

国产利福平口服制剂质量评价

庞庆林 袁耀佐 张玫 钱文 侯玉荣 赵恂 范青峰

(江苏省食品药品检验所 南京 210008)

摘要 目的:采用法定检验方法与探索性研究方法相结合评价国产利福平口服制剂的质量现状及存在问题。方法:按照 2010 年度国家评价性抽验计划总体要求,采用现行标准对抽验样品进行法定检验;建立或完善了用于探索性研究的多个方法:采用添加原料识别辅料的方法,建立了口服制剂中利福平晶型判别的粉末 X-衍射法,对国内外胶囊所用原料进行测定;目测法观察胶囊内容物的颜色,考察其与晶型的关系;建立判定利福平胶囊制剂所用原料晶型的近红外定性模型;采用 HPLC-UV-ESI-IT-MSⁿ 联用技术,借助 MatLab 分析软件,对药典色谱条件下色谱图中主要色谱峰进行结构认定,并采用 SPSS 软件对上述数据进行统计分析;采用斑马鱼模型对比利福平及其部分有关物质对斑马鱼胚胎发育的毒性;分别采用常压干燥、减压干燥和卡氏法测定不同处方胶囊中的水分含量。结果:法定检验:检验 226 批利福平口服制剂,222 批合格,合格率为 98.2%,4 批不合格项目均为干燥失重;探索性研究:国内胶囊和片剂所用利福平原料均为 I 型,国外主要为 II 型,部分为 I 型;胶囊内容物所用原料为 I 型的呈鲜红色,II 型的呈暗红色,与粉末 X-衍射结果一致;从有关物质检出的类型、个数和检出量结果显示,国产利福平胶囊在杂质谱层面上均优于进口利福平胶囊;6 种利福霉素类化合物的斑马鱼胚胎致死作用由强及弱依次为:利福霉素 S-钠盐 > 利福霉素 SV > 3-甲酰利福霉素 SV > 酞式利福平 > 利福平 > N-氧化利福平,其毒性类型主要与其母环结构有关,毒性大小与其 3 位取代基结构相关;采用原料直接灌装的胶囊,3 种水分测定方法测得的数据无显著性差异,但辅料较多的胶囊,卡氏法测定结果明显高于干燥失重的结果。结论:目前国产利福平口服制剂的制剂工艺较为稳定,总体质量较好,胶囊杂质水平总体优于国外产品;个别企业也存在违规现象,需加强自我约束;现行利福平口服制剂质量标准存在缺陷,有待完善。

关键词: 利福平胶囊; 利福平片; 评价性抽验; 质量评价; 晶型; X-衍射; LC-MS; Matlab 分析软件; Spss 软件; 斑马鱼模型
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)10-1862-06

Assessment the quality of domestic rifampicin for oral preparation

PANG Qing-lin, YUAN Yao-zuo, ZHANG Mei, QIAN Wen,
HOU Yu-rong, ZHAO Xun, FAN Qing-feng

(Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract Objective: To evaluate the quality status of domestic rifampicin for oral preparation and existing problems. **Methods:** According to the general requirements of national assessment programs in 2010, use statutory testing methods to examine samples; Establish or improve some methods for the exploratory research: (1) Recognition by adding raw materials used to establish a method for the identification of rifampicin crystalline in oral dosage by powder X-diffraction. Determined the raw materials used for foreign and domestic capsules; capsule contents were observed by visual color to find the contact with rifampicin crystalline; Established the model to identify rifampicin crystal rapidly by near-infrared; (2) Using HPLC-UV-ESI-IT-MSⁿ technology and MatLab analysis software, to identified the structural of main peaks under the chromatographic conditions carried out in Chinese Pharmacopoeia 2010. These data were stated by using SPSS software; (3) Using zebrafish model to compare the toxicity of zebrafish embryos of rifampicin and related substances; (4) Using ambient drying, decompression drying and karl fischer titration to determine the moisture content of the capsules. **Results:** Using statutory testing methods, in 226 batch of samples, 224 batch of qualified (98.2%), 4 groups (1.8%) failed. Loss on drying as the main causes of fail-

第一作者 Tel: (025) - 86631609; E-mail: pangqinglin1980@hotmail.com

ure; Using the exploratory research: (1) Rifampicin raw materials used in domestic capsules are I type ,mainly foreign were II type ,part I type; domestic tablets was I type also. Capsule contents were observed by visual color ,I type was bright red ,II type was dark red; and the results is same of the results from powder X - diffraction; (2) Also referring to the relevant literature ,the structure and fragmentation pattern of rifampicin and related impurities were presumed which were based on mass spectrometry results; (3) Comparison the toxicity of zebrafish embryos of rifampicin and related substances showed that ,although rifamycins can cause abnormal embryonic development of the individual ,but its main role is for the early embryonic death. The order of the embryonic lethal action of six rifamycins is that: S - sodium salt of rifamycin > rifamycin SV > 3 - formyl rifamycin SV > quinone rifampicin > rifampicin > > N - oxidation of rifampicin. Its toxicity mainly related to the parent ring structure ,toxicity is related of the structure at C3 substituent; (4) Three methods for measurement of water showed no significant difference ,which using raw materials to fill the capsule directly ,but the results of karl fischer titration was significantly higher than the results of weight loss results which the accessories is more. **Conclusions:** At present the most products quality of domestic rifampicin for oral preparation can meet the current standards ,there are still in some problems in few enterprises ,such as Loss on drying exceeded ,weight uniform uneven and content assayed lowly and so on. Exploratory search suggests that existing standards is in deficiencies ,and need to improve standard immediately.

Key words: rifampicin capsules; rifampicin tablets; evaluative testing; quality evaluation; crystalform; X - diffraction; LC - MS; Matlab analysis software; SPSS software; zebrafish model

利福平于 1965 年由 Maggi^[1] 等首先以半合成法获得 ,国内 1972 年试制 ,并进行了工艺改进^[2] ,中国药典自 1985 年版起开始收载 ,英、美、日等国药典均有收载 ,中国药典主要收载胶囊剂、片剂等 ,国外主要药典只收载了胶囊剂。利福平为国家基本药物 ,主要用于肺结核和其他结核病 ,近年来 ,全球结核病发病率和患病率逐年上升 ,耐药结核病、尤其是耐多药结核病在人群中逐渐增多 ,因此 ,结核类药物的质量研究引起全世界的关注 ,为加快遏制和扭转结核病的蔓延 ,中国卫生部和比尔和梅林达·盖茨基金会与世卫组织协力合作 ,促成中国卫生部 - 盖茨基金会结核病防治项目 ,利福平原料质量标准的提高是其中的项目之一 ,国家食品药品监督管理局将抗结核的基本药物利福平口服制剂列入 2010 年度全国药品质量评价性抽验计划 ,本次抽样共完成 224 批利福平胶囊、1 批利福平片及 1 批利福平胶囊 (II) 样品的检验 ,采用统计学的方法对上述检验结果进行分析^[3-4] ,结合本品的特点 ,还建立或完善了多个探索性研究方法 ,现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪: Shimadzu 高效液相色谱仪 (Shimadzu 公司 ,日本 ,LC - 20AB 泵 ,SIL - 20ACHT 自动进样器 ,SPD - M20A 二极管阵列检测器 ,CTO - 20AC 柱温箱 ,Shimadzu LC solution 工作

站) 、D8 Advance X - ray Diffractometer (德国 Bruker) 、MPA 型近红外光谱仪 (1.2 m 光纤探头) 、OPUS5.5 软件 ((德国 Bruker) 、Agilent 1100 LC / MSD Trap 液质联用仪。

1.2 试剂 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、高氯酸钠、盐酸、氢氧化钠均为分析纯 ,由南京化学试剂有限公司提供; 柠檬酸为分析纯 ,由 SIGMA - ALORICH 提供 ,甲醇、乙腈均为色谱纯 ,由 Fisher Scientific 提供。

1.3 试药 利福平 (批号: 130496 - 200702 ,纯度: 98.0%) 、酞式利福平 (批号: 130413 - 200303) 、N - 氧化利福平 (批号: 130522 - 200301) 、3 - 甲酰利福霉素 SV (批号: 414 - 8702) 、利福霉素 SV (批号: 0333 - 200006 ,纯度: $832 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$) 、利福霉素 S (批号: 130539 - 200402 ,纯度: 94.8%) ,均来自中国药品生物制品检定所; 利福平胶囊 2010 年国家基本药物评价性抽样共抽样 224 批 ,涉及 30 家企业 ,规格均为 0.15 g; 利福平片抽样仅 1 批 ,规格为 0.15 g; 利福平胶囊 (II) 抽样仅 1 批 ,规格为 0.225 g; 国外利福平胶囊由中国药品生物制品检定所提供; 利福平原料来源于中国卫生部 - 盖茨基金会结核病防治项目 (一期) 。

2 实验方法

2.1 法定检验方法 参照中国药典 2005 年版二部 ,中国药典 2005 年版增补本进行法定检验。

2.2 探索性研究方法 参照中国药典 2010 年版、

USP33 版等^[5~9]开展探索性研究,对利福平口服制剂所用原料的晶型进行判定,分析推测利福平及相关杂质结构与毒性等。

3 法定检验结果与讨论

按中国药典 2005 年版二部及 2005 年版增补本进行检验 226 批样品,222 批符合规定(合格率为 98.2%)。法定检验结果主要发现部分厂家的干燥失重、装量差异和含量存在不合格或潜在的质量隐患。

3.1 干燥失重 224 批利福平胶囊中有 3 个企业 4 批样品不合格,不合格百分率为 1.8%。

3.2 装量差异 对 225 批胶囊的装量差异批间及批内的变异结果进行统计,RSD 在 0.37%~6.24% 之间,同时结合各自的生产工艺及含量测定结果,提示原料直接灌装胶囊的装量差异性相对较大,而辅料比例较大的则相对比较稳定,可能与其辅料量较多,灌装时流动性好有关。同时也有文献报导,如果个别批次药粉水分含量大或分装室温度偏高时,分装过程中极易粘冲,造成装量差异大,严重影响利福平胶囊装量的稳定性^[10]。综上所述,提示个别厂家利福平胶囊的生产工艺还有待进一步改进,以提高利福平质量的稳定性。

3.3 含量测定 含量的频数分布图呈正态分布,口服制剂总的平均含量为 97.05%,其中 151 批的样品含量在 95.0%~100.0% 之间,占 66.8%;173 批的样品含量在 95.0%~105.0% 之间,占 76.5%。有个别厂家存在低限投料的现象。

3.4 讨论 干燥失重、溶出度、有关物质、含量测定结果均显示大部分同一企业不同批次间的结果一致,说明企业内部质量稳定,而各生产厂家的样品测定结果具有显著性差异,说明各厂家在生产过程中所使用的工艺和条件不尽相同。

4 探索性研究结果与讨论

4.1 利福平口服制剂所用原料晶型的判定 利福平的晶型可分为 I 型、II 型、SV 型及无定型四种,主要取决于结晶溶剂;利福平的晶型与其理化特性和生物利用度关系密切,晶型不同也会导致颜色有所差异。现已证明,利福平的 I 型和 II 型晶型为有效晶型,其溶解速率基本一致,但 I 型晶体在人体的生物利用度优于 II 型晶体^[11~14]。

4.1.1 国内外利福平口服制剂用原料晶型的研究比较

对于口服胶囊剂,前期调研结果显示,国内主要生产企业均以 I 型原料制备利福平胶囊,但无实验数据支持,由于其质量标准中无晶型控制检查项目,为摸清国产利福平胶囊中利福平的晶型状况,需要建立合适的测定方法。

本次探索性研究参考相关文献^[15],根据不同晶型的利福平原料的粉末 X-射线衍射特征,归纳出各晶型的主要特征衍射峰,并采用原料添加法判断利福平制剂中辅料的方法,归属出制剂中辅料的主要特征衍射峰,建立了快速确定利福平制剂中利福平晶型的方法。对 35 个企业的 224 批国产利福平胶囊、1 批利福平片和中检所提供的 15 批国外利福平胶囊的粉末 X-射线衍射谱图的比较分析显示,国产胶囊制剂所用原料均为 I 型,国外制剂所用原料主要为 II 型,只有 1 批为 I 型。

4.1.2 胶囊内容物的颜色与所用原料晶型相关性研究 结合目测法观察不同晶型胶囊内容物的颜色,胶囊内容物颜色鲜红色为 I 晶型原料制得;胶囊内容物颜色暗红色为 II 晶型原料制得,X-射线衍射法测定结果与颜色测定高度相关。

4.1.3 利福平晶型近红外快速鉴别模型的建立

采用偏最小二乘-判别分析的方法(PLS-DA)利用 OPUS 软件的定量模型向导建立定性模型,经优化后采用如下参数:一阶导数预处理,平滑点数为 17,谱段选择 9746.8~7498.1 cm^{-1} 和 4601.5~4424 cm^{-1} 。进行交叉验证,发现 II 型最大预测值为 0.2, I 型最小预测值为 0.9。

本研究对判定利福平口服制剂所用原料晶型的方法进行系统的考察,扣除辅料峰的 X-衍射法和新建立的近红外光谱法均可准确判别利福平口服制剂所用原料的晶型,原料晶型与制剂内容物颜色之间也有明确的相关性,这些方法在仲裁、快检和质量标准的提高中均可发挥作用。检验数据显示:国产的利福平制剂均采用利福平原料 I 型晶体,其制剂中利福平仍保持为 I 型结晶,提示不仅国产利福平原料的结晶工艺较合理,其制剂工艺也较合理,在制剂过程和存储过程中利福平未发生转晶现象。

4.2 国内外利福平胶囊杂质谱的比较研究

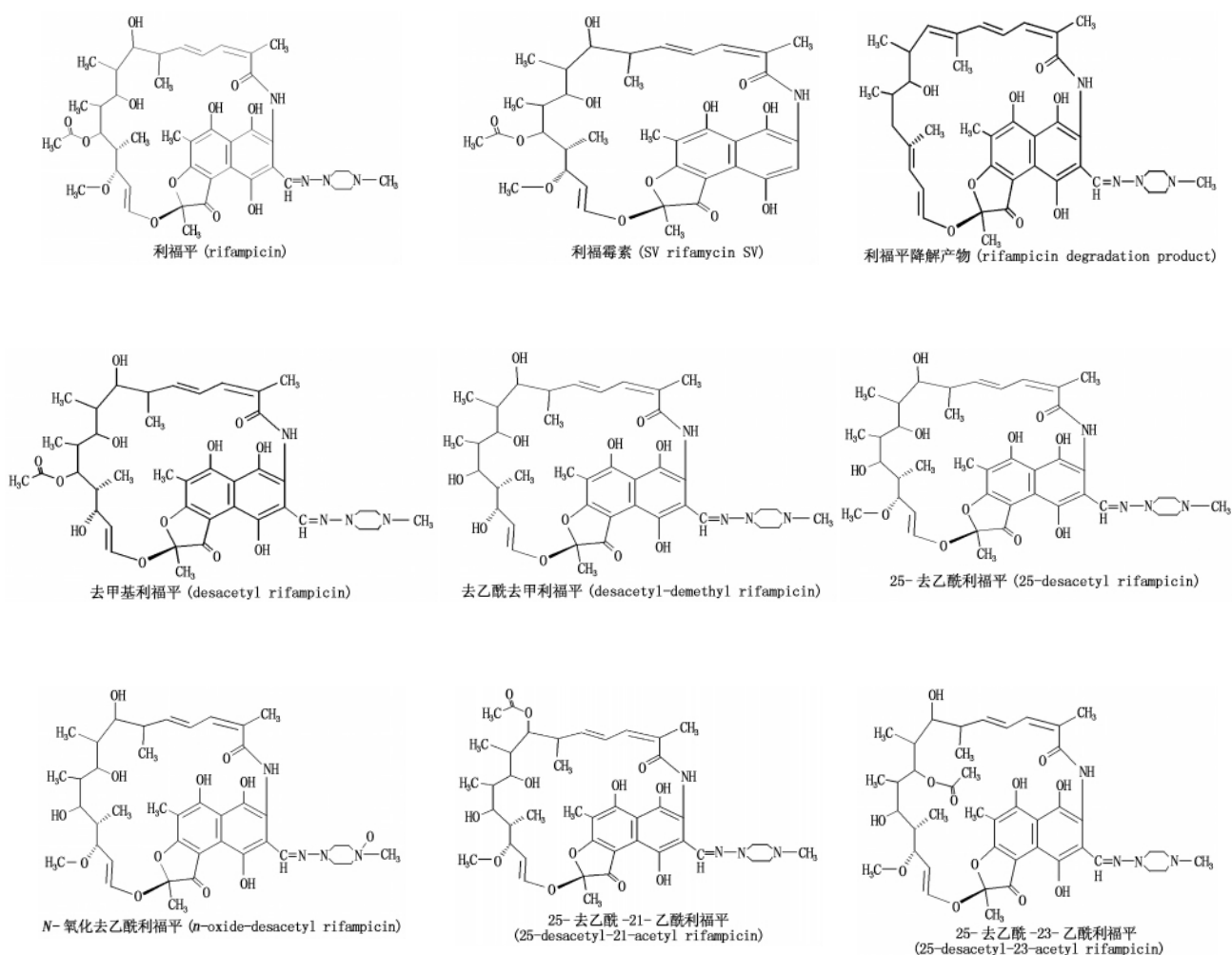
4.2.1 利福平胶囊杂质谱 LC-MSⁿ 方法的建立及杂质结构的推定

本次评价性研究过程中,建立了用于国内外利福平胶囊杂质谱的比较研究的 LC-PDA-ESI-

MSⁿ方法,对国内外胶囊中出现的主要杂质的结构进行了推定。结果显示:出现的主要杂质有:利福霉素 SV、利福平降解产物、去甲基利福平、去乙酰去甲基利福平、25-去乙酰利福平、N-氧化去乙酰利福

平、25-去乙酰-21-乙酰利福平、25-去乙酰-23-乙酰利福平等。限于篇幅,本文只在表 1 中将杂质可能的结构进行描述。推定过程另文发表。

表 1 利福平胶囊杂质结构
Tab 1 Impurity structure of rifampicin



4.2.2 质谱-光谱相关性研究

在药典方法的 HPLC-UV 色谱条件和建立的测定利福平的 HPLC-ESI-MSⁿ 条件中,各杂质的色谱峰相对利福平的保留时间有变化,根据在特定条件下同一物质的 UV 特征具有高度相似的原理,将 HPLC-UV-ESI-IT-MSⁿ 中采集得到各杂质的 UV 图谱,借助 MatLab 软件,与药典方法色谱条件下采集得到的各杂质进行匹配,利用色谱-光谱相关技术,实现对药典方法中检出杂质的结构推定。样品的相关拟和图见图 1。

图 1 中左色谱图为药典方法下的国产利福平胶

囊样品溶液的 UV 图,下方色谱图为 HPLC-ESI-IT-MSⁿ 法条件的国产利福平胶囊样品溶液的 UV 图,由图中可见,药典方法测定的 3 号色谱峰与 LC-MS 中的 a 号峰相关,4 号色谱峰与 LC-MS 中的峰 b 相关,5 号色谱峰与 LC-MS 中的峰 d 相关,7 号色谱峰与 LC-MS 中的峰 e 相关,两系统中利福平峰互为相关,而样品中 N-氧化利福平、3-甲酰利福霉素 SV、酰式利福平等杂质的量较小,所以相关性不明显。图中 a、b、c、d、e 经过 LC-MS 测定的一级、二级和三级质谱数据结果,参考利福平对照品和杂质对照品的裂解规律及相关文献推定结构,分

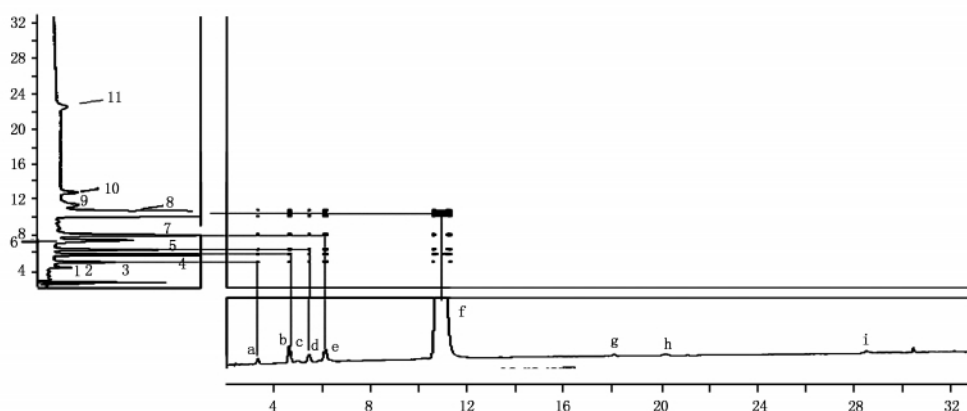


图1 光谱相关法识别药典条件下色谱图中有关物质示意图

Fig 1 Schematic diagram of related substances by spectroscopy correlation

6 μ . 酞式利福平(rifampicin quinine) 8, f. 利福平(rifampicin) 10 μ . *n*-氧化利福平(*n*-oxide rifampin) 11 μ . 3-甲酰基利福霉素 SV(3-formyl rifamycin sv)

别为: a 为去乙酰去甲基利福平; b 为去乙酰利福平; c 为 *N*-氧化利福平的同分异构体; d 为 *N*-氧化利福平的同分异构体; e 为去甲基利福平。

4.2.3 国内外胶囊中杂质谱的比较

在建立好的 HPLC-ESI-IT-MSⁿ 法下对国产利福平胶囊、国产利福平胶囊(Ⅱ)、进口利福平胶囊样品 LC-MS 测定,利用 LC-MSⁿ 鉴定有关物质结构的基本思路对各样品中存在的有关物质及类型进行分析和结构推测,从有关物质检出的类型、个数和检出量来看,国产利福平胶囊均远远优于进口利福平胶囊。

同时利用中药指纹图谱相似度测定软件,分别拟合国内、外胶囊的杂质全谱图,定性分析结果显示,国内外胶囊的杂质全谱具有显著性差异,国内Ⅰ型胶囊的杂质个数为 11 个,国外Ⅱ型胶囊的杂质个数为 14 个,进一步对各个杂质的含量分布进行方差分析,结果显示:国产利福平胶囊各杂质含量相对较低,波动较小,质量相对稳定。

4.3 利福平与相关杂质的斑马鱼模型的毒性比较

利福平原料及制剂为七十年代上市品种,对利福平及其杂质的毒理性研究较少。本次探索性研究利用斑马鱼模式动物,检测利福平及其部分有关物质对斑马鱼胚胎发育的毒性(致畸性和致死性),并进行比较分析,结果显示:

①利福霉素类化合物虽可引起个别胚胎发育畸形,但其主要为胚胎早期致死作用。6 种利福霉素类化合物的胚胎致死作用由强及弱依次为:

利福霉素 *S*-钠盐($LD_{50} = 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > 利福霉素 SV ($LD_{50} = 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > 3-甲酰利福霉素 SV ($LD_{50} = 1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > 酞式利福平 ($LD_{50} = 1.9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > 利福平 ($LD_{50} = 2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > *N*-氧化利福平。其中 *N*-氧化利福平在 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时仍未检测到明显的胚胎毒性。

②化合物的致死率动态量效关系分析显示,其中五种化合物对胚胎发育的影响方式可能不同。推测大致分为三类:利福平为一类;酞式利福平、3-甲酰利福霉素 SV 和利福霉素 SV 为一类;利福霉素 *S*-钠盐为一类。

③利福类化合物的毒性主要与其母环结构有关,但其毒性大小与其 3 位取代基结构相关。

4.4 水分测定方法的比较研究

ChP2005、ChP2010、USP32 均采用干燥失重的方法控制利福平胶囊中水分,但不同药典具体的测定条件和限度要求不完全相同,BP2010、JP XV 对利福平胶囊中的水分含量未做规定。对利福平片中的水分均未做规定。干燥失重操作简便,但实验时间较长。考虑到利福平在甲醇溶解,化学结构中无与卡氏试剂中组分快速反应的基团,故实验中尝试采用卡氏水分测定方法测定利福平胶囊中水分的含量。

本次探索性研究分别采用常压干燥、减压干燥和卡氏法测定不同处方胶囊中的水分含量,结果显示,采用原料直接灌装的胶囊,3 种方法测定结果无显著性差异;但辅料较多的胶囊,卡氏法测

定结果明显高于失重法的结果,用卡氏法测定了215批样品,15批不合格,不合格率7%。除原有采用干燥失重法检出的不合格批次外,还有11批胶囊超过干燥失重规定的限度值,对这11批样品水分结果进行分析发现,均为3家企业产品,同时这三家产品装量差异的结果显示这3家企业利福平胶囊中均含有辅料,通过与原料的对比实验,提示辅料可能会影响水分测定的结果,其原因还有待进一步研究。

5 小结

本次评价性抽检采取了法定检验结合探索性研究这一新模式对利福平口服制剂从标准到质量的现状、质量影响因素各方面进行了较全面的分析和评价。由法定检验可知:目前绝大部分国产利福平口服制剂产品能符合现行标准要求,合格率达98.2%;少部分企业产品在装量差异、干燥失重、含量测定项目中仍存在可能导致产品不合格的问题,尤以干燥失重的问题较为突出。通过分析发现:产品的干燥失重与生产工艺的有效控制密切相关,而投料量和生产工艺的准确控制与否可影响产品的含量和装量差异。

同时,综合探索性研究结果,发现国内利福平口服制剂均为I型,各杂质含量相对较低,波动较小,质量相对稳定,各生产企业产品体外溶出过程基本相似,优于国外同类产品。

参考文献

- 1 Maggi N. Chemotherapy, 1966, 11: 283
- 2 Sichuan Industrial Institute of Antibiotics synthesis Room(四川抗菌素工业研究所合成室): Antibiotic II(《抗菌素》(二)), 1978.
- 3 HU Chang-qin(胡昌勤). Quality Assess for Antibiotics(抗生素质量评价). Bei jing(北京): China Meteorological Press(气象出版社), 2003. 14
- 4 ZHANG Dou-sheng(张斗胜), WANG Chen(王晨), LIU Wen(刘文), *et. al.* Sampling results and assessment the quality of domestic azithromycin for injection in 2009(2009年国产注射用阿奇霉素评价性抽检结果与质量评价). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(9): 1804
- 5 ChP(中国药典). 2010. Vol II(二部): 358
- 6 USP32 - NF27: 3501
- 7 BP2010: 1844
- 8 BP2010: 3063
- 9 J P(日本药局方). X V(十五版): 1064
- 10 XIU Yu-mei(修玉梅), FENG Yu-mei(冯玉梅). The influence factors on uniformity of content of rifampicin capsules(影响利福平胶囊装量差异的因素). *Heilongjiang Med J*(黑龙江医药) 2004, 17(2): 115
- 11 WU Xiao-hang(吴小杭). Relationship between the rifamycins polymorphic forms and the drug content in plasma(urine)(利福霉素类抗生素的晶型与血(尿)药浓度). *J Wenzhou Med Coll*(温州医学院学报) 2001, 31(4): 225
- 12 Shrutidevi Agrawal, Yasvanth A, Prasad VB, *et al.* Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci* 2004, 22(2-3): 127
- 13 Sichuan semi-synthetic antibiotics of antibiotic industrial research institute(四川抗菌素工业研究所半合成抗菌素研究室). Study on the polymorphism of rifampicin(甲哌力复霉素(利福平)多晶现象研究). *Pharm Ind*(医药工业), 1978, 12: 14
- 14 YANG Pei-ming(杨培明). Development of rifampicin crystalline(甲哌力复霉素型结晶的研制). *Antibiotic*(抗生素), 1979, 1: 18
- 15 LAN Jing(兰静), HU Chang-qin(胡昌勤). Determination of rifampicin crystalline forms in preparation(制剂中利福平晶型的确定). *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志) 2003, 4(06): 347

(本文于2011年3月14日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告