

【 评价方法学 】

劳拉西泮片的关键质量属性研究

尹 婕, 金方方, 南 楠, 陈 华*

中国食品药品检定研究院, 北京 102629

摘要: 目的 对国产劳拉西泮片的关键质量属性进行分析, 为该品种现行质量标准的完善以及质量风险控制提供依据。方法 在了解国内劳拉西泮片整体质量状况的基础上, 以问题为导向, 围绕安全性和有效性, 选择片剂的有关物质、溶出度等质控关键点开展研究。结果 通过对原料杂质谱的分析, 确认 USP 杂质 C (ChP 杂质 II) 为劳拉西泮最主要的降解杂质, 同时确定了该杂质的来源; ChP 现行标准有关物质检查方法能够有效分离已知及未知杂质, 且杂质的定量方法合理; 斑马鱼胚胎发育毒性结果显示杂质 C 的神经毒性较劳拉西泮强; 对现行标准溶出度检查法进行了优化; 国产制剂与进口制剂在体外溶出特性方面存在一定差别。结论 国产劳拉西泮片的整体质量状况良好, 但与进口制剂间仍存在一定的差距, 应提高生产工艺的稳定性。现行标准基本上能够实现对本品关键指标的控制, 但溶出度检查项有待优化, 以提高对不同质量产品的区分度。

关键词: 劳拉西泮; 片剂; 关键质量属性; 有关物质; 溶出度

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)09-1630-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.012

Study on the critical quality attributes of Lorazepam tablets

YIN Jie, JING Fangfang, NAN Nan, CHEN Hua

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Abstract: Objective The critical quality attributes of domestic Lorazepam tablets were analyzed, in order to improve the current quality standard and provide direct ground for quality risk control. **Methods** On the basis of evaluating the whole quality status of domestic Lorazepam tablets, several exploratory researches were carried out using problem-oriented approach. It involved in the related substances and dissolution. **Results** By investigation of the impurity profile, Lorazepam related compound C was considered to be the critical impurity of Lorazepam, and the source and the degradation pathway were discussed. The current quality standard can effectively separate the known and the unknown impurities, and the quantitative methods for impurities were rational. Moreover, the effect of Lorazepam and its related compound B and C on cell proliferation has no significant difference, but the toxicity of Lorazepam related compound C on zebrafish embryos were strongest than that of Lorazepam and related compound B. The method of dissolution was optimized and it was found that there were some differences between domestic and imported preparations in dissolution characteristics in vitro. **Conclusion** The overall quality of domestic Lorazepam tablets was satisfied, but there was still the certain gap between domestic and imported preparations. The stability of production process should be improved, and it was suggested to optimize the dissolution test to improve the differentiation of different quality products.

Key words: Lorazepam; tablet; critical quality attributes; related substance; dissolution

对上市药品进行质量评价的目的是确保上市药品质量可靠、民众用药安全有效, 并促进生产企业健康发展^[1]。基于质量源于设计 (quality by design,

QbD) 理念, 产品的质量不是检验出来的, 而是通过设计赋予的; 对产品及其整个生产过程的控制是建立有效监管的基础。产品的质量通常可以通过产

收稿日期: 2018-03-19

第一作者: 尹 婕 (1982—), 副研究员, 研究方向为药物分析。Tel: (010)53851627 E-mail: yinjie513@163.com

*通信作者: 陈 华 Tel: (010)53851622 E-mail: chenhua@nifdc.org.cn

品的关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)进行评价。QbD理念的核心就是通过确认产品生产过程中的关键原辅料属性(critical material attributes, CMAs)和关键工艺参数(critical process parameters, CPPs),建立产品CMAs、CPPs和CQAs的关系;再通过对CMAs和CPPs的控制实现对产品CQAs的控制,并实现对生产工艺的不断优化^[2-3]。

劳拉西洋(Lorazepam)属于苯二氮卓类镇静催眠药,具有中枢神经镇静、催眠、抗焦虑、抗癫痫等作用,可作为一线抗癫痫持续状态的首选药物,是国家基本药物。目前国内上市的制剂为片剂,临床适用于焦虑障碍的治疗或用于缓解焦虑症状及与抑郁症状相关焦虑的短期治疗。《中国药典(ChP)》、《美国药典(USP)》和《英国药典(BP)》现行版中均收录了劳拉西洋片^[4-6]。本文根据国家评价性抽检工作获得的3个企业的70批次样品的标准检验结果,结合该品种国内外药典标准的比对分析,发现劳拉西洋片的CQAs,有助于评价目前国产劳拉西洋片工艺设计和过程控制的合理性,为国产药品整体质量水平的提升和标准完善提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Mettler Toledo XS205DU 电子天平; AND EK-400H 分析天平; Agilent 1260 高效液相色谱仪; Climacell 222 恒温恒湿箱; 培英 HZQ-F160 全温双层振荡箱; Sotax AT 7smart 溶出仪; Shimadzu UV-2450 紫外可见分光光度计; Thermo 3141 CO₂ 细胞培养箱; Kylin-Bell 微型振荡器; Biotek synergy HT 多功能微板检测仪; Olympus SZX10 体式显微镜; Olympus DP71 显微镜照相系统。

1.2 样品与试药

劳拉西洋原料(企业提供);劳拉西洋片(来自3个企业的共70批样品,其中69批规格为1 mg,1批规格为0.5 mg);劳拉西洋对照品(中国食品药品检定研究院,批号171253-201102,质量分数为99.2%);劳拉西洋已知杂质A(企业提供,批号150501);劳拉西洋已知杂质B(国药集团化学试剂有限公司提供,USP对照品,批号I0K255,纯度99.0%);劳拉西洋已知杂质C(国药集团化学试剂有限公司提供,USP对照品,批号R011F0,纯度100.0%);劳拉西洋已知杂质D(国药集团化学试剂有限公司提供,USP对照品,批号J0L024,纯度100.0%);劳拉西洋已知杂质E(国药集团化学试剂

有限公司提供,USP对照品,批号J0K256,纯度100.0%);磷酸二氢铵、三乙胺、磷酸、盐酸、氢氧化钠、30%过氧化氢、DMSO(国药集团化学试剂有限公司);甲醇、乙腈(Fisher);三氯醋酸、Tris base、SRB、MTT(Sigma公司);RPMI1640培养基、特级胎牛血清、PBS缓冲液、胰蛋白酶(Gibco公司);高级海水晶(天津中盐海洋生物科学有限公司)。

1.3 实验动物与细胞

斑马鱼 TU 品系(Zebrafish, Danio rerio, TU strain)野生型由北京大学生命科学学院张博教授惠赠,养殖于(28.5±1)℃的人工海水中,繁殖方法参照文献进行^[7]。SD 乳鼠原代心肌细胞按照实验室标准操作方案分离、培养;A549 人肺癌细胞株、Bel-7402 人肝癌细胞株、HCT-8 人结肠癌细胞株均购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。

2 方法与结果

2.1 国产劳拉西洋片的质量情况

劳拉西洋原料及其制剂2010年开始被收入ChP。70批次劳拉西洋片按照生产日期,对在2015年12月1日以前生产的7批样品依据ChP 2010年版二部^[8]标准进行检验,其余的63批样品均执行ChP 2015年版二部。两版药典标准的检验项目与方法一致,检验项目包括:性状、鉴别、有关物质、含量均匀度、溶出度、含量测定。70批样品依据法定标准检验合格率为100%。综合分析各项检验结果,发现涉及的3家生产企业产品的均一性不同。

各国药典现行版中劳拉西洋原料和制剂标准的主要差异分别见表1和表2。根据标准检验结果和国内外药典标准的差异,发现该品种ChP现行标准存在一些值得关注的问题:(1)前期调研企业反馈的有关对ChP现行标准的修订建议都集中在有关物质检查项。该品种USP标准中收录了劳拉西洋的5种已知杂质(A、B、C、D、E),ChP 2015年版收录了2种已知杂质I(即USP杂质B)和杂质II(即USP杂质C)。ChP现行质量标准中有关物质项下,系统适用性试验仅规定了劳拉西洋与杂质II的分离度,且在抽检部分样品检出了1~2个未知杂质(图1)。因此对ChP现行标准色谱条件下,USP所收载杂质A~E的分离情况有待考察,以便对样品中的未知杂质进行归属。(2)该品种国内外药典溶出度检查项以及日本橙皮书推荐方法,溶出介质和溶出量测定方法、取样时间以及规定限度(Q值)均不

表1 各国药典劳拉西洋原料标准差异

Table 1 Differences of standards of Lorazepam among national pharmacopoeia

各国药典	有关物质	含量测定	炽灼残渣
ChP 2015	HPLC[杂质 I $\leq 0.01\%$; 杂质 II $\leq 0.5\%$; 其他单个杂质 $\leq 0.5\%$; 总杂质 $\leq 1.0\%$]	HPLC (98.5%~102.0%)	$\leq 0.1\%$
USP 40	HPLC[杂质 A $\leq 0.10\%$; 杂质 B $\leq 0.01\%$; 杂质 C $\leq 0.30\%$; 杂质 D $\leq 0.15\%$; 杂质 E $\leq 0.15\%$; 其他未知杂质 $\leq 0.10\%$; 总杂质 $\leq 0.75\%$]	HPLC (98.0%~102.0%)	$\leq 0.3\%$
BP 2017	HPLC[杂质 B $\leq 0.1\%$; 杂质 D $\leq 0.1\%$; 其他未知杂质 $\leq 0.1\%$; 总杂质 $\leq 0.2\%$]	0.1 mol/L 四丁基氢氧化铵滴定 (98.5%~102.0%)	$\leq 0.1\%$
EP 9.0	HPLC[杂质 B $\leq 0.1\%$; 杂质 D $\leq 0.1\%$; 其他未知杂质 $\leq 0.1\%$; 总杂质 $\leq 0.2\%$]	0.1 mol/L 四丁基氢氧化铵滴定 (98.5%~102.0%)	$\leq 0.1\%$
JP 17	TLC ($\leq 1.0\%$)	0.1 mol/L 四丁基氢氧化铵滴定 ($\geq 98.5\%$)	$\leq 0.3\%$

表2 国内外药典劳拉西洋片标准差异

Table 2 Differences of standards of Lorazepam Tablets among national pharmacopoeia

药典	有关物质	溶出度
ChP 2015	HPLC[杂质 II $\leq 2.0\%$; 总杂质 $\leq 3.0\%$]	篮法-HPLC 法; $Q=70\%$ (30 min)
USP 40	HPLC[杂质 B $\leq 0.1\%$; 杂质 C $\leq 3.0\%$; 杂质 D $\leq 0.5\%$; 杂质 E $\leq 0.5\%$; 其他未知杂质 $\leq 0.2\%$; 总杂质 $\leq 4.0\%$]	篮法-HPLC 法; $Q=60\%$ (30 min), $Q=80\%$ (60 min)
BP 2017	TLC[杂质 E $\leq 1\%$; 其他单个杂质 $\leq 1\%$]	篮法-UV 吸收系数法($\lambda=232$ nm); $Q=75\%$ (45 min)

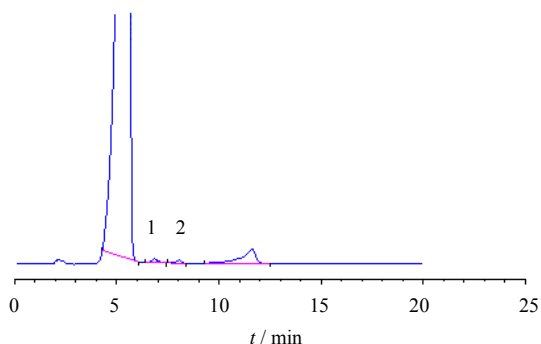


图1 样品有关物质色谱图

Fig.1 Chromatogram of sample solution

同,因此有必要对 ChP 现行标准溶出度检查方法的合理性以及对不同质量样品的区分性进行评价,以达到通过溶出度控制质量,促进企业不断完善生产工艺,提高药品生产水平的目的。

2.2 关键质量属性研究

综合文献检索、生产企业调研和标准检验结果,系统分析了劳拉西洋片标准检验中发现的共性与个性问题。以问题为风险点,围绕药品的安全性和有效性,分别对片剂的两个 CQAs—有关物质和溶出度进行探索性研究。

2.2.1 有关物质研究

(1) ChP 现行标准方法对劳拉西洋 USP 5 种已

知杂质的分离效能考察

图2为 USP 收载的劳拉西洋的5种已知杂质(A、B、C、D、E)的结构式及其化学名称。经前期研究得知,杂质A和杂质B(ChP 杂质 I)为过程杂质,同时杂质B又是可能的降解产物,因此 ChP、USP 均对原料药中的杂质B进行了严格的控制($\leq 0.01\%$)。杂质C、D、E均为降解产物,其中杂质C为主要降解物,因此 ChP、USP 在原料药及制剂标准中均对杂质C进行了限度要求。配制劳拉西洋与杂质A~E的混合对照品溶液,按 ChP 有关物质色谱方法^[4]进行色谱行为比较,考察药典方法的专属性。劳拉西洋与杂质A~E混合溶液的色谱图见图3。可见在 ChP 规定的色谱条件下,劳拉西洋与各杂质峰及各杂质峰之间均能完全分离。

表3为各杂质与劳拉西洋的相对响应因子。除杂质B外,杂质A、C、D、E均可采用不加校正因子的主成分自身对照法,并不会降低质量标准。ChP 2010年版与2015年版劳拉西洋原料中杂质I(杂质B)采用外标法定量,原料与片剂中的杂质II(杂质C)以及其他单杂和总杂均采用不加校正因子的主成分自身对照法定量。可见现行标准杂质的定量方法合理。

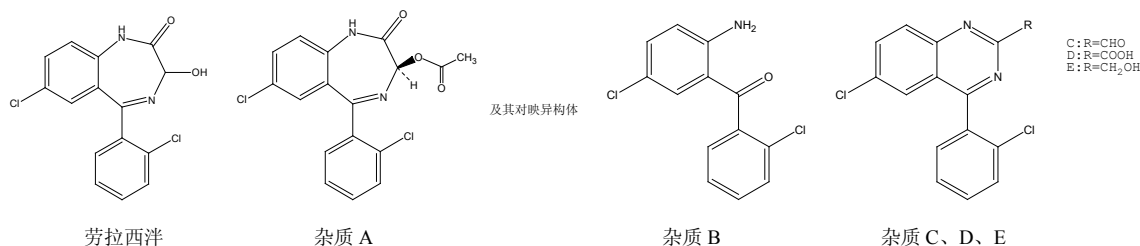


图2 USP 收载劳拉西泮及其已知杂质的结构式及其化学名

Fig.2 Structural formula and chemical names of Lorazepam and its known impurities in USP

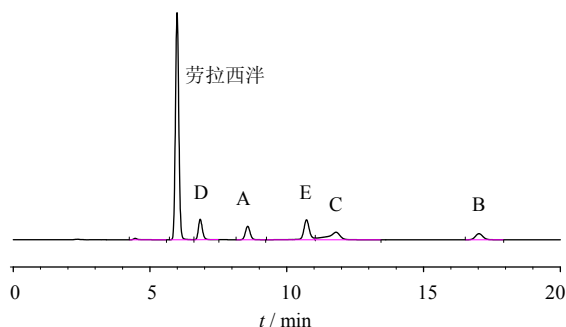


图3 劳拉西泮与杂质 A~E 混合溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of the mixed solution containing Lorazepam and the known impurities

表3 劳拉西泮各杂质的相对响应因子

Table 3 Relative response factor of Lorazepam and the known impurities

色峰	相对保留时间	相对响应因子
劳拉西泮	1.0	1.0
杂质 D	1.1	1.0
杂质 A	1.4	0.9
杂质 E	1.8	1.3
杂质 C	2.0	1.3
杂质 B	2.8	0.6

(2) 杂质谱研究

为了对在样品中检出的两个未知杂质峰(图1)进行归属,并对其来源进行确认,对劳拉西泮原料药进行加速破坏试验^[9]。采用 ChP 标准色谱方法对破坏样品进行有关物质检查,分别考察劳拉西泮在酸(1 mol/L 盐酸)、碱(1 mol/L 氢氧化钠溶液)、氧化(3%过氧化氢)、热(沸水浴)以及光照(4 500 lx)条件下的降解情况。对破坏降解样品的 HPLC-PDA 图谱进行分析,发现劳拉西泮在氧化条件下较稳定,但在酸、碱、加热以及光照破坏条件下,均有不同程度地降解(图4)。酸破坏时,产生3个杂质,分别为杂质 A、C、B,按峰面积归一化法计算,杂质含量分别为 3.0%、0.9%、1.2%;碱破

坏时,产生3个杂质,除杂质 A、C 外,在相对保留时间为 0.9 处检出一个未知杂质,按归一化法计算,杂质含量分别为 0.1%、0.1%、0.8%;加热破坏时,只产生杂质 C,归一化含量为 31.2%;光照破坏时,产生两个杂质,分别为杂质 A、C,归一化法计算杂质含量分别为 0.3%和 9.0%。各降解杂质的来源见表4。

表4 劳拉西泮破坏降解产物归属

Table 4 Source of the degradation product of Lorazepam

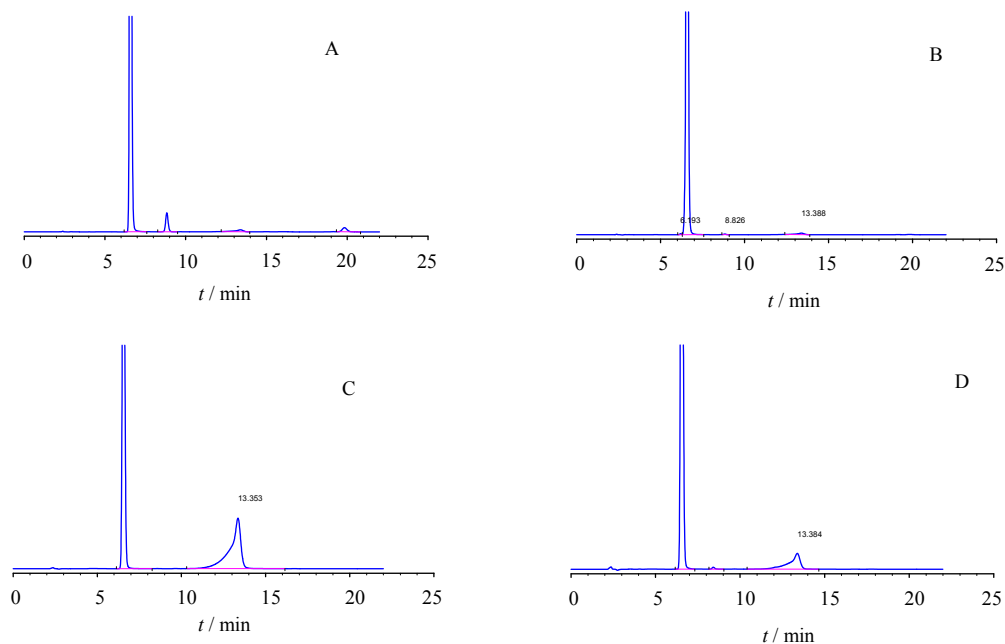
杂质	相对保留时间	归属/来源
未知杂质	0.9	碱降解产物
杂质 A	1.4	酸、碱、光照降解产物
杂质 C (杂质 II)	2.0	酸、碱、热、光照降解产物
杂质 B (杂质 I)	2.9	酸降解产物

70 批样品中除检出杂质 C 外,在部分样品中发现的两个未知杂质 1 和杂质 2 的相对保留时间和紫外光谱分别与杂质 D、杂质 A 的保留时间和光谱一致;杂质 B (定量限为 0.63 ng) 和杂质 E (定量限为 0.19 ng) 在所有样品中均未检出。70 批次样品中杂质的检出批数和检出量见图5,发现不论是检出的频数还是数量,杂质 C 都是最多的,可见该杂质是劳拉西泮的主要降解杂质。

2.2.2 劳拉西泮及其杂质 B、杂质 C 的毒性比较研究

(1) 体外细胞毒与增殖抑制试验

参照文献^[10-11]报道,选择 SD 乳鼠原代心肌细胞为模型细胞株,采用 MTT 法以细胞相对活力[相对活力=(给药组 A 值-调零孔 A 值)/(正常组 A 值-调零孔 A 值)]为指标,对劳拉西泮及其杂质 B、杂质 C 的体外细胞毒性进行比较。结果见图6,可知劳拉西泮、杂质 B 和杂质 C 对原代心肌细胞的活力都有升高的趋势,表明劳拉西泮及其杂质 B、杂质 C 对心肌细胞无毒性,且三者没有显著性差异。



A-酸破坏 B-碱破坏 C-热破坏 D-光破坏

A-destroyed by acid; B-destroyed by base; C-destroyed by heat; D-destroyed by UV light

图4 劳拉西洋破坏试验 HPLC 色谱图

Fig.4 Chromatogram of the degraded solution of Lorazepam

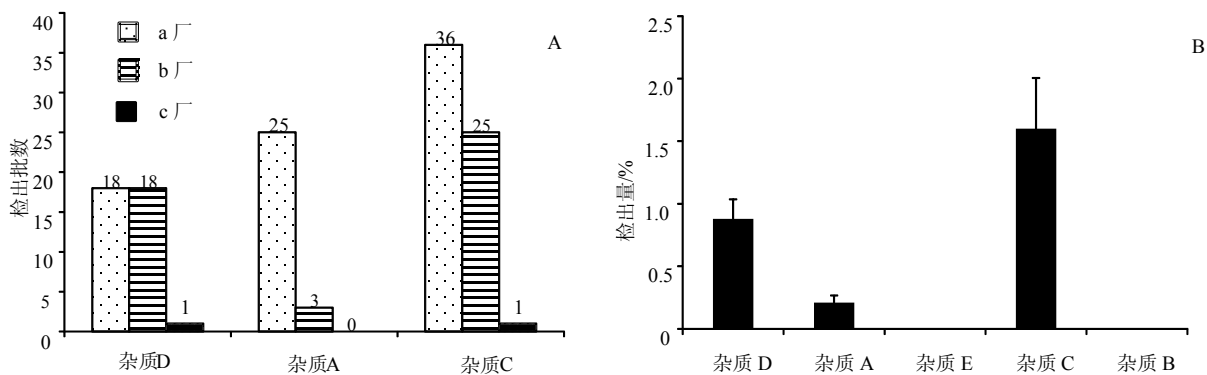


图5 70批样品中杂质的检出批数(A)和检出量(B)比较

Fig.5 Comparison of the detected number and amount of impurities in 70 batches of samples

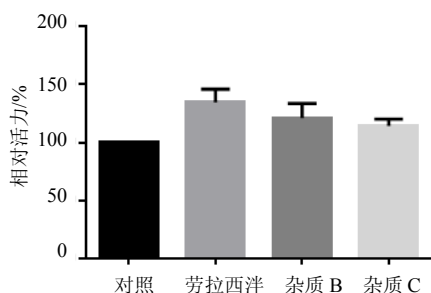


图6 劳拉西洋、杂质B和杂质C对原代心肌细胞活力的影响

Fig.6 Comparison of apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes treated with Lorazepam and impurities, respectively

分别以 A549 人肺癌细胞株、Bel-7402 人肝癌细胞株、HCT-8 人结肠癌细胞株为模型细胞株, 采用 SRB 法以细胞生长抑制率[细胞生长抑制率=(对照组 A 值-给药组 A 值)/(对照组 A 值-空白 A 值)]为指标, 评价劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 对肿瘤细胞生长的抑制作用(表 5)。根据生长抑制率的结果, 初步认为劳拉西洋、杂质 B、杂质 C 对 3 种肿瘤细胞的增殖没有明显的抑制作用, 并且彼此之间亦无显著差异。

(2) 斑马鱼胚胎毒性与神经毒性研究

由于本品的药理作用部位为中枢神经系统, 因

表5 劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 对 3 种肿瘤细胞株的生长抑制率

Table 5 Growth inhibition ratio of three kinds of tumor cells treated with Lorazepam and impurities

细胞株	劳拉西洋	杂质 B	杂质 C
A549	2.32	2.38	9.16
Bel-7402	3.60	2.00	-1.73
HCT-8	-10.92	-3.43	-1.22

此选择在神经发育、神经损伤等神经科学研究中广泛应用的模式动物斑马鱼^[12], 在体外比较劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 对斑马鱼胚胎发育的影响^[13]。

选取发育至 50% 外包状态的斑马鱼 TU 品系野生型胚胎, 每组 30 枚, 分别暴露于梯度浓度的劳拉

西洋及其杂质 B、杂质 C 溶液中 (采用 DMSO 助溶, <0.5%), 同时以在 0.5% DMSO 的饲养液中发育的胚胎为溶剂对照组; 以在斑马鱼饲养液中发育的胚胎为正常对照组。待胚胎发育至第 3 天 (3 day past fertilization, 3 dpf) 时, 换入正常饲养液中继续发育观察至第 5 天。每天观察记录胚胎发育状况, 如脑、眼、心、躯干、游动及对刺激的反应能力等, 同时统计 3 dpf 时的畸形和死亡数占存活胚胎数的比例。测试组每种浓度测试液平行检测至少 3 次。图 7 为斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 时, 各测试组胚胎的异常表型。各测试组胚胎发育的致畸率与致死率比较如图 8 所示。

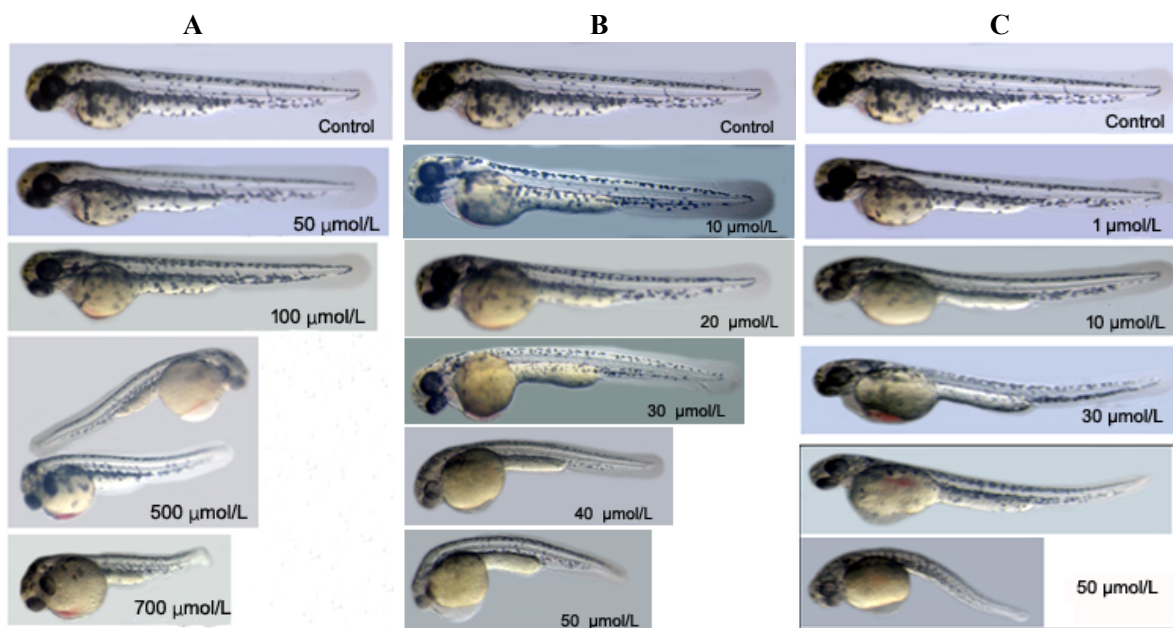
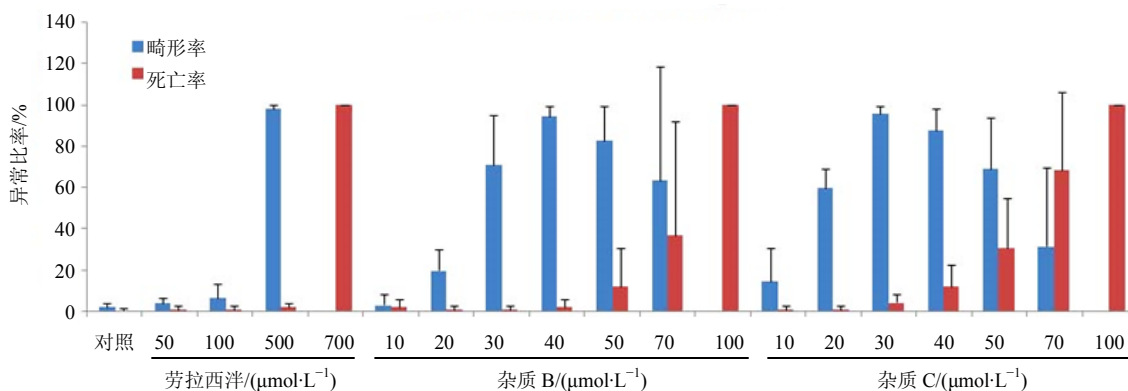


图7 劳拉西洋 (A)、杂质 B (B) 和杂质 C (C) 对斑马鱼胚胎发育的毒性表型 (3 dpf)

Fig.7 Comparison of zebrafish embryonic phenotype at 3 dpf

图8 劳拉西洋、杂质 B 和杂质 C 对斑马鱼胚胎发育致畸率与致死率比较 ($n=30$, 3 dpf)Fig.8 Teratogenic and lethal effect of Lorazepam and impurities on zebrafish embryo ($n=30$, 3 dpf)

结果显示, 劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 对斑马鱼胚胎发育具有相同或类似的毒性表型, 其毒性作用发生在胚胎早期, 可影响胚胎的神经系统、心血管系统和骨骼等发育。当劳拉西洋浓度不大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 B 浓度不大于 20 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 C 浓度不大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胚胎未见明显的畸形; 当浓度增大时, 胚胎发育过程中出现浓度依赖性畸形。当劳拉西洋浓度达到 500 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 B 浓度达 40 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 C 浓度达 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胚胎出现死亡; 当劳拉西洋浓度达到 700 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 B 浓度达 100 $\mu\text{mol/L}$ 、杂质 C 浓度达 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胚胎全部死亡。在相同浓度下, 杂质 C 处理组的致畸致死程度均要比杂质 B 组严重。劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 的半数致畸浓度 (TD_{50}) 和半数致死浓度 (LD_{50}) 结果见表 6, 可见三者对胚胎发育的毒性大小为: 杂质 C > 杂质 B > 劳拉西洋。

表 6 劳拉西洋及其杂质 B、杂质 C 的毒性参数比较(3 dpf)

Table 6 Toxicities of Lorazepam and impurities on zebrafish embryo (3 dpf)

化合物	$\text{TD}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{LD}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
劳拉西洋	100 ~ 500	500 ~ 700
杂质 B	23.39	57.35
杂质 C	12.45	49.02

2.2.3 溶出度方法研究

ChP 劳拉西洋片溶出度检查项采用的溶出介质、溶出量测定方法、取样时间以及 Q 值与 USP、BP 以及日本橙皮书均存在差异。70 批样品按照 ChP 标准溶出度方法检验, 97% 的样品在 30 min 溶出量都在 85% 以上, 全部样品在 10 min 内均能快速溶出。说明溶出试验条件较剧烈, 检测结果虽然可达到合格, 但并不一定能准确区分制剂质量的优劣, 这就偏离了溶出度检查法建立的初衷。因此有必要对现行标准溶出度检查方法的合理性进行探讨。

(1) 劳拉西洋 pH-溶解性曲线考察

劳拉西洋为弱碱性药物, pK_a 为 11.5, 且具有较高的脂溶性, 在水中几乎不溶(溶解度约为 80 mg/L)。取劳拉西洋适量, 分别用不同 pH 值的溶出介质溶解, 超声处理后置于摇床中震荡, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 用 HPLC 法测定溶液中劳拉西洋的浓度, 计算不同 pH 下劳拉西洋的溶解度, 并绘制劳拉西洋在不同 pH 值的溶解度曲线。由图 9 可见劳拉西洋的溶解度呈现明显的 pH 值依赖性。

在低 pH 区段 (pH 1.0~5.5), 其溶解度与 pH 无明显的相关性, 溶解度在 11~15 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。随着 pH 的升高, 其溶解度迅速增大, pH 为 6 时溶解度最大, 约为 80 $\mu\text{g/mL}$ 。但 pH > 6 以后, 溶解度又明显下降。

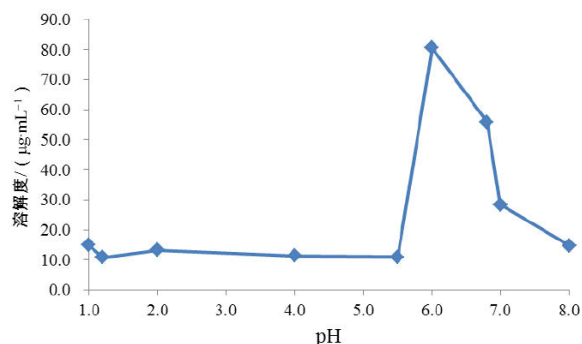


图 9 劳拉西洋在不同 pH 水溶液中的溶解度

Fig.9 Solubilities of Lorazepam in aqueous solutions with the different pH value

(2) 劳拉西洋在不同溶出介质中的稳定性

为保证在取样时间内劳拉西洋稳定存在, 不发生降解, 对劳拉西洋在不同溶出介质中的稳定性进行了考察。精密称取劳拉西洋适量, 分别用不同介质 (pH 1.2 缓冲液、pH 4.0 缓冲液、pH 6.8 缓冲液、水) 溶解并稀释, 使终浓度约为 1 $\mu\text{g/mL}$, 分别于不同时间点进行检测。以峰面积为评价指标考察劳拉西洋在不同溶出介质中的稳定性。结果用 pH 1.2 缓冲液、pH 4.0 缓冲液、pH 6.8 缓冲液、水稀释测得峰面积的 RSD 分别为 3.11%、0.29%、0.14%、0.24%, 表明测定浓度下劳拉西洋在 pH 4.0 缓冲液、pH 6.8 缓冲液、水中 24 h 内稳定性良好, 但在 pH 1.2 缓冲液中不够稳定。

(3) 溶出度试验条件的选择

参照日本橙皮书、BP2017、USP40 以及 FDA 溶出度数据库收录的劳拉西洋片溶出度检查方法, 以对不同质量产品的区分力为主要评价指标, 分别考察溶出实验装置、转速以及溶出介质种类对产品溶出行为的影响。

实验装置: 该品种 ChP、USP、BP 现行版以及 FDA 推荐的溶出装置均为篮法, 但日本橙皮书推荐采用桨法, 因此对不同溶出装置进行了比较考察。选取三家企业样品分别采用篮法、桨法在水和 pH 6.8 缓冲液中的溶出曲线进行了比较, 发现在水和 pH 6.8 缓冲液中, 3 家企业样品分别采用篮法与桨法溶出, 其溶出行为均无显著性差异 (双侧 t 检

验 $P>0.05$)。因此,仍采用 ChP 标准中的第一法(篮法)装置进行实验。

转篮转速: 转速对制剂的溶出效率影响明显。采用篮法,以 pH 6.8 缓冲液 500 mL 作为溶出介质,转速分别选择 50、75、100 r/min,经不同时间取样,照 ChP 劳拉西洋片溶出度 HPLC 法计算溶出量,考察三家企业样品的溶出行为(图 10)。由图可知当转速为 50 r/min 时,对 3 家企业产品的区分度最好。因此选定转篮转速为 50 r/min。

溶出介质: 根据胃肠道不同部位 pH 不同的特点,选取 pH 1.2 缓冲液、pH 4.0 缓冲液、pH 6.8 缓冲液和水作为溶出介质。采用篮法,分别以上述 4 种溶液为溶出介质,介质体积为 500 mL,转速 50 r/min,经不同时间点取样,计算溶出量,结果见图

11。4 种溶出介质对于 3 家生产企业的样品均表现出了一定的区分性,3 家企业样品在 pH 6.8 缓冲液和 pH 4.0 缓冲液中的溶出趋势相似, pH 6.8 缓冲液的区分度相对最大。

劳拉西洋口服吸收良好,绝对生物利用度为 90%,服药后大约 2 h 血药浓度达峰值。临床上本品通常安排在入睡前给药,基本处于空腹状态,空腹状态时胃排空时间为 0.5~1 h。因而本品在服药后 2 h 应该位于肠段,此部位的 pH 值在 4~8 范围内。另外由于劳拉西洋的溶解度呈现明显的 pH 值依赖性(图 9)。在 pH 值为 6 时其溶解度最大; pH 值在 1.0~5.5,其溶解度与 pH 无明显的相关性; pH >6 以后,溶解度又明显下降。因此溶出介质确定为 pH 6.8 缓冲液。

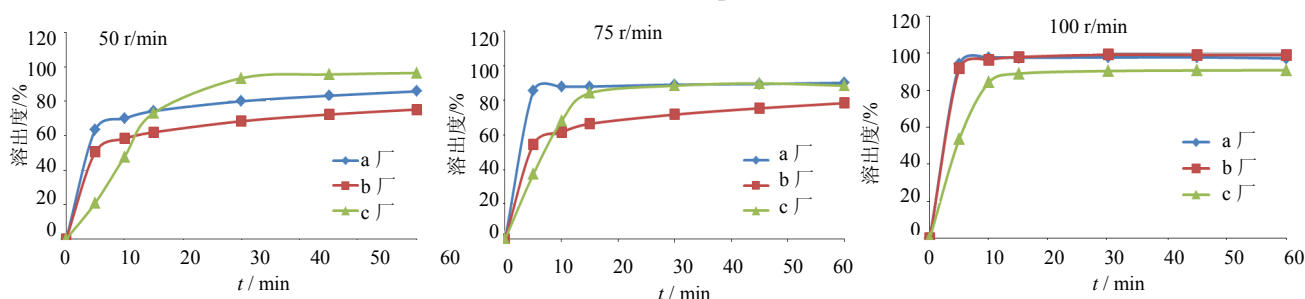


图 10 不同转速下各企业样品的溶出曲线

Fig.10 Dissolution profile of Lorazepam tablets using basket method with different rotating rate

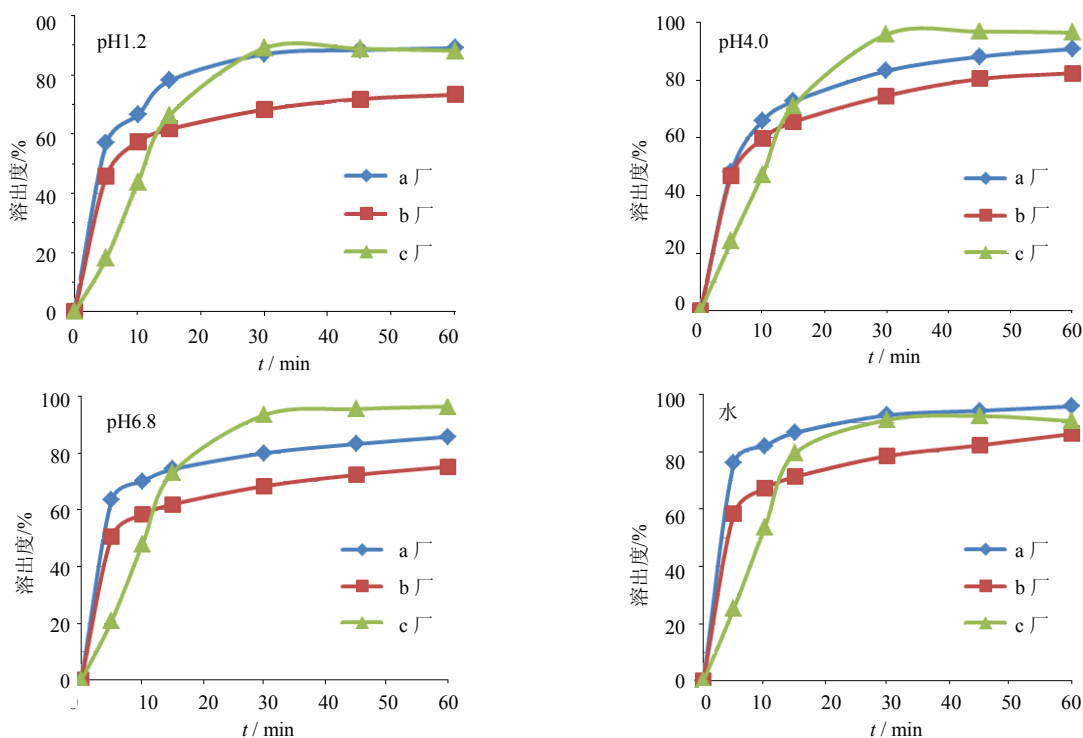


图 11 不同溶出介质中各企业样品的溶出曲线

Fig.11 Dissolution profile of Lorazepam tablets in different medium

(4) 各企业样品溶出曲线的考察

通过“2.3.3”项下实验考察,溶出度试验条件确定为:溶出装置选择第一法(篮法),转速为 50 r/min,以 pH 6.8 缓冲液 500 mL 为溶出介质。根据

标准检验结果、样品来源以及剩余效期等,各厂家选取 4 批样品进行溶出曲线的比较(其中 c 厂仅抽到 1 批 0.5 mg 规格样品)。同时选取该品种的进口产品平行试验。结果见图 12 和图 13。

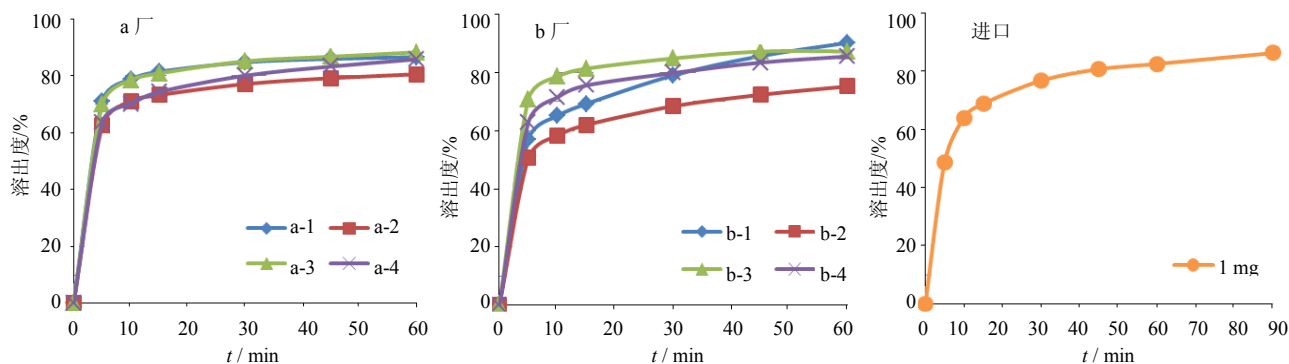


图 12 不同企业样品(1 mg 规格)的溶出曲线

Fig.12 Dissolution profile of Lorazepam tablets (1 mg)

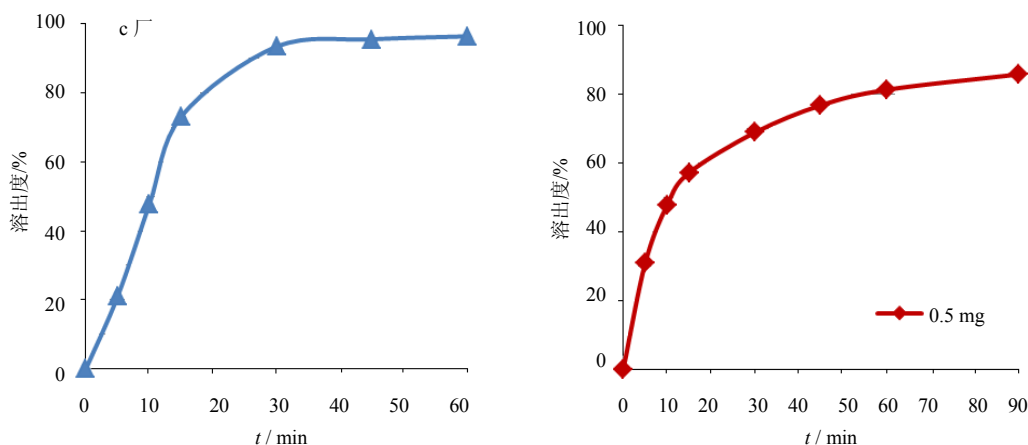


图 13 不同企业样品(0.5 mg 规格)的溶出曲线

Fig.13 Dissolution profile of Lorazepam tablets (0.5 mg)

分别采用相似等效限法^[14]和 f_2 因子法^[15]评价溶出曲线的相似性。经比较发现,3 家国内企业样品的批内均一性以及批间重现性均不好,提示国内企业应提高其生产工艺的稳定性。以进口样品作为参比,分别计算国产企业样品的 f_2 因子(表 7),结果相同规格制剂,国内产品与进口制剂之间存在一定差别。

综合以上溶出度方法研究,确定优化后的溶出度试验条件为:溶出装置选择第一法(篮法),转速为 50 r/min,以 pH 6.8 缓冲液 500 mL 为溶出介质,30 min 取样。照 ChP 劳拉西洋片溶出度 HPLC 法计算溶出量,限度为标示量的 70%。按照以上条件溶出,3 家企业抽取的共 9 批样品只有 b 厂的 1 批样

表 7 国产样品溶出曲线的 f_2 值

Table 7 Similarity factor of dissolution profile of the domestic pharmaceuticals

规格	生产厂家	f_2
1 mg	a	48.83
	b	48.02
0.5 mg	c	39.66

品不符合规定,30 min 溶出量为 68%,其余 8 批样品均符合规定。

3 结论及质控建议

口服固体制剂的溶出特性和杂质谱通常被认为是其质控的关键参数,是 CQAs 的重要方面^[2]。本文在对来自国内 3 个生产企业的 70 批样品进行整体

质量分析的基础上,重点对片剂的有关物质、劳拉西洋及其主要杂质的毒性比较以及溶出度几个CQAs进行了较为深入的研究。

ChP 现行质量标准有关物质检查方法能够有效分离劳拉西洋的已知及未知杂质,并且杂质的定量方法合理。70批样品中均未检出USP杂质B,有62批检出USP杂质C。通过对原料杂质谱的分析,确认杂质C为劳拉西洋最主要的降解产物。斑马鱼胚胎发育毒性考察结果表明杂质C的神经毒性最强,杂质B次之,劳拉西洋毒性最弱。比较劳拉西洋原料和片剂的国内外标准,各国药典均对杂质B和杂质C进行了限度规定,但限度值有所不同。对于质量标准杂质限度规定的合理性有待于后续采用多种方法进行全面地评估,以提高标准的科学性和合理性。为达到通过溶出度控制质量的目的,对现行标准溶出度检查方法进行了优化。优化后的溶出度试验条件不仅保证了劳拉西洋在取样时间内稳定存在,对于不同企业、不同生产工艺的样品又具有一定的区分度。

综合以上CQAs的研究结果,认为目前国产劳拉西洋片的整体质量状况良好。但是与进口制剂间仍存在一定的差距,特别应提高其生产工艺的稳定性,加强生产环节的质量控制,以保证产品的批内均一性以及批间重现性良好。

参考文献

- [1] 金少鸿,栗晓黎. 基于QbD理念的药品质量分析研究新概念[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1845.
- [2] ICH Expert Working Group. Harmonised Tripartite Guideline Pharmaceutical Development Q8(R2) [EB/OL]. Geneva, Switzerland: The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2005 [2009-08]. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
- [3] Yu L X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding and control [J]. Pharm Res, 2008, 25(4): 781-791.
- [4] 中国药典 [S]. 二部. 2015:453.
- [5] USP 40-NF 35 [S]. 2017:4908.
- [6] BP 2017 [S]. 2017:1250.
- [7] 郭隽,耿兴超,汪巨峰. 药物发育毒性体外替代方法研究进展及组合策略[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 345-349.
- [8] 中国药典 [S]. 二部. 2010:325.
- [9] 杜明华,朱婷婷,苏浩明,等. LC-MS法鉴定依普利酮的降解产物[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 85-90.
- [10] Ahir B K, Pratten M K. Association of anxiolytic drugs diazepam and lorazepam, and the antiepileptic valproate, with heart defects--effects on cardiomyocytes in micromass (MM) and embryonic stem cell culture [J]. Reprod Toxicol, 2011, 31(1): 66-74.
- [11] Malhotra R, Brosius FC. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12567-12575.
- [12] 全珊珊,吴新荣. 斑马鱼,人类疾病研究的理想模式动物[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 260-263.
- [13] Yang L, Ho N Y, Alshut R, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals [J]. Reprod Toxicol, 2009, 28(2): 245-253.
- [14] 谢沐风. 溶出曲线相似性的评价方法[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(4): 308-311.
- [15] Chow S C, Ki F Y. Statistical comparison between dissolution profiles of drug products [J]. J Biopharm Stat, 1997, 7(2): 241-258.