

有关物质检查方法建立的思路

在新药研发过程中，有关物质检测方法的建立至关重要，它是合成研究人员的“眼睛”，甚至可助研究工作突破难关，也是产品质量的保证。有关物质方法学的研究是根据不同样品的不同性质，不同要求进行的，没有固定的格式和固定的内容，但基本的方向是一致的，在此基础上不断的完善和改进，从而使测定药物有关物质的方法更准确，更先进，更有专属性，然而如何理清思路，快刀斩乱麻？如何将工作步骤化繁为简？本篇就此从以下方面来介绍。

1 了解原料药和制剂的相关理化性质

1.1 对于原料药，了解原料药的基本性质和结构特点。了解原料药合成工艺过程中的起始原料、副产物、副产物产生的杂质、中间体或可能产生的降解产物等。结合相关已知的杂质来确定有关物质检测的条件。

1.2 对于制剂，可能影响药物有关物质的重要因素有辅料、剂型、存储条件等，主要了解辅料对有关物质检测的干扰情况，不同剂型在不同存贮条件下可能产生的杂质等。对于复方制剂，同时要考虑复方中原料的相互作用可能产生的杂质等。

2 有关物质检查的方法选择

2.1 对于已有 EP、BP、USP 等质量标准的仿制药，首选以上的色谱条件进行筛选，尤其关注离子对试剂的使用。

2.2 选用不同色谱条件进行对比研究，如果方法一是等度测定的，方法二最好选用梯度色谱条件，对所筛选的方法进行系统的方法学研究，比较不同检测方法的优劣，选择较好的色谱条件为本品有关物质检查的测定方法。

2.3 对于仿制药同时要将自制样品与市售原研样品进行全面的质量比较，分析其杂质的种类和含量，确保自制样品与市售原研样品的杂质在同一水平。

3 有关物质分析方法的验证

3.1 检测波长的选择

简而言之，有关物质的检测波长应结合主成分与杂质的最大吸收波长进行选择，其确定方法如下：

分别称取待测供试品、对照品、空白辅料、市售对照样品适量，用流动相溶解并稀释到一定浓度，配制成对照品溶液、供试品溶液以及空白辅料溶液，分别采用 DAD 检测器进行全波长扫描，确定待测物质中各杂质的最大吸收波长、主峰的最大吸收波长以及空白辅料的干扰情况等，有杂质对照品的同时进行扫描，或 HPLC 进行测定，必要时可将供试品溶液适当破坏后测定各降解产物的最大吸收波长。

判断标准：根据测定结果确定有关物质测定的最佳检测波长。

3.2 专属性试验

专属性是指在其它成分可能共存的情况下，采用的方法能准确测定出待测杂质的特性。

3.2.1 对于原料药，可根据其合成工艺，采用各步反应的中间体（尤其是后 3 步反应的中间体）、立体异构体、粗品、重结晶母液等作为测试品进行系统适应性研究，考察产品中各杂质峰及主成分峰之间的分离度是否符合要求，从而验证分析方法对工艺杂质的分离能力。

3.2.2 根据药物的化学结构特点、制剂的处方与工艺、储存条件等，选用合适的酸、碱、光、热、湿、氧化反应等加速破坏性试验来验证分析方法的专属性。

3.2.3 强制降解试验在试验过程中，应注意破坏性试验要适度，应着重考察敏感条件。如在一定条件下稳定，则没必要再提高条件的剧烈程度进行重复试验。破坏试验的程度暂无统一要求，一般以强力破坏后主成分的含量仍占绝大部分为宜（10~20%）。要达到这种破坏程度，需要在研究过程中进行摸索，先通过初步试验了解样品对光、热、湿、酸、碱、氧化条件的基本稳定情况，然后进一步调整破坏性试验条件（如光照强度、酸碱浓度、破坏的时间、温度等），以得到能充分反映降解产物与主成分分离的结果和图谱。

3.3 检测限与定量限

检测限系指样品中的被分析物能够被检测到的最低量，是反映分析方法灵敏度的一个重要指标；最低检测限不得大于该杂质的报

告限，以保证能检出需控制的杂质。

测定方法：取待测物质对照品适量，加流动相配制成一定浓度的对照品溶液，逐级稀释，以信噪比为 3：1 时相应的浓度或注入仪器的量确定检测限。同时将信噪比为 3：1 的样品溶液重复进样 6 针，以峰面积计算相对标准偏差。

判断标准：检测限浓度下样品峰面积的相对标准偏差应 \leq 20%，以达到检测限时的供试品溶液浓度作为依据。

定量限是指待测杂质能够被定量测定的最低量。定量限体现了分析方法是否具备灵敏的定量检测能力。杂质定量试验，需考察方法的定量限，以保证含量很低的杂质能够被准确测定。

测定方法：取待测物质对照品适量，加流动相配制成一定浓度的对照品溶液，逐级稀释，以信噪比为 10：1 时相应的浓度或注入仪器的量确定检测限。同时将信噪比为 10：1 的样品溶液进样 6 针，以峰面积计算相对标准偏差。

判断标准：定量限浓度下样品峰面积的相对标准偏差应不大于 10%。

3.4 系统适应性

系统适应性试验主要是考察主成分与杂质的分离情况以及主峰参数信息,如理论塔板数、拖尾因子、分离度等，均应符合测定要求。

试验方法：取空白溶液（制剂有关物质测定时应加上空白辅料），运行一针或多针，直至系统平衡好。再取杂质对照品加主成

分限度浓度对照溶液，连续进样 6 针，查看杂质及主成分理论板数、分离度、重复性和拖尾因子是否符合要求。

判断标准：主峰峰面积的 RSD 应不大于 2.0%，主峰保留时间的 RSD 应不大于 1.0%。另外，主峰的拖尾因子不得大于 2.0，主峰与杂质峰必须达到基线分离，主峰的理论塔板数应符合质量标准的规定。

3.5 精密度试验

精密度试验包括：重复性试验、中间精密度试验等。重复性系指在同样的操作条件下，在较短时间间隔内，由同一分析人员测定所得结果的精密度。重复性测定可在规定范围内，至少用 9 次测定结果进行评价，如制备 3 个不同浓度的试样，各测定 3 次，或 100% 的浓度水平，用至少测定 6 次的结果进行评价。中间精密度系指在同一实验室，由于实验室内部条件改变，如时间、分析人员、仪器设备、测定结果的精密度。验证设计方案中的变动因素一般为日期、分析人员、设备，考察在不同因素变动的条件下测定结果的标准偏差。

重复性试验方法：配制 6 份相同浓度的杂质对照品溶液，由同一分析人员在相同的条件下进行测试，计算所得 6 份杂质含量数据的相对标准差。

中间精密度试验方法：配制 6 份相同浓度的杂质对照品溶液，分别由两个分析人员使用不同的仪器在不同时间进行测试，计算所得 12 份杂质含量数据的相对标准差。

判断标准：所得杂质含量数据的 RSD 应不大于 2%。

3.6 溶液稳定性试验

考察样品在配制溶剂中的杂质与主峰的稳定性，取一定浓度的样品溶液，分别于不同时间取样测定杂质与主峰的峰面积，以相对标准偏差来表示不同时间测定结果的稳定性。

判断标准：实验结果 RSD 不大于 2.0%，说明在测定时间内的样品溶液稳定性良好。

3.7 耐用性试验

耐用性试验是指测定条件发生小的变动时，测定结果不受影响的承受程度。一般系统变化条件为分别考察流动相比例变化 $\pm 5\%$ 、流动相 pH 值变化 ± 0.2 、柱温变化 $\pm 5^\circ\text{C}$ 、检测波长变化 $\pm 5\text{nm}$ 、流速相对值变化 $\pm 20\%$ 以及采用三根不同批号的色谱柱进行测定时，仪器色谱行为的变化，每个条件下各测试 3 次。

判断标准：各杂质峰的拖尾因子不得大于 2.0，杂质峰与其他成分峰必须达到基线分离；各条件下的杂质含量数据 ($n=6$) 的 RSD 应不大于 2.0%，杂质含量的绝对值在 $\pm 0.1\%$ 以内。特殊样品如果色谱条件变化比较敏感的，可适当降低变化范围。

4 有关物质杂质的定量方法

有关物质杂质的定量方法根据杂质与主成分的最大吸收波长及校正因子来确定。若杂质与主峰的吸收波长基本一致，则一般采用自身对照法或峰面积归一化法；若杂质与主峰的吸收波长差异

范围较小，校正因子在 0.9 ~ 1.1 之间，则可采用不加校正因子的主成分自身对照法；超出该范围，校正因子在 0.2 ~ 5.0 范围以内时，采用主成分自身对照法的定量方式，须用校正因子进行校正；若杂质与主峰的吸收波长相差较大，校正因子在 0.2 ~ 5.0 范围以外时，不能通过校正因子校正，需采用外标法进行测定。

4.1 杂质对照品法（标准曲线法）

外标法定量比较准确，采用外标法进行测定时，应进行相应的方法学研究。线性关系应在设计的测定范围内测定。可将供试液经精密稀释，或分别精密称样，制备一系列被测物质浓度进行测定，一般制备 6 个浓度，以测得的杂质峰面积作为被测物浓度的函数作图，观察是否呈线性，用最小二乘法进行线性回归计算。

备注：可将杂质的定量限浓度作为标准曲线线性浓度的最低点。

4.2 加校正因子的主成分自身对照法

采用加校正因子自身对照法应进行相应杂质的校正因子的测定（仅适用于已知杂质的控制），如果校正因子在 0.2 ~ 5.0 的范围内也可用加校正因子的主成分自身对照法。

4.2.1 校正因子的定义及特点

一般来讲，HPLC 定量测定中，物质的量 W 与色谱响应值（峰面积等） A 之间的比值称为绝对校正因子，即单位响应值（峰面积等）所对应的被测物质的量（浓度或质量）；而某物质 i 与所选定的参照物质 s 的绝对校正因子之比，即为相对校正因子，即通常所讲的校正因子。但这种方法有时会因不同仪器及色谱条件的波动，可产生一定

范围的误差，需进行充分的方法耐用性验证，并结合色谱峰定位控制等措施，将误差控制在一定范围内。

4.2.2 校正因子测定的要求

4.2.2.1 测定校正因子的各杂质与主成分的对照品，应符合对照品的要求。

4.2.2.2 确定校正因子的分析方法应与最终确定的质量标准方法一致，色谱条件等需经筛选优化后确定，如有变更，需考虑对校正因子的影响，必要时重新确定。

4.2.2.3 要关注影响待测物紫外吸收的各种因素，如溶液制备所用溶剂最好与最终确定的流动相相同，检测波长最好在特定杂质及主成分紫外吸收曲线的峰或谷处，避开吸收值急剧变化波段，以保证测定方法具有较好的耐用性，并保持测定结果的恒定。

4.2.3 校正因子的测定

4.2.3.1 单浓度点测定：制备适当浓度的杂质对照品溶液和主成分对照品溶液，分别测定杂质与主成分的绝对校正因子，通过两者比值得到校正因子。

4.2.3.2 多浓度点测定：制备适当的高、中、低三水平浓度的杂质对照品溶液和主成分对照品溶液，分别进样测定，同法进行分别各点计算，求平均值并计算 RSD，得到校正因子。

4.2.3.3 标准曲线法测定：精密称取杂质对照品和主成分对照品，分别制备一系列浓度的溶液，分别进样后，按最小二乘法以进样量对峰面积进行线性回归，得两物质的标准曲线，两曲线斜率之

比即为校正因子。

4.2.3.4 吸收系数比值法：对于紫外检测器来讲，两物质的相对校正因子实际上也是两物质以流动相为溶剂，在检测波长处的紫外吸收系数之比，故可按吸收系数测定法的相关技术要求测定各自吸收系数，如对照品级别的标准物质、高中低三水平浓度测定、吸收度介于 0.3 ~ 0.8 之间、至少 5 台不同型号的 UV 分光光度计、2 份供试液同时平行制备测定、同台仪器 2 份供试液的平行测定结果不超过 $\pm 0.5\%$ 等。测定两物质的吸收系数后，经统计分析确定两物质吸收系数，计算比值，求得校正因子。

4.2.3.5 校正因子测定方法的选择：上述各方法中，前两法较为简捷，可以快捷地量化特定杂质与主成分紫外吸收特征的差异，多用于评估采用主成分自身对照法定量杂质时是否需要校正。但如采用加校正因子的主成分自身对照法定量杂质，需将标准物质赋值信息转化为校正因子固化在质量标准中，那么校正因子的准确性非常关键，校正因子的准确计算应符合更为严格的要求，需要考虑并控制求算校正因子过程中的各种误差因素，以及仪器通用性和色谱系统的耐用性等因素，以便使求得的常数更为准确并具代表性，此时采用后两法更为适宜。

在采用校正因子测定杂质的时候，要有加校正因子定量方式的合理性和测定结果的准确性的试验对比研究数据（研究数据应包括杂质对照品外标法、加校正因子的主成分自身对照法、不加校正因子的主成分自身对照法对相同多批样品杂质定量测定结果的对比数

据，作为是否需要校正或能否有效校正检测结果的支持与依据)。

4.3 不加校正因子的主成分自身对照法

不加校正因子的主成分自身对照法是杂质与主成分的响应因子基本相同(校正因子在 0.9 ~ 1.1)。一般情况下，如杂质与主成分的分子结构相似，其响应因子差别不会太大。

测定方法：称取供试品适量，加适当溶剂配制成一定浓度的供试品溶液，精密量取供试品溶液稀释到一定浓度(一般 1%)，作为对照溶液。供试品溶液中的杂质峰面积与对照溶液峰面积相比乘以稀释浓度即为供试品溶液中的杂质的含量。

4.4 峰面积归一化法

峰面积归一化法测定有关物质简便快捷，但因各杂质与主成分响应因子不一定相同、杂质量与主成分量不一定在同一线性范围内、仪器对微量杂质和常量主成分的积分精度及准确度不相同等因素，所以在质量标准中一般不采用峰面积归一化法计算有关物质，仅在合成工艺研究中作为中控方法。

有关物质杂质的分析主要是对样品中各杂质含量、数量，以及各杂质的来源进行分析，有关物质的杂质研究要贯穿在整个质量研究过程中，对于杂质含量超过 0.1%的未知杂质要确定其结构，遗传毒性等基本信息；对已知杂质和新增加的杂质均要分别控制，确定杂质的变化情况，同时结合 CTD 的要求，杂质分析部分对于杂质的名称、结构、来源、控制限度、是否定入质量标准等都有明确的要求。

5 有关物质杂质的分析和限度制订

有关物质杂质的分析主要是对样品中各杂质含量、数量，以及各杂质的来源进行分析，有关物质的杂质研究要贯穿在整个质量研究过程中，对含量超过 0.1% 的未知杂质要确定其结构，遗传毒性等基本信息；对已知杂质和新增加的杂质均要分别控制，确定杂质的变化情况，同时结合 CTD 的要求，杂质分析部分对于杂质的名称、结构、来源、控制限度、是否定入质量标准等都有明确的要求。

有关物质杂质限度的制订，首先应从安全性方面进行考虑，尤其对于有药理活性或毒性的物质，设定的杂质限度不能高于安全性数据所能支持的水平；其次在确保产品安全的前提下，杂质限度的确定主要基于中试规模以上产品的实测情况，应考虑生产的可行性及批与批之间的正常波动；考虑药品本身的稳定性及生产情况的误差，往往对限度做适当放宽。同时对于仿制药还应考虑原研样品的杂质的限度，自制样品应与原研样品的杂质在同一水平，如仍不能达到要求，则应做必要的安全性研究。



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE