

国产注射用阿奇霉素杂质谱及其与成盐工艺相关性的考察*

张斗胜¹, 王悦雯², 李进¹, 李娅萍¹, 刘文¹, 杨亚莉¹, 胡昌勤^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要 目的: 考察国产不同成盐注射用阿奇霉素所含杂质谱情况, 并对其工艺进行相关性评价。方法: 以 217 批注射用阿奇霉素有关物质 HPLC 检验数据为基础, 采用数理统计与化学计量学方法, 对其杂质谱及与成盐工艺相关性进行考察, 并通过加速实验验证考察结果。结果: 所检样品中均检出阿奇霉素 B (EP-B) 和 3'-去克拉定糖阿奇霉素 (EP-J) 杂质, 且在不同厂家、不同成盐工艺产品中变化幅度较大, 统计标准偏差 (SD) 分别达 2.5 和 2.0; 其他杂质还检出阿奇霉素-N-氧化物 (EP-L)、氮红霉素 (EP-A)。结论: 目前国产注射用阿奇霉素中主要杂质为阿奇霉素-N-氧化物、3'-去克拉定糖阿奇霉素、氮红霉素和阿奇霉素 B; 氮红霉素和阿奇霉素 B 为工艺杂质, 分别源于合成反应残留和起始原料红霉素中红霉素 B 残留; 阿奇霉素-N-氧化物和 3'-去克拉定糖阿奇霉素分别为阿奇霉素氧化和酸降解物, 其中酸降解物为主要降解形式; 不同厂家注射用阿奇霉素中所含杂质的种类、数目及水平均存在较大差异, 且与其成盐工艺密切相关。

关键词: 注射剂; 阿奇霉素; 杂质谱; 成盐工艺; 相关性; 考察

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)08-1521-06

The investigation between impurity profile of domestic azithromycin for injection and correlation of its salifiable craft*

ZHANG Dou-sheng¹, WANG Yue-wen², LI Jin¹, LI Ya-ping¹,
LIU Wen¹, YANG Ya-li¹, HU Chang-qin^{1**}

(1. National institutes for food and drug control, Beijing 100050, China; 2. Tianjin institute for drug control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the impurity profile status of domestic azithromycin for injection by using different salifiable technologies and evaluate the correlation of its crafts. **Methods:** Based on 217 batches of impurity testing datas of azithromycin for injection by HPLC, investigate the impurity profile and correlation of its salifiable technologies according to mathematical statistics and chemometrics methods, and validate the investigate results by using acceleration experiment. **Results:** Azithromycin B (EP-B) and 3'-decladinosyl azithromycin (EP-J) had been detected in all the samples, and there are large rangeability among the different factories and salifiable technological samples, the SD was 2.5 and 2.0; other impurities exist in samples included azithromycin-N-oxides (EP-L) and azithromycin A (EP-A) yet. **Conclusion:** The main imurities of domestic azithromycin for injection in now were azithromycin-N-oxides (EP-L), 3'-decladinosyl azithromycin (EP-J), azithromycin A (EP-A) and azithromycin B (EP-B), azithromycin A and azithromycin B was craft impurities, derived from residues between synthetic reaction and erythromycin B in original material; azithromycin-N-oxides and 3'-decladinosylazithromycin were degradation products by oxidation and acidation, and acidation products was major degradative form. There are biggish distinction for species, amounts and levels of impurities of azithromycin for injection exsited in differ factories, it was closely correlation to their salifiable craft.

Key words: azithromycin; injection; impurity profile; salifiable craft; correlation; investigation

阿奇霉素 (azithromycin) 是红霉素 A 经酮基脂
化、贝克曼重排、N-甲基化等一系列反应得到的十

五元氮杂化合物, 这种结构修饰阻碍了内部形成半
酮缩醛, 使其与红霉素相比^[1, 2], 对酸稳定性更强,

* 国家科技支撑计划《药品注射剂检测技术体系研究》课题 (No: 2008BA155B04-2)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095308; E-mail: hucq@nicpbp.org.cn

因而成为临床重点应用的一类抗生素,注射用粉针剂作为一线药物,应用更为广泛。但因为阿奇霉素本身不溶于水,需要同酸反应成盐才能用于注射剂型,加之对酸、碱、热、氧化等因素较敏感等原因,使得该品种质量情况较其他类抗生素品种更为复杂。而要保证注射用粉针剂在临床使用安全,首先要保证药品的质量稳定、可靠。为此,本文针对目前国内已批准有盐酸盐、枸橼酸盐、马来酸盐、磷酸盐及门冬氨酸等 14 种不同酸根盐形式的注射用阿奇霉素剂型现状,特以 2009 年国评抽验计划中的 217 批注射用阿奇霉素有关物质 HPLC 检验数据为基础^[3],采用数理统计与化学计量学方法^[4],对注射用阿奇霉素中有关物质进行考察,特别是结合不同工艺考察其杂质谱的差异。初步考察及酸化成盐加速实验结果均显示:目前国产注射用阿奇霉素中主要杂质为阿奇霉素-N-氧化物、3'-去克拉定糖阿奇霉素、氮红霉素和阿奇霉素 B;氮红霉素和阿奇霉素 B 为工艺杂质,分别源于合成反应残留和起始原料红霉素中红霉素 B 残留;阿奇霉素-N-氧化物和 3'-去克拉定糖阿奇霉素为阿奇霉素氧化和酸降解物,其中酸降解物为主要降解形式;不同厂家注射用阿奇霉素中所含杂质的种类、数目及水平均存在较大差异,且与其成盐工艺如成盐剂种类、工艺水平以及原(辅)料质量等密切相关。

1 材料与试药

高效液相色谱仪:戴安 DINOXE - UltiMate3000 系统(包括:UltiMate3000 泵,UltiMate3000 可变波长检测器),Chromelimon 色谱工作站。

217 批注射用阿奇霉素样品均为由国家局市场

办 2009 年国评抽验品种;阿奇霉素-N-氧化物、3'-去克拉定糖阿奇霉素、氮红霉素杂质对照品由美国辉瑞制药有限公司提供;阿奇霉素原料由中国药品生物制品检定所提供。

乙腈为色谱纯,磷酸氢二钾和盐酸均为分析纯试剂,水为双蒸水。

2 实验方法与数据处理

参考中国药典 2010 年版二部阿奇霉素原料与口服制剂有关物质 HPLC 法^[5],色谱柱:资生堂 CAP-CELL PAK MG II 型包被硅胶 C₁₈ 柱(5 μm 4.6 mm × 250 mm),流动相:磷酸盐缓冲液(0.05 mol · L⁻¹磷酸氢二钾溶液,用 20% 磷酸溶液调 pH 至 8.2) - 乙腈(45:55) 柱温 40 °C;流速 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 210 nm,进样体积 50 μL,供试品浓度:2 mg · mL⁻¹。

所有数据均转为 AIA、ASCII 格式存储数据,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(国家药典会制)和 Matlab7.0 软件(Mathworks 公司制)处理、运算数据。

3 酸化成盐加速试验

取阿奇霉素原料适量,精密称定,加盐酸溶液 2 mL,再加流动相溶解稀释制成浓度为 2.0 mg · mL⁻¹的溶液,摇匀,室温放置 24 h 后,滤过,取续滤液 50 μL 进样,按本文方法测定。

4 结果与讨论

4.1 国产注射用阿奇霉素成盐工艺统计

对 2009 年国评抽验上报的 217 批注射用阿奇霉素成盐工艺进行统计分析,结果见图 1。

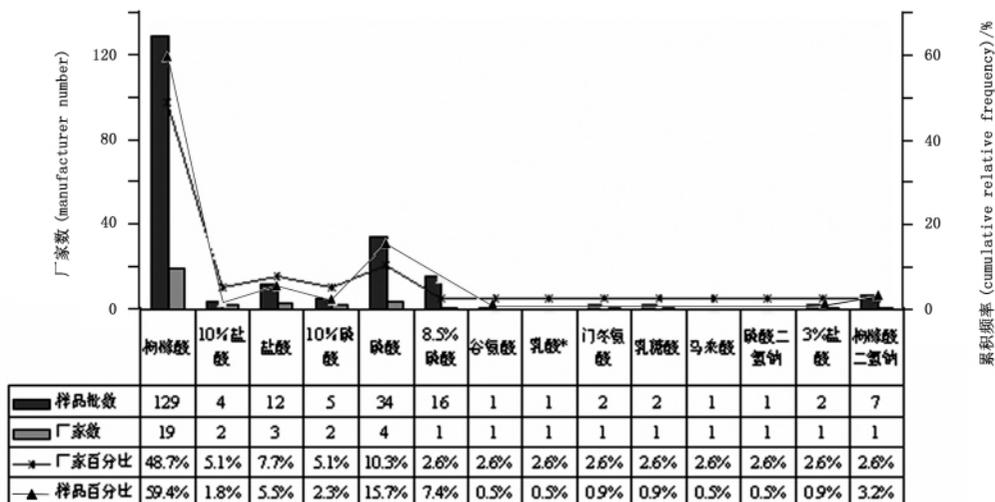


图 1 国产注射用阿奇霉素成盐工艺统计图

Fig 1 The statistical chart of salify technology of the domestic azithromycin for injection

图 1 显示: 采用枸橼酸、磷酸、盐酸成盐工艺占到全部 14 种成盐工艺前 3 位, 统计厂家分布数为: 19 家(48.7%)、7 家(18.0%)和 6 家(15.4%), 其余成盐工艺分布较平均, 各为 1 家(2.6%)。通过统计分析得到注射用阿奇霉素成盐工艺的总体情况, 即目前国产注射用阿奇霉素成盐形式多达 14 种, 酸的类型可从弱酸(弱酸根盐)变到强酸, 酸度跨度大, 其中以枸橼酸为主要成盐工艺, 其次为磷酸、盐酸以及其他类型酸或酸根盐为成盐剂。

4.2 杂质谱的考察

4.2.1 HPLC 数据的拟合

收集、整理 2009 年国评抽验 217 批注射用阿奇霉素杂质 HPLC 数据, 以 AIA 数字格式转出并存储, 输入中药色谱指纹图谱相似度评价软件(国家药典会制), 通过对所有批次数据进行拟合计算得到注射用阿奇霉素样品杂质全谱分析模拟图, 结果见图 2(模拟图中各峰按照相对于阿奇霉素峰的 RRT 顺序进行统一编号)。

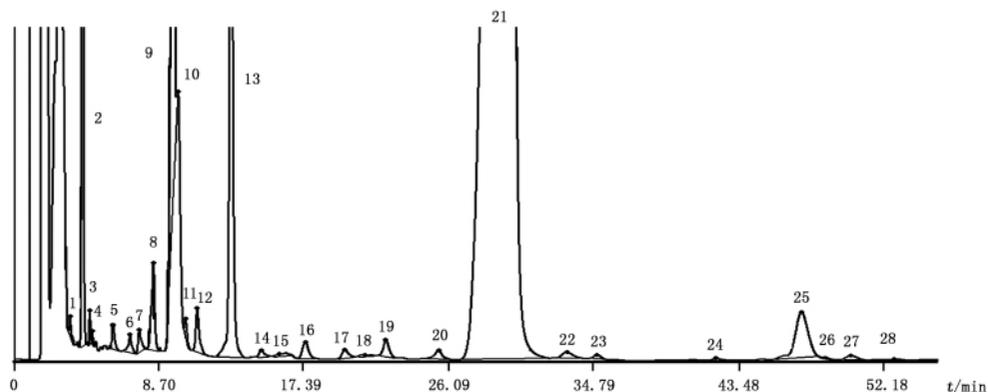


图 2 注射用阿奇霉素杂质谱分析模拟图

Fig 2 The stimulant analysis chart of impurity profile of azithromycin for injection

如图 2 所示: 217 批注射用阿奇霉素杂质数据经拟合分析得到了含 28 个谱峰的杂质全谱拟合色谱图, 其反映了国产注射用阿奇霉素杂质谱的总体概况, 即目前国内所有厂家、工艺的注射用阿奇霉素中可能存在的杂质最多为 27 个; 同时也为快速比较、分析不同成盐工艺产品中杂质的差异情况提供谱图参考。

4.2.2 HPLC 数据的统计与分析

对 217 批注射用阿奇霉素杂质 HPLC 数据, 采用峰面积归一化法计算各杂质含量, 并按图 2 中 28 个谱峰编号顺序, 以统计均值(%)、标准偏差(SD)为统计量, 进一步分析统计图 2 中各杂质在所检样品中的分布情况, 结果见图 3。

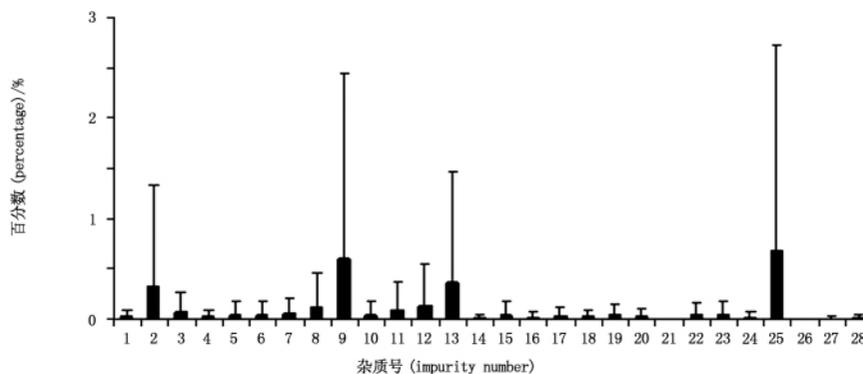


图 3 注射用阿奇霉素中杂质的分布

Fig 3 The distribution of impurities in azithromycin for injection

图 3 显示: 编号为 2[#]、3[#]、9[#]、13[#]、25[#] 杂质在所检 217 批样品的统计均值较大, 依次为: 25[#]、9[#]、13[#]、2[#]和 3[#], 且标准偏差(SD)也较大, 上述 5 杂质的 SD 均大于 2.0。上述结果表明: 2[#]、3[#]、9[#]、13[#]、25[#] 杂质是目前国产注射用阿奇霉素中存在的主要

杂质, 且在不同厂家产品中的分布有较大变化。

在已有研究中^[3], 通过采用如色谱保留时间对比、紫外光谱匹配、杂质对照品标准加入等系列定性分析方法以及相关文献, 已确知上图 3 中主要谱峰的归属, 详见表 1。

表1 图3中主要杂质归属列表

Tab 1 The attributive listing of main impurities in Fig 3

编号 (number)	保留时间 (retention time)	相对保留时间 (relative retention time) (29.107)	杂质名称 (impurities name)	产生来源 (origin of produce)
2	4.053	0.139	酸根(acid radical)	\
3	4.753	0.163	阿奇霉素-N-氧化物(azithromycin-N-oxides)	氧化降解产物(oxidative degradation products)
9	9.287	0.319	3'-去克拉定糖阿奇霉素 (3'-decladinosylazithromycin)	酸降解产物(acid degradation products)
13	13.053	0.448	氮红霉素(azithromycin A)	反应残留物(reaction residue)
21	29.107	1.000	阿奇霉素(azithromycin)	\
25	46.120	1.584	阿奇霉素(azithromycin B)	起始残留物(starting residue)

由表1可知:2[#],3[#],9[#],13[#],25[#]杂质分别为酸根、阿奇霉素-N-氧化物、3'-去克拉定糖阿奇霉素、氮红霉素和阿奇霉素B,除2[#]酸根外,其他4个杂质分别来源于氧化、酸解、反应残留及起始原料残留,21[#]为阿奇霉素。图中其他谱峰的归属研究还在进行中。

综合上述分析,可初步归纳出国产注射用阿奇霉素杂质谱的基本概况,即目前国产注射用阿奇霉素中可能存在的杂质可达27个,其中主要杂质包括:阿奇霉素-N-氧化物、3'-去克拉定糖阿奇霉

素、氮红霉素和阿奇霉素B,分别来源于氧化、酸解、反应残留及起始原料残留;且在不同厂家产品中的分布有较大差异。

4.3 杂质谱变化与其成盐工艺的相关性考察

进一步考察不同成盐工艺对杂质谱差异性的相关影响。

首先将217批注射用阿奇霉素杂质HPLC数据,以ASCII数字格式转出并存储,将其输入Matlab7.0软件(Mathworks公司制)进行三维模拟,得到注射用阿奇霉素杂质三维分布图,结果见图4。

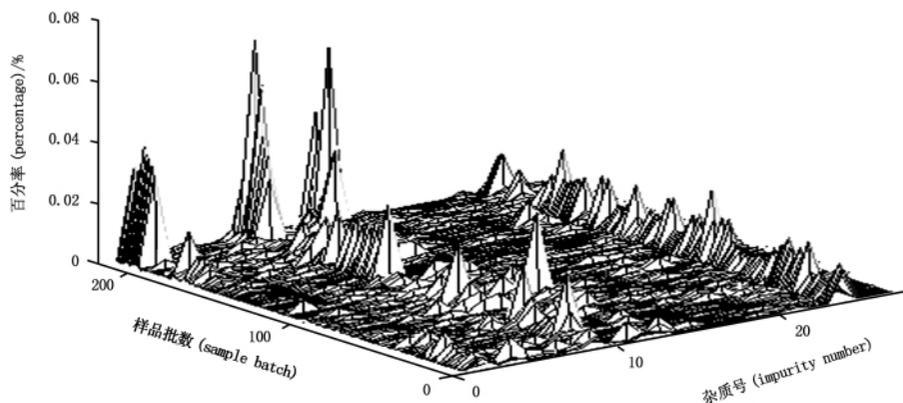


图4 注射用阿奇霉素杂质三维模拟分布图

Fig 4 The three-dimensional stimulant attributive chart of impurities in azithromycin for injection

三维模拟分布图(图4)直接显示出各杂质在不同厂家、不同成盐工艺样品中分布情况,也即显示出注射用阿奇霉素样品的杂质谱存在明显差异性,表现为不同成盐工艺样品中杂质的种类、数目及水平的差异变化,并显示其与成盐工艺存在相关性。

按成盐工艺分类,采用“4.2.2”项方法统计分析217批注射用阿奇霉素杂质HPLC数据,进一步探讨注射用阿奇霉素杂质谱差异性变化及其与成盐工艺相关性的规律,结果见图5。

由图5可知:随着成盐剂的酸性加强,制剂中含杂质数目也逐渐增多,枸橼酸等弱酸盐样品中含杂质数目小于盐酸等强酸盐样品的杂质数。3'-去克

拉定糖阿奇霉素(9[#])和阿奇霉素B(25[#])2杂质在全部样品中均检出,检出水平存在显著差异,其中阿奇霉素B(25[#])在所有样品中检出量较为接近,介于0.5%~1.0%之间,而3'-去克拉定糖阿奇霉素(9[#])在盐酸成盐产品中检出量最高,分别达2.5%以上,远高于枸橼酸等弱酸盐产品(除在乳酸盐产品检出量为0.9%外,其余弱酸成盐产品检出量均在0.2%~0.4%之间)。在枸橼酸、磷酸和盐酸等3种主要成盐工艺样品中还检出阿奇霉素-N-氧化物(3[#])和氮红霉素(13[#])杂质,检出水平的变化与阿奇霉素B情况相似,除乳酸盐产品中氮红霉素(13[#])检出量稍高为0.5%外,该2杂质在盐酸盐样品检出水平均高于其他酸根盐样品。此外,酸根

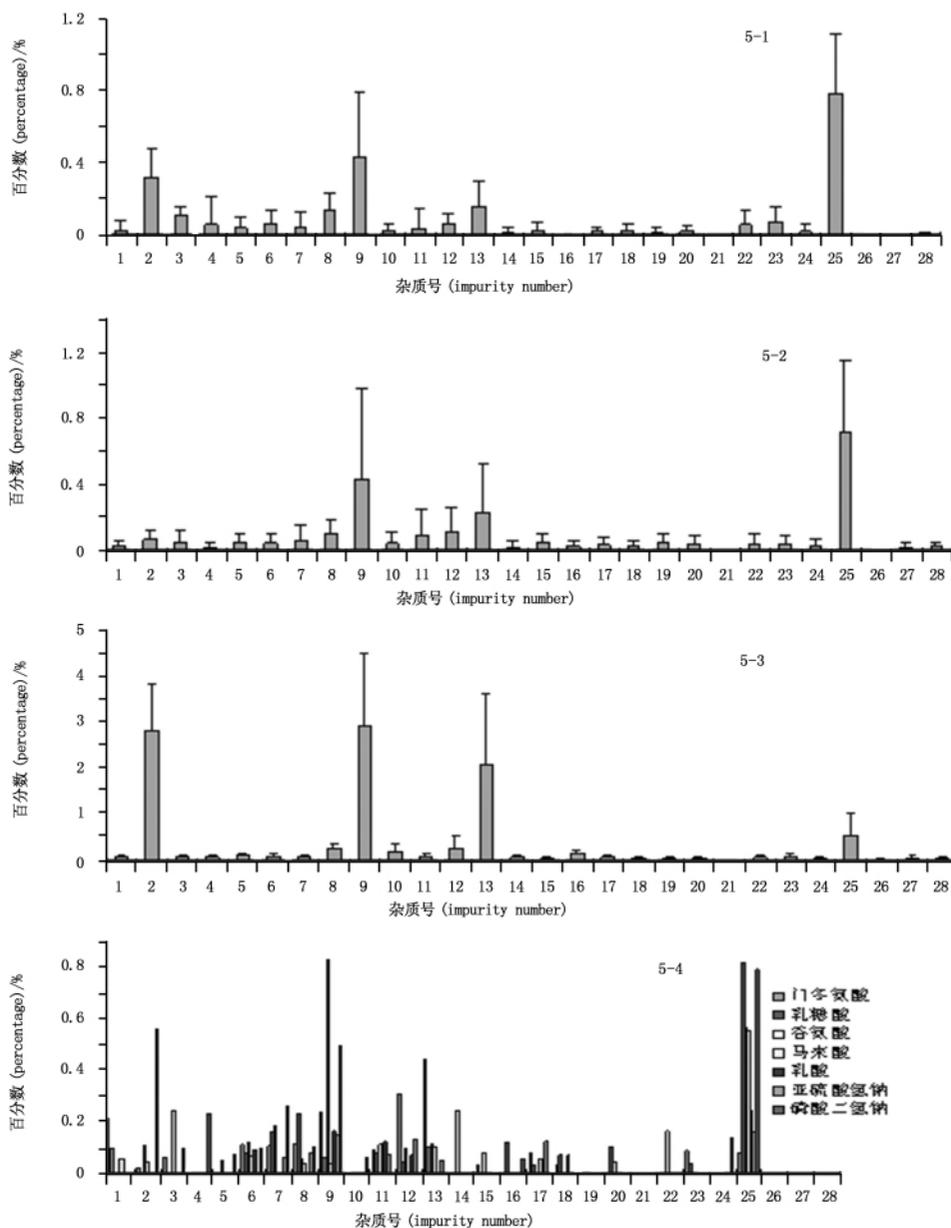


图5 不同成盐工艺的样品中杂质统计

Fig 5 The statistics of impurities in different salify technological samples

1. 磷酸(phosphoric acid) 2. 枸橼酸(citric acid) 3. 盐酸(hydrochloric acid) 4*. 其他酸根(other acid radical)

* 样品少于2批,无统计意义,只列出结果(only listed results for non-statistical values of samples not so many as two batches)

(2[#]) 检出量也较大,且在不同成盐工艺产品中的变化较大。提示今后标准执行中,除应加强对源于原料的杂质的控制外,还应加强对辅料中杂质的控制。

结合上述分析初步归纳出注射用阿奇霉素杂质谱差异性变化及其与成盐工艺相关性的一般规律。即以盐酸成盐样品中杂质数目、类型和水平最高,3'-去克拉定糖阿奇霉素为主要杂质,根据其来源于酸降解反应的分析,可确定盐酸盐产品酸稳定性差,易发生酸解产生3'-去克拉定糖阿奇霉素杂质。枸橼酸等弱成盐样品含杂质情况相对较好,其稳定

性也较好。阿奇霉素B和氮红霉素杂质属于工艺杂质,与成盐剂无关,但检出水平与生产工艺水平相关,其在不同厂家样品中变化较大。阿奇霉素B为起始原料红霉素中红霉素B残留,目前国内红霉素中的红霉素B含量通常小于5%,其含量主要和红霉素的发酵菌种有关,通常是红霉素中的最大杂质,故控制阿奇霉素中阿奇霉素B的含量应从红霉素原料的控制着手。氮红霉素是阿奇霉素合成反应残留物,故控制阿奇霉素中氮红霉素的含量应从优化生产工艺着手,避免反应不完全情况发生。

上述分析均表明不同成盐酸根、工艺水平以及原(辅)料质量等对杂质谱有明显影响,存在密切相关性,应引起充分的注意。

4.4 酸化成盐加速试验

2009年注射用阿奇霉素质量评价结果显示^[3]:盐酸成盐样品中单个最大杂质和总杂质质量均很高,分别达9.2%和17.8%,远超过5.0%的限度规定,

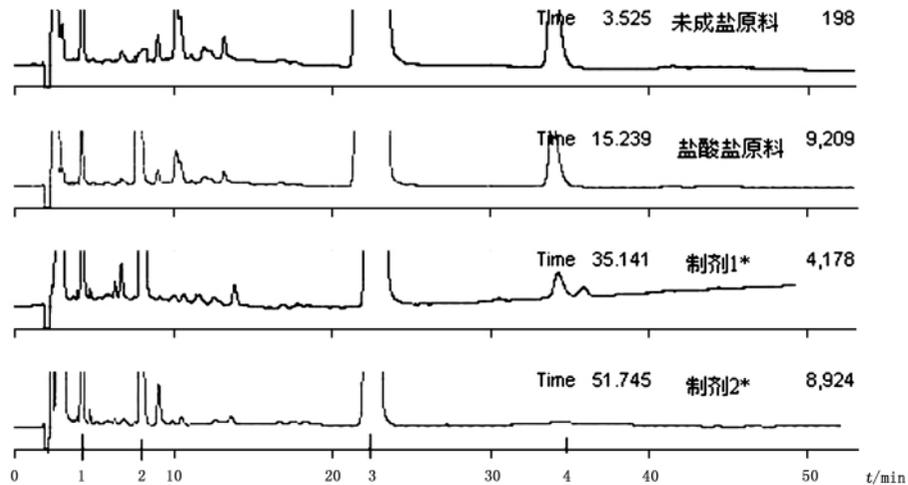


图6 盐酸阿奇霉素制剂过程的色谱图

Fig 6 The chromatogram of azithromycin hydrochloride in pharmaceutical procedures

1. 阿奇霉素 *N*-氧化物(azithromycin-*N*-oxides) 2. 3'-去克拉定糖阿奇霉素(3'-decladinosylazithromycin) 3. 阿奇霉素(azithromycin) 4. 阿奇霉素 B(azithromycin B)

* 同一厂家不同批次样品(the different batch samples in same factory)

如图6所示:阿奇霉素原料未加盐酸前,主要检出杂质有2个为:阿奇霉素 *N*-氧化物和阿奇霉素 B,且含阿奇霉素 B 的量较高;当加盐酸制成盐酸阿奇霉素后,检出杂质增加到3个,除上述2杂质外,还产生3'-去克拉定糖阿奇霉素杂质,且其含量明显增加;通过生产制成成品后,样品中含杂质情况与加酸成盐情况基本相同,但阿奇霉素 B 杂质呈减少趋势,且在同一厂家不同批次产品中检出量变化较大的,而其他2杂质质量基本未变。酸化成盐加速实验表明:阿奇霉素在用盐酸成盐过程中不稳定,易产生3'-去克拉定糖阿奇霉素;而阿奇霉素 B 是存在于起始原料中的杂质,与成盐剂无关,但工艺水平会影响其剔除程度。上述结果与杂质谱差异性、成盐工艺的相关性考察结果一致;而且也证实阿奇霉素原(辅)料及制剂工艺的优劣均可影响到终产品的质量。酸化成盐加速实验不仅验证了上述考察结果的准确性,也进一步提示盐酸等强酸不适宜用作注射用阿奇霉素的成盐剂。

5 小结

对不同厂家注射用阿奇霉素杂质谱以及其与成盐工艺相关性的考察与分析,进一步准确揭示出目前国产注射用阿奇霉素的真实质量状况以及影响质量的关键因素,即盐酸等强酸盐产品质量及稳定性较

表明目前盐酸成盐产品的质量存在较大问题。鉴于此,特选阿奇霉素原料,按3法进行酸化成盐加速实验,采用HPLC法^[3]分析成盐前阿奇霉素原料、成盐后原料及制成成品过程中的杂质变化情况,以进一步掌握产品中杂质变化与生产工艺间的关联性,并验证上述考察结果。HPLC-UV色谱比较见图6。

差,枸橼酸等弱酸盐产品质量及稳定性较好;成盐剂类型、工艺水平、原(辅)料质量与产品杂质谱密切相关,是影响产品质量的关键因素;其研究结果可为注射用阿奇霉素的标准与质量的提高,为更有效监管药品质量,降低临床用药风险提供有价值的参考。

参考文献

- GU Jue-fen(顾觉奋). Microbial Drug Chemistry and Analysis(微生物药品化学与分析). Beijing(北京): Military Medicine Science Press(军事医学科学出版社), 1996. 81
- ZOU Wen(邹文), ZHOU Wen(周文). New cognition of macrolides(对大环内酯类药物的新认识). *Qilu Pharm Aff(齐鲁药事)*, 2007, 6(8): 485
- 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): 1805
- HU Yu-zhu(胡育筑). Computational Pharmaceutical Analysis(计算药物分析). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2006. 6
- ChP(中国药典). 2010. Vol II(二部): 396
- HE Qi-ying(何琪莹), LÜ Wan-liang(吕万良), ZHANG Qiang(张强). Study on the selection of appropriate salt forming agents for azithromycin for injection(注射用阿奇霉素的成盐剂的研究). *Chin J Antibiot(中国抗生素杂志)*, 2005, 30(4): 207

(本文于2011年1月12日修改回)