燥至恒重, 而由于杂质对照品量少, 使用干燥失重法测定水分时标准可适当放宽, 由对照品的研制者通过实验探索, 确定干燥至恒重的最短的具体时间, 并在对照品说明书中注明即可。

#### 2.5 重金属测定

微量重金属元素可采用原子吸收分光光度(AAS)法、原子荧光(AFS)法、电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-MS)法测定<sup>[22-23]</sup>。

#### 2.6 溶剂残留测定

样品中的有机溶剂残留量一般使用 GC 法检测, 但所配制的供试品溶液的浓度应满足定量测定的需要, 一般供试品取样量在 0.1~1 g, 当样品量较少且主成分对热稳定时可考虑做干燥失重, 对可能由少量水分带来的误差再辅助库仑滴定法确定水分的量。

### 3 纯度测定方法

纯度测定的方法按照用途可分为 3 类<sup>[24]</sup>: (1) 需用外标对照品的方法(如色谱法); (2) 依据固有的动力学特性建立的方法(相溶解度法或差热扫描法), 适用于首批对照品的标定; (3) 其他方法。

用第一类方法测定纯度时必须用系统适用性试验进行验证, 色谱法常用于杂质的鉴别及定量。其中 HPLC 法是应用最广泛的色谱方法<sup>[25-26]</sup>, 此外 TLC 法、GC 法、毛细管电泳(CE)<sup>[27]</sup>法也得到越来越多的应用。第二类方法可用来测定总杂质的含量。如 DSC 法正越来越多的用于检测具有多晶型结构且构型不同的化合物, 同时测定全部固体杂质的总量。第三类方法包括紫外分光光度(UV)法、IR 法、NMR 法、滴定法、比旋法等。通过熔程也可判断纯度(样品量在 1 mg 以上), 纯化合物熔程

很短, 1~2 °C; 混合物熔点下降, 熔程变长。

#### 3.1 HPLC 法

一般使用二极管阵列检测峰纯度, 它可提供痕量水平测定所需的灵敏度。栾成章等<sup>[28]</sup>使用 HPLC 法对强心药氨力农对照品的纯度进行测定, 检测量为 0.5 mg, 最小检出 0.049 μg, 达到检测量的 0.01%, 试验中更换色谱柱作为方法耐用性考察, 用不加校正因子的自身对照法计算杂质纯度, 进而得到氨力农的纯度, 说明 HPLC 法适合氨力农对照品纯度的检测, 具有灵敏度高、快速、准确等优点。此法的缺点在于可能会出现杂质漏检, 所以在使用 HPLC 法时应充分重视梯度洗脱及波长选择<sup>[29-30]</sup>。

#### 3.2 TLC 法

TLC 法属于半定量方法, 所用仪器简单且价格较低。试验时要求 3 个展开系统, 显色灵敏度要达到检测量的 0.1%~0.2%<sup>[31]</sup>。此项技术易于操作并且可方便地在微克水平进行试验。该方法可分离立体异构体或者同系物等结构相似的有关物质。但 TLC 法影响因素较多<sup>[32]</sup>, 检验对照品时需有所注意, 建议作为辅助测定方法。

#### 3.3 DSC 法

DSC 法是一种简便、快速、可靠且试样用量少的方法<sup>[33]</sup>, 尤其适合杂质对照品纯度的测定, 如 Henry<sup>[34]</sup>用改良过的热分析法对病毒唑的已知杂质进行定性分析, 结果杂质的检测限可以到 0.04 mg。《美国药典》从 16 版开始至今一直将 DSC 法用于对照品的纯度检查, 目前各国药典均已收载。杨腊虎等<sup>[35]</sup>用 DSC 法和热失重法对雌二醇化学对照品的纯度进行了测定, 得到两个吸热峰, 经计算热失重为 3.3%, 显示分子中含有半分子结晶水并进一步通过计算得出雌二醇对照品纯度。

#### 3.4 软电离质谱法

软电离质谱的特点是只给出化合物的准分子离子峰<sup>[36]</sup>。如果样品不纯, 就会检出多个准分子离子峰, 不但确定了纯度, 还能明确混杂物的相对分子质量。

#### 3.5 NMR 法

在氢谱中如果发现有很多面积积分值不到 1 的小峰, 就有可能是样品中的杂质。利用门控去偶的技术通过对碳谱的定量也能实现纯度鉴定。

此外还可以将上述多种纯度测定方法相结合对结果进行验证<sup>[37]</sup>。如刘志亮等<sup>[38]</sup>采用测定熔点、TLC 法和 HPLC 法对阿苯达唑亚砷酸盐进行了纯

度测定。使用 HPLC 法时面积归一法计算杂质含量, 3 种方法均验证阿苯达唑亚砷酸盐可作为对照品使用。

#### 4 结语

《英国药典》和《欧洲药典》中 95% 以上的品种项下有关物质检查项采用了杂质对照品, 《美国药典》也占到 80% 以上。《美国药典》中目前所公布的标准物质(包括杂质对照品)就有 2 600 多种, 有一整套的研制、测试方法, 测试手段齐全(运用多种光谱、色谱手段进行纯度等的测定), 故《美国药典》对照品的质量已获得大多数国家的认可。《英国药典》对照品等也具有较高的质量要求。

在国内, 药物对照品的研究近年来有发展的趋势, 但对杂质对照品的研究还不够完善, 有关物质检查项中更多地使用主成分自身对照法进行检测。所以, 杂质对照品的标准建立在我国显得更为迫切。杂质对照品可帮助确定杂质的合理限度, 对药品检验方法及质量标准的建立将会起着极大的促进作用。

#### 参考文献

- [1] 刘祥东, 梁琼麟, 罗国安, 等. HPLC 法测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱中杂质 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1316-1319.
- [2] David Q L, Sun M J, Alireza S K. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 999-1014.
- [3] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [4] 朱霓虹. 药物标准物质的发展和应用概况 [J]. 中国药品标准, 2000, 1(1): 15-16.
- [5] 李海霞. 浅谈如何用化学标准物质检验药品 [J]. 中国中医药咨讯, 2010, 2(7): 75.
- [6] *U.S. Pharmacopeia/National Formulary, USP34-NF29* [S]. 2011: 38-39.
- [7] *European Pharmacopoeia 7.0* [S]. 2010: 727-730.
- [8] *British Pharmacopoeia* [S]. 2009: 11-12.
- [9] 吕子敏, 丁惟培, 管瑞琴, 等. 利洛司酮中微量杂质的分离、鉴别与合成 [J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(4): 300-302
- [10] 宁保明, 严菁, 张启明, 等. 欧洲药典标准物质指导原则介绍 [J]. 中国药品标准, 2006, 7(4): 74-78.
- [11] 程奇蕾, 张启明. 一种研制和建立贵重化学对照品的方法 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 683-685.
- [12] 魏农农. 创新性化学药物杂质研究目的、思路与技术要求 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(16): 1461-1463.
- [13] 郭寿鹏, 王建华. 浅谈标准样品(物质)研制过程中分析方法的应用 [J]. 中国标准化, 2007, 6(16): 23.
- [14] Lee D, Rumbelow S, Williams S K. Identification and quantitation of trace impurities in fatty alcohol ethoxylates using HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 654(1): 59-63.
- [15] 化学药物原料药制备和结构确证研究的技术指导原则 [S]. 2005: 21-23.
- [16] 查月珍. 液-质联用法分析愈创木酚甘油醚中的微量杂质 [J]. 分析测试学报, 2001, 20(1): 40-41.
- [17] 张芳, 耿昱, 郭寅龙, 等. 液相色谱/大气压化学电离飞行时间质谱分析氢化可的松中微量杂质 [J]. 有机化学, 2002, 22(2): 123-126.
- [18] 周洪柱, 崔云彪, 李光. 毛细管气相色谱法测定丙烯酸酯中微量杂质 [J]. 应用化工, 2009, 38(4): 617-619.
- [19] 胡敏, 胡昌勤. H-NMR 法分析头孢孟多酯钠对照品 [J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(9): 534-538.
- [20] Jenny F, Bengt E, Sven P J. Quantification of aldehyde impurities in poloxamer by <sup>1</sup>H NMR spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 552(1/2): 160-165.
- [21] 张启明, 宁保明. 有关化学对照品中水分的思考 [J]. 中国药品标准, 2003, 4(4): 30-31.
- [22] 徐春蕾, 张丽, 曹雨诞. 原子光谱法测定中药材中的铜含量 [J]. 时珍国医国药, 2007(2): 285-286.
- [23] Nageswara R R, Talluri M V. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(1): 1-13.
- [24] 宁保明, 黄海伟, 张启明, 等. 世界卫生组织关于化学对照品的指导原则介绍 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(6): 166-172.
- [25] Kamberi M, Riley C M, Ma S X, et al. A validated sensitive HPLC method for the determination of trace impurities in acetaminophen drug substance [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2004, 34(1): 123-128.
- [26] Soman A, Jacob S, Swanek F. Low level determination of 4-amino-2-ethoxy-cinnamic acid and its ethyl ester in a drug substance and its formulation prototypes by HPLC-UV-DAD [J]. *Chromatogr Sci*, 2009, 47(4): 315-319.
- [27] Paul H, Amjad M, Khan T B, et al. Drug impurity profiling by capillary electrophoresis/mass spectrometry using various ionization techniques [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(18): 2878-2884.
- [28] 栾成章, 庞靖, 王尊文. HPLC 法测定氨基农对照品的色谱纯度 [J]. 齐鲁药事, 2006, 25(1): 23-24.
- [29] 张哲峰. 药物杂质研究中风险控制的关键问题 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 327-333.
- [30] 冯钰安, 庄海青, 周辉. 高效液相色谱法分析精对苯

- 二甲酸中的微量杂质 [J]. 色谱, 1996, 14(3): 119-201.
- [31] 肖颖, 倪坤仪. 新药中特殊杂质的分析研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(5): 119-201.
- [32] 苏佳妍, 于大海, 马坤. 药物中有机杂质的控制 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(24): 364-367.
- [33] 许鸣镛. 热分析法在化学药品对照品中的应用 [C]. //2003 年药物分析论坛“热分析在药物分析中的应用”专题学术研讨会论文集. 上海: 热分析在药物分析中的应用学术研讨会, 2003: 14-20.
- [34] Henry H Y T, Boris Y S, John P C, *et al.* An improved thermoanalytical approach to quantifying trace levels of polymorphic impurity in drug powders [J]. *Pharmaceutics*, 2005, 295(1/2): 191-199.
- [35] 杨腊虎, 黄海伟, 刘明理, 等. 雌二醇化学对照品热特征分析 [C]. //2003 年药物分析论坛“热分析在药物分析中的应用”专题学术研讨会论文集. 上海: 热分析在药物分析中的应用学术研讨会, 2003: 14-20.
- [36] Li H, Sluggett G W. Development and validation of a sensitive GC-MS method for the determination of trace levels of an alkylating reagent in a betalactam active pharmaceutical ingredient [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3/4): 486-494.
- [37] Pan C, Liu F, Ji Q, *et al.* The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(3): 581-590.
- [38] 刘志亮, 徐光科, 裴香玲, 等. 阿苯达唑亚砷酸盐对照品候选物纯度检测方法的建立 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(7): 13-15.

### 《现代药物与临床》近况

中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、中国科学文献计量评价研究中心发布了《中国学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术·2011版)》。《现代药物与临床》的影响因子为 0.369, 基金论文比为 0.30, 引用半衰期为 4.9, 被引半衰期为 6.6, 引用期刊数为 288, 被引期刊数为 301, WEB 下载量为 6.93 万次。与上一统计年度相比, 我刊期刊综合即年指标增加幅度达到 156.52%, 期刊综合影响因子增加幅度为 82.58%, 基金论文比增加幅度为 66.67%。

《2011 年版中国期刊引证报告》(扩刊版)发布:《现代药物与临床》(原刊名《国外医药(植物药分册)》) 2010 年总被引频次 392, 影响因子 0.386, 基金论文比 0.30, 即年指标 0.184, 他引率 0.95, 被引半衰期 4.24。各项数据显示刊物质量在逐步提高, 影响力在逐步提升。

天津市期刊质量评估结果及第十届优秀期刊评选结果公布,《现代药物与临床》被评为一级期刊。此次评估由中共天津市委宣传部、天津市新闻出版局、天津市期刊工作者协会共同组织, 评估范围包括我市公开发行的全部期刊, 分为自然科学类和社会科学类。经过评委会初评、复评, 在 120 多种自然科学类期刊中评选出一级期刊 56 种, 二级期刊 66 种, 天津中草药杂志社的《中草药》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志均被评为一级期刊, 其中《中草药》杂志同时荣获优秀期刊特别奖。

衷心感谢各位编委、作者和读者对我刊的大力支持和厚爱!

《现代药物与临床》编辑部