

罗红霉素分散片有关物质分析方法优化及一致性评价研究

范巧云¹, 陆赛花², 刘莉², 周自桂², 秦勇^{1, 2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 燃点(南京)生物医药科技有限公司, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 优化有关物质分析方法, 有效分离罗红霉素分散片中13种杂质, 建立加校正因子的主成分自身对照法测定有关物质, 并与原研制剂进行有关物质一致性评价研究。方法 使用 Waters XBridge[®] C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 以0.52 mol·L⁻¹磷酸二氢铵水溶液(用5 mol·L⁻¹氢氧化钠调节pH值至4.3)为流动相A, 以乙腈-水(70:30)为流动相B, 进行梯度洗脱; 体积流量0.9 mL·min⁻¹, 柱温20℃, 检测波长205 nm, 进样20 μL。对13种杂质成分进行线性回归, 以线性斜率计算各杂质相对于罗红霉素的校正因子, 用加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量并进行方法验证。罗红霉素分散片经碱破坏、酸破坏、氧化破坏、高温破坏、光照破坏后检测色谱图变化; 取参比制剂及自研制剂, 置于温度40℃、相对湿度75%条件下放置6个月, 分别于第1、2、3、6个月取样测定其有关物质含量。结果 在已建立的色谱条件下, 罗红霉素与相邻杂质、杂质与杂质之间均能有效分离, 分离度均≥1.5。罗红霉素在0.968 9~100.090 0 μg·mL⁻¹相关系数为0.999 4, 其他已知杂质在相应浓度范围内相关系数也均在0.999 0~1.000 0, 线性关系均良好。各已知杂质平均回收率均在90.0%~108.0%, 9份回收率的RSD≤5.0%。采用加校正因子的主成分自身对照法测定3批样品中杂质含量, 结果与杂质对照品外标法一致。自研制剂杂质与原研制剂具有有关物质一致性。自研制剂在光照条件下稳定; 在氧化、酸、碱、高温破坏条件下均有不同程度的降解, 在酸条件下主峰降解最为明显, 杂质B、D显著增加; 氧化条件下降解产生氮氧化物; 原研制剂与自研制剂在加速条件下均未检出杂质B、K及氮氧化物, 在加速6个月过程中, 二者杂质D均有增长趋势, 其他杂质无明显变化。结论 建立的方法具有良好的专属性、准确性和重复性, 可采用加校正因子的主成分自身对照法测定罗红霉素分散片中有关物质。

关键词: 罗红霉素分散片; 有关物质; 校正因子; 高效液相色谱; 一致性评价

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1099-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.012

Optimization of content determination for related substances and consistency evaluation of related substances in roxithromycin dispersible tablets

FAN Qiaoyun¹, LU Saihua², LIU Li², ZHOU Zigui², QIN Yong²

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Burning Point (Nanjing) Biopharm Co., Ltd., Nanjing 210046, China

Abstract: **Objective** Optimize the method of related substances to effectively separate 13 known impurities in Roxithromycin Dispersible Tablets. Establish a principal component self-control method with correction factors to determine related substances, and conduct a study on the consistency of related substances with the original research agent. **Methods** Waters XBridge[®] C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) was used for analysis, with a gradient elution system using 0.52 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate aqueous solution (adjust pH to 4.3 with 5 mol·L⁻¹ sodium hydroxide) as mobile phase A and acetonitrile-water (70:30) as mobile phase B. The flow rate was 0.9 mL·min⁻¹, column temperature was 20℃, detection wavelength was 205 nm and injection volume was 20 μL. The linear regression equations of 13 impurities were drawn to calculate the correction factor of each impurity relative to roxithromycin with linear slope. The method was used to calculate impurities contents and verify. Chromatographic changes of roxithromycin dispersive tablets were detected after alkali, acid, oxidation, high temperature and light damage. The reference preparation and self-developed preparation were placed at 40℃ and 75% relative humidity for six months, and Samples

收稿日期: 2021-11-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973443)

第一作者: 范巧云, 女, 硕士研究生, 研究方向为药品质量控制。E-mail: 907760928@qq.com

*通信作者: 秦勇, 男, 研究员, 主要从事新药研究与开发。E-mail: qyjason@163.com

were taken in the 1st, 2nd, 3rd and 6th month to determine the content of related substances. **Results** The resolution between roxithromycin and neighboring impurities, and impurities was greater than 1.5 under the above chromatographic condition. The correlation coefficient of roxithromycin in the range of 0.968 9—100.090 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was 0.999 4, and the correlation coefficients of other known impurities in the corresponding concentration range were all between 0.999 0 and 1.000 0, respectively. The linear relationship was good. The average recovery rate of each known impurity was between 90.0%—108.0%, and the RSD of nine parts recovery rate was less than or equal to 5.0%. The impurity content in the three batches of samples was determined by the principal component reference method with correction factors, and the results were consistent with the impurity reference external standard method. Impurities of self-preparation were consistent with related substances of reference preparation. The self-developed agent was stable under light condition. The impurities B and D were significantly increased under the condition of oxidation, acid, alkali and high temperature. Oxidation conditions drop solution to produce nitrogen oxides. No impurities B, K and nitrogen oxides were detected in the original and self-developed agent under the condition of acceleration. In the process of acceleration for six months, the impurity D in both of them had an increasing trend, while the other impurities had no obvious change. **Conclusion** This method has good specificity, accuracy and repeatability, and the principal component reference substance method with correction factor can be used to determine the related substances in roxithromycin dispersible tablets.

Key words: Roxithromycin Dispersible Tablets; relative substances; correction factor; HPLC; consistency evaluation

罗红霉素(roxithromycin)是一种半合成的大环内酯类抗生素,主要作用于革兰阳性菌、厌氧菌、衣原体和支原体等,主要用于治疗敏感菌株引起的呼吸道、泌尿道、皮肤组织感染,也可用于慢性支气管哮喘的辅助用药^[1-3]。罗红霉素分散片具有崩解迅速、药物活性高等特点,在临床上广泛应用^[4]。

有关物质一直作为关键的药品质量属性而成为药品被评价的重要内容之一。而如今国家药品监督管理局药品审评中心要求企业补充完善申报资料的一个主要原因,就是企业在药品申报资料中有关物质研究部分缺少校正因子的研究,因此,校正因子的研究逐渐成为企业和科研单位所关注的焦点^[5-7]。针对罗红霉素制剂的质量研究,《中国药典》2020年版标准^[8]未列出已知杂质,仅列出单杂及总杂要求;罗红霉素分散片与罗红霉素片的进口药品注册标准中,均列举了2个用代号标记的已知杂质,但是未知其结构及具体名称,有关物质限度较为宽泛。

根据原料厂家的原料合成路线及检测结果,原料中存在罗红霉素E衍生物,同时在前期破坏试验中氧化条件下产生氮氧化物杂质,而目前现行质量标准中均未对上述2种杂质有相关描述及研究,因此需要一种更有效准确的分析方法对潜在杂质进行定量分析。本研究在欧洲药典基础上优化高效液相色谱(HPLC)梯度洗脱方法,对欧洲药典已知杂质及潜在杂质均进行有效分离,并通过校正因子的测定及耐用性考察,首次建立了加校正因子的主成分自身对照法对罗红霉素分散片有关物质进行定量计算,并进行一致性评价研究。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(Lab-solution CS 工作站)(日本 Shimadzu 公司);BT125D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);XP6 电子分析天平、FE28 pH 计(瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 药物及主要试剂

罗红霉素对照品(批号 130557-201604,质量分数 96.0%)购自中国食品药品检定研究院,其他杂质具体信息见表 1。罗红霉素分散片自研制剂[燃点(南京)生物医药有限公司,批号 20012、200125、200126]、罗红霉素分散片原研制剂[罗力得,赛诺菲(北京)制药有限公司,批号 7PE4A、7LA3A、4F23A]。

磷酸二氢铵(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,西陇科学股份有限公司);乙腈(色谱级,美国天地有限公司);三乙胺(分析级,上海阿拉丁生化科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters XBridge[®] C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm);流动相 A:0.52 mol·L⁻¹磷酸二氢铵水溶液(用 5 mol·L⁻¹氢氧化钠调节 pH 值至 4.3),流动相 B:乙腈-水(70:30),梯度洗脱,详见表 2;柱温 20 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 205 nm;体积流量 0.9 mL·min⁻¹;进样量 20 μL (进样盘控温 8 $^{\circ}\text{C}$)。

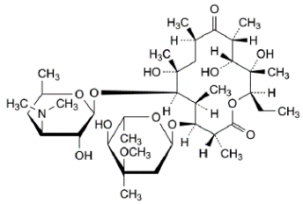
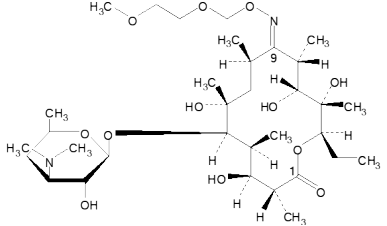
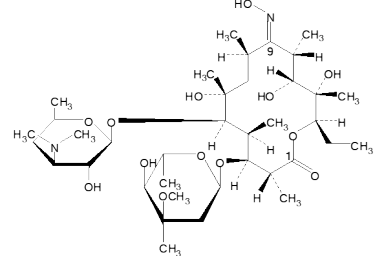
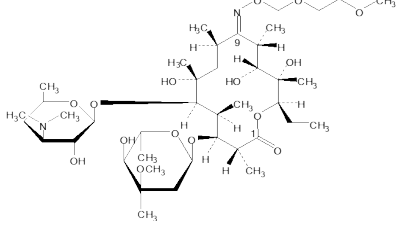
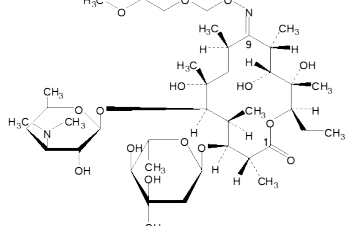
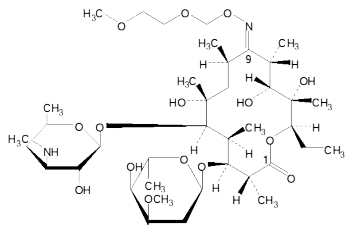
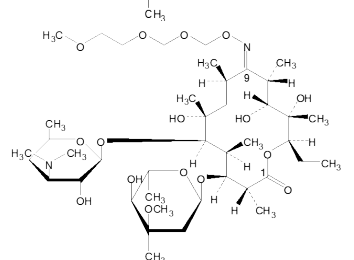
2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶液(稀释液) 0.067 mol·L⁻¹磷酸二氢铵缓冲液(三乙胺调节 pH 值至 6.5)-乙腈(65:35)。

2.2.2 空白辅料溶液 按处方配比,取空白辅料

表1 杂质对照信息汇总

Table 1 Summary of impurity reference information

杂质代号	结构式	来源	批号	质量分数/%
杂质A		中国食品药品检定研究院	130307-201417	93.30
杂质B		Sinco Pharmachem	20-06-2205	96.60
杂质C		浙江国邦药业	KAJ2007017-B	97.00
杂质D		浙江国邦药业	20-06-0902	96.86
杂质E		浙江国邦药业	LHMSW-2020062801	100.00
杂质F		深圳菲斯生物科技	20061708	97.16
杂质G		深圳菲斯生物科技	20061709	98.47

续表1

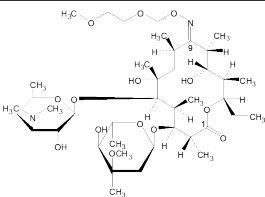
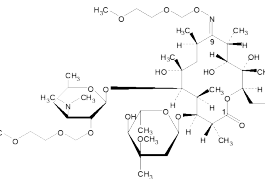
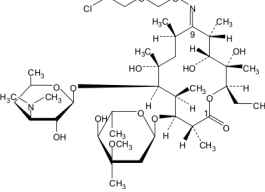
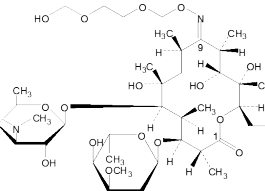
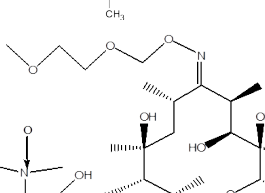
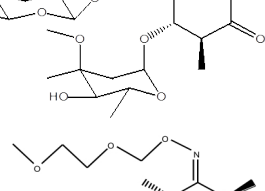
杂质代号	结构式	来源	批号	质量分数/%
杂质H		深圳菲斯生物科技	18073164	95.81
杂质I		Sinco Pharmachem	19-10-0406	96.30
杂质J		Sinco Pharmachem	20-06-1712	97.76
杂质K		广州牌牌生物科技	PILHMS-K-EP-20181106-03	95.99
氮氧化物		美国TLC公司	2325-010A6	93.70
红霉素E衍生物		浙江国邦药业	LHMSW-2020062801	100.00

表2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedure

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	66	34
60	52	48
65	52	48
65.1	66	34
75	66	34

约 40 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加稀释液适量 (约 40 mL), 超声 5 min, 取出冷却至室温, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.2.3 各杂质定位溶液 分别称取罗红霉素及杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、红霉素 E 衍生物、氮氧化物各约 5 mg, 置不同 10 mL 量瓶中, 稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀; 再分别精密移取上述溶液

1.0 mL,置不同50 mL量瓶中,稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 混合对照品溶液 分别称取罗红霉素及杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K,红霉素E衍生物,氮氧化物各约5 mg,置10 mL量瓶中,加稀释液溶解并定容。再精密移取上述溶液1.0 mL,置50 mL量瓶中,稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 选择性溶液 取罗红霉素对照品20 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加混合对照品溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.6 供试品溶液 取本品10片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于罗红霉素100 mg),置50 mL量瓶中,加稀释液适量(约40 mL),超声5 min使溶解,放冷至室温,用稀释液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.7 自身对照溶液 取供试品溶液适量,加稀释液稀释至10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,摇匀,即得。

2.2.8 系统适用性溶液 取罗红霉素对照品20 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加混合对照品溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

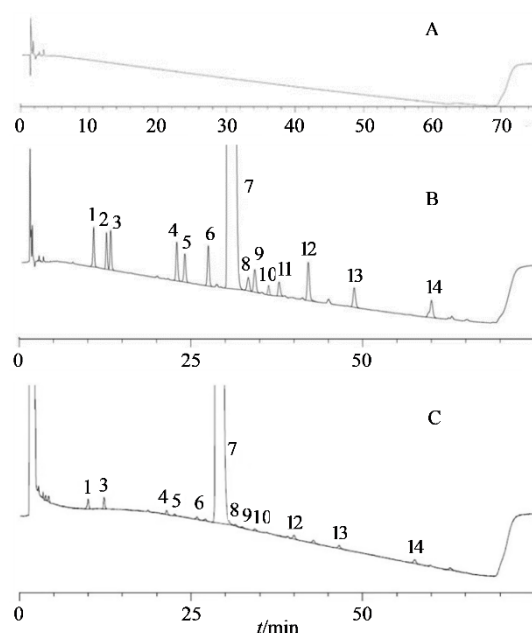
2.3 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,精密量取空白溶液、系统适用性溶液及混合对照品溶液20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图。系统适用性溶液中,罗红霉素与相邻杂质间分离度、杂质与杂质间分离度均大于1.5;混合对照品溶液连续进样5针,各组分峰面积的RSD均小于5.0%。

2.4 专属性试验

2.4.1 选择性考察 在“2.1”项色谱条件下,精密量取空白溶剂、空白辅料溶液、各杂质定位溶液、供试品溶液、选择性溶液进行定位来确定所有潜在杂质。空白溶液、空白辅料均不干扰本品有关物质检测;选择性溶液中,罗红霉素与相邻杂质之间的最小分离度为3.0,杂质与杂质之间最小分离度为1.5。色谱图见图1。

2.4.2 强制降解试验 取罗红霉素分散片(批号200124)10片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于罗红霉素100 mg),置50 mL量瓶中,分别在不同条件下进行破坏试验:(1)碱破坏:加0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液2 mL,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h,取出后放至室温,加等量的0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和;(2)酸破坏:加0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液2 mL,室温放置5 min后,加等量的0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和;(3)氧化破坏:加3% H_2O_2 溶液2 mL,室温放



1-杂质A;2-杂质B;3-杂质C;4-杂质D;5-杂质E;6-杂质F;7-罗红霉素;8-杂质G;9-红霉素E衍生物;10-氮氧化物;11-杂质K;12-杂质H;13-杂质J;14-杂质I

1-impurity A; 2-impurity B; 3-impurities C; 4-impurities D; 5-impurity E; 6-impurity F; 7-roxithromycin; 8-impurities G; 9-erythromycin E derivatives; 10-nitrogen oxide; 11-impurity K; 12-impurity H; 13-impurities J; 14-impurities I

图1 空白溶液(A)、选择性溶液(B)、供试品溶液(C)色谱图
Fig. 1 Chromatograms of blank solution (A), selective solution (B), and test solution (C)

置2 h;(4)未破坏;(5)高温破坏:加稀释液适量(约40 mL),超声5 min,置于80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴5 h,取出后放至室温,用稀释液稀释至刻度,滤过,即得高温破坏溶液;(6)光照破坏:加稀释液适量(约40 mL),超声5 min使溶解,放至室温,用稀释液稀释至刻度,密封后光照(光照箱照度为日光5 000 Lx,紫外光90 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$,25 $^{\circ}\text{C}$)4 d,取出后放至室温,滤过,即得光照破坏溶液。上述(1)~(4)按“2.2.6”项供试品溶液制备方法同法操作,即得各破坏溶液,按照“2.1”项色谱条件进样,记录色谱图,见图2。

结果显示,本品自研制剂在光照条件下稳定;在氧化、酸、碱、高温破坏条件下均有不同程度的降解,在酸条件下主峰降解最为明显,杂质B、D显著增加;氧化条件下降解产生氮氧化物。破坏产生的降解杂质峰与罗红霉素色谱峰分离度均大于1.5,且物料平衡,表明本法专属性好,能有效检出本品所有降解杂质。

2.5 定量限(LOQ)、检测限(LOD)、线性关系考察及校正因子测定

精密称取罗红霉素对照品与已知杂质(杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、红霉素E衍生物、氮氧化

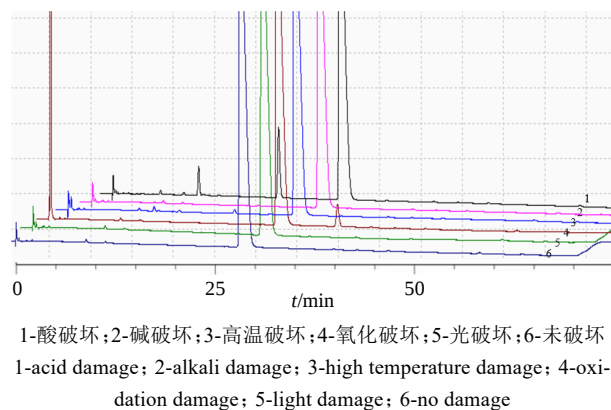


图2 不同破坏条件下自研制剂色谱图
Fig. 2 Chromatograms of self-developed agents under different damage conditions

物)对照品适量,配制成适宜浓度,再用稀释液逐级稀释成不同浓度的系列对照品混合溶液,在“2.1”项色谱条件下进样分析,以各组分峰面积对其实际浓度进行线性回归,同时以 $S/N \geq 10$ 作为 LOQ,以 $S/N \geq 3$ 为 LOD,并以线性方程斜率(K)计算校正因子($K_{\text{罗红霉素}}/K_{\text{杂质}}$)。结果见表3。

结果表明,杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、红霉素E衍生物及氮氧化物分别在LOQ(相当于供试品浓度0.05%)~20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于供试品浓度1%),罗红霉素在LOQ(相当于供试品浓度0.05%)~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于供试品浓度5%)范围内,相关系数均在0.999 5~1.000 0,线性关系均良好。

2.6 重复性试验

按照“2.2.6”项下方法平行制备6份供试品溶液,依法测定,记录色谱图,以加校正因子的主成分自身对照法计算。测得6份供试品中,均检出10个已知杂质(杂质A、C、D、E、F、G、红霉素E衍生物、H、J、I),6个未知杂质(RRT0.13/0.15/0.95/1.20/1.50/2.19),杂质个数一致,其中各单杂含量RSD最大为2.57%,总杂含量RSD为1.24%。表明重复性良好。

2.7 回收率试验

分别精密称取罗红霉素、杂质A~K及氮氧化物、红霉素E衍生物各适量,加稀释剂配制质量浓度各约10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的回收率对照品溶液。按“2.2.6”项方法制备供试品溶液共9份,每3份中分别加入0.5、1.0、1.5 mL回收率对照品溶液,配成相当于限度浓度50%、100%、150%的加样回收率溶液。精密量取上述溶液各20 μL ,进样测定,记录色谱图。结果用加校正因子的主成分自身对照法计算,与外标法计算回收率结果基本一致,各杂质平均回收率均在90.0%~108.0%,9份回收率的RSD $\leq$ 2.29%。结果见表3。

2.8 溶液稳定性试验

取混合对照品溶液1份,另取“2.7”项下100%限度回收率溶液1份作为溶液稳定性考察用对照品溶液及供试品溶液。依据欧洲药典10.0版中控温条件,分别于8 $^{\circ}\text{C}$ 放置0、3、6、9、12、18、24、48 h,于拟定色谱条件的同一系统下进样测定,记录色谱

表3 有关物质方法验证结果

Table 3 Result of method verification for related substances

组分	线性回归方程	校正因子	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率试验	
					平均回收率/%	RSD/%
杂质A	$y=6\,199.814\,7x-3.864\,1$	1.30	0.999\,0	0.299\,7	103.0	1.78
杂质B	$y=8\,580.513\,8x-709.411\,7$	0.94	0.958\,7	0.287\,6	103.8	1.45
杂质C	$y=5\,967.432\,2x-945.221\,4$	1.35	0.982\,8	0.294\,8	102.2	1.91
杂质D	$y=8\,247.056\,0x+23.216\,0$	0.98	0.987\,8	0.296\,3	100.2	1.03
杂质E	$y=6\,886.718\,7x-950.493\,8$	1.17	1.008\,6	0.302\,6	101.0	1.39
杂质F	$y=7\,315.143\,7x-228.463\,0$	1.10	1.018\,6	0.305\,6	101.7	1.37
罗红霉素	$y=8\,043.689\,3x-263.019\,4$	1.00	0.968\,9	0.290\,7	—	—
杂质G	$y=5\,475.245\,1x-1\,538.291\,9$	1.47	0.968\,2	0.290\,5	96.0	2.29
红霉素E衍生物	$y=6\,419.248\,6x-1\,192.247\,6$	1.25	1.014\,0	0.304\,2	99.1	1.49
氮氧化物	$y=7\,516.800\,1x-1\,695.008\,6$	1.07	0.949\,6	0.284\,9	98.5	2.11
杂质K	$y=7\,267.322\,0x-1\,001.235\,0$	1.11	1.006\,2	0.301\,9	100.7	2.07
杂质H	$y=6\,535.776\,6x-486.670\,1$	1.23	0.963\,3	0.289\,0	99.3	0.83
杂质J	$y=6\,449.406\,1x-29.849\,9$	1.25	0.992\,9	0.297\,9	102.8	1.01
杂质I	$y=5\,105.442\,7x-1\,572.905\,1$	1.58	0.976\,3	0.292\,9	100.6	0.92

图。在8℃下放置48 h,混合对照品溶液中各杂质在各个时间点的峰面积与0 h峰面积的比值均在90.0%~110.0%,供试品溶液各时间点杂质数一致,各单杂含量RSD均 $\leq 0.05\%$,总杂含量RSD $\leq 0.25\%$,表明供试品溶液和混合对照品溶液在8℃下放置48 h内稳定。

2.9 耐用性考察

分别于不同波长、不同流动相配制参数、不同柱温以及不同仪器不同色谱柱的条件下,考察色谱系统的微小变化对系统适用性与供试品中有关物质测定结果不受影响的程度,同时考察各杂质校正因子的差异变化。结果在色谱条件发生微小变动下,分离度均大于1.5,供试品中各单杂含量均 $\leq 0.05\%$,总杂含量均 $\leq 0.25\%$,测得各杂质校正因子RSD均小于5.0%。结果表明方法耐用性良好。

2.10 样品检测

取本品自研制剂3批样品(批号200124、200125、200126),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶

液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,分别以外标法和加校正因子的主成分自身对照法计算各杂质含量。检测结果见表4。

结果表明,在拟定方法下,采用主成分自身对照法结果与外标法基本一致,佐证了所建立的校正因子的准确性。

2.11 有关物质一致性评价

2.11.1 原研与自研制剂样品检测 分别取自研制剂(批号200124、200125、200126)与原研制剂(批号7PE4A、7LA3A、4F23A)各3批样品,在拟定方法下进样检测。结果见表5。

结果表明,所建立的有关物质方法均适用于上述样品检测。本品自研制剂主要杂质为杂质C、H、I,原研制剂主要杂质为杂质G。由于国内外产品所用原料药厂家不同,故杂质水平存在一定差异,但自研制剂总杂小于原研制剂。因此,原料厂家应重视工艺中上述杂质的含量,通过提升原料质量而对制剂质量进行有效提高。

表4 罗红霉素分散片有关物质检测结果

Table 4 Detection results of related substances in roxithromycin dispersible tablets

批号	检测方法	杂质A/%	杂质B/%	杂质C/%	杂质D/%	杂质E/%	杂质F/%	杂质G/%	红霉素E衍生物/%	氮氧化物/%	杂质K/%	杂质H/%	杂质J/%	杂质I/%	总杂/%
200124	1	0.073	/	0.239	0.071	0.032	0.050	0.055	0.029	/	/	0.118	0.099	0.171	1.445
	2	0.075	/	0.239	0.071	0.032	0.050	0.055	0.030	/	/	0.118	0.099	0.170	1.448
200125	1	0.080	/	0.252	0.064	0.024	0.055	0.048	0.022	/	/	0.119	0.098	0.166	1.425
	2	0.079	/	0.253	0.065	0.025	0.055	0.048	0.023	/	/	0.119	0.098	0.168	1.429
200126	1	0.078	/	0.251	0.070	0.022	0.053	0.063	0.018	/	/	0.126	0.098	0.163	1.457
	2	0.080	/	0.252	0.071	0.023	0.053	0.063	0.019	/	/	0.127	0.098	0.162	1.458

1-加校正因子主成分自身对照法;2-外标法;/-未检出

1- principal component self-comparison method with correction factor; 2- external standard method; / - not checked out

表5 自研制剂与原研制剂有关物质检测结果

Table 5 Results of related substances in self-developed agent and original agent

样品	杂质A/%	杂质B/%	杂质C/%	杂质D/%	杂质E/%	杂质F/%	杂质G/%	红霉素E衍生物/%	氮氧化物/%	杂质K/%	杂质H/%	杂质J/%	杂质I/%	最大未知单杂/%	总杂/%
自研	0.077	/	0.247	0.068	0.026	0.053	0.055	0.023	/	/	0.121	0.098	0.167	0.023	1.406
原研	0.056	/	0.035	0.032	0.040	0.248	0.706	0.024	/	/	0.230	0.020	0.218	0.026	1.674

2.11.2 加速试验 取参比制剂(批号7LA3A)及自研制剂(批号200124),置于温度40℃、相对湿度75%条件下放置6个月,分别于1、2、3、6个月取样测定其有关物质含量,结果见表6。

结果表明,原研制剂与自研制剂在加速条件下均未检出杂质B、K及氮氧化物,在加速6个月过程中,二者杂质D均有增长趋势,其他杂质无明显

变化。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

本研究试验前期,参考原料测定结果及结构确证,原料中含有红霉素E衍生物约0.03%,同时经过破坏预实验,产生杂质经结构确证为氮氧化物。为更完全的监测罗红霉素分散片的质量,将这二者

表6 加速试验有关物质检测结果
Table 6 Accelerated test results for related substances

t/ 个月	样品	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	红霉素E 衍生物/%	氮氧 化物/%	杂质 K/%	杂质 H/%	杂质 J/%	杂质 I/%	最大未知 单杂/%	总 杂/%
0	原研	0.054	/	0.050	0.032	0.031	0.227	0.639	0.028	/	/	0.219	0.012	0.223	0.028	1.630
	自研	0.073	/	0.239	0.071	0.032	0.050	0.055	0.029	/	/	0.118	0.099	0.171	0.021	1.405
1	原研	0.058	/	0.051	0.041	0.033	0.229	0.643	0.028	/	/	0.224	0.017	0.226	0.029	1.638
	自研	0.078	/	0.241	0.084	0.033	0.057	0.052	0.023	/	/	0.104	0.105	0.169	0.018	1.470
2	原研	0.052	/	0.061	0.063	0.034	0.214	0.632	0.026	/	/	0.202	0.015	0.226	0.023	1.690
	自研	0.075	/	0.228	0.101	0.36	0.049	0.047	0.030	/	/	0.112	0.115	0.180	0.017	1.509
3	原研	0.060	/	0.083	0.091	0.033	0.210	0.633	0.028	/	/	0.224	0.013	0.227	0.027	1.734
	自研	0.073	/	0.277	0.113	0.044	0.066	0.082	0.034	/	/	0.124	0.119	0.197	0.020	1.501
6	原研	0.070	/	0.050	0.129	0.033	0.224	0.699	0.031	/	/	0.217	0.010	0.220	0.026	1.883
	自研	0.062	/	0.287	0.168	0.031	0.075	0.063	0.034	/	/	0.128	0.137	0.186	0.021	1.544

纳入杂质研究。对比各国药典分析方法,发现各色谱条件下均不能将已知杂质很好的分离,其中中国药典方法检出杂质个数较少,欧洲药典方法柱温较低,色谱柱压力较大,易损伤色谱柱,且主峰与杂质G不能完全分离,易导致杂质判定的遗漏,影响杂质测定的准确性。通过不同色谱系统筛选,选用 $0.52\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐-乙腈体系,并分别考察不同品牌色谱柱(岛津 WondaCract C₁₈、YMC Hydrosphere C₁₈、菲罗门 Gemini C₁₈、Waters XBridge® C₁₈)柱温(15、20、25、30℃)、不同体积流量(0.8、0.9、1.0 mL·min⁻¹)、不同提取时间(样品溶液超声2、5、10 min)下杂质分离及测定情况。结果显示柱温越高,杂质间分离度越差,考虑色谱柱最佳使用条件,最终选择柱温20℃,体积流量0.9 mL·min⁻¹作为色谱条件;样品溶液超声时间5 min可将主成分与杂质提取完全。在此基础上,根据不同杂质的极性差异,对流动相A、B进行梯度程序的调整,最终缩短了梯度洗脱时间,使包括氮氧化物及红霉素E衍生物在内的所有已知杂质均达到更好、更快的分离。

3.2 校正因子研究结果及质量标准提升

依据国际人用药品注册技术协调会(ICH)关于化学药物质量标准中校正因子的指导原则,当校正因子在0.9~1.1,可无需校正,而通过本实验中对13个杂质研究结果来看,杂质B、D、F、氮氧化物、K可不予校正。通过耐用性试验,对各杂质校正因子进行充分考察,耐用性良好,同时样品检测中将结果与外标法对比,结果基本一致,故最终拟定罗红霉素分散片有关物质计算方法为加校正因子的主成分自身对照法,从而在对有关物质含量精确控制的

基础上,也避免了多种对照品杂质配制带来的高昂检测成本。最终根据方法验证结果,补充完善对罗红霉素分散片的各类杂质类型及限度要求,参照各制剂标准中较严格的限度,拟定本品各已知杂质不得超过0.50%,未知单杂不得超过0.20%,总杂不得超过2.5%。

3.3 杂质来源分析及一致性评价

通过对原研制剂及自研制剂同时进行强制降解试验,发现本品自研制剂及原研制剂在光照条件下均较稳定,未见明显的降解杂质;碱破坏、高温破坏条件下,杂质B、D略有增长;氧化条件下,降解产生氮氧化物杂质(自研制剂含量2.525%,原研制剂含量3.099%);酸破坏条件下,降解产生杂质B(自研制剂含量2.478%,原研制剂3.099%)、杂质D(自研制剂含量8.614%,原研制剂8.126%)。

根据破坏试验结果来看,本品自研制剂与原研制剂降解途径一致,主要降解途径为酸和氧化降解。结合杂质结构分析,杂质B为去糖产物,在酸碱或高温条件下由罗红霉素降解而成,杂质D为罗红霉素的反式异构体,在高温条件下发生构型翻转而得,氮氧化物是罗红霉素氧化反应产物,在强氧化条件下产生。结合稳定性试验中的加速试验结果,自研制剂与原研制剂均只有杂质D有明显增长趋势,其他杂质在制剂生产与储存中无明显变化。综合来看,对于新加入研究的杂质:氮氧化物为罗红霉素强氧化条件下产生的氧化产物,正常生产和存储条件下均未检出,红霉素E衍生物在为工艺杂质,稳定性期间基本不增。故企业应对原料的质量属性高度重视,同时在制剂工艺过程中应重视药用辅料的酸碱度降解杂质的影响,而在商业批生产检

验放行和货架期稳定性考察时可仅关注其降解杂质。

本研究通过优化色谱条件,选择分离度更好的测定方法对样品进行检测,在欧洲药典已知杂质基础上增加红霉素E衍生物和氮氧化物杂质进行同时监测,对13种杂质进行校正因子研究,并对该方法进行完整的方法验证。最终采用加校正因子的主成分自身对照法对罗红霉素分散片中有关物质进行测定,证明本品自研制剂与原研制剂具有有关物质一致性。该方法既省去对照品带来的检测负担,又解决了杂质与主成分响应因子不同带来的检测误差,具有专属性强、准确度高、灵敏度好的优势,可作为现行标准的补充,为罗红霉素分散片日后更准确、严格的质控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 智会静, 尤启冬. 第三代大环内酯类抗生素的结构改造及合成方法 [J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(7): 492-501, 535.
Zhi H J, You Q D. The research advancement and synthesis of ketolides [J]. Chin J Antibiot, 2011, 36(7): 492-501, 535.
- [2] 徐雅, 邱卓. 国产罗红霉素分散片治疗儿科细菌感染性疾病的临床观察 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(35): 181-182.
Xu Y, Qiu Z. Clinical observation of domestic roxithromycin dispersible tablets in treating pediatric bacterial infectious diseases [J]. Guid China Med, 2017, 15(35): 181-182.
- [3] 赵保玲, 王小艳, 王青梅, 等. 蒲地蓝消炎口服液联合罗红霉素治疗小儿急性化脓性扁桃体炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(10): 1981-1984.
Zhao B L, Wang X Y, Wang Q M, et al. Clinical study on Pudilan Xiaoyan Oral Liquid combined with roxithromycin in treatment of children with acute suppurative tonsillitis [J]. Drugs Clin, 2020, 35(10): 1981-1984.
- [4] 刘光宇. QbD在药物制剂工艺改进中的应用——影响罗红霉素分散片分散均匀性的关键因素研究 [D]. 北京: 北京大学, 2013.
Liu G Y. Applying QbD Design to dispersibility improvement of roxithromycin dispersible tablets through process optimization [D]. Beijing: Beijing University, 2013.
- [5] 操锋, 马玉楠. 化药原料药当前药学审评技术要求初探 [J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(3): 274-280.
Cao F, Ma Y N. Thoughts on current chemistry, manufacturing & control (CMC) technical review requirement of chemical active pharmaceutical ingredients [J]. J China Pharm Univ, 2014, 45(3): 274-280.
- [6] 周立春. 仿制药一致性评价中有关物质研究的思考 [J]. 药学进展, 2016, 40(12): 924-927.
Zhou L C. Reflections on the research of related substances in consistency evaluation for generic drugs [J]. Prog Pharm Sci, 2016, 40(12): 924-927.
- [7] 肖亨, 王晨, 姚尚辰, 等. HPLC校正因子法在药物分析中的应用 [J]. 药科学报, 2020, 55(12): 2854-2861.
Xiao T, Wang C, Yao S C, et al. Application of an HPLC correction factor method in pharmaceutical analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(12): 2854-2861.
- [8] 中国药典 [S]. 二部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020.
- [9] European Pharmacopoeia [S]. EP 9.4, 2016.
- [10] Japanese Pharmacopoeia (17th) [S]. 2016: 1534-1535.

【责任编辑 兰新新】