

呋塞米及其注射液的杂质谱研究*

王小晶, 张晓明**, 柯静, 王文丽, 张小燕, 孙莺, 郭朝晖

(甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070)

摘要 **目的:**建立 HPLC 法研究呋塞米及其注射液的杂质谱,同时检测和分析来源于国内外多家企业的产品,评价该产品的杂质控制现状,以及注射液的主要降解杂质与处方、包装材料的相关性。**方法:**采用 YMC Hydrosphere C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱,以 0.05% 三氟乙酸溶液 (pH 2.23) - 甲醇 - 乙腈为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 238 nm 和 277 nm,柱温 30 °C。计算各杂质与呋塞米的相对保留时间 (RRT),已知杂质采用加校正因子 (*f*) 的主成分自身对照法计算,未知杂质为不加校正因子的主成分自身对照法。**结果:**建立了呋塞米及其注射液中 11 个已知杂质和 1 个潜在基因毒杂质的检测方法,各杂质分离度均符合要求,通过强制降解试验归属了各杂质来源。2~3 家企业注射液中降解杂质 C 和降解杂质 G 的检出量比 ICH 的鉴定限度大 0.2%,5 家企业注射液中潜在基因毒杂质糠醛的检出量远高于参比制剂。**结论:**建立的 HPLC 方法可用于呋塞米及其注射液中杂质的快速检测分析,国内只有 2 家企业生产的注射液杂质控制水平基本与参比制剂一致,其他企业需优化处方和包装材料,本研究可为提高呋塞米注射液的安全性和仿制药质量一致性评价研究提供参考。

关键词:呋塞米注射液;杂质归属;有关物质;高效液相色谱;参比制剂;一致性评价;潜在基因毒杂质

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024)08 - 1443 - 11

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0535

Impurity profile study of furosemide and its injection*

WANG Xiao - jing, ZHANG Xiao - ming**, KE Jing, WANG Wen - li,
ZHANG Xiao - yan, SUN Ying, GUO Zhao - hui

(Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of the impurity profile in furosemide and its injection. At the same time, applying this method to detect and analyze products from many domestic and foreign enterprises, to evaluate the status quo of impurity control in API and injection, and the correlation of major degraded impurities in injection with prescription and packaging materials. **Methods:** A YMC Hydrosphere C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) was used, and the mobile phase was 0.05% TFA solution (pH 2.23) - methanol - acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, gradient elution. Detection wavelength was set at 238 nm and 277 nm and column temperature was 30 °C. Impurity reference was used for localization and the relative retention time of each impurity was calculated. The known impurities were calculated using the principal component self - control method with correction factor, the unknown impurities were determined by principal component without

* 甘肃省药品监督管理局科研项目 (No. 2021GSMPA001); 甘肃省药品监督管理局科研项目 (No. 2023GSMPA071)

** 通信作者 Tel: (0931) 7822982; E - mail: 1171570522@qq.com

第一作者 Tel: (0931) 7822983; E - mail: 1175478872@qq.com

correction factor. **Results:** The method for the determination of 11 kinds of known impurities, the potential genotoxic impurity in furosemide, its injection was established, the separation degree of all impurities met the requirements, and the sources of the impurities were identified by forced degradation test. The detected quantity of degraded impurity C and degraded impurity G in the injections produced by 2 to 3 companies exceeded the identification limit in ICH by 0.2%, the amount of potential genotoxic impurity furfural detected in the injection of 5 enterprises was much higher than that of the reference preparation, other impurities were the same as the reference preparation. **Conclusion:** The established HPLC method can be used for rapid detection and analysis of impurities in furosemide and its injection. The impurity control level of injection produced by only 2 domestic enterprises is basically consistent with the reference preparation, others need to optimize prescription and packaging materials. This study can provide reference for improving the safety of furosemide injection and evaluating the quality consistency of generic drugs.

Keywords: furosemide injection; impurity attribution; related substances; HPLC; reference preparation; consistency evaluation; potential genotoxic impurities

呋塞米(结构式见图1)化学名为2-[(2-呋喃甲基)氨基]-5(磺酰基)-4-氯苯甲酸,别名呋喃苯胺酸^[1-4]。呋塞米注射液由原研企业 Sanofi Aventis Us LLC 于1968年在美国上市,商品名“Lasix”;国内由西安风华药业首先研发并上市。2020年1月,国家局发布呋塞米注射液参比制剂,2mL:20mg规格的注射液持证商为 Sanofi - Aventis GmbH 和 Sanofi - Aventis France,属于未进口原研药品。

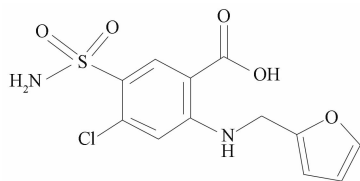


图1 呋塞米的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of furosemide

呋塞米及其注射液现均收载于2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》),其有关物质仅对未知单个杂质和总杂质进行控制,且采用不加校正因子的主成分自身对照法^[5],未控制已知杂质;BP 2022收载了杂质A、B、C、D、E、F 6个杂质的结构式,并对杂质C和杂质D进行了单独控制^[6]。呋塞米注射液稳定性欠佳^[7],光照、高温和氧化条件均可加速其降解,且光降解杂质糠醛含基因毒警示结构^[8],各国药典均未对其控制。目前,尚无文献报道对呋塞米及其注射液中杂质的系统研究。本研究结合购买到的12个杂质对照品和原料药破坏试验,建立HPLC梯度

洗脱分析方法,归属各杂质来源,并测定10家企业的原料药和注射液,探索杂质与产品的贮存环境、处方、包装材料的相关性,为提高呋塞米注射液的安全性和仿制药质量一致性评价研究提供参考。

1 仪器与试剂

日立 Chromaster 高效液相色谱仪,梅特勒 MS205DU 型十万分之一电子天平。

呋塞米对照品(批号100544-201102,中国食品药品检定研究院,含量99.7%);各杂质对照品信息见表1。

呋塞米(国内H企业(CPC-004-M180204),印度I企业(I0038304),呋塞米注射液(来自国内A(D42201051)、B(34220208)、C(2202261)、D(2203032)、E(72204161)、F(22022827)、G(2112021-1)等7家生产企业,规格2mL:20mg),呋塞米注射液参比制剂(LASIX公司,批号J0485),规格2mL:20mg)。

乙腈、甲醇为色谱纯,默克公司;三氟乙酸为分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;纯化水为自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用YMC Hydrosphere C₁₈(250mm×4.6mm, 3μm)色谱柱,以0.05%三氟乙酸溶液(pH为2.23)(A)-甲醇(B)-乙腈(C)为流动相,梯度洗脱程序见表2,检测波长238nm(杂质A~杂质K)和277nm(糠醛),柱温30℃,流速1.0mL·min⁻¹,进样体积20μL。

表 1 杂质对照品信息
Tab. 1 Impurity reference information

杂质名称 (impurity name)	结构式 (structural formula)	结构式名称 (structural name)	批号 (batch No.)	含量 (content)/%	来源 (source)
杂质 A(impurity A)		2-chloro-4-((furan-2-ylmethyl)amino)-5-sulfamoylbenzoic acid	2798-069A3	98.6	LGC
杂质 B(impurity B)		2,4-dichloro-5-sulfamoylbenzoic acid	2643-025A1	98.9	LGC
杂质 C(impurity C)		2-amino-4-chloro-5-sulfamoylbenzoic acid	2487-069A2	98.3	LGC
杂质 D(impurity D)		2,4-bis((furan-2-ylmethyl)amino)-5-sulfamoylbenzoic acid	3361-007A6	98.1	LGC
杂质 E(impurity E)		2,4-dichlorobenzoic acid	2015-005A1	99.4	LGC
杂质 F(impurity F)		4-chloro-5-sulfamoyl-2-(((2RS)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)amino)benzoic acid	3312-039A3	98.1	LGC
杂质 G(impurity G)		2,4-dichloro-5-sulfobenzoic acid	3132-098A4	91.8	LGC
杂质 H(impurity H)		5-carboxy-2,4-bis((furan-2-ylmethyl)amino)benzenesulfonate, sodium salt(1:1)	3204-059A9	92.8	LGC
杂质 I(impurity I)		2-chloro-4-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid	3924-011A5	98.5	LGC
杂质 J(impurity J)		4-chloro-2-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid	3901-020A3	98.6	LGC
杂质 K(impurity K)		2-((furan-2-ylmethyl)amino)-4-hydroxy-5-sulfamoylbenzoic acid	3799-047A3	96.8	LGC
糠醛(furfural)		furan-2-carbaldehyde	3398-033A1	100.0	LGC

注 (note): 以上对照品均带有标准物质证书和结构确证图谱(the above control includes the standard material certificate and the structure confirmation map)

表 2 流动相梯度洗脱程序
Tab. 2 The gradient elution program of mobile phase

时间 (time)/min	流动相比例 (rate of mobile phase)/%		
	A	B	C
0 ~ 11	92.0	2.0	6.0
11 ~ 22	58.5	10.5	31.0
22 ~ 24	56.0	21.5	22.5
24 ~ 32	48.0	21.0	31.0
32 ~ 40	45.0	27.0	28.0
40 ~ 45	30.0	25.0	45.0
45 ~ 48	15.0	35.0	50.0
48 ~ 55	8.0	35.0	57.0
55 ~ 65	92.0	2.0	6.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品咪塞米 10.26 mg 和糠醛 10.14 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液 I; 精密量取混合对照品储备液 I 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 乙腈溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液 I。再分别精密称取对照品咪塞米 10.69 mg、杂质 A 10.15 mg、杂质 B 10.43 mg、杂质 C 10.44 mg、杂质 D 10.05 mg、杂质 E 10.10 mg、杂质 F 10.32 mg、杂质 G 11.25 mg、杂质 H 10.18 mg、杂质 I 10.44 mg、杂质 J 10.66 mg 和杂质 K 10.45 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品

储备液 II;精密量取混合对照品储备液 II 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液 II。精密量取混合对照品储备液 I 和 II 各 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别取吠塞米原料和吠塞米注射液各适量,加 50% 乙腈溶液稀释制成每 1 mL 中含吠塞米 1 mg 的溶液,滤过,即得。

2.2.3 系统适用性溶液 取杂质 A 适量,置 50 mL 量瓶中,加入“2.2.2”项下供试品溶液 5 mL,加 50% 乙腈溶液制成每 1 mL 约含吠塞米和杂质 A 各 0.1 mg 的混合溶液。

2.2.4 对照溶液 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 空白辅料溶液 将辅料根据各企业的最大处方量按照“2.2.2”项供试品溶液的制备方法配制空白辅料溶液,滤过,即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性与专属性 分别取“2.2.1”项混合对照品溶液、“2.2.3”项系统适用性溶液和“2.2.5”项空白辅料溶液,按“2.1”项色谱条件测定,结果混合对照品溶液和系统适用性溶液中各色谱峰与相邻色谱峰在双波长下均可满足分离度要求,空白辅料溶液无干扰。

利用强制降解试验进一步验证该方法的专属性。取吠塞米原料(H企业,批号 CPC-004-1903014)6份,每份约 50 mg,分别置 50 mL 量瓶中,分别对 6 份样品进行不处理、加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 室温放置 6 h、加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL 室温放置 6 h、加 30% 过氧化氢溶液 2 mL 室温放置 6 h、加 50% 乙腈溶液 5 mL 水浴(60℃)加热 6 h 和加 50% 乙腈溶液 5 mL 紫外灯(254 nm)照射 6 h 等操作,酸碱破坏样品各加入 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液或 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 中和,各破坏样品加 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,按“2.1”项色谱条件分析测定,结果在不同破坏条件下,各降解产物之间均能达到良好分离,见图 2。

2.3.2 线性与校正因子 精密量取“2.2.1”项混合对照品储备液 I 和 II 各适量,分别置 10 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,即得含吠塞米和各杂质浓度约为 0.1~20 μg·mL⁻¹ 的线性溶液。按

“2.1”项色谱条件进样分析,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归得回归方程。以各杂质的保留时间与吠塞米主峰的保留时间之比计算相对保留时间(RRT),以吠塞米与各杂质标准曲线斜率之比计算相对校正因子(*f*),结果见表 3。

2.3.3 检测限与定量限 取“2.2.1”项混合对照品溶液 I 和 II,以 *S/N* 为 3 时的对照品浓度作为检测限,以 *S/N* 为 10 时的对照品浓度作为定量限,结果见表 3。

2.3.4 精密度和重复性试验 取“2.2.1”项混合对照品溶液 I 和 II,按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,测得吠塞米及其 12 个杂质保留时间的 RSD(*n* = 6)均为 0,峰面积 RSD(*n* = 6)均小于 1.0%,仪器精密度良好。

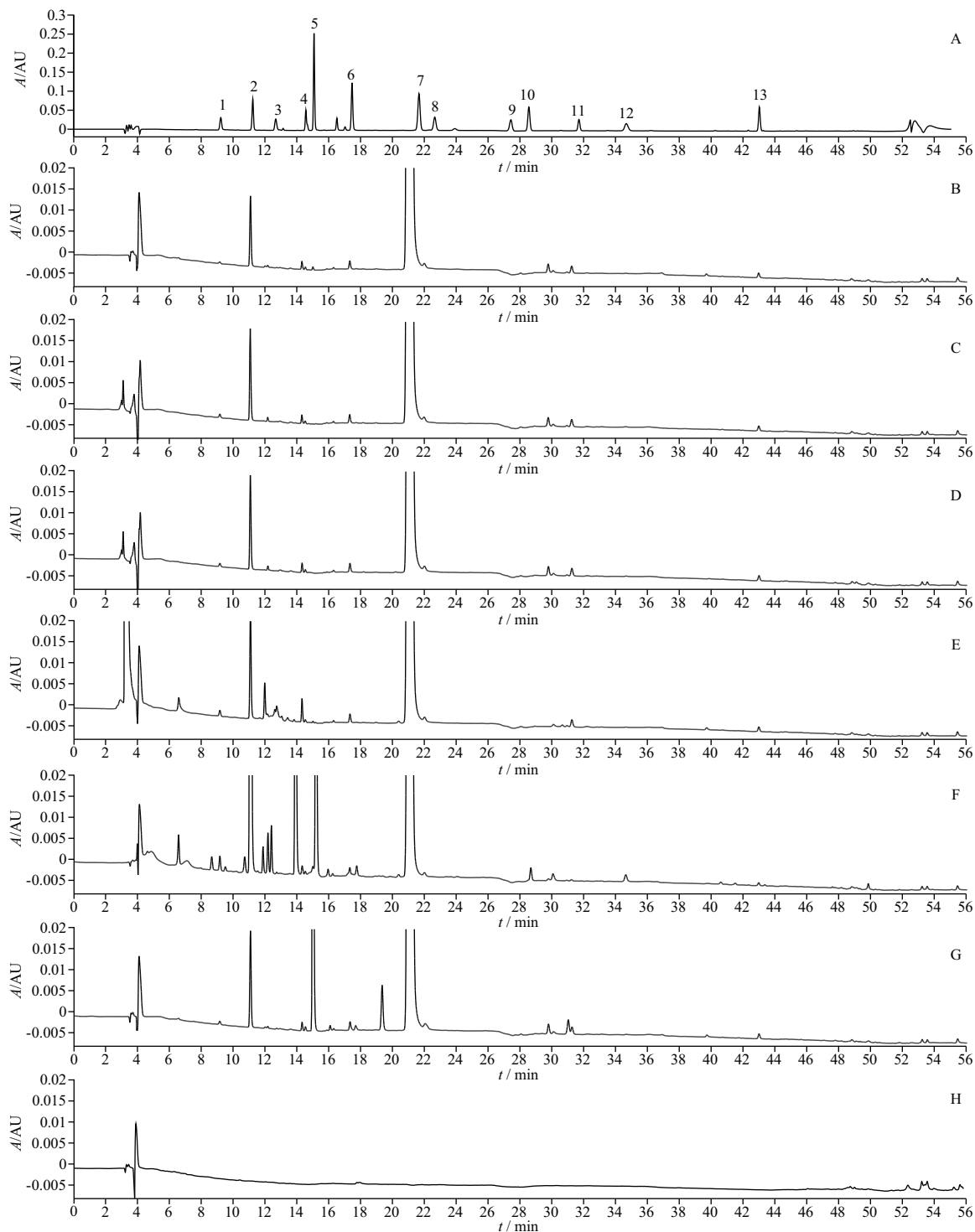
取吠塞米注射液(E企业,批号 72202161),按照“2.2.2”项供试品溶液的配制方法和“2.2.4”项对照溶液的配制方法分别平行配制供试品溶液和对照溶液各 6 份。照“2.1”项色谱条件进样,按加校正因子(如表 3 所示)的主成分自身对照法计算各杂质含量,结果杂质 C 含量分别为 0.24%、0.23%、0.24%、0.24%、0.23%、0.23%,RSD = 2.3%;杂质 B 含量均为 0.01%;杂质 F 含量均为 0.01%;杂质 A 含量均为 0.01%;杂质 D 含量均为 0.02%;糠醛含量均为 0.006%;各杂质总和分别为 0.30%、0.30%、0.30%、0.31%、0.30%、0.29%,RSD = 2.1%。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液,在样品温度为 10℃时,分别于 0、1、2、4、7、10 h,按“2.1”项色谱条件进样,测得供试品溶液在温度为 10℃时,各杂质含量稳定无变化,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.6 回收率试验 精密量取混合对照品溶液 I 和 II 各 80、100 和 120 μL,分别置 100 mL 量瓶中,每个浓度平行制备 3 份,共 9 份;再精密量取吠塞米注射液(E企业,批号 72202161)10 mL,分别置于上述 9 个 100 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,制得高中低 3 个浓度的供试品溶液,照“2.1”项色谱条件进样,按外标法计算回收率,12 种已知杂质的平均回收率为 91.8%~100.0%,见表 4。

2.4 样品测定

采用“2.1”项色谱条件测定 10 家企业产品中的有关物质,已知杂质按照加校正因子的主成分自身对照法计算,未知杂质按照不加校正因子的主成分自身对照法计算,结果如表 5 所示。



1. 糠醛 (furfural) 2. 杂质 C (impurity C) 3. 杂质 G (impurity G) 4. 杂质 B (impurity B) 5. 杂质 K (impurity K) 6. 杂质 F (impurity F) 7. 呋塞米 (Furosemide) 8. 杂质 A (impurity A) 9. 杂质 I (impurity I) 10. 杂质 E (impurity E) 11. 杂质 D (impurity D) 12. 杂质 H (impurity H) 13. 杂质 J (impurity J)

A. 混合对照品溶液 (mixed reference solution) B. 呋塞米供试品溶液 (furosemide API test solution) C. 酸破坏溶液 (acid destroyed solution) D. 碱破坏溶液 (alkali destroyed solution) E. 氧化破坏溶液 (oxidation destroyed solution) F. 高温破坏溶液 (high temperature destroyed solution) G. 光照破坏溶液 (light destroyed solution) H. 空白溶液 (blank solution)

图 2 专属性试验 HPLC 色谱图 (238 nm)

Fig. 2 The HPLC chromatograms for specificity

表 3 各已知杂质相对校正因子(*f*)与检测限和定量限

Tab. 3 Relative response factor(*f*) and LOD and LOQ of the known impurities

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linearity range)/(μg · mL ⁻¹)	<i>r</i>	RRT	<i>f</i>	LOD/ (μg · mL ⁻¹)	LOQ/ (μg · mL ⁻¹)
呋塞米(furosemide)	$Y = 1.32 \times 10^5 X - 3.10 \times 10^4$	0.11 ~ 21.32	0.999 7	1.00	/	/	/
杂质 A(impurity A)	$Y = 6.44 \times 10^4 X - 1.62 \times 10^4$	0.11 ~ 20.02	0.999 6	1.05	2.1	0.035	0.175
杂质 B(impurity B)	$Y = 5.37 \times 10^4 X - 1.28 \times 10^4$	0.11 ~ 20.63	0.999 6	0.677	2.5	0.036	0.072
杂质 C(impurity C)	$Y = 7.59 \times 10^4 X - 1.44 \times 10^4$	0.11 ~ 20.52	0.999 8	0.516	1.7	0.018	0.072
杂质 D(impurity D)	$Y = 3.72 \times 10^4 X - 8.85 \times 10^3$	0.10 ~ 19.72	0.999 7	1.48	3.6	0.034	0.172
杂质 E(impurity E)	$Y = 6.46 \times 10^4 X - 1.61 \times 10^4$	0.11 ~ 20.08	0.999 6	1.34	2.1	0.035	0.176
杂质 F(impurity F)	$Y = 1.52 \times 10^5 X - 2.86 \times 10^4$	0.11 ~ 20.25	0.999 7	0.811	1.0	0.007	0.035
杂质 G(impurity G)	$Y = 4.45 \times 10^4 X - 1.33 \times 10^4$	0.11 ~ 20.65	0.999 5	0.581	3.0	0.036	0.108
杂质 H(impurity H)	$Y = 6.03 \times 10^4 X - 1.57 \times 10^4$	0.10 ~ 18.89	0.999 6	1.63	2.2	0.066	0.264
杂质 I(impurity I)	$Y = 4.77 \times 10^4 X - 1.43 \times 10^4$	0.11 ~ 20.57	0.999 6	1.27	2.8	0.108	0.288
杂质 J(impurity J)	$Y = 8.00 \times 10^4 X - 1.88 \times 10^4$	0.11 ~ 21.02	0.999 7	2.03	1.7	0.037	0.110
杂质 K(impurity K)	$Y = 1.88 \times 10^5 X - 4.12 \times 10^4$	0.11 ~ 20.23	0.999 7	0.698	0.70	0.007	0.018
呋塞米(furosemide)	$Y = 7.78 \times 10^4 X - 1.54 \times 10^4$	0.10 ~ 20.46	0.999 6	1.00	/	/	/
糠醛(furfural)	$Y = 1.54 \times 10^5 X + 5.15 \times 10^3$	0.10 ~ 20.28	0.999 6	0.43	0.51	0.020	0.051

表 4 呋塞米各杂质回收率结果(*n* = 9)

Tab. 4 Recovery of furosemide impurities

组分 (component)	已知含量 (known)/μg	加入量 (added)/μg	实测值 (detected)/μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %		
杂质 A(impurity A)	0.714 8	0.400 3	1.088 7	93.4	92.7	1.9		
			1.077 9	90.7				
			1.090 7	93.9				
		0.500 4	1.182 2	93.4				
		1.183 7	93.7					
		1.187 7	94.5					
	0.600 5	1.283 5	94.7	94.5	0.82			
	1.285 9	95.1						
	1.276 9	93.6						
	杂质 B(impurity B)	0.718 9	0.412 6	1.111 7	95.2	93.4	1.7	
				1.102 2	92.9			
				1.098 9	92.1			
0.515 8			1.226 4	98.4	97.8			1.1
1.217 2			96.6					
1.226 4			98.4					
0.618 9		1.305 0	94.7	94.2		1.0		
1.295 1		93.1						
1.306 2		94.9						
杂质 C(impurity C)		24.749 8	0.410 5	25.124 6	91.3	91.9	1.6	
				25.122 6	90.8			
				25.133 6	93.5			
	0.513 1		25.218 3	91.3	92.2			1.0
	25.228 0		93.2					
	25.221 8		92.0					
	0.615 8	25.315 7	91.9	92.3		0.72		

表 4(续)

组分 (component)	已知含量 (known)/ μg	加入量 (added)/ μg	实测值 (detected)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %			
杂质 D (impurity D)	2.469 1	0.394 4	25.323 1	93.1	92.7	1.8			
			25.316 3	92.0					
			2.841 8	94.5					
			2.828 4	91.1					
			2.834 3	92.6					
			0.493 0	2.954 2			98.4	98.5	0.77
			2.958 6	99.3					
			2.951 3	97.8					
			0.591 5	3.042 3			96.9	96.1	0.75
			3.034 0	95.5					
杂质 E (impurity E)	0	0.401 6	3.036 3	95.9	91.8	1.5			
			0.374 7	93.3					
			0.364 7	90.8					
			0.366 3	91.2					
			0.502 0	0.492 5			98.1	98.9	0.81
			0.500 5	99.7					
			0.496 0	98.8					
			0.602 4	0.583 1			96.8	97.4	0.76
			0.584 9	97.1					
			0.591 6	98.2					
杂质 F (impurity F)	0.785 2	0.405 0	1.170 8	95.2	94.3	1.3			
			1.169 1	94.8					
			1.161 4	92.9					
			0.506 2	1.270 6			95.9	96.1	0.26
			1.273 2	96.4					
			1.271 7	96.1					
			0.607 4	1.369 5			96.2	95.6	0.81
			1.360 4	94.7					
			1.367 1	95.8					
			0.413 1	0.407 3			98.6	96.9	1.6
杂质 G (impurity G)	0	0.413 1	0.399 5	96.7	100.0	0.95			
			0.394 5	95.5					
			0.516 4	0.510 7			98.9	100.0	0.95
			0.519 5	100.6					
			0.519 0	100.5					
			0.619 7	0.616 6			99.5	99.6	1.1
			0.624 0	100.7					
			0.610 4	98.5					
			0.377 9	0.356 4			94.3	93.2	1.6
			杂质 H (impurity H)	0			0.377 9	0.345 8	91.5
0.354 5	93.8								
0.472 4	0.458 7	97.1			98.6	1.3			
0.470 0	99.5								
0.468 1	99.1								
0.566 8	0.551 5	97.3			97.9	0.52			
0.555 5	98								

表 4(续)

组分 (component)	已知含量 (known)/ μg	加入量 (added)/ μg	实测值 (detected)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %		
杂质 I (impurity I)	0	0.411 3	0.557 2	98.3	92.9	1.6		
			0.375 9	91.4				
			0.382 1	92.9				
		0.388 3	94.4					
		0.514 2	0.492 6	95.8				
		0.498 3	96.9					
	0.617 0	0.497 2	96.7					
		0.595 4	96.5					
		0.586 8	95.1					
		0.589 9	95.6					
		杂质 J (impurity J)	0.289 4	0.420 4	0.688 4	94.9	93.0	2.0
					0.679 1	92.7		
0.673 2	91.3							
0.525 5	0.797 6		96.7					
0.804 9	98.1							
0.792 8	95.8							
0.630 6	0.895 4	96.1						
	0.884 7	94.4						
	0.891 0	95.4						
	杂质 K (impurity K)	0	0.404 6	0.380 7	94.1	92.9	1.9	
				0.367 8	90.9			
				0.378 7	93.6			
0.505 8		0.496 2	98.1					
0.487 6		96.4						
0.491 1		97.1						
0.606 9	0.583 8	96.2						
	0.580 2	95.6						
	0.591 7	97.5						
	糠醛 (furfural)	0.567 4	0.405 6	0.966 1	98.3	97.9	0.48	
				0.962 5	97.4			
				0.965 3	98.1			
0.507 0		1.062 2	97.6					
1.065 3		98.2						
1.067 3		98.6						
0.608 4	1.173 4	99.6						
	1.173 4	99.6						
	1.178 8	100.5						

由检测结果可知,杂质 A、杂质 E、杂质 H 和杂质 I 在原料药和注射液中均未检出,其余 8 个杂质有不同程度的检出,其中杂质 C 在 E、F 和 G 企业的注射液含量相对较高,杂质 G 在 F 和 G 企业的注射液中检出量较高;除 B 企业注射液中糠醛含量略高于参比制剂外,其他注射液企业中糠醛含量相较于参

比制剂高出一个数量级。

3 结果与讨论

3.1 有关物质方法的建立

根据咪塞米注射液溶液性质,优化了制备供试液的溶剂,重新建立了有效分离咪塞米及其 12 个杂质的 HPLC 方法。

表5 不同企业呋塞米及其注射液中杂质检测结果

Tab. 5 Detection results of impurities in furosemide and its injection from different enterprises

杂质 (impurity)	杂质含量(impurity content)/%									
	呋塞米(furosemide)		呋塞米注射液(furosemide injection)							
	H	I	Lasix	A	B	C	D	E	F	G
杂质 C(impurity C)	0.075	0.031	0.063	0.063	0.036	0.12	0.11	0.18	0.44	0.26
杂质 G(impurity G)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.046	0.27	0.25
杂质 B(impurity B)	0.010	0.011	0.022	0.0072	0.009 6	0.007 2	0.008 4	0.015	N/A	0.008 2
杂质 K(impurity K)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.001 9	0.0025
杂质 F(impurity F)	0.007 5	N/A	N/A	0.006 4	0.007 4	0.005 3	0.005 3	N/A	N/A	N/A
杂质 A(impurity A)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
杂质 I(impurity I)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
杂质 E(impurity E)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
杂质 D(impurity D)	0.044	0.068	0.039	0.050	0.066	0.063	0.055	N/A	N/A	0.019
杂质 H(impurity H)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
杂质 J(impurity J)	0.016	N/A	N/A	0.016	0.024	0.013	N/A	0.093	N/A	N/A
糠醛(furfural)	0.008 5	N/A	0.005 3	0.017 6	0.009 0	0.026 7	0.023 6	0.058 6	0.052 7	0.037 6
最大单杂(individual impurity)	0.013	0.001 4	0.003 5	0.002 3	0.001 7	0.002 5	0.001 4	0.002 7	0.016	0.036
杂质总量(total impurities)	0.20	0.11	0.14	0.16	0.16	0.24	0.21	0.40	0.81	0.65

注(note): A~I. 企业(company); N/A. 未检出(not detected); 小于定量限(LOQ)的杂质均忽略不计(impurities less than the limit of quantitation were ignored)

3.1.1 溶剂的优化 呋塞米呈弱酸性易溶于碱性溶液中,因此呋塞米注射液呈碱性,pH在8.0~9.0。在酸性环境下呋喃苯胺酸容易游离产生沉淀,而且生成沉淀的速度与数量随pH值的下降而增加^[9]。依据标准检验中发现在制备供试液时加入溶剂(取冰醋酸22 mL,加乙腈-水(1:1)至1 000 mL,混匀)的瞬间有白色絮状沉淀生成。另外,呋塞米在高浓度的乙酸溶液中,见光会很快地产生杂质C、糠醛等降解杂质,检验中需严格避光操作,对操作环境要求严格^[9-10],因此现行标准中的溶剂不适用于本品供试液制备。经查阅文献资料和实验对比研究,最终选择50%乙腈溶液作为溶剂。

3.1.2 流动相的选择 现行标准采用水-四氢呋喃-冰醋酸(70:30:1)作为流动相,对比2020年版《中国药典》和EP 9.0的流动相,分别尝试了磷酸二氢钠溶液、磷酸溶液、磷酸二氢钾溶液和0.05%三氟乙酸溶液,最终选择分离效果最佳的0.05%三氟乙酸溶液作为色谱系统水相,以0.05%三氟乙酸溶液-乙腈-甲醇作为梯度洗脱的流动相。

3.1.3 检测波长的选择 2020年版《中国药典》有关物质测定波长为272 nm, BP 2013和EP 9.0采用238 nm,而USP 40-NF 35采用254 nm和272 nm双波长进行测定。本研究发现在238 nm波长处各杂

质检测灵敏度更高,检出杂质种类数也更多;糠醛的最大吸收波长为277 nm,而在238 nm处吸收较弱(图4),综上,最终选择双波长测定本品的有关物质^[11],238 nm测定除糠醛外的其他所有杂质,277 nm波长测定糠醛。

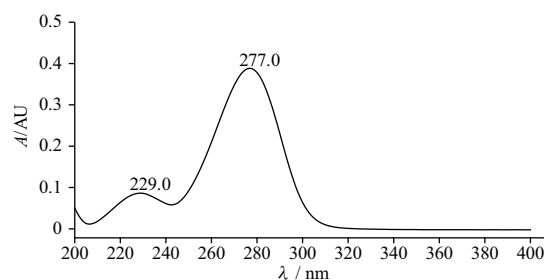


图4 糠醛紫外光谱图

Fig. 4 Ultraviolet spectrum of furfural

3.2 呋塞米及其注射液中各杂质来源归属

分别对呋塞米及其注射液进行酸、碱、氧化、高温和光照破坏试验,结果原料药和注射液在光照、氧化和高温条件下均不稳定,其中杂质C、杂质B、杂质G、杂质K和糠醛增加明显;结合注射液的稳定性试验,对各杂质进行归属(表6)。破坏试验表明注射液中降解杂质的产生主要受生产和储运过程中高温、光照和氧化等因素的影响,其中光照影响最大。

表 6 杂质来源归属
Tab. 6 Attribution of impurity source

杂质(impurity)	来源归属(attribution)	杂质(impurity)	来源归属(attribution)
杂质 A(impurity A)	工艺杂质(process impurity)	杂质 G(impurity G)	光和氧化降解杂质(Light and oxidation degrade impurities)
杂质 B(impurity B)	工艺杂质、光降解杂质(process impurity, photodegradable impurity)	杂质 H(impurity H)	光降解杂质(photodegradable impurity)
杂质 C(impurity C)	光、氧化、高温和酸降解杂质(impurities degraded by light, oxidation, high temperature and acid)	杂质 I(impurity I)	光降解杂质(photodegradable impurity)
杂质 D(impurity D)	工艺杂质(process impurity)	杂质 J(impurity J)	工艺杂质(process impurity)
杂质 E(impurity E)	光降解杂质(photodegradable impurity)	杂质 K(impurity K)	工艺杂质、光降解杂质(process impurity, photodegradable impurity)
杂质 F(impurity F)	工艺杂质、光降解杂质(process impurity, photodegradable impurity)	糠醛(furfural)	光和氧化降解杂质(light and oxidation degrade impurities)

3.3 呋塞米及其注射液杂质控制现状

由表 5 可以看到,呋塞米中各已知杂质检出量均低于质控限度 0.15%,同时其他未知最大单个杂质远低于鉴定限度 0.10%^[12]。大部分企业注射液中杂质含量较低,除了杂质 C、杂质 G 和糠醛外,其他杂质检出量与参比制剂基本相同;F 和 G 2 家企业制剂中杂质 C 和杂质 G 均超出了鉴定限度 0.2%,其他未知最大单杂检出量远低于鉴定限度 0.2%^[13]。

糠醛为潜在基因毒杂质,除 A、B 2 家企业和参比制剂外,其余 5 家仿制企业注射液中糠醛含量均高于文献报道中按照注射液的最大使用量计算糠醛的质控限度 0.019 7%^[8],其中 E 和 F 企业最高;2 家企业原料药,仅 1 家检出糠醛,检出量较低。

综上,呋塞米原料药杂质控制较好,国内大部分企业注射液杂质控制水平与参比制剂存在较大差距,需进一步改进。

3.4 呋塞米注射液中主要降解杂质与处方和包装材料的关系

根据杂质测定结果,对比各企业处方,E、F 和 G 企业处方中含有参比制剂未使用的抗氧化剂无水亚硫酸钠和亚硫酸氢钠,课题组开展了原辅料相容性试验,结果在高温条件下亚硫酸氢钠和无水亚硫酸钠会加速呋塞米的降解,尤以杂质 C 含量升高最为明显(表 7),未加入任何抗氧化剂的原料药在高温条件下杂质 C 含量反而增长缓慢,说明亚硫酸氢钠和亚硫酸钠在高温条件下与呋塞米不相容。

表 7 原辅料相容性结果
Tab. 7 Compatibility test results of raw materials and auxiliary materials

杂质 (impurity)	含量(content)/%						
	呋塞米 (furosemide)			呋塞米 + 亚硫酸钠 (furosemide and sodium sulfite)		呋塞米 + 亚硫酸氢钠 (furosemide and sodium hydrogen sulfite)	
	无处理 (untreated)	高温 (high temperature)	光照 (light)	高温 (high temperature)	光照 (light)	高温 (high temperature)	光照 (light)
杂质 C(impurity C)	0.10	0.27	1.60	1.06	0.86	2.40	2.20
杂质 G(impurity G)	N/A	N/A	0.08	N/A	0.46	2.50	1.40
糠醛(furfural)	0.012	0.002	0.235	N/A	0.135	N/A	0.704
杂质总量(total impurities)/%	0.23	0.39	2.80	2.53	4.00	6.40	8.00

注(note):此表为光照(1 500 lx)和高温(60 ℃)破坏各 10 d 的结果(this table is the result of 10 d of damage by light (1 500 lx) and high temperature (60 ℃) respectively);N/A. 未检出(not detected)

E 和 G 企业注射液中杂质 G 含量远高于其他企业,处方显示 2 家企业所用辅料的种类一致,均采用

亚硫酸氢钠作为抗氧化剂。由表 7 可知,呋塞米与亚硫酸氢钠的混合物在高温和光照条件下放置 10 d

后,杂质 G 含量迅速升高;在光照放置 10 d 后,糠醛含量也迅速升高,表明亚硫酸氢钠与呋塞米不相容。

鉴于未加抗氧化剂处方的稳定性反而优于加入抗氧化剂的处方,且注射液属于高风险剂型,选择辅料的种类应越少越好^[14],呋塞米注射液处方中添加抗氧化剂无水亚硫酸钠和亚硫酸氢钠不合理^[15]。根据质量源于设计(QbD)理念,建议相关企业优化处方,对产品质量从源头设计进行较为系统的控制。

杂质 C、杂质 G 和潜在基因毒杂质糠醛均属于光降解杂质,除受上述处方因素影响之外,光稳定性试验表明包装材料也直接影响杂质含量的高低。参比制剂采用棕色的中硼硅玻璃安瓿瓶,而国内仿制制剂企业均采用透明的低硼硅玻璃安瓿瓶,对主药基本没有光保护作用,建议国内企业采用与参比制剂一致的包装材料。

综上,本研究采用高效液相色谱法建立了呋塞米及其注射液中 11 个已知杂质和 1 个潜在基因毒杂质的有关物质检查方法,对呋塞米注射液的杂质控制现状,主要降解杂质与处方和包装材料之间的相关性进行了分析研究,可为后续呋塞米注射液的安全性提高和仿制药的质量一致性评价提供参考。

参考文献

- [1] 黄萍,刘萍. HPLC 法测定呋塞米中有关物质 B[J]. 广州化工, 2017, 45(15):151
HUANG P, LIU P. Determination of related compound B in furosemide tablets by HPLC [J]. Guangzhou Chem Ind, 2017, 45(15):151
- [2] 任璐彤,周刚,高佳丽. 呋塞米片原研药与仿制药溶出曲线的研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14):1681
REN LT, ZHOU G, GAO JL. Research on dissolution curves of generic and original furosemide tablets [J]. Chin Mod Appl Pharm, 2020, 37(14):1681
- [3] 胡泽锴,罗娜. HPLC 加校正因子的主成分自身对照法测定呋塞米片中有关物质的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(8):1433
HU ZK, LUO Y. Determination of related substances in furosemide tablets by HPLC - principal component self - control with correct factor[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(8):1433
- [4] 姜宏宇,王翰洵,王健. 呋塞米杂质 B 的潜在毒性预测研究[J]. 中南药学, 2021, 19(12):2517
JIANG HY, WANG HX, WANG J. Potential toxicity of impurity B in furosemide preparation [J]. Central South Pharm, 2021, 19(12):2517
- [5] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020:575
ChP 2020. Vol II [S]. 2020:575
- [6] BP 2022. Vol I [S]. 2020:1140
- [7] 谢娟,杨放,翟羽,等. HPLC 法测定注射用呋塞米中有关物质的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(31):2454
XIE J, YANG F, ZHAI Y, et al. Determination of the related substances in furosemide for injection by HPLC[J]. Chin Pharm, 2007, 18(31):2454
- [8] 赵亚男,何念平,韩淑娟,等. 呋塞米及其制剂中微量基因毒杂质的检测[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(9):1534
ZHAO YN, HE NP, HAN SX, et al. Determination of trace genotoxic impurities in furosemide and its preparations [J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(9):1534
- [9] 张建怀,张薇,张晓林. 呋塞米注射液从莫非壶加入酸性输液中的配伍变化[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4):161
ZHANG JH, ZHANG W, ZHANG XL. Incompatibility of furosemide injection in acidic infusion from Moffi pot [J]. Northwest Pharm J, 2005, 20(4):161
- [10] BROCH SC, ROMERO JE. Furosemide assay in pharmaceuticals by Micellar liquid chromatography; study of the stability of the drug [J]. J Pharm Biomed Anal, 2000,23(5):803
- [11] MILLER JHM, ROBERT JL. Reversed - phase ion - pair liquid chromatographic method for determining the impurities of furosemide[J]. J Pharm Biomed Anal, 1993, 2(3):257
- [12] 化学药物杂质研究技术指导原则[EB/OL]. 《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组, 2005[2023 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn>
Technical Guidelines for The Study of Chemical Drug Impurities [EB/OL]. 《Technical guidelines for the study of chemical drug impurities》Project Study Group, 2005[2023 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn>
- [13] ICH Q3b(R2):Impurities in New Drug Products(Revised Guideline), International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use [EB/OL]. Geneva, 2006 [2023 - 05 - 11]. <http://www.ich.org>
- [14] 化学药品注射剂基本技术要求(试行)[S/OL]. 2008 [2023 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn>
Basic Technical Requirements for Chemical Injection(Trial) [S/OL]. 2008 [2023 - 05 - 11]. <https://www.nmpa.gov.cn>
- [15] 王峰,陶巧凤. HPLC 法测定呋塞米注射液中的有关物质及含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6):1081
WANG F, TAO QF. HPLC determination of furosemide injection and its related substance[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(6):1081

(本文于 2023 年 8 月 21 日收到)