

HPLC法测定阿奇霉素颗粒中的基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯

孙 丽¹, 王 雪², 陈 锋², 孙志翀², 王 欣², 朱振涛², 曹思瑶², 赵龙山^{1*}

1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 长春雷允上药业有限公司, 吉林 长春 130000

摘要: 目的 建立阿奇霉素颗粒中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的高效液相色谱 (HPLC) 测定方法。方法 采用 Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以磷酸盐缓冲液 (2.2 g·L⁻¹ 无水磷酸氢二钾溶液, 用稀磷酸调节 pH 值至 8.9) 为流动相 A; 甲醇-乙腈 (25:75) 为流动相 B, 进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 225 nm, 柱温为 60 °C, 进样量为 50 μL。进行专属性、线性关系、定量限和检测限、精密度、重复性、回收率、稳定性、耐用性试验。结果 空白溶剂、空白辅料、混合溶液中邻近对甲苯磺酸乙酯的杂质 L 均不干扰对甲苯磺酸乙酯检测; 对甲苯磺酸乙酯质量浓度在 0.05~0.20 μg·mL⁻¹ ($R^2=0.9999$) 与峰面积呈良好线性关系; 检测限为 0.016 7 μg·mL⁻¹, 定量限为 0.050 0 μg·mL⁻¹; 平均回收率为 95.76%~96.48%, RSD 为 0.42%~1.53%; 精密度、重复性、稳定性、耐用性均符合要求。3 批样品中均未检出对甲苯磺酸乙酯。结论 建立的方法专属性强、灵敏度高、特异性强、准确度高, 可用于阿奇霉素颗粒中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的限度控制与检测。

关键词: 阿奇霉素颗粒; 对甲苯磺酸乙酯; 高效液相色谱; 基因毒性杂质; 质量控制

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 09-1843-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.020

Determination of genotoxic impurity isopropyl ethyl *p*-toluenesulfonate in Azithromycin Granules by HPLCSUN Li¹, WANG Xue², CHENG Feng², SUN Zhichong², WANG Xin², ZHU Zhentao², CAO Siyao², ZHAO Longshan¹

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Changchun Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130000, China

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of genotoxic impurity ethyl *p*-toluenesulfonate in azithromycin granules. **Methods** The separation was performed on Waters XBridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The mobile phase A was phosphate buffer (2.2 g·L⁻¹ anhydrous dipotassium hydrogen phosphate solution, adjusted to pH 8.9 with dilute phosphoric acid), and mobile phase B consisted of methanol-acetonitrile (25:75) and gradient elution was performed. The detection wavelength was set at 225 nm, the column temperature was 60 °C, and the injection volume was 50 μL. Specificity, linearity, limit of quantitation and detection, precision, repeatability, recovery, stability and durability tests are carried out. **Results** Blank solvent, blank excipient and impurity L nearest to ethyl *p*-toluenesulfonic acid in mixed solution do not interfere with ethyl *p*-toluenesulfonic acid detection. Good linear relationships between the concentration and the peak area of ethyl *p*-toluenesulfonate in the range of 0.05—0.20 μg·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9999$) was achieved. The limit of detection was 0.016 7 μg·mL⁻¹, and the limit of quantitation was 0.050 0 μg·mL⁻¹. The average recoveries were 95.76%—96.48%, RSD were 0.42%—1.53%. Precision, repeatability, stability and durability all meet the requirements. No genotoxic impurities ethyl *p*-toluenesulfonate was detected in three batches of samples. **Conclusion** This method has strong specificity, high sensitivity, high specificity and high accuracy, and can be used for the limit control and detection of ethyl *p*-toluenesulfonate, a genotoxic impurity in azithromycin granules.

Key words: Azithromycin Granules; *p*-toluenesulfonate; HPLC; genotoxic impurity; quality control

收稿日期: 2022-02-10

第一作者: 孙 丽(1975—),女,高级职称,研究方向为仿制药一致性评价。E-mail: 39850223@qq.com

*通信作者: 赵龙山(1982—),男,副教授。E-mail: longshanzhao@163.com

阿奇霉素颗粒为大环内酯类抗生素。经典药理实验研究表明,阿奇霉素能够抑制细菌、支原体和衣原体等病原微生物存活,具有良好的抗感染功效^[1]。阿奇霉素对临床上多种常见致病菌有抗菌作用,如金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌(A组 β 溶血性链球菌)、肺炎(链)球菌^[2]、溶血性链球菌(草绿色链球菌)和其他链球菌、白喉(棒状)杆菌。主要治疗化脓性链球菌引起的急性咽炎、急性扁桃体炎,敏感细菌引起的皮肤软组织感染,敏感细菌引起的鼻窦炎、中耳炎、急性支气管炎、沙眼衣原体及非多种耐药淋病奈瑟菌所致的尿道炎等^[3-4]。

红霉素经盐酸羟酸盐胺化,得到产物E-红霉素肟,与过量对甲苯磺酰氯发生贝克曼重排反应得产物红霉素A-6,9-亚胺醚,红霉素A-6,9-亚胺醚用铂-碳催化加氢还原,得产物9-脱氧-9 α -氮杂-9 α -高红霉素,该物质和甲酸、聚甲醛反应,最终制备得到阿奇霉素。由于阿奇霉素颗粒制备过程中需要使用乙醇配制包衣溶液,进行包衣工序,阿奇霉素原料生产工艺中使用到的对甲苯磺酰氯或其水解产生的对甲苯磺酸可能与乙醇发生酯化反应产生基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯^[5],形成途径见图1。制备工艺中未使用其他醇类化学物质,仅乙醇可能与对甲苯磺酸发生酯化反应。磺酸酯类化合物已被确认为药物中潜在的基因毒性杂质^[6],按阿奇霉素颗粒最大日剂量为500 mg,致突变杂质限度为1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 计算,对甲苯磺酸乙酯限度应不得超过 3×10^{-6} 。目前,对于阿奇霉素中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的质量控制研究甚少,这就增加了阿奇霉素的用药安全性风险,因此必须建立一种可行的检测方法,用于阿奇霉素中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的检测。本研究建立高效液相色谱(HPLC)法用于阿奇霉素中对甲苯磺酸乙酯的检测^[7],期为阿奇霉素的用药安全性评价提供新的参考。

1 仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国沃特世公司); Waters XBridge C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)色谱柱。

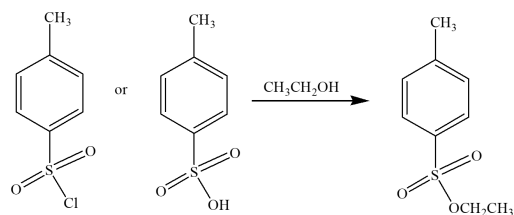


图1 对甲苯磺酸乙酯的形成

Fig. 1 Formation of *p*-toluenesulfonate

对甲苯磺酸乙酯对照品(质量分数99.7%,批号R19080287,上海韶远试剂有限公司);杂质L(质量分数92%,批号G0M507,美国药典委员会,邻近对甲苯磺酸乙酯的杂质,结构见图2);阿奇霉素颗粒(每袋0.1 g,批号Y181101、Y181201、Y181202,长春雷允上药业有限公司);空白辅料(长春雷允上药业有限公司,所有辅料与阿奇霉素Y181101相同);磷酸氢二钾(色谱纯,百灵威科技有限公司);磷酸(色谱纯,北京化工厂);甲醇(色谱纯,Merck);乙腈(色谱纯,Merck);磷酸二氢铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氨水(分析纯,天津福晨化学试剂有限公司)。

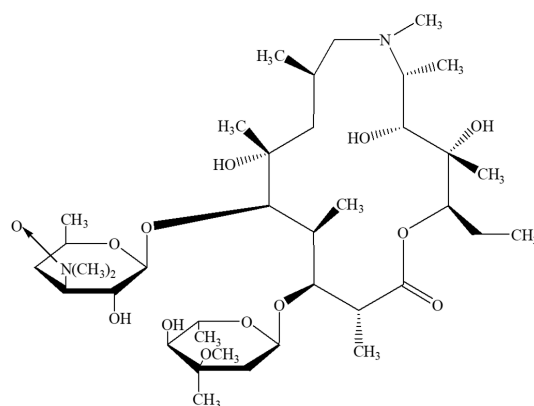


图2 杂质L结构

Fig. 2 Impurity L structure

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Waters XBridge C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);以磷酸盐缓冲液(2.2 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 的无水磷酸氢二钾溶液,用稀磷酸调节pH值至8.9)为流动相A,甲醇-乙腈(25:75)为流动相B,梯度洗脱(0~18 min, 60% A; 18~35 min, 60%~30% A; 35~50 min, 30% A),体积流量1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长225 nm;柱温60 $^{\circ}\text{C}$;进样量50 μL ,理论塔板数按对甲苯磺酸乙酯计算不低于5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶剂 首先配制磷酸二氢铵溶液,称取磷酸二氢铵1.73 g,加水溶解并稀释至1 000 mL,用氨水调节pH值至10.0。空白溶剂为磷酸二氢铵溶液-乙腈-甲醇(7:6:7)。

2.2.2 对照品溶液的制备 取对甲苯磺酸乙酯适量,精密称定,加空白溶剂溶解并定量稀释制成约含对甲苯磺酸乙酯0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.3 混合溶液的制备 分别取阿奇霉素杂质L、阿奇霉素原料药适量,置10 mL量瓶中,加空白溶剂

定量稀释制成约含阿奇霉素 $300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、杂质 L $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 取阿奇霉素颗粒适量,精密称定,加空白溶剂溶解并定量稀释制成含阿奇霉素约 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

2.2.5 空白辅料溶液的制备 取空白辅料约 2.7 g ,精密称定,置 20 mL 量瓶中,加空白溶剂 10 mL 振摇,摇匀,离心取上清,即得空白辅料溶液。

2.2.6 加样供试品溶液 取阿奇霉素颗粒适量,精密称定,加对照品溶液溶解,摇匀,制成含阿奇霉素约 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的加样供试品溶液。

2.3 计算公式

检出量($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $A_T \times W_S \times P \times M \times D_T / (A_S \times D_S \times W_T \times C)$
 A_T 为供试品溶液色谱图中对甲苯磺酸乙酯的峰面积; A_S 为对照品溶液色谱图中对甲苯磺酸乙酯的峰面积; D_T 为供试品溶液的稀释倍数; D_S 为对照品溶液的稀释倍数; $W_T(\text{mg})$ 为供试品的称样量; $W_S(\text{mg})$ 为对照品的称样量; $P(\%)$ 为对照品的质量分数; $M(\text{mg})$ 为供试品的平均装量; $C(\text{mg})$ 为供试品的标示量;限度不得超过 $3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.4 专属性试验

分别精密量取“2.2”项下空白溶剂、空白辅料溶液、混合溶液、对照品溶液、供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样检测。混合溶液中杂质 L 出峰时间为 26.798 min ,对照品溶液中对甲苯磺酸乙酯出峰时间为 11.946 min ,色谱峰图见图 3。测定结果表明,空白溶剂、空白辅料、混合溶液中杂质 L 均不干扰对甲苯磺酸乙酯检测。

2.5 线性关系考察

取对甲苯磺酸乙酯对照品适量,精密称定,分别制备质量浓度为 0.05 、 0.08 、 0.10 、 0.12 、 0.15 、 $0.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对甲苯磺酸乙酯线性溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图,以峰面积(Y)

对质量浓度(X)进行线性回归分析,得回归方程 $Y = 182\,578.345\,5 X - 58.651\,2$ ($R^2 = 0.999\,9$)。结果表明,对甲苯磺酸乙酯在 $0.05 \sim 0.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.6 定量限和检测限检测

精密量取“2.2”项下对照品溶液适量,加溶剂定量稀释制成对甲苯磺酸乙酯质量浓度为 $0.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为定量限溶液,将定量限溶液稀释 3 倍,作为检测限溶液。按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图。当信噪比(S/N)大于 10 时,定量限为 $0.050\,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,当 S/N 大于 3 时,检测限为 $0.016\,7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。灵敏度符合要求。

2.7 精密性试验

取“2.2”项下对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,连续进样 6 次。对甲苯磺酸乙酯色谱峰保留时间 RSD 值为 0.23% ,峰面积 RSD 值为 1.94% ,结果表明,该方法精密性良好。

2.8 重复性试验

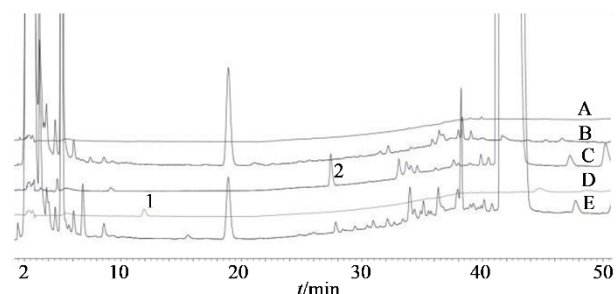
平行配制同批次 6 份加样供试品溶液,按外标法以峰面积计算对甲苯磺酸乙酯质量浓度的 RSD 值为 0.69% ,结果表明,测定方法的重复性良好。

2.9 回收率试验

以对甲苯磺酸乙酯对照品限度质量浓度为 $0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为 100% 水平,取阿奇霉素颗粒,分别制备低(50%)、中(100%)、高(150%)3 个质量浓度的加样供试品溶液,每个浓度 3 份,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图,按外标法以峰面积计算回收率。对甲苯磺酸乙酯在低、中、高浓度水平下平均回收率为 96.48% 、 95.76% 、 96.39% ,RSD 分别为 1.53% 、 0.42% 、 1.49% ,表明方法准确度良好。

2.10 溶液稳定性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液以及供试品溶液,于低温 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 和室温放置,在不同时间点($4 \text{ } ^\circ\text{C}$: 0 、 7 、 15 、 20 、 28 、 35 、 40 h ; 室温: 0 、 8 、 12 、 16 、 20 、 24 、 28 h) 取样,按“2.1”项下色谱条件进样检测。结果显示,供试品溶液和对照品溶液在室温条件下放置,对照品溶液各时间点的主峰面积相对于 0 h 的比值均在 $90\% \sim 110\%$,表明对照品溶液 28 h 内稳定;供试品溶液放置 28 h 内,对甲苯磺酸乙酯均未检出,表明供试品溶液 28 h 内稳定。供试品溶液和对照品溶液在低温 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 条件下放置,对照品溶液各时间点的主峰面积相对于 0 h 的比值均在 $90\% \sim 110\%$,表明对照品溶液 40 h 内稳定;供试品溶液放置 40 h 内,对甲苯磺酸乙酯均未检出,表明供试品



A-空白溶剂;B-空白辅料溶液;C-混合溶液;D-对照品溶液;E-供试品溶液;1-对甲苯磺酸乙酯;2-杂质 L

A-blank solvent; B-blank excipient solution; C-mixed solution; D-reference solution; E-sample solution; 1-p-toluenesulfonate; 2-impurity L

图 3 专属性试验的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of specificity test

溶液 40 h 内稳定。

2.11 耐用性试验

对色谱系统进行少量变动,以考察测定结果不受影响的承受程度。精密量取“2.2”项下空白溶剂、混合溶液、空白辅料溶液、对照品溶液、供试品溶液、加样供试品溶液适量,在不同色谱系统条件下进行检测,记录色谱图。实验条件及结果见表1,结果显示,在柱温 58~62 °C、体积流量 0.9~1.1 mL·min⁻¹、流动相缓冲盐溶液 pH 值 8.7~9.1、流动相缓冲盐质量浓度 2.0~2.4 g·L⁻¹、同一品牌不同批次色谱柱及同一品牌不同型号色谱柱条件下,空白溶剂及空白辅料均无干扰,供试品中均无对甲苯磺酸乙酯检出,加样供试品回收率均在 89.48%~98.43%,符合验证要求。

2.12 样品测定

取3批阿奇霉素颗粒,按“2.2.3”项下供试品溶液方法制备,按“2.1”项下色谱条件进样分析,检测

结果见图4,结果显示,3批样品均未检测出对甲苯磺酸乙酯。

3 讨论

液相色谱法具有分离效率高、选择性好、检测灵敏度高、操作自动化、应用范围广等特点,能够满足日常检测需求。因此选择使用液相色谱法仍是化学、生物化学与分子生物学、医药学、农业等学科领域与专业最为重要的分离分析技术,是用以解决各种实际分离分析课题必不可少的工具。

实验过程中发现流动相的 pH 值大小影响色谱峰的峰形,通过将缓冲盐的 pH 值由 8.2 调整为 8.9,调整流动相种类和比例,获得了较好的峰形和分离效果。

由于阿奇霉素颗粒中杂质 L 是离对甲苯磺酸乙酯最近的杂质,配制混合溶液,能够更好地区分二者。对甲苯磺酸乙酯作为阿奇霉素颗粒的工艺杂质,现阶段缺乏对其的质量控制研究。通过全波长扫描确定对甲苯磺酸乙酯的最适检测波长 225 nm,

表1 对甲苯磺酸乙酯耐用性试验结果

Table 1 Durability test results of *p*-toluenesulfonate

实验条件	峰归属	<i>t</i> /min	回收率/%	供试品检测浓度
“2.1”项下色谱条件	对甲苯磺酸乙酯	11.946	96.09	ND
	杂质 L	27.413		
	阿奇霉素	41.189		
柱温调整为 58 °C	对甲苯磺酸乙酯	12.449	89.48	ND
	杂质 L	26.621		
	阿奇霉素	40.925		
柱温调整为 62 °C	对甲苯磺酸乙酯	11.934	93.92	ND
	杂质 L	26.659		
	阿奇霉素	40.699		
体积流量调整为 0.9 mL·min ⁻¹	对甲苯磺酸乙酯	13.716	95.00	ND
	杂质 L	28.147		
	阿奇霉素	42.307		
体积流量调整为 1.1 mL·min ⁻¹	对甲苯磺酸乙酯	11.041	86.43	ND
	杂质 L	25.393		
	阿奇霉素	39.691		
缓冲盐浓度(2.0 g·L ⁻¹)	对甲苯磺酸乙酯	11.313	94.10	ND
	杂质 L	25.061		
	阿奇霉素	38.841		
缓冲盐浓度(2.4 g·L ⁻¹)	对甲苯磺酸乙酯	11.591	92.81	ND
	杂质 L	25.905		
	阿奇霉素	39.414		
缓冲盐 pH 值调整为 8.7	对甲苯磺酸乙酯	11.778	97.57	ND
	杂质 L	26.663		
	阿奇霉素	40.464		
缓冲盐 pH 值调整为 9.1	对甲苯磺酸乙酯	11.361	93.66	ND
	杂质 L	26.047		
	阿奇霉素	40.128		
同品牌不同批号色谱柱	对甲苯磺酸乙酯	11.704	97.02	ND
	杂质 L	26.654		
	阿奇霉素	40.860		
同品牌不同型号色谱柱	对甲苯磺酸乙酯	11.843	98.43	ND
	杂质 L	24.258		
	阿奇霉素	37.777		

ND-未检出

ND-not detected

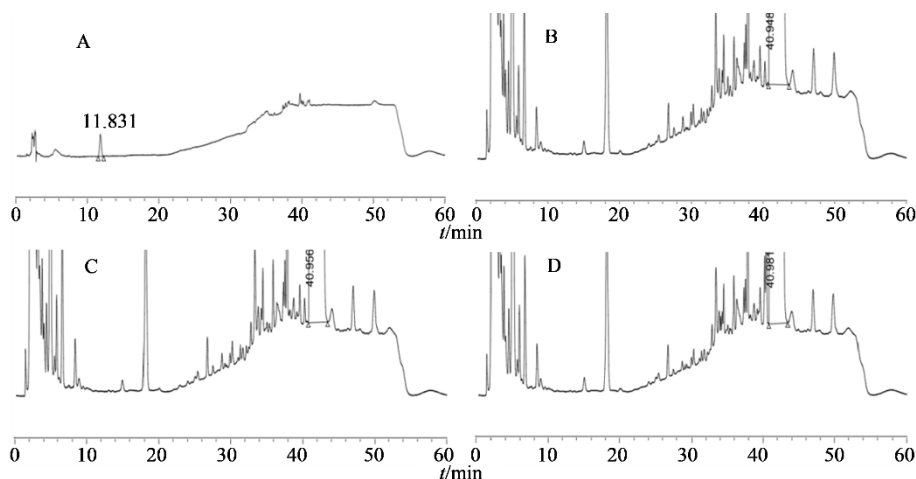


图4 对照品对甲苯磺酸乙酯(A)、样品 Y181101(B)、样品 Y181201(C)、样品 Y181202(D)检测色谱图

Fig. 4 Chromatogram of *p*-toluenesulfonate (A), sample Y181101 (B), sample Y181201 (C), and sample Y181202 (D)

选用 Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱能够获得较高的理论板数和较好的杂质分离效果,其他色谱峰均不干扰对甲苯磺酸乙酯的检测。参照《中国药典》2020年版^[8]阿奇霉素有关物质的检测方法,通过0~18 min时间段设计为等度洗脱,18 min后提高有机相比例,以此来缩短运行时间。

本研究建立阿奇霉素颗粒中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯含量的高效液相色谱法(HPLC)测定方法,此方法专属性强、灵敏度高,避免液质、气质等贵重仪器的使用,可行性高,为阿奇霉素颗粒中基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯的检测提供了新参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 唐超智,耿晓柯,张玉玲,等.阿奇霉素的免疫治疗机制[J].中国免疫学杂志,2021,37(14):1768-1771.
Tang C Z, Geng X K, Zhang Y L, et al. Immunotherapy mechanism of azithromycin [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(14): 1768-1771.
- [2] 罗玉君,温晓莹,倪晓良,等.喜炎平注射液联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎疗效及安全性的Meta分析[J].中国中药杂志,2018,43(10):2153-2161.
Luo Y J, Wen X Y, Ni X L, et al. Efficacy and safety of Xiyanping injection combined with azithromycin in treating *Mycoplasma pneumonia* of children: Meta-analysis [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(10): 2153-2161.
- [3] 姬峰,金华,韩智国,等.阿奇霉素与红霉素治疗小儿支原体肺炎87例临床分析[J].山东医药,2008,48(16):47-48.

Ji F, Jin H, Han Z G, et al. Clinical analysis of 87 cases of *Mycoplasma pneumonia* treated by azithromycin and erythromycin [J]. Shandong Med J, 2008, 48(16): 47-48.

- [4] 吴贤,徐明,黄卫东.阿奇霉素用于非淋菌性尿道炎的效果及不良反应分析[J].海峡药学,2020,32(12):202-203.
Wu X, Xu M, Huang W D. Effects and adverse reactions of azithromycin in non-gonococcal urethritis [J]. Strait Pharm J, 2020, 32(12): 202-203.
- [5] 谢卫锋,高玉珍.HPLC法检测托吡司特中的基因毒性杂质对甲苯磺酸异丙酯、对甲苯磺酸仲丁酯、对甲苯磺酸乙酯[J].药物分析杂志,2018,38(10):1788-1793.
Xie W F, Gao Y Z. Determination of genotoxic impurities isopropyl *p*-toluenesulfonate, sec-butyl *p*-toluenesulfonate and ethyl *p*-toluenesulfonate in topiroxostat by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1788-1793.
- [6] Jin B, Guo K J, Zhang T T, et al. Simultaneous determination of 15 sulfonate ester impurities in phentolamine mesylate, amlodipine besylate, and tosufloxacin tosylate by LC-APCI-MS/MS [J]. J Anal Methods Chem, 2019, 2019: 4059765.
- [7] 孙朴.HPLC法测定氢溴酸西酞普兰中的基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯[J].药学研究,2015,34(11):637-639.
Sun P. Determination of ethyl *p*-toluenesulfonate in citalopram hydrobromide by HPLC [J]. J Pharm Res, 2015, 34(11): 637-639.
- [8] 中国药典[S].一部.2020:689-690.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 689-690.

【责任编辑 兰新新】