

·国家药监局重点实验室·麻精药品质量研究专题·

中图分类号: R927.2; R971⁺.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)09-0011-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.09.004

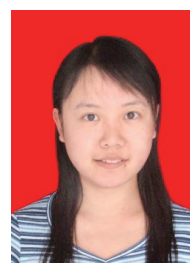


盐酸布比卡因注射液中基因毒性杂质含量测定与来源分析*

周冰捷¹, 王非梦^{1,2}, 李超¹, 罗立骏¹, 徐登¹, 冯琴¹, 梁静^{1△}

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院·国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室, 重庆 401121;
2. 西南大学药学院, 重庆 400716)

专家简介:梁静,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药物分析及检验。主研并参与国家级、省级科研课题多项。完成国家药品标准提高课题5项,并已被增订入《中国药典》。获国家发明专利5项。发表SCI论文2篇, EI论文1篇。



摘要:目的 建立测定盐酸布比卡因注射液中基因毒性杂质2,6-二甲苯胺(杂质F)含量的高效液相色谱法,探讨杂质F的产生原因。方法 色谱柱为Xbridge Shield RP18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为[0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.0)-乙腈(65:35,V/V)]-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为240 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。从原料药合成工艺、辅料、制剂生产工艺、制剂所用原料药4个方面,抽取5家生产企业94批样品进行杂质F的检测和对比,分析基因毒性杂质F的产生原因。结果 杂质F的质量浓度在0.15~3 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=1.0000, n=5$);精密度、重复性试验结果的RSD分别为0.42%($n=6$)和9.27%($n=6$);加样回收率为99.41%,RSD为2.06%($n=9$)。生产企业B,D,F,G的85批样品中均未检出杂质F;企业E的9批样品中均检出杂质F,检出量分别为0.0004%,0.0004%,0.0004%,0.0006%,0.0005%,0.0005%,0.0004%,0.0004%,0.0003%。结论 该方法专属性强、重复性好、精密度高,可为杂质F的定量检测和制剂的质量控制提供参考。建议各制剂生产企业重视基因毒性杂质F的质量控制,尽快建立企业的内控标准,同时对原料药进行严格的入库质控,从源头控制杂质F的引入风险。

关键词:盐酸布比卡因注射液;高效液相色谱法;2,6-二甲苯胺;生产工艺

Content Determination and Source Analysis of Genotoxic Impurity in Bupivacaine Hydrochloride Injection

ZHOU Bingjie¹, WANG Feimeng^{1,2}, LI Chao¹, LUO Lijun¹, XU Deng¹, FENG Qin¹, LIANG Jing¹

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, Chongqing, China 401121; 2. School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China 400716)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of genotoxic impurity 2,6-dimethylaniline (impurity F) in Bupivacaine Hydrochloride Injection, and to investigate the source of impurity F. **Methods** The chromatography column was Xbridge Shield RP18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was [0.05 mol/L phosphate buffer (pH = 8.0) - acetonitrile (65 : 35, V / V)] - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 240 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The content of impurity F in 94 batches of samples from five manufacturers was detected and compared from the aspects of active pharmaceutical ingredients (API), synthesis process, excipients, preparation production process, and API used in preparation, and the source of genotoxic impurity F was analyzed. **Results** The linear range of impurity F was 0.15 - 3 μg / mL ($r = 1.0000, n = 5$). The RSDs of precision and repeatability test results were 0.42% ($n = 6$) and 9.27% ($n = 6$), respectively. The recovery rate of impurity F was 99.41% with an RSD of 2.06% ($n = 9$). Impurity F was not detected in 85 batches of samples from manufacturers B, D, F, and G, while that was detected in nine batches of samples from manufacturer E, with contents of 0.0004%, 0.0004%, 0.0004%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0004%, and 0.0003%, respectively. **Conclusion** This method has strong specificity, good repeatability, and high precision, which can provide a reference for the quantitative detection of impurity F and the quality control of preparations. It is recommended that all manufacturers should pay attention to controlling the content of genotoxic impurity F, establish internal control standards as soon as possible, and strictly control the quality of purchased API in the warehouse to control the introduction risk of impurity F from the source.

Key words: Bupivacaine Hydrochloride Injection; HPLC; 2,6-dimethylaniline; production process

*基金项目:重庆市技术创新与应用发展专项面上项目[CSTB2022TIAD-GPX0071]。

第一作者:周冰捷,女,硕士,工程师,研究方向为药物分析,(电子信箱)zhoubingjie@cqifdc.org.cn。

△通信作者:梁静,女,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析与药品质量,(电子信箱)liangjing@cqifdc.org.cn。

盐酸布比卡因注射液是一种长效酰胺类局部麻醉药,用于局部浸润麻醉、外周神经阻滞和椎管内阻滞,麻醉和镇痛作用强烈,药效持续时间较长,能有效改善患者的预后,可避免阿片类药物造成的过度镇静及呼吸抑制等不良反应^[1-3],临床应用范围较广^[4]。但制备过程中部分杂质的引入会影响制剂的安全性,其中2,6-二甲基苯胺(杂质F)是制备布比卡因等酰胺类局部麻醉药的关键起始物料^[5-6]。杂质F是一种基因毒性杂质,可直接或间接损伤细胞DNA,具有基因毒性和致癌作用,已被世界卫生组织国际癌症研究机构列为2B类致癌物,必须严格控制含量^[7-13]。盐酸布比卡因注射液现行质量标准中均未对杂质F进行有效控制^[14]。药品标准能否准确控制有关物质直接关系到药品的质量可控性与安全性^[15-16],其中基因毒性杂质的研究至关重要^[7]。本研究中建立了测定盐酸布比卡因注射液中基因毒性杂质F含量的高效液相色谱法,并从原料药合成工艺、辅料、制剂生产工艺、制剂所用原料药4个方面对5家生产企业提供的样品进行杂质F的检测和分析,以更好地控制和评价药品质量,并为后续药品标准的修订提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);XSE204 型电子天平(精度为 0.1 mg),Quintix 224 - 1CN 型电子天平(精度为 0.01 mg),均购自瑞士 Mettler Toledo 公司;SB25 - 12DT 型新芝超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为 600 W,频率为 50 kHz)。

1.2 试剂

盐酸布比卡因原料药(生产企业 A - C,共 9 批);盐酸布比卡因注射液(生产企业 B, D - G,共 94 批);盐酸布比卡因对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 101034 - 202103,含量为 94.6%);杂质 F 对照品(美国 Sinco Pharmachem,批号为 18 - 10 - 1501,含量为 99.48%);乙腈为色谱纯,水为二次纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

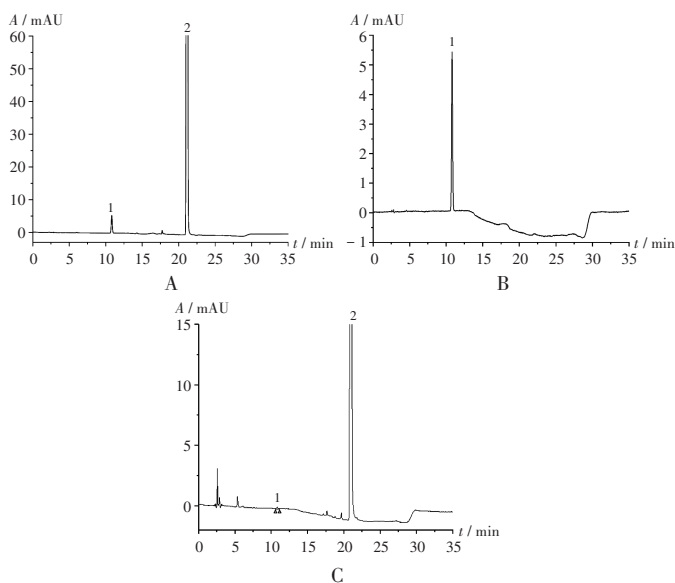
色谱柱:Xbridge Shield RP18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.8 g 与氢氧化钠 1.87 g,加水至 1 000 mL,调 pH 至 8.0) - 乙腈(65:35, V/V),B 为乙腈,梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.0 mL/min;检测波长:240 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。在此色谱条件下,系统适用性溶液色谱图中,出峰顺序依次为杂质 F 和布比卡因,且两峰间的分离度符合要求;对照品溶液色谱图中,理论

板数按布比卡因峰计大于 3 000,且杂质 F 峰高的信噪比(S/N)大于 10。色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase (%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0 min	100	0	25 min	60	40
10 min	100	0	26 min	100	0
15 min	60	40	35 min	100	0



1. 杂质 F 2. 布比卡因

A. 系统适用性溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Impurity F 2. Bupivacaine

A. System suitability solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

2.2 溶液制备

供试品溶液:取样品,即得。

对照品溶液:取杂质 F 对照品适量,精密称定,用流动相 A 稀释成每 1 mL 约含杂质 F 1.5 μg 的溶液,摇匀,即得。

系统适用性溶液:取盐酸布比卡因和杂质 F 对照品各适量,精密称定,用流动相 A 稀释成每 1 mL 约含盐酸布比卡因 5 mg 和杂质 F 1.5 μg 的混合溶液,摇匀,即得。

空白辅料溶液:取除主药的辅料 2.0 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 70% 容量瓶体积的流动相 A,振摇至完全崩散,超声并不时强烈振摇,冷却至室温,用流动相 A 稀释并定容,摇匀,离心,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下空白辅料溶剂,按 2.1 项下色谱条件进样测定,结果表明空白辅料溶液无干扰。

线性关系考察:取杂质 F 对照品适量,精密称定,用流动相 A 定量稀释成每 1 mL 分别含杂质 F 0.15, 0.75, 1.5, 2.25, 3.00 μg 的溶液,摇匀,精密量取上述溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以

杂质F的质量浓度($C, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 25\ 224\ C - 343.45$ ($r = 1.000\ 0, n = 5$)。结果表明,杂质F的质量浓度在 $0.15 \sim 3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果峰面积的RSD为0.42%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品6瓶,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的RSD为9.27%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取杂质F对照品适量,精密称定,共9份,用供试品溶液稀释成每1 mL含杂质F 0.75, 1.5, 2.25 μg 的溶液,各3份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果平均回收率为99.41%,RSD为2.06%($n = 9$),表明方法准确度良好。

2.4 杂质F含量测定

取生产企业B, D, E, F, G的94批样品,按2.1项下色谱条件进样测定。结果生产企业B, D, F, G的85批样品中均未检出杂质F;企业E的9批样品中均检出杂质F,含量分别为0.000 4%, 0.000 4%, 0.000 4%, 0.000 6%, 0.000 5%, 0.000 5%, 0.000 4%, 0.000 4%, 0.000 3%。

3 讨论

3.1 杂质F来源

3.1.1 原料药合成工艺

盐酸布比卡因原料药的国内生产企业有3家,分别为生产企业A、生产企业B和生产企业C。本次国家药品抽验样品所用原料药上述3家生产企业均有涉及,调查发现,原料药的合成路线基本一致,起始物均由 $N-(2',6'-二甲苯基)-2-$ 哌啶甲酰胺(杂质B)和溴代正丁烷通过缩合反应生成布比卡因碱基,再经脱碱基生成盐酸布比卡因。

通过分析原料药的合成工艺认为,在原料药合成过程中有2个风险点可能会引入杂质F。风险点1,杂质F为起始反应物料盐酸布比卡因杂质B的副产物,有可能由杂质B引入;风险点2,根据强降解试验结果,在强酸条件下,布比卡因会降解产生杂质F,在合成路线中,布比卡因碱基酸化得到布比卡因,盐酸与布比卡因会结合成盐酸盐的形式,从而引入杂质F。本研究中按2.1项下色谱条件测定原料药生产企业A, B, C的9批样品,结果均未检出杂质F,表明各原料药生产企业对该基因毒性杂质的风险控制良好。

3.1.2 辅料

盐酸布比卡因注射液的辅料单一,抽检的5家生产企业均仅以0.9%氯化钠溶液作为等渗调节剂。按2.1项下有关物质检查方法,对生产企业B, D, E, G提供的

样品进行杂质F检查(企业F未能提供原辅料),结果均未检出杂质F。

3.1.3 制剂生产工艺

制剂生产工艺:根据影响因素试验和强降解试验结果,在强酸条件下,布比卡因会降解产生杂质F,而在强碱、光照、高温和氧化的强破坏条件下均未产生杂质F。对比各制剂生产企业的生产工艺发现,其生产工艺步骤基本一致,且整个生产过程不会用到强酸和浓酸,均以氢氧化钠溶液调节pH。可见,制剂的生产及储存过程中均不会降解产生杂质F。

模拟活性炭生产工艺:在盐酸布比卡因注射液的生产过程中,生产企业B, E, F均以活性炭作吸附剂进行热源吸附、除杂、脱色。其中,生产企业B和E在浓配步骤中加入0.1%活性炭,煮沸,保温搅拌20 min。通过模拟生产企业B和E的实际工艺条件,按各处方的用量,分别配制原料药溶液、原料药+氯化钠溶液、原料药+氯化钠+活性炭溶液,煮沸,保温搅拌30 min,考察活性炭的引入对杂质谱的影响。结果生产企业B和E的样品中均未检出杂质F,表明活性炭的使用并不会引入杂质F。但生产企业B和E的产品在生产过程中引入活性炭后,杂质谱的数量和含量均出现增长。对比不同企业的杂质检测结果可知,未使用活性炭的生产企业D和G的样品杂质谱的数量和含量均较低,而使用了活性炭的生产企业B, E, F的样品杂质谱的数量和含量均较高,表明活性炭的使用存在引入其他未知杂质的风险。

模拟高压灭菌试验:生产企业E的灭菌温度为 $100\ ^\circ\text{C}$,灭菌时间为30 min。通过模拟灭菌工艺条件,考察灭菌工艺对生产企业E和F的样品中杂质F含量的影响。结果表明,灭菌工艺并未引起生产企业E和F的样品中杂质F的含量变化,表明灭菌工艺不会使盐酸布比卡因降解产生杂质F。

3.1.4 制剂所用原料药

经调研和追溯发现,在抽检的生产企业E的产品中,有部分批次产品的原料药供货商及批号与生产企业F的部分批次产品所用原料药一致。生产企业A提供了2批(批号分别为C053-210402, C053-211002)原料药的留样,2批原料药中均未检出杂质F;采用相同批次原料药的生产企业F的注射剂产品中也均未检出杂质F。

3.2 结语

所建立的方法专属性强、重复性好、精密度高,可为杂质F的定量检测和制剂的质量控制提供参考。此外,从原料药及合成工艺、辅料、制剂生产工艺、制剂所用原料药4个方面探讨了杂质F的来源,认为杂质F不会在盐酸布比卡因注射液的生产过程中降解产生,但通过原料药引入的可能性较大。因此,建议制剂生产企