

拉米夫定片参比制剂和 4 种仿制制剂的含量有关物质分析

LC-164

摘要：建立了一种使用岛津 LC-2030C 高效液相色谱仪结合网络版 LabSolutions CS 软件测定拉米夫定片含量及有关物质的方法，以 LabSolutions CS 软件对数据进行管理，有效地保障了数据的可靠性。本试验利用 LabSolutions CS 软件对系统适用性检查结果进行自动评价，结果表明拉米夫定及其各杂质峰之间的分离度符合要求。参比制剂和 4 种仿制制剂的含量均在标示量的 90%~110% 之间，有关物质的量均符合中国药典 2015 年版的限量规定，但仿制制剂与参比制剂的杂质谱存在一定的差异。

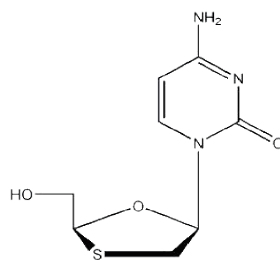
关键词：拉米夫定片 高效液相色谱 仿制药一致性评价 LabSolutions CS

拉米夫定片是临床抗乙肝病毒的重要药物，同时也是治疗艾滋病的核心药物，被列入了 2012 年版国家基本药物目录。该药品的活性成分为 (2R- 顺式)-4- 氨基 -1-(2- 羟甲基 -1,3- 氧硫杂环戊 -5- 基)-1H- 嘧啶 -2- 酮，对病毒 DNA 链的合成和延长有竞争性抑制作用。目前，拉米夫定片被 CFDA 批准的生产批件有 16 个，并有 26 个拉米夫定非注射剂型处于在审状态。根据 2016 年 CFDA 发布第 106 号文件关于贯彻落实《国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见》的相关要求，拉米夫定片属于一致性评价目录中的 289 种药品之一，原则上需在 2018 年底之前完成药品的一致性评价。

2017 年 5 月，CFDA 发布了 4 个仿制药质量和疗效一致性评价相关指导原则，从 4 个指导原则的核查要点、

判定原则等可以看出，CFDA 越来越关注核查中的关键细节，特别是药品申报中的重要数据完整性等，并将真实性、一致性、数据可靠性和合规性作为研究现场及生产现场核查的一项重要的基本要求。岛津网络版 CDS 系统以数据库形式对所有数据进行严格的一元化数据管理，完全符合法规要求，是保障色谱数据完整性和可靠性的有力工具。

含量和有关物质是药品的关键质量属性，也是仿制药一致性评价的重要内容。本文采用高效液相色谱法结合网络版 LabSolutions CS 软件对拉米夫定片参比制剂和 4 种市售品进行了含量和有关物质的对比分析。参考中国药典 2015 版拉米夫定片含量测定及有关物质测定项下方法，制定本实验方案。



拉米夫定结构

实验部分

1.1 药品与试剂

参比制剂：拉米夫定片（规格：100 mg，葛兰素威康公司）；4 种仿制制剂：拉米夫定片（规格：100 mg，国内 4 家制药公司）；拉米夫定对照品（纯度：98%，规格 100 mg，百灵威科技有限公司），含拉米夫定与杂质 II 的拉米夫定分离度混合物 B 对照品（中国食品药品检定研究院，规格 20 mg，供系统适用性检查用），水杨酸对照品（纯度 99.5%，规格 0.25 g，德国 Dr.Ehrenstorfer 公司），胞嘧啶对照品（纯度 99%，规格 5 g，Sigma），尿嘧啶对照品（纯度 99.6%，规格 20mg，中国食品药品检定研究院），杂质 I 对照品（规格 20 mg，供系统适用性检查用，中国食品药品检定研究院）；甲醇（Merck 公司，HPLC 级）；纯水由 Milli-Q 超纯水制得；其他化学试剂均为分析纯

1.2 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-2030C 系统，LabSolutionsVer.6.72 SP2 色谱工作站 (CS 系统)。



1.3 分析条件

液相条件

流速：1.0 mL/min

色谱柱：Phenomenex Gemini C18 4.6 mm I.D.
×250 mm L., 5 μm

进样体积：20 μL

柱温：35°C

流动相：A-0.025mol/L 醋酸铵溶液 (用冰醋酸调节
pH 至 3.8); B- 甲醇

检测波长：277 nm

洗脱方式：等度洗脱，A:B = 95:5(v/v)

1.4 系统适用性溶液的配制

取胞嘧啶对照品与尿嘧啶对照品各适量，加流动相溶解并稀释制成 1 mL 中分别含 10 μg 的溶液，作为溶液 (1)。另取拉米夫定分离度混合物 B 对照品 (含拉米夫定与杂质 II) 5 mg，置 10 mL 量瓶中，加流动相 2 mL，振摇使溶解，再精密加入溶液 (1) 1 mL，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性溶液。

1.5 含量对照品溶液及供试品溶液的配制

含量对照品溶液：取拉米夫定对照品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.2 mg 的溶液，作为对照品溶液，平行配制 2 份。

供试品溶液：取本品 5 片，置 500 mL 量瓶中，加水适量，振摇约 15 分钟，使拉米夫定溶解，用水稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液适量，用流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含拉米夫定 0.2 mg 的溶液，作为供试品溶液，平行配制两份。

1.6 有关物质对照品溶液及供试品溶液的配制

水杨酸对照品溶液：精密称取水杨酸对照品适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 0.2 μg 的溶液，作为对照品溶液。

供试品溶液：取含量测定项下的供试品溶液作为供试品溶液。

对照溶液：精密量取供试品溶液 1 mL，置 500 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

结果与讨论

2.1 系统适用性试验

系统适用性是药品质量标准中含量及有关物质测定项下的一项关键考察指标，也是 GMP 认证的重要检查项之一。其目的主要是考察分析系统和设定的参数是否满足所指定方法的要求，确保该仪器检测的数据真实可靠。对于液相色谱系统适应性要求，各国药典均有明确规定。

通常系统适用性检查失败，检测数据则被认为失效。网络版 LabSolutionsCS 软件可在多样品连续进样前自动根据系统适用性预先设定标准判断检查结果并采取相应措施，确保所有样品在系统适用性符合要求的情况下进行测定，能有效减少无效数据的产生。

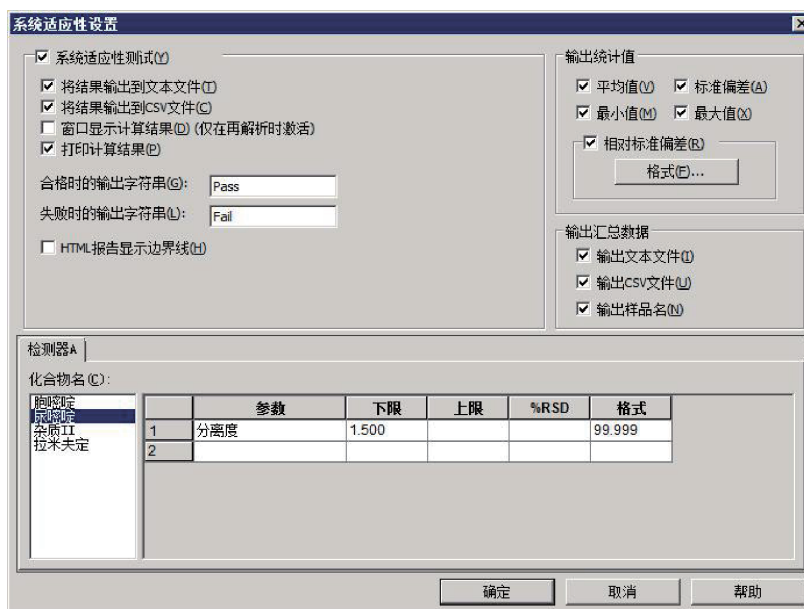


图1 系统适用性判断标准设定

分析	样品瓶号	样品瓶架	样品名	样品类型	系统适用性	措施
1	1	3	系统适用性溶液	0:未知	结束并清除	系统适用性-失败-停止(执行下一队列)
2	2	3	胞嘧啶定位	0:未知	无	
3	3	3	尿嘧啶定位	0:未知	无	
4	4	3	拉米夫定定位	0:未知	无	
5	5	3	杂质I定位	0:未知	无	

图2 系统适用性检查在批处理中的设置

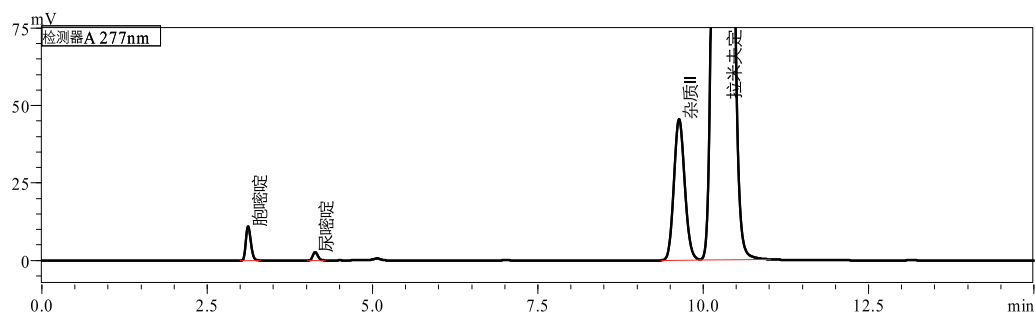


图3 系统适用性溶液的液相色谱图



图4 系统适用性报告

从上述色谱图及软件自动输出的系统适用性报告可知，胞嘧啶、尿嘧啶、杂质 II 与拉米夫定各峰之间的分离度均大于 1.5，符合系统适用性要求。

2.2 含量测定

含量是药品的关键质量属性之一，其差异将影响药品的安全性和有效性。本文对拉米夫定片参比制剂和 4 种仿制剂的含量进行了分析，对照品色谱图如图 5，以外标法计算，含量结果如表 1 所示：

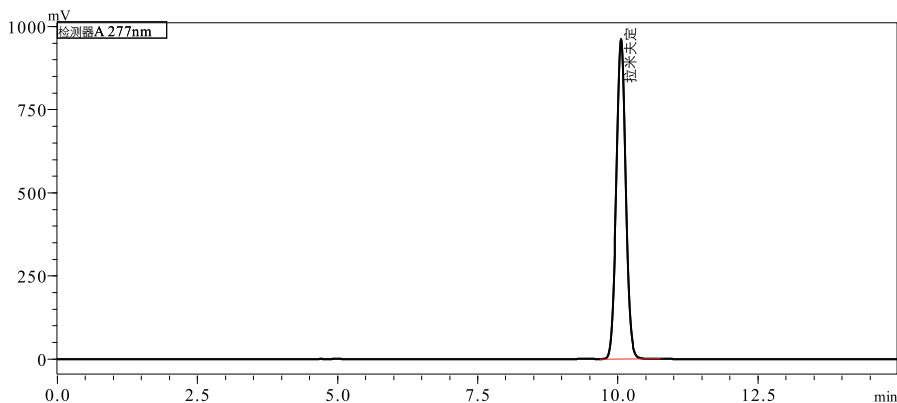


图5 拉米夫定含量对照品的液相色谱图(0.2 mg/mL)

表1 参比制剂与仿制制剂中的含量测定结果(n=2)

名称	含量 (%)	结论
A 厂家参比制剂	100.13	符合规定
B 厂家仿制制剂	95.60	符合规定
C 厂家仿制制剂	100.34	符合规定
D 厂家仿制制剂	98.59	符合规定
E 厂家仿制制剂	99.64	符合规定

由上述结果可知，拉米夫定片参比制剂及4种仿制制剂含拉米夫定(C₈H₁₁N₃O₃S)的量稍有差异，但均在标示量的90.0%~110.0%之间，符合中国药典2015版含量规定。含量的差异主要来源于生产中的投料量、生产过程中的损失以及样品中有关物质的量，由于最高含量与最低含量相差约5%，是否导致生物等效性的差异还有待验证。

2.3 有关物质

有关物质是评价产品质量的关键指标之一。有关物质一般主要分为两类：一类为工艺杂质，是药品在制备工艺过程中引入的杂质，包括没有反应完全的反应物、反应过程中所生成的中间体及副产物、反应过程中所使用的试剂及催化剂等；另一类为降解产物，是药品在生产和贮藏过程中发生化学变化而产生的杂质，如发生水解、氧化、开环等反应，降解产物主要与药物的结构特征密切相关。有关物质会降低药品的纯度，可能产生毒副作用，因此有关物质的研究对于药品的质量控制有重要的意义。在拉米夫定片2015年版中国药典标准中，有关物质项对杂质水杨酸、杂质I、杂质II、其他单个最大未知杂质及总杂质的限度进行了明确规定。在该类控制的杂质中，水杨酸为拉米夫定原料合成反应过程中引入的杂质；杂质I为拉米夫定氧硫杂环部分的2位羟甲基氧化为羧酸基团的降解产物；杂质II为拉米夫定2位或者5位手性C发生差向异构化反应生成的差向异构体，属于降解杂质。

本文对拉米夫定片参比制剂和4种仿制制剂的有关物质进行了分析，色谱图如图6和图7，水杨酸以外标法计算，其他杂质以加校正因子的主成分自身对照法计算，各杂质测定结果如表2所示。

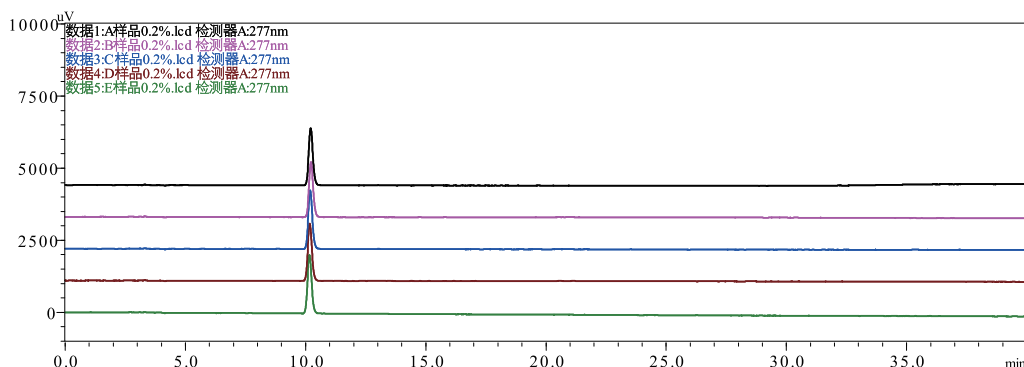


图6 拉米夫定片参比制剂与仿制制剂0.2%自身对照溶液色谱图(40 μg/mL)

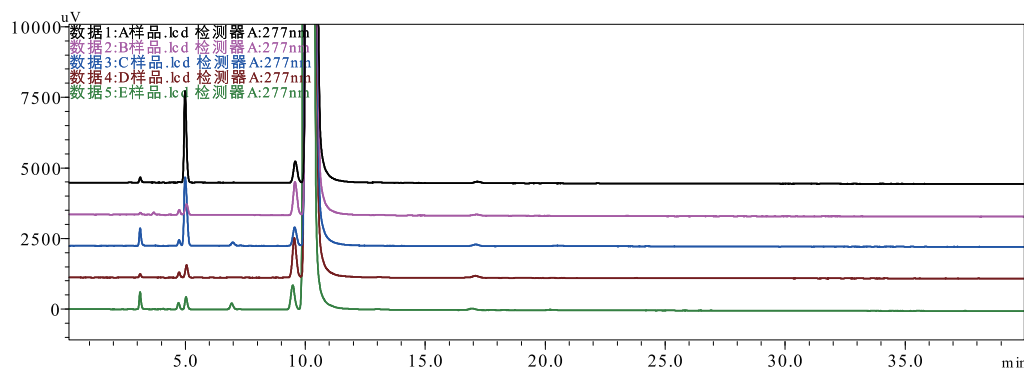


图7 拉米夫定片参比制剂与仿制制剂中有关物质色谱图(0.2 mg/mL)

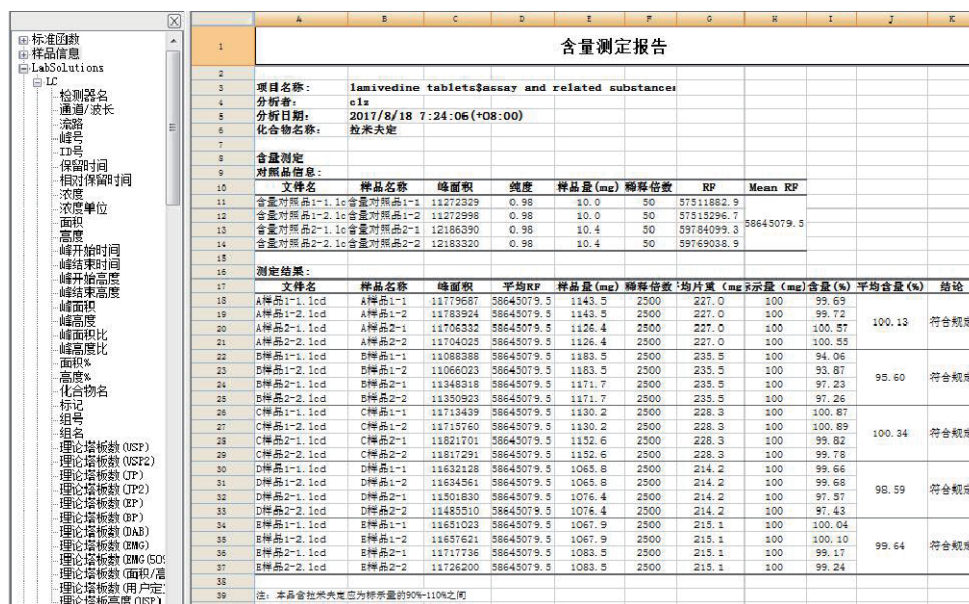
表2 参比制剂与仿制制剂中的有关物质测定结果

名称	水杨酸 (%)	杂质 I (%)	杂质 II (%)	其他单个杂质 (%)	总杂质 (%)	杂质数量	结论
A 厂家参比制剂	未检出	0.186	0.070	未检出	0.256	2	符合规定
B 厂家仿制制剂	未检出	0.026	0.113	未检出	0.139	2	符合规定
C 厂家仿制制剂	未检出	0.167	0.059	0.029	0.255	3	符合规定
D 厂家仿制制剂	未检出	0.026	0.130	0.010	0.166	3	符合规定
E 厂家仿制制剂	未检出	0.025	0.078	0.027	0.157	5	符合规定

由表 2 结果可知，拉米夫定片参比制剂和 4 种仿制制剂中，水杨酸、杂质 I、杂质 II、其他单个未知杂质及总杂质的量均分别未大于 0.1%、0.3%、0.2%、0.1%、0.6%，即 5 种产品均符合 2015 年版中国药典拉米夫定片中有关物质的标准要求，且 5 种制剂中均未出现超过 ICH 相关指导原则中规定的鉴定限度的杂质。对比参比制剂和 4 种仿制制剂所有检出的杂质，除原料合成引入的杂质水杨酸均未被检出外，4 种仿制制剂中的降解杂质均在含量或是在数量有不同程度的增加。根据仿制药的质量不能低于原研，且杂质谱要与原研一致或少于原研的要求，仿制制剂需进一步考察含量相对较高的杂质及新增杂质的具体来源，采用合适的 API 或改进生产工艺等方式，以达到仿制药与参比制剂质量的一致性。

2.4 数据可靠性

仿制药质量和疗效一致性评价相关指导原则明确指出应当规范一致性评价过程中的记录与数据的管理，保证数据记录准确真实、清晰可追溯、原始一致、及时同步记录、能归属到人、完整持久，并且采取必要的措施确保数据可靠性。LabSolutionsCS 软件利用数据库，可对分析数据实施安全管理，可有效避免数据被覆盖、删除或其他误操作等情况发生。审计追踪功能的开启，可有效记录不同类型文件详细的修改记录，有效地保障了数据的可靠性。另外，通过软件的多数据报告功能可设置不同的 Excel 报告模板，软件将自动提取原始数据文件的相关信息计算并出具报告，该报告被数据库统一管理，有效地保障了数据结果的安全性和可靠性。



含量测定报告											
1											
2	项目名称: lamivudine tablets assay and related substances										
3	分析者: cis										
4	分析日期: 2017/8/18 7:24:06(+08:00)										
5	化合物名称: 拉米夫定										
6	含量测定										
7	对样品信息:										
8	文件名	样品名称	峰面积	纯度	样品量 (mg)	稀释倍数	RP	Mean RP			
9	含量对照品 1-1.1c	含量对照品 1-1	11272329	0.98	10.0	30	57511882.9				
10	含量对照品 1-2.1c	含量对照品 1-2	11272998	0.98	10.0	30	57515296.7	58645079.5			
11	含量对照品 2-1.1c	含量对照品 2-1	12186590	0.98	10.4	30	59784099.3				
12	含量对照品 2-2.1c	含量对照品 2-2	12183320	0.98	10.4	30	59769038.9				
13	测定结果:										
14	文件名	样品名称	峰面积	平均RP	样品量 (mg)	稀释倍数	均片重 (mg)	标示量 (mg)	含量 (%)	平均含量 (%)	结论
15	A样品 1-1.1cd	A样品 1-1	11779687	58645079.5	1143.5	2500	227.0	100	99.69		
16	A样品 1-2.1cd	A样品 1-2	11783924	58645079.5	1143.5	2500	227.0	100	99.72		
17	A样品 2-1.1cd	A样品 2-1	11706932	58645079.5	1126.4	2500	227.0	100	100.87	100.13	符合规定
18	A样品 2-2.1cd	A样品 2-2	11704025	58645079.5	1126.4	2500	227.0	100	100.55		
19	B样品 1-1.1cd	B样品 1-1	11086388	58645079.5	1183.5	2500	235.5	100	94.06		
20	B样品 1-2.1cd	B样品 1-2	11066023	58645079.5	1183.5	2500	235.5	100	93.87		
21	B样品 2-1.1cd	B样品 2-1	11248318	58645079.5	1171.7	2500	235.5	100	97.23	95.60	符合规定
22	B样品 2-2.1cd	B样品 2-2	11350923	58645079.5	1171.7	2500	235.5	100	97.26		
23	C样品 1-1.1cd	C样品 1-1	11713439	58645079.5	1130.2	2500	228.3	100	100.87		
24	C样品 1-2.1cd	C样品 1-2	11715760	58645079.5	1130.2	2500	228.3	100	100.89		
25	C样品 2-1.1cd	C样品 2-1	11821701	58645079.5	1152.6	2500	228.3	100	99.82	100.34	符合规定
26	C样品 2-2.1cd	C样品 2-2	11817291	58645079.5	1152.6	2500	228.3	100	99.78		
27	D样品 1-1.1cd	D样品 1-1	11632128	58645079.5	1065.8	2500	214.2	100	99.66		
28	D样品 1-2.1cd	D样品 1-2	11634561	58645079.5	1065.8	2500	214.2	100	99.68		
29	D样品 2-1.1cd	D样品 2-1	11501830	58645079.5	1076.4	2500	214.2	100	97.87	98.59	符合规定
30	D样品 2-2.1cd	D样品 2-2	11485510	58645079.5	1076.4	2500	214.2	100	97.43		
31	E样品 1-1.1cd	E样品 1-1	11651023	58645079.5	1067.9	2500	215.1	100	100.04		
32	E样品 1-2.1cd	E样品 1-2	11657621	58645079.5	1067.9	2500	215.1	100	100.10		
33	E样品 2-1.1cd	E样品 2-1	11717736	58645079.5	1083.5	2500	215.1	100	99.17	99.64	符合规定
34	E样品 2-2.1cd	E样品 2-2	11726200	58645079.5	1083.5	2500	215.1	100	99.24		
35	注: 本品含拉米夫定应为标示量的90%~110%之间										

图8 含量测定多数据报告

结论

本实验利用岛津 LC-2030C 高效液相色谱仪结合网络版 LabSolutions CS 软件，对拉米夫定片参比制剂和 4 种仿制制剂的含量及有关物质进行测定分析，并有效地保障了数据的完整性和可靠性。通过 LabSolutions CS 软件对系统适用性检查结果实现了自动评价，结果表明拉米夫定及其各杂质峰之间的分离度符合要求。参比制剂和 4 种仿制制剂的含量均在标示量的 90%~110% 之间，有关物质的量均符合中国药典 2015 年版的限量规定，但仿制制剂与参比制剂的杂质谱存在一定的差异。