

盐酸坦索罗辛有关物质测定方法及杂质控制限度研究

程冬, 薛敏华, 裘旭华, 赵述强, 陆益红* (江苏省食品药品监督检验研究院, 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室, 南京 210019)

摘要: **目的** 建立加校正因子的主成分自身对照法, 测定盐酸坦索罗辛有关物质, 并基于 Nexus 2.6 软件(包含 Derek 和 Sarah 模型)遗传毒性预测结果拟定各已知杂质的控制限度。**方法** 采用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm), 以高氯酸盐缓冲液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 225 nm 波长下测定盐酸坦索罗辛 8 个已知杂质的校正因子, 通过加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸坦索罗辛的有关物质, 并采用 Nexus 2.6 软件对已知杂质进行遗传毒性预测。**结果** 采用加校正因子的主成分自身对照法测定各已知杂质含量与外标法测定结果基本一致(差值为 ±0.02%), 方法学验证结果显示各已知杂质线性、精密度、准确度、定量限、检测限均满足检测要求, 遗传毒性软件预测结果杂质 I 为阳性(ICH M7 第 3 类), 其他杂质均为阴性(ICH M7 第 5 类)。**结论** 本研究建立的方法快速、高效、准确、灵敏, 并且基于遗传毒性软件预测结果拟定各已知杂质限度为 0.1%, 本研究可为盐酸坦索罗辛标准的制修订提供参考。

关键词: 盐酸坦索罗辛; 校正因子法; 主成分自身对照法; 有关物质; 遗传毒性预测; 杂质限度

doi: 10.11669/cpj.2024.11.012 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)11-1047-10

Determination and Limits of Related Substances in Tamsulosin Hydrochloride

CHENG Dong, XUE Minhua, QIU Xuhua, ZHAO Shuqiang, LU Yihong* (Jiangsu Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs, Nanjing 210019, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a self-contrast HPLC method with correction factor for determination of the related substances in tamsulosin hydrochloride, and validate the limits of impurities based on the prediction of genotoxicity using Nexus 2.6 software (with Derek and Sarah). **METHODS** ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) column was used for the determination of correction factors of the eight known impurities in tamsulosin hydrochloride with mobile phase consisting of perchlorate buffer solution-acetonitrile by gradient elution under the detection wavelength of 225 nm, the related substances in tamsulosin hydrochloride were determined by self-contrast HPLC method with the correction factor, and the genotoxicity of the impurities was predicted by using Nexus 2.6 software. **RESULTS** There was no significant difference (the deviation is within ±0.02%) between the results by relative correction factors and external standards. The validation test showed that the proposed method met the requirements for the intended analytical applications, and the predicted result of impurity I by Nexus 2.6 software was positive (ICH M7 class 3), and all the others were negative (ICH M7 class 5). **CONCLUSION** The established method is rapid, efficient, accurate and sensitive, and a limit of 0.1% is established for each known impurity according to the predicted genotoxicity. This study provides a basis for revising pharmacopoeia standards.

KEY WORDS: tamsulosin hydrochloride; correction factor method; self-contrast method; related substance; genotoxicity prediction; impurity limit

盐酸坦索罗辛(tamsulosin hydrochloride)为 α₁ 肾上腺素受体拮抗剂, 临床上主要用于治疗前列腺增生症^[1-2]。目前国内该品种有 10 多个原料药和药品批准文号, 已上市制剂包括盐酸坦索罗辛缓释片和盐酸坦索罗辛缓释胶囊等。2020 年版《中国药典》尚未收录该品种, 各生产企业均执行各自注册标准, 检验标准有待进一步提高和完善。《欧洲药典》(EP11.0)、《美国药典》(USP2023)、《日本药典》(JP18)中均有盐

酸坦索罗辛原料药标准收载, 且有关物质检测方法一致, 规定方法 1 测定盐酸坦索罗辛色谱峰保留时间之前的杂质(包括已知杂质 B、C、D、E、F), 方法 2 测定盐酸坦索罗辛色谱峰保留时间之后的杂质(包括已知杂质 A、H、I)。各已知杂质结构及来源信息见图 1, 其中杂质 B 和杂质 I 为合成盐酸坦索罗辛的起始物料, 杂质 A、杂质 D、杂质 E 和杂质 F 为工艺杂质, 杂质 C 和杂质 H 为降解产物。

基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订研究课题资助(2011233); 江苏省药品监督管理局科研计划课题资助(202120)

作者简介: 程冬, 男, 主管药师 研究方向: 药品质量控制及安全性评价 * **通讯作者:** 陆益红, 女, 主任药师 研究方向: 药品质量控制及安全性评价 Tel: (025)86251220

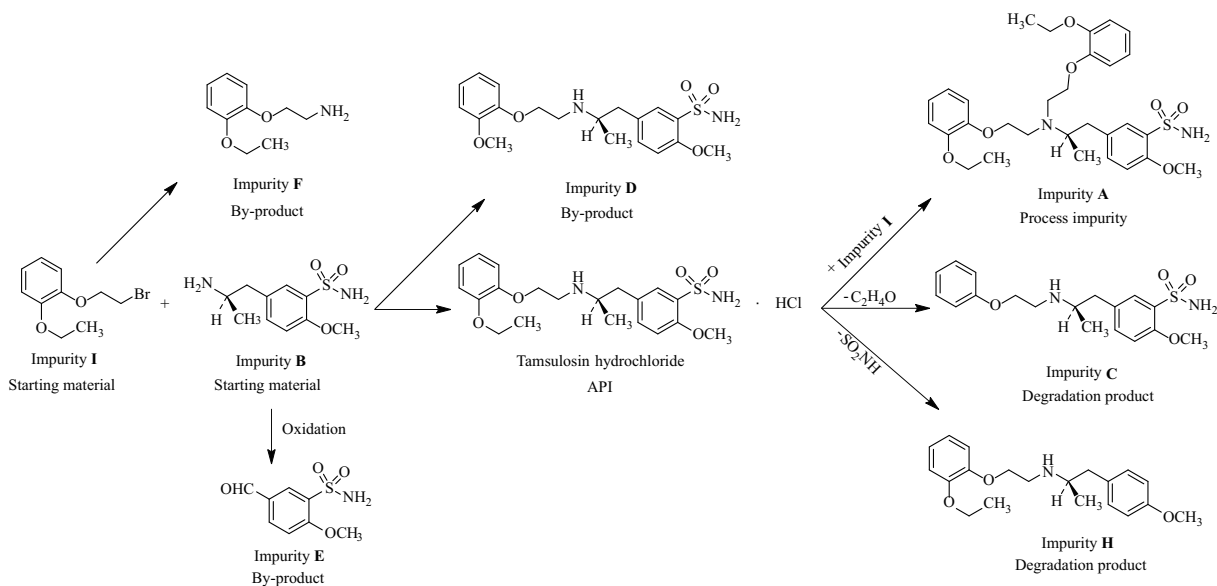


图1 盐酸坦索罗辛及其杂质结构及来源信息

Fig. 1 The structures and sources of tamsulosin hydrochloride and its impurities

采用 EP 有关物质方法 1 检测时,杂质 C 和杂质 D 未能有效分离,且杂质 B 和杂质 E 均在保留时间 2.5 min 内出峰,当该法用于制剂有关物质检测时,容易受到辅料峰的干扰。同时,EP11.0 收载的质量标准有关物质采用方法 1 和方法 2 分别控制,耗时且增加检验成本。因此,有必要对盐酸坦索罗辛有关物质检测方法进行优化,提高检测效率,并对其有关物质含量进行考察。

EP11.0 盐酸坦索罗辛有关物质检测方法采用主成分自身对照法计算各杂质的含量,为了进一步提高各已知杂质含量测定的准确性,拟采用建立的方法对盐酸坦索罗辛已知杂质的校正因子进行测定^[3-4],通过加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸坦索罗辛各已知杂质的含量,确保杂质准确定量。此外,本研究拟采用 Nexus 2.6 版本软件中的 Derek 和 Sarah 模型对已知杂质进行遗传毒性预测^[5-6],按照 ICH M7 的要求对遗传毒性杂质制定严格的限度进行控制,确保临床安全有效。本研究可为盐酸坦索罗辛标准的制修订提供参考。

1 仪器与试剂

LC-20AB 高效液相色谱仪(日本岛津公司); HPLC 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Vanquish 高效液相色谱仪(美国赛默飞公司); MettlerXSE-205DU 十万分之一电子天平、Mettler Seven Excellence pH 计(瑞士梅特勒托利多公司);Nexus

2.6 版本遗传毒性预测软件(英国 Lhasa 公司);甲醇、乙腈均为色谱纯,高氯酸、氢氧化钠、盐酸、过氧化氢均为分析纯;超纯水由 Millipore 超纯水系统制备。

盐酸坦索罗辛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100688-201102,纯度:99.8%);杂质 A 对照品(批号:4524-028A8,纯度:98.8%)、杂质 B 对照品(批号:2163-087A1,纯度:99.6%)、杂质 C 对照品(批号:1912-012A5,纯度:98.9%)、杂质 D 对照品(批号:1904-018A3,纯度:99.6%)、杂质 E 对照品(批号:4479-027A6,纯度:97.4%)、杂质 F 对照品(批号:1708-010A3,纯度:95.2%)、杂质 H 对照品(批号:2225-042A3,纯度:99.7%)、杂质 I 对照品(批号:4473-007A3,纯度:98.8%)[TLC Pharmaceutical Standards 公司(以下简称 TLC 公司)];盐酸坦索罗辛供试品(企业 I,批号:211102、211103、211104;企业 II,批号:639220601、639220602、639220603;企业 III,批号:20170203、20170302、20171103)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm);流动相:A 相为高氯酸盐缓冲液(取高氯酸 17.4 mL 和氢氧化钠 6 g,加水 3 800 mL 溶解,用氢氧化钠试液调节 pH 至 2.0,加水至 4 000 mL),B 相为乙腈;梯度洗脱:0~5 min,流动相 A 85%~78%;

5~30 min, 流动相 A 78%~75%; 30~50 min, 流动相 A 75%~40%; 50~55 min, 流动相 A 40%~40%; 55~55.1 min, 流动相 A 40%~85%; 55.1~65 min, 流动相 A 85%~85%; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C, 检测波长: 225 nm, 进样体积: 10 μL。

2.2 溶液的制备

稀释剂:取高氯酸盐缓冲液和乙腈, 按照体积比为 7:3 混匀, 即得。

系统适用性:取盐酸坦索罗辛与杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 对照品各适量, 精密称定, 用稀释剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别含盐酸坦索罗辛约 5 mg 及各杂质均为约 5 μg 的混合

溶液。

供试品溶液:取盐酸坦索罗辛供试品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加稀释剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含盐酸坦索罗辛约 5 mg 的溶液。

对照溶液:精密量取供试品溶液适量, 用稀释剂定量稀释制成每 1 mL 中含盐酸坦索罗辛约 5 μg 的溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性实验 系统适用性溶液色谱图中, 各组分色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 理论板数按盐酸坦索罗辛峰计算大于 3 000, 典型色谱图见图 2。

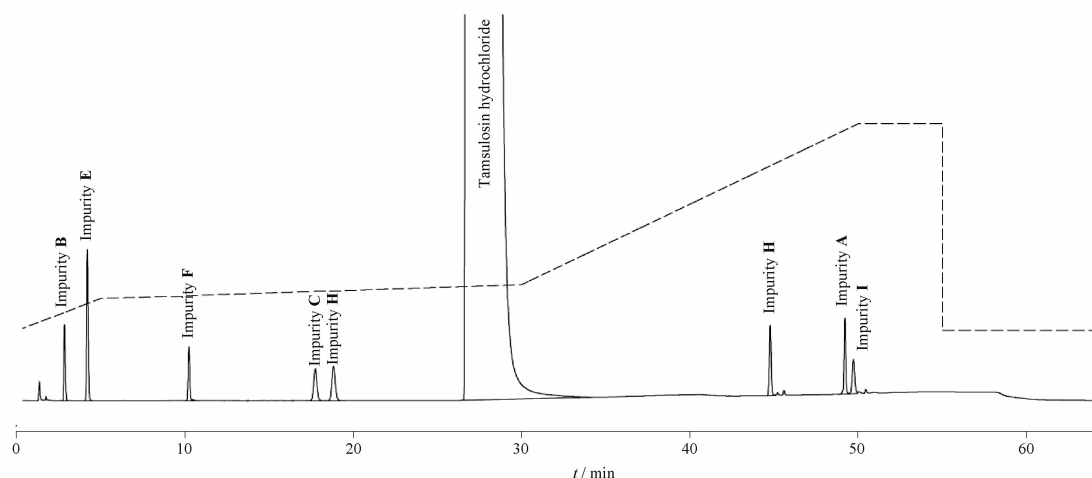


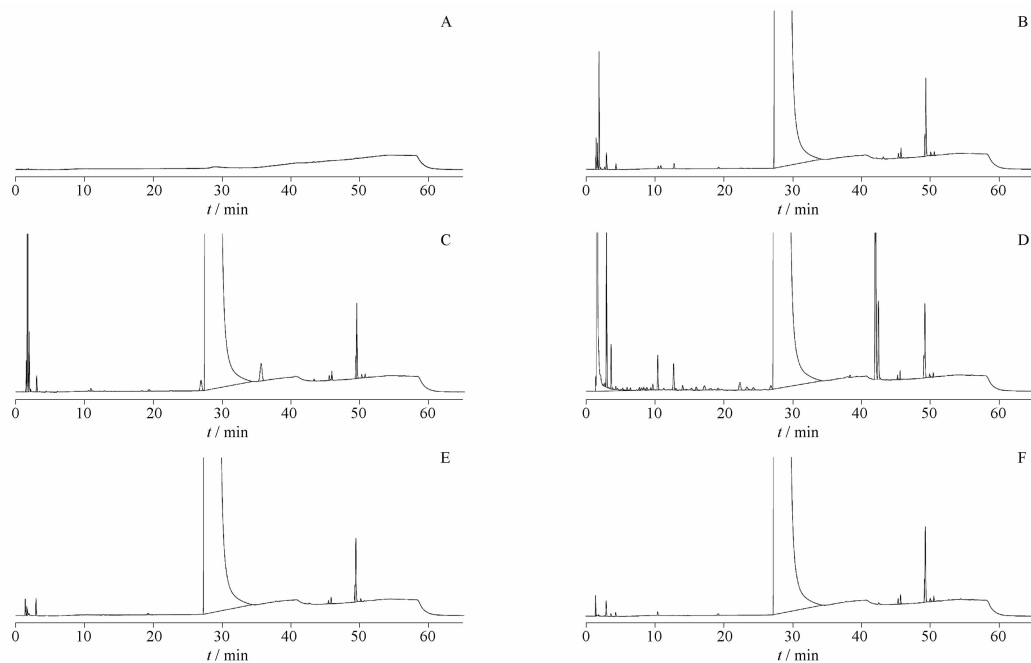
图 2 盐酸坦索罗辛有关物质系统适用性溶液典型色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of system suitability solution for related substances testing in tamsulosin hydrochloride

2.3.2 专属性 以稀释剂为空白溶剂进样分析, 空白溶剂无干扰。称取盐酸坦索罗辛供试品 (批号: 211102) 适量, 分别进行酸、碱、氧化、高温与光照破坏, 酸、碱破坏样品须中和, 将各破坏样品用稀释剂定量稀释制成每 1 mL 中含盐酸坦索罗辛约 5 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液进样分析。破坏试验结果表明, 该色谱条件专属性好, 盐酸坦索罗辛色谱峰与原有杂质以及极端条件下破坏产生的杂质色谱峰均能良好分离。盐酸坦索罗辛对热较稳定, 在较强的酸、碱和光照条件下可降解产生多个杂质, 在氧化条件下容易被破坏产生较大的杂质, 典型色谱图见图 3。

2.3.3 线性范围和范围 取盐酸坦索罗辛与杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 对照品各适量, 精密称定, 用稀释剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别含盐酸坦索罗辛与杂质各约 1 mg 的溶液, 作为 S0 对照品溶液。

再分别稀释配制每 1 mL 含各组分约 100、50、25、10、5、2.5、1、0.5 μg 的溶液, 作为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8 对照品溶液进样分析。以峰面积 Y 和浓度 X 计算线性回归方程, 盐酸坦索罗辛线性方程为 $Y = 21\ 116.41X - 3544.90$ ($r = 0.999\ 9$)、杂质 A 线性方程为 $Y = 21\ 170.40X - 1\ 065.77$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 B 线性方程为 $Y = 21\ 507.27X - 284.59$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 C 线性方程为 $Y = 20\ 750.02X - 2\ 532.80$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 D 线性方程为 $Y = 23\ 554.88X - 4\ 014.85$ ($r = 0.999\ 9$)、杂质 E 线性方程为 $Y = 49\ 991.25X - 27.44$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 F 线性方程为 $Y = 18\ 505.58X - 1\ 418.44$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 H 线性方程为 $Y = 27\ 659.43X - 3\ 221.66$ ($r = 1.000\ 0$)、杂质 I 线性方程为 $Y = 16\ 862.91X - 3\ 795.34$ ($r = 0.999\ 9$), 结果显示盐酸坦索罗辛与各已知杂质浓度在 0.5~100 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好。



A - 空白溶剂; B - 酸破坏; C - 碱破坏; D - 氧化破坏; E - 高温破坏; F - 光照破坏。

A - blank; B - acid damage; C - base damage; D - oxidative damage; E - heat damage; F - light damage.

图3 盐酸坦索罗辛破坏试验高效液相典型色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of degradation tests of tamsulosin hydrochloride

2.3.4 校正因子(f) 分别采用岛津、安捷伦和赛默飞3个品牌的高效液相色谱仪对盐酸坦索罗辛与杂质A、B、C、D、E、F、H、I的线性进行测定,计算线性回归方程。各杂质的校正因子以盐酸坦索罗辛的线性斜率和杂质的线性斜率的比值计算,取校正因子的平均值为校正因子结果。杂质A、B、C、D、E、F、H、I的校正因子分别为1.0、

1.0、1.0、0.9、0.4、1.2、0.8和1.3,详细数据见表1。根据《化学药物杂质研究的技术指导原则》(编号:[H]GPH3-1)相关要求,杂质A、B、C、D的校正因子在0.9~1.1范围内,可以直接用主成分的自身对照法计算含量;杂质E、F、H、I的校正因子超出0.9~1.1范围,可采用加校正因子的主成分自身对照法计算含量。

表1 盐酸坦索罗辛杂质A、B、C、D、E、F、H、I的校正因子(f)

Tab. 1 Relative correction factors (f) of impurity A, B, C, D, E, F, H, I of tamsulosin hydrochloride

HPLC /Name	Shimadzu		Agilent		Thermo		Average f
	Slope	f	Slope	f	Slope	f	
Tamsulosin hydrochloride	21 116.41	/	21.05	/	0.3416	/	/
Impurity A	21 170.40	1.00	22.17	0.95	0.3592	0.95	1.0
Impurity B	21 507.27	0.98	21.17	0.99	0.3467	0.99	1.0
Impurity C	20 750.02	1.02	20.17	1.04	0.3213	1.06	1.0
Impurity D	23 554.88	0.90	23.30	0.90	0.3785	0.90	0.9
Impurity E	49 991.25	0.42	49.79	0.42	0.7945	0.43	0.4
Impurity F	18 505.58	1.14	18.28	1.15	0.2917	1.17	1.2
Impurity H	27 659.43	0.76	28.40	0.74	0.4563	0.75	0.8
Impurity I	16 862.91	1.25	16.45	1.28	0.2598	1.31	1.3

2.3.5 检测限和定量限 取“2.3.3”项下混合对照品溶液,进一步稀释得到每1 mL含各组分约0.25、0.1、0.05、0.025、0.01、0.005 μg 的混合溶液,分别作为S9、S10、S11、S12、S13、S14对照品溶液进

样分析,以信噪比(S/N) = 3计算检测限,以 $S/N = 10$ 计算定量限。盐酸坦索罗辛及各杂质的检测限及定量限结果见表2,各杂质的检测限和定量限均可满足检测的灵敏度要求。

表2 盐酸坦索罗辛杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 的检测限和定量限

Tab. 2 LODs and LOQs of the impurity A, B, C, D, E, F, H, I of tamsulosin hydrochloride

Name	LOD		LOQ	
	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%
Tamsulosin hydrochloride	0.025	-	0.100	-
Impurity A	0.010	0.000 2	0.025	0.000 5
Impurity B	0.010	0.000 2	0.025	0.000 5
Impurity C	0.025	0.000 5	0.100	0.002 0
Impurity D	0.025	0.000 5	0.100	0.002 0
Impurity E	0.010	0.000 2	0.025	0.000 5
Impurity F	0.025	0.000 5	0.050	0.001 0
Impurity H	0.005	0.000 1	0.025	0.000 5
Impurity I	0.025	0.000 5	0.100	0.002 0

2.3.6 精密度 取 S5 对照品溶液 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 连续进样 6 次, 结果显示盐酸坦索罗辛与各已知杂质峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值均在 0.11% ~ 1.02% 范围内, 进样精密度良好。

2.3.7 重复性 取盐酸坦索罗辛供试品 (批号: 211102) 约 100 mg, 精密称定, 置 20 mL 棕色量瓶中, 精密加入 S1 对照品溶液 1 mL, 加稀释剂溶解并定量稀释至刻度, 摇匀, 同法处理 6 份样品作为重复性供试品溶液进样分析。重复性结果显示, 供试品溶液加标约相当于 100% 限度浓度 (各已知杂质拟定限度为 0.1%, 即浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时, 盐酸坦索罗辛与各已知杂质的重复性结果 RSD 值均在 0.46% ~ 1.19% 范围内, 重复性良好。

2.3.8 准确度 取盐酸坦索罗辛供试品 (批号: 211102) 约 100 mg, 精密称定, 置 20 mL 棕色量瓶中, 分别精密加入 S1 对照品溶液 0.5、1 和 1.5 mL, 加稀释剂溶解并定量稀释至刻度, 摇匀, 作为低、中、高 3 个浓度的加标溶液, 每个浓度制备 3 份样品溶液进样分析。准确度结果显示, 供试品溶液加标约相当于 50%、100%、150% 限度浓度 (各杂质浓度为 2.5 、 5 、 $7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时, 杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 平均回收率结果分别为 101.18%、101.35%、102.70%、103.70%、100.44%、98.36%、101.65%、101.00% ($n=9$), 准确度良好。

2.3.9 稳定性 取盐酸坦索罗辛供试品 (批号: 211102) 约 100 mg, 精密称定, 置 20 mL 棕色量瓶中, 精密加入 S1 对照品溶液 1 mL, 加标约相当于 100% 限度浓度, 加稀释剂溶解并定量稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、18 和 24 h 进样, 稳定性结果显示, 供试品溶液在 24 h 内各已知杂质面积 RSD 值均在 0.49% 以内, 稳定性良好。

2.3.10 耐用性 采用不同批号的 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 和 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 进行试验, 精密量取 S5 对照品溶液进样分析。结果显示, 不同批号的 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱和 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱分析时各组分峰之间分离度均大于 2.0, 色谱柱耐用性良好, 典型色谱图见图 4。

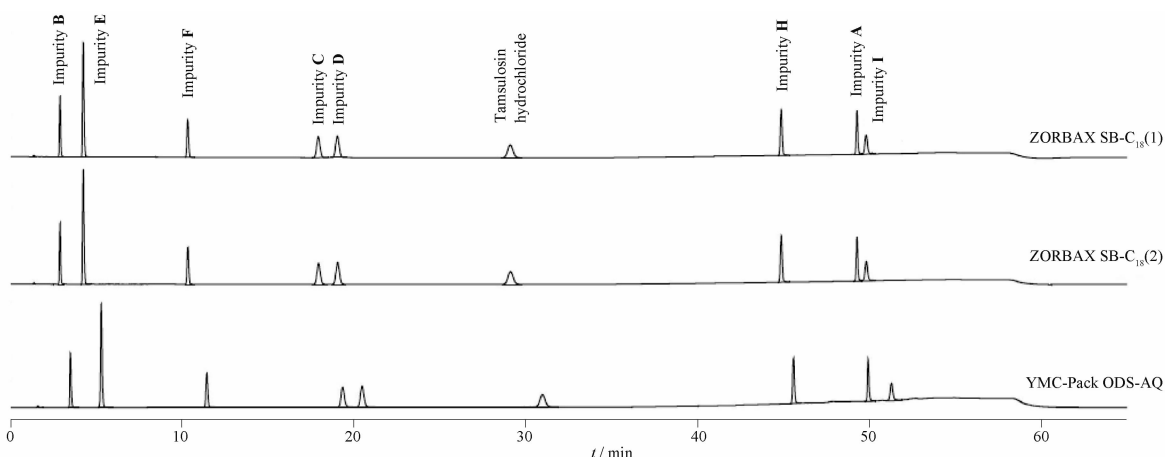


图4 盐酸坦索罗辛有关物质对照品色谱柱耐用性检测典型色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms for durability test of tamsulosin hydrochloride relative substance reference solution by different chromatographic columns

采用安捷伦高效液相色谱仪和赛默飞高效液相色谱仪进行实验, 精密量取 S5 对照品溶液进样, 实

验结果显示, 各组分色谱峰之间分离度均符合要求, 仪器耐用性良好, 典型色谱图见图 5。

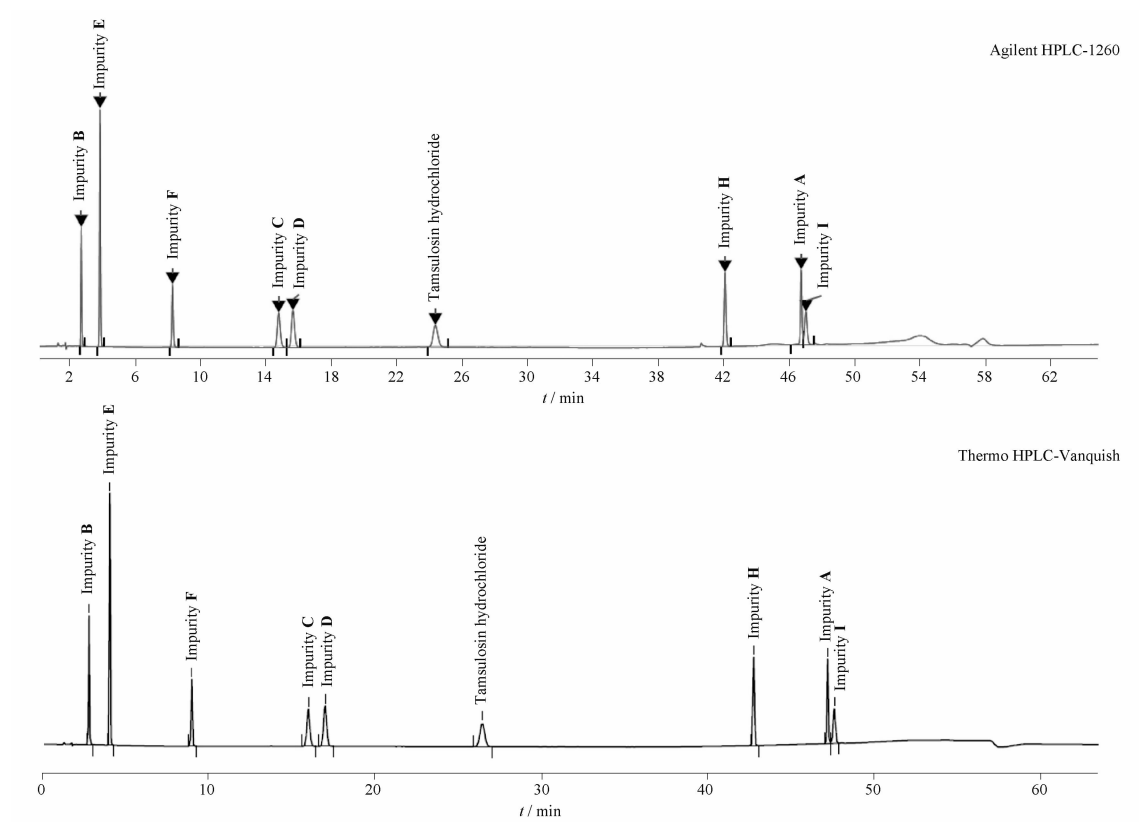


图5 盐酸坦索罗辛有关物质对照品高效液相色谱仪耐用性检测典型色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms for durability test of tamsulosin hydrochloride relative substance reference solution by different HPLC instrument

2.4 供试品测定

取盐酸坦索罗辛供试品溶液和对照溶液进样分析,供试品溶液色谱图中如有与杂质A、B、C、D、E、F、H、I保留时间一致的色谱峰,杂质A、B、C、D按

主成分自身对照法计算含量,杂质E、F、H、I按校正因子分别为0.4、1.2、0.8、1.3的加校正因子主成分自身对照法计算含量,其他单个未知杂质按主成分自身对照法计算含量,结果见表3。

表3 盐酸坦索罗辛供试品有关物质测定结果.%

Tab. 3 The results of sample analysis of related substances testing in tamsulosin hydrochloride. %

Company Lot No.	Company I				Company II		Company III		
	20171103	211102	211103	211104	639220601	639220602	639220603	20170203	20170302
Impurity A	0.073	0.050	0.063	0.035	0.015	0.017	0.055	0.039	0.039
Impurity B	0.011	0.009	0.011	0.003	0.008	0.004	0.005	0.006	0.007
Impurity C	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Impurity D	0.002	0.002	< LOD	0.002	0.002	0.002	< LOD	0.003	< LOD
Impurity E	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Impurity F	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Impurity H	0.002	0.002	0.016	0.002	0.002	0.002	0.001	0.004	0.003
Impurity I	0.004	0.004	0.010	0.007	0.008	0.007	0.002	0.002	0.004
Other impurity	0.010	0.012	0.034	0.007	0.014	0.009	0.007	0.013	0.007
Total impurities	0.101	0.079	0.134	0.057	0.050	0.041	0.070	0.068	0.060

因供试品中部分已知杂质未检出,本研究通过对准确度试验中的高、中、低3个浓度的加标样品进行检测结果比较,采用加校正因子的主成分自身对

照法与外标法计算各已知杂质含量,两种方法检测各已知杂质含量的结果差值在 $\pm 0.02\%$ 以内,结果基本一致,结果见表4。

表4 盐酸坦索罗辛供试品加校正因子的主成分自身对照法(A)与外标法(B)有关物质测定结果比较. %

Tab. 4 Comparison of the results of related substances testing in tamsulosin hydrochloride by relative correction factors and by external standards. %

Name	Low concentration		Medium concentration		High concentration	
	A	B	A	B	A	B
Impurity A	0.118	0.134	0.162	0.173	0.206	0.226
Impurity B	0.057	0.064	0.105	0.116	0.151	0.168
Impurity C	0.046	0.055	0.092	0.108	0.138	0.151
Impurity D	0.047	0.056	0.093	0.108	0.138	0.149
Impurity E	0.042	0.050	0.084	0.100	0.126	0.140
Impurity F	0.056	0.051	0.094	0.102	0.140	0.152
Impurity H	0.045	0.051	0.091	0.100	0.136	0.149
Impurity I	0.050	0.059	0.093	0.106	0.136	0.152

2.5 杂质控制限度研究

2.5.1 遗传毒性软件预测 绘制盐酸坦索罗辛及其已知杂质的化学结构,导入 Nexus 2.6 软件(包括 Derek 和 Sarah 模型)进行化合物的遗传毒性预测。Derek 模型通过毒理学专家文献、毒理学数据库等信息,结合化合物在数据库中所匹配的警示结构预测化合物的遗传毒性。Sarah 模型则基于统计学算法,从 Ames 突变实验数据出发,构建统计模型,通

过搜索匹配已知毒性风险化合物结构片段,预测化合物的遗传毒性。本研究采用 ICH M7 分类模式,定义盐酸坦索罗辛为原料药(API),对 8 个已知杂质进行遗传毒性预测。计算机构效关系(QSAR)技术筛选评估结果显示,盐酸坦索罗辛杂质 I 具有烷基卤化物警示结构,预测结果为阳性,ICH M7 分类为 3 类,其他杂质均为阴性,ICH M7 分类为 5 类,结果见表 5。

表5 盐酸坦索罗辛杂质遗传毒性预测结果

Tab. 5 Genotoxicity prediction results of tamsulosin hydrochloride impurities

Name	Derek	Sarah	Alerts	Experimental data	ICH M7 class	Overall in silico
Impurity A	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity B	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity C	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity D	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity E	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity F	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity H	Inactive	Negative	/	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class5	Negative
Impurity I	Plausible	Equivocal	Alert027-Alkyl halide	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Class3	Positive

注:Inactive - 查询结构未匹配到 Derek 数据库中 Ames 试验遗传毒性警示结构或实例;Negative - 查询结构在 Ames 试验中被预测为阴性,即不具有遗传毒性;Plausible - 有足够比例的数据支持该结构为阳性,即具有遗传毒性;Equivocal - 无法根据已有的数据库资料对该结构的遗传毒性作出明确的预测,因此结果是模棱两可的。

Note: Inactive - the query structure does not match any structural alerts or examples in Derek which show activity in a bacterial reverse mutation assay (Ames test); Negative - the query structure is predicted to be negative in a Ames test; Plausible - the weight of evidence supports the proposition; Equivocal - a strong argument cannot be made based on the training set compounds and any hypotheses generated for the query compound for either activity or inactivity in a Ames test. In the absence of a strong overall signal, an equivocal call has been made.

2.5.2 杂质 I 的限度 软件预测结果显示盐酸坦索罗辛杂质 I 具有遗传毒性警示结构: Alert027-Alkyl halide, 结构见图 6, 烷基卤化物具有亲电性结构, 可以通过与 DNA 碱基上的亲核基团反应生成 DNA 加合物, 产生遗传毒性。Derek 数据库中 Ames 试验结果表明一级和二级烷基卤化物均有一定的致突变性。因此, 盐酸坦索罗辛杂质 I 的软件预测结果为阳性, ICH M7 分类为 3 类。

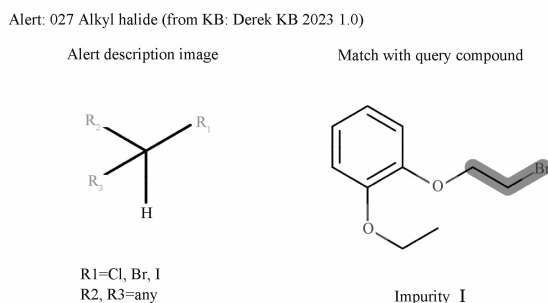


图 6 盐酸坦索罗辛杂质 I 的警示结构图
Fig. 6 The alert of tamsulosin hydrochloride impurity I

根据 ICH M7 (R2) 指导原则《评估和控制药物中 DNA 反应性 (致突变) 杂质以限制潜在致癌风险》^[7], 第 3 类杂质为具有警示结构、与原料药结构无关、无致突变数据的化合物。该类杂质应按照适宜的毒理学关注阈值 (TTC) 控制不超过可接受限度, 或进一步开展细菌致突变试验进行研究。在使用 TTC 值评估原料药和制剂中的致突变杂质的可接受限度时, 宜采用 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 的杂质限度, 对应理论上额外增加 1×10^{-5} 的患癌风险^[8,9]。根据 TTC 值计算遗传毒性杂质限度 (公式 1)。

$$\text{杂质限度}(\%) = \frac{\text{TTC}(1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1})}{\text{每日剂量}(\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1})} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

盐酸坦索罗辛制剂的成人剂量为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$, 按照 TTC 值为 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 计算, 杂质 I 的限度应为 0.75%。因盐酸坦索罗辛的每日给药剂量较低, 所以该杂质的计算限度远高于 EP 和 USP 标准中盐酸坦索罗辛一般杂质的限度 0.1%。因此, 为了有效控制产品质量风险, 结合样品中杂质 I 实际测定结果, 建议参照 ICH Q3A 杂质限度控制要求^[10] 拟定盐酸坦索罗辛杂质 I 的限度为 0.1%。

2.5.3 其他杂质的限度 其他已知杂质遗传毒性的软件预测结果均为阴性, ICH M7 分类为 5 类, 建议参考 EP 和 USP 一般杂质限度拟定盐酸坦索罗辛

各已知杂质的限度为 0.1%。EP 和 USP 盐酸坦索罗辛有关物质标准限度规定: “单个未知杂质的峰面积不得大于对照溶液的主峰面积 (0.10%)”。建议拟定标准限度为: “供试品溶液色谱图中如有与杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 保留时间一致的色谱峰, 其峰面积乘以校正因子 (杂质 A、B、C、D、E、F、H、I 校正因子依次为 1.0、1.0、1.0、0.9、0.4、1.2、0.8、1.3) 后均不得大于对照溶液主峰面积 (0.1%)”, 其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积 (0.1%)”。本研究建立的加校正因子的主成分自身对照法在检测各杂质的含量时, 与对照溶液的主峰面积进行比较, 杂质的峰面积不得大于对照溶液的主峰面积。因此, 限度规定括号内的 0.1% 与 EP 和 USP 标准中的 0.10% 的表述基本一致。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

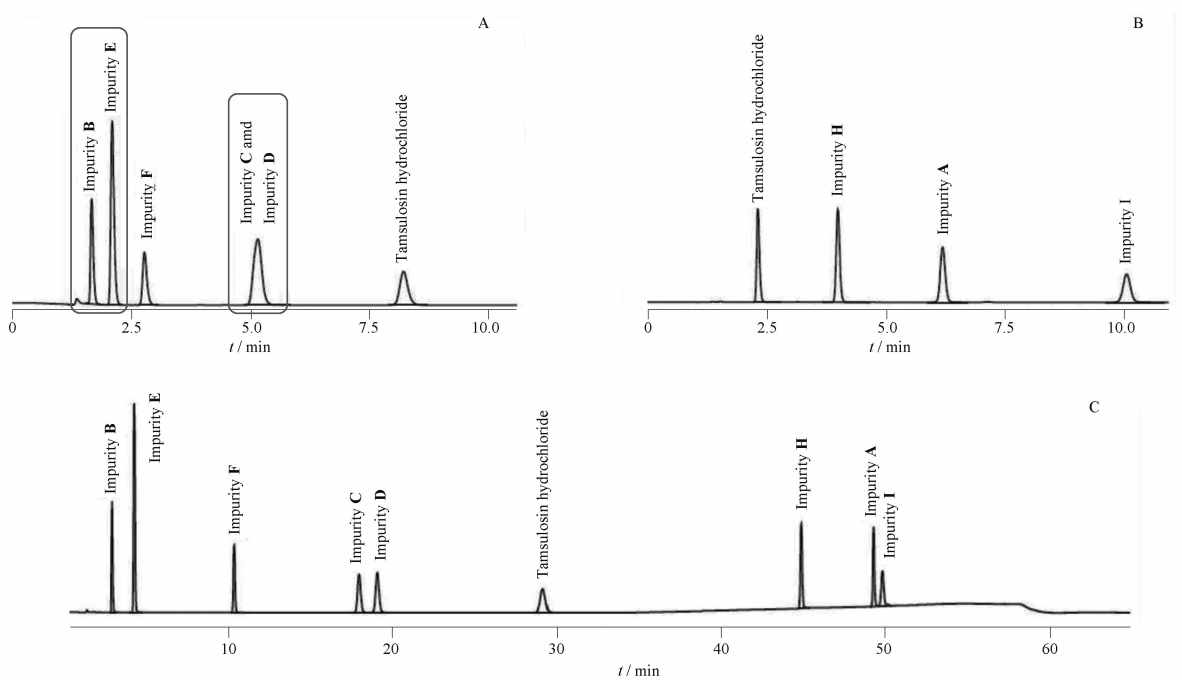
紫外-可见光谱扫描结果显示, 盐酸坦索罗辛的最大吸收波长为 225.2 和 279.8 nm, 在 225.2 nm 波长处的吸光度约是 279.8 nm 处吸光度的 3.5 倍。盐酸坦索罗辛不同生产企业的标准分别使用了 223 和 225 nm 波长进行有关物质检查, 研究比较了上述 2 个波长的测定结果, 在 225 nm 波长下的图谱基线相对较平稳。同时, EP11.0 和 USP2023 标准中盐酸坦索罗辛标有关物质检查均采用了 225 nm 的波长进行检测。综上, 本研究选择 225 nm 作为盐酸坦索罗辛有关物质的检测波长。

3.2 流动相的优化

当采用 EP 和 USP 盐酸坦索罗辛标准有关物质方法 1 规定的流动相 A-流动相 B (70:30) 等度洗脱时, 已知杂质 C 与杂质 D 无法有效分离, 典型图谱见图 7, 尝试其他比例的等度洗脱时杂质分离效果均不理想。因此, 本研究选择了与 EP 和 USP 标准中相同的流动相, 即以高氯酸盐缓冲液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 考察了系列梯度洗脱方式, 优化之后的梯度洗脱方法可以有效的分离盐酸坦索罗辛及其 8 个已知杂质, 杂质 B 和杂质 E 均可在保留时间 2.5 min 之后出峰, 典型图谱见图 7。该法可以将 EP 和 USP 盐酸坦索罗辛标准有关物质方法 1 和方法 2 合并进行检测, 提高检测效率。

3.3 色谱柱的选择

本研究在方法开发初期采用型号为 ZORBAX SB-C₁₈ 的色谱柱时选择了规格 1 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 和规格 2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 的 2 种



A - EP 有关物质方法 1; B - EP 有关物质方法 2; C - 本研究建立方法。

A - EP method 1; B - EP method 2; C - the established method.

图 7 盐酸坦索罗辛已知杂质混合对照品溶液典型色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of mixed reference solution of tamsulosin hydrochloride and its impurities

色谱柱进行试验,结果杂质 C 与杂质 D 色谱峰、杂质 A 与杂质 I 色谱峰之间的分离度均小于 1.5。因此,研究选择规格 3 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 后,各杂质峰的分度均符合要求。继续考察了不同批号的 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 和 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 分离效果,各组分峰之间分离度均大于 2.0。试验结果说明, C₁₈ 色谱柱填料的粒径对杂质 C 与杂质 D 色谱峰以及杂质 A 与杂质 I 色谱峰之间的分离度有一定的影响, 3.5 μm 粒径的填料对于上述杂质的分离效果较好。

3.4 质量与工艺分析

3 家企业生产的 9 批次盐酸坦索罗辛原料药按建立的方法进行有关物质分析,结果显示各已知杂质及未知杂质的含量均在 0.1% 以下,杂质总量在 0.2% 以下,总体质量水平较高。各企业的样品检出杂质的种类相同,见图 8,可以推测 3 家原料药生产企业的合成工艺基本一致。工艺杂质中的合成氧化产物杂质 E 和副产物杂质 F 均小于检测限 (< LOD),副产物杂质 D 的含量 < 0.003%,说明合成工艺水平良好。但是,3 家企业样品均检出了含量约为 0.01% 的起始原料杂质 B 和杂质 I,企业应持续关注不同批次间该 2 种杂质的含量变化趋势,结

合纯化工艺参数的控制情况,合理评价纯化工艺对起始物料杂质的去除能力。各企业样品均检出了较高含量的工艺杂质 A,企业 I 样品的杂质 A 的平均含量为 0.06%,企业 III 样品的杂质 A 的平均含量为 0.04%。杂质 A 为合成工艺中盐酸坦索罗辛与起始物料杂质 I 反应生成,见图 1,提示生产企业应关注该杂质批间含量差异变化情况,是否有含量接近 0.1% 限度值的异常趋势,结合工艺可行性、经济性等综合因素,考虑优化提纯工艺,通过分离纯化来减少盐酸坦索罗辛原料药中杂质 A 的含量。必要时,可以进一步优化合成工艺,通过控制反应速率,调整起始物料投料量等降低杂质 A 的反应生成,提高产品的质量水平。

4 结论

本研究建立了加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸坦索罗辛的有关物质,方法学验证结果良好。该法将欧洲药典 (EP) 和美国药典 (USP) 载收的盐酸坦索罗辛标准有关物质检查项下两法合并成一法,采用加校正因子的主成分自身对照法进行已知杂质定量,提高了检测效率和方法的准确度。使用本文建立的方法对 3 家企业的样品进行有关物质检测,结果显示各企业生产的盐酸坦索罗辛原料药

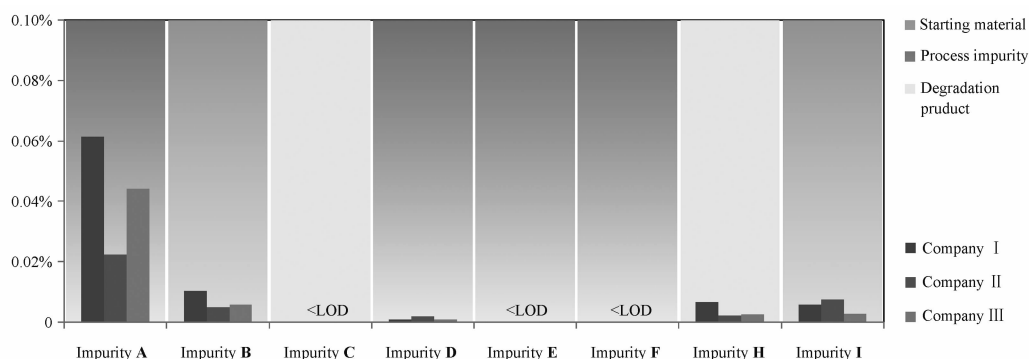


图8 3家企业生产的9批次盐酸坦索罗辛原料药检出杂质情况柱状图

Fig. 8 Histogram of impurities detected in 9 batches of tamsulosin hydrochloride raw materials produced by 3 enterprises

质量稳定,通过杂质来源分析,提示企业在该品种的生产工艺上仍有提升的空间。此外,采用 Nexus 2.6 软件对各已知杂质的遗传毒性进行预测,为杂质的限度制定提供了依据。因此,本研究建立的盐酸坦索罗辛有关物质分析方法及拟定的杂质限度可用于盐酸坦索罗辛原料药的质量控制,可为《中国药典》标准的制修订提供参考。

REFERENCES

[1] ZHANG X R, WU D L, CHEN R, *et al.* Randomized controlled study on the monotherapy of tamsulosin in the treatment of low-risk prostate hyperplasia[J]. *J Clin Urol*(临床泌尿外科杂志), 2009, 24(4):318-320.

[2] YU J R. The clinical application of tamsulosin hydrochloride[J]. *Strait Pharm J*(海峡药理学), 2006, 18(1):143-145.

[3] WANG K, SUN P, MA Y, *et al.* Determination of diketo aldehyde in dihydroartemisinin bulk drug by principal component reference substances external standard method with correction factor [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2020, 55(1):52-57.

[4] ZHU X P, CHEN A P, DAI Y Z. HPLC method with correction factor for determination of related substances in compound

ezetimibe and rosuvastatin calcium tablets[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2017, 52(2):140-146.

[5] ZHU Q F, WANG W J. Application of (Q) SAR analysis in the genotoxic evaluation of drug impurities[J]. *Chin J Drug Eval*(中国药物评价), 2021, 38(5):371-374.

[6] ZHU Q F, WEI X, WANG W J, *et al.* Assessment of 5-hydroxymethylfurfural as an impurity in drugs based on its genotoxicity [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2018, 38(3):485-489.

[7] ICH. M7(R2): assessment and control of DNA reactive(mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk[EB/OL]. 2023 [2023-04-03]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf.

[8] HE W, WANG H X. General consideration for validation of impurity limitation in drug development[J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2009, 40(10):787-790.

[9] ZHU Q F, WEI X, GEGN X, *et al.* Assessment and control of two class 1 genotoxic impurities in levodropropizine and calcium dobesilate[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2018, 38(2):354-358.

[10] ICH. Q3B(R2): impurities in new drug products[EB/OL]. 2006 [2006-06-02]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>.

(收稿日期:2023-12-13)