

药物的杂质检查案例分析

药物的杂质检查是评价药物纯度的主要方面，特别是有关物质的检查，具有很强的针对性，其与药物的生产工艺、结构特性密切相关。通过一般杂质和特殊杂质检查的案例分析，熟悉如何根据合成工艺，药物的稳定性，选择适宜的检查方法、确立最佳测试条件和合理的限量指标。



案例一

药物中重金属检查方法和限度的确定

① 概述：

重金属属于一般杂质，广泛存在于自然界中，其为有毒杂质，在体内易积蓄中毒，因此，多数药物均要控制重金属限量。《中国药典》收载的品种中重金属限量多数控制在百万分之五至百万分之二十之间。限量制定是否合理，关系到能否真正控制样品中重金属量，可通过实验半定量方式进行确定。同时重金属可与某些环状结构的药物分子形成较牢固的价键，不易被检出，需采用炽灼破坏，使有机结合的重金属游离后，再依法检查。而一些药物难溶于水、稀酸，使直接重金属检查有一定难度。《中国药典》针对不同性质的药物，收载了三种测定方法，在建立药物中重金属限量检查方法时，首先应确定采用哪一种测定方法更适宜。

② 测定方法确定：

按照《中国药典》（2010年版）重金属测定第一法操作。根据标准铅溶液最适宜的取用量为1.0~2.0ml，精密吸取标准铅溶液（ $10\mu\text{g Pb}^{2+}/\text{ml}$ ）2ml，依法制备，作为标准液（甲管），另称取样品1.0g两份，一份作为样品，依法制备，作为供试液（乙管）；另一份加溶剂溶解后，再加同样量标准铅溶液（2ml），同法制备，作为监控溶液（丙管）。取甲、乙、丙三管，依法操作。比较丙管与甲管所显颜色深浅，当丙管颜色不浅于甲管时，说明药物分子对重金属检查没有干扰，可用硫代乙酰胺直接显色法（第一法）进行检查。再比较乙管与甲管，分析所取样品量与标准铅溶液取用量是否合适？若丙管所显颜色浅于甲管，表明药物分子对重金属测定有干扰，应按炽灼后的硫代乙酰胺法（第二法）进行检查。

③ 限量确定：

无论采用哪一种方法,在确定限量时应采用半定量方法,即取不同量标准铅溶液,如 1.0, 1.5, 2.0ml,同时取高、低浓度样品溶液,同法操作,比较系列标准液所显颜色梯度是否明显,高、低浓度样品液所显颜色落在系列标准颜色何处,由此可判断出样品中重金属的含量,并据此作出初步限度规定。

4 样品检验:

根据以上实验结果确定样品和标准液取用量,并对不同批号样品进行检查,每批样品做双份,检验上述确定的限量是否适宜,同时对样品中重金属检查是否符合规定作出判断。并按照中国药典格式撰写药物的重金属检查方法。

5 该案例说明的主要问题:

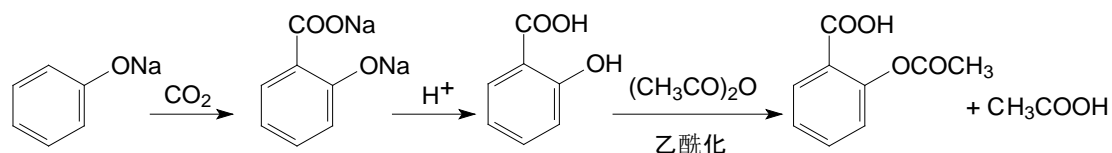
一般杂质检查方法的选择,采用半定量方法确定杂质的限量,杂质标准液取用量和样品取样量的确定。



案例二

根据阿司匹林的合成工艺和结构性质,设计特殊杂质检查项目和测定方法。

1 合成工艺路线:



2 可能的特殊杂质:

根据合成路线,可能存在的特殊杂质有水杨酸、苯酚以及反应副产物等,同时由于阿司匹林具有酯结构,在药物的贮藏或制剂过程中易引起水解,产生水杨酸。因此原料药和制剂中游离水杨酸是必须控制的特殊杂质,可利用水杨酸有游离酚羟基,阿司匹林无游离酚羟基,采用三氯化铁(硫酸铁铵)比色法进行控制;也可采用 HPLC 法检测。

3 限量检查方法:

(1) 比色法——游离水杨酸的检查

取本品 0.10g,加乙醇 1ml 溶解后,加冷水适量使成 50ml,立即加新制的稀硫酸铁铵溶

液 1ml, 摇匀; 30 秒钟内如显色, 与水杨酸对照液 (0.1mg/ml) 1ml 同法制得结果比较, 不得更深 (0.1%)。

药物中游离水杨酸含量未知时, 应取水杨酸系列对照液做标准曲线进行半定量, 以求得样品中游离水杨酸的含量范围, 然后根据实际样品质量, 参考药典限度要求, 确定本产品中游离水杨酸的限量。

比色法为 2005 年版《中国药典》方法, 其只能检查游离水杨酸的量, 不能控制其他有关物质的量。而且在样品溶解过程中, 易发生水解反应, 可能导致游离水杨酸含量偏高。2010 年版中国药典改用 HPLC 法检查。

(2) HPLC 法——游离水杨酸和有关物质的检查

①色谱条件初步选择: 取合成原料、中间体、粗品、成品适量, 分别用含 1% 冰醋酸的甲醇溶解, 配制成 0.1~1mg/ml 的溶液(注意: 阿司匹林易水解, 不能用含水流动相作溶剂)。以 ODS 柱为分析柱, 检测波长可考虑阿司匹林和水杨酸均有较大吸收的波长处, 待流动相条件基本确定后, 最根据检测灵敏度要求进行调整。首先考察流动相中有机相种类, 可从最常用的甲醇开始选择, 如有必要, 改用乙腈、四氢呋喃, 或几种有机溶剂合用。同时选择流动相中有机相比例, 对于极性较大的成分, 可从 50% 的有机相开始, 根据色谱峰的保留时间, 降低有机相比例或升高有机相比例。一般有机相比例宜从高到低进行选择, 这样样品出峰较快, 可以在较短时间内获得较合适的有机相比例。阿司匹林、水杨酸均具酸性, 流动相中宜添加 1%~5% 的冰醋酸(注意: 若用缓冲盐, 应添加到水相中, 并测定 pH 值, 常规 ODS 柱使用 pH 为 2~8)。取合成粗品, 注入高效液相色谱仪, 观察各成分峰形状、保留时间、分离情况, 调整流动相成分和比例, 使柱效、分离度达到一定要求, 保留时间适中。

②杂质归属与方法专属性考察: 取空白溶剂(配制样品溶液的溶剂)、合成原料、中间体、粗品、成品溶液, 在上述基本确定的色谱条件下进行分析, 比较色谱图, 确定样品溶剂峰、水杨酸峰、其它有关杂质峰, 必要时, 可将有关杂质添加到样品液中, 以确定杂质的归属, 同时将成品的色谱图与粗品色谱图进行比较, 分析最后纯化精制工序的效果, 如果杂质峰较大, 就有必要考虑合成工艺或精制方法的改进。在这步分析中应尽可能记录较长的层析时间, 以便确定合理的色谱图记录时间。

同时采用破坏试验, 以产生可能的降解产物, 考察方法的专属性。取成品, 加适宜浓度的酸、碱或过氧化氢溶液, 放置一定时间或加热一定时间(视样品稳定性而异), 或采用烘箱烘烤、日光照射等, 然后制成一定浓度溶液, 进样分析, 破坏程度以样品主峰分解 20% 以内为宜。观察产生的杂质峰是否完全分离, 并同时取破坏用空白试剂进样分析, 以排除干

扰。根据以上分析情况进一步调整流动相和检测波长，以达到最佳化。

③检测限和样品测定液浓度的确定：对不同浓度样品液进行测定，比较杂质峰个数，确定合适的样品液浓度范围。并考察阿司匹林和水杨酸的检测灵敏度。分别取阿司匹林和水杨酸溶液，采取逐步稀释法，以信噪比等于 2~3 确定检测限。根据检测限和杂质的限量要求，进一步确定样品测定液浓度。

④限量检查方法的确定：水杨酸可采用外标法，其他有关杂质可采用主成分自身对照法。原料药中水杨酸限量为 0.1%，其它有关杂质总量一般可控制在 0.5%。

取阿司匹林成品，根据上述确定浓度配制供试品溶液（如 1~5mg/ml），取一定量供试品溶液，稀释 200 倍，作为自身对照液（如 5~25 μ g/ml）；另取水杨酸对照品适量，制成浓度相当于供试液 1/1000 倍的溶液（如 1~5 μ g/ml），作为水杨酸对照液；也可将自身对照液和水杨酸对照液配成混合对照溶液。取混合对照溶液注入液相色谱仪，调节仪器检测灵敏度，使对照液主成分峰高为满量程的 10%~20%，两峰分离度达到一定要求，再精密吸取对照液和供试品溶液分别注入液相色谱仪，记录色谱图至主成分峰保留时间的一定倍数（根据实际考察结果确定记录时间，一般至少为主成分峰保留时间的 2 倍）。

供试品溶液色谱图中如有与水杨酸峰保留时间一致的色谱峰，不得大于对照液中水杨酸峰面积（也可采用外标法计算水杨酸含量）；其它各杂质峰面积和不得大于对照液中阿司匹林峰面积（也可规定单个杂质峰面积不得大于对照液中阿司匹林峰面积的 1/2 等，以控制单个杂质量）。

注：以上阿司匹林色谱条件的选择和方法确定仅为举例，主要是介绍方法设计过程，并非真实测定条件。

4 该案例说明的主要问题：

特殊杂质检查方法的建立，包括：色谱条件（流动相、检测波长）的选择、杂质归属、方法学评价、限量确定等内容。