

【评价方法学】

盐酸艾司洛尔注射液质量评价

章 为^{1,2}, 蒋 涛¹, 易必新¹, 李晓燕¹, 王伟姣¹, 刘雁鸣^{1*}

1. 湖南省药品检验研究院, 湖南 长沙 410001

2. 中南大学湘雅药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: **目的** 对75批次盐酸艾司洛尔注射液的质量及质量标准进行评价和分析, 为该品种的安全监管和质量标准完善提供参考。**方法** 采用法定标准检验方法对75批次样品进行检验, 将检验结果进行统计分析, 并采用探索性研究方法对有关物质、甲醇量、含量测定、细菌内毒素以及稳定性等进行考察, 建立了该品种的拉曼光谱模型。**结果** 法定检验结果显示, 75批盐酸艾司洛尔注射液中4批不合格, 合格率94.7%; 探索性研究结果表明, 现行标准在检验方法的专属性和检验项目设置方面尚存在不足, 有关物质检出含量较高的单个杂质(杂质I), 部分样品的甲醇量超出限度。**结论** 该品种虽然法定检验合格率高, 但探索性研究发现现行标准和产品质量均有待于进一步提高, 同时需加大该品种的监管, 以减少临床用药的风险。

关键词: 药品安全监测; 药品质量检验; 探索性研究; 药品质量标准提高; 盐酸艾司洛尔注射液

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)10-1989-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.013

Quality evaluation of Esmolol Hydrochloride Injection

ZHANG Wei^{1,2}, JIANG Tao¹, YI Bixin¹, LI Xiaoyan¹, WANG Weijiao¹, LIU Yanming¹

1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China

2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, CSU, Changsha 410013, China

Abstract: **Objective** To evaluate the quality status and analyze the existing problems of 75 batches of Esmolol Hydrochloride injection, so as to provide references for safety supervision and standard improvement of the preparations. **Methods** Statutory testing methods were used to examine 75 batches of samples, and the results were assessed by statistical analysis, the related substances, determination of methanol, assay, bacterial endotoxin and stability were all investigated in exploratory study, the Raman spectrum model of this preparation was also established. **Results** The statutory test showed four out of the 75 batches of esmolol hydrochloride injection were unqualified and the pass rate was 94.7%. The exploratory study showed the existing standards were inadequate in the specificity of analytical methods and project settings, and there was a single impurity(Impurity I) which had a high content in the related substances of certain products, determination of methanol in some samples exceeded the limit. **Conclusion** Although the pass rate of the statutory inspection was high, the exploratory study indicated that the qualities of products and the levels of standards still needed to be improved. At the same time, we need to strengthen the supervision to reduce the risk of clinical medication.

Key words: drug safety monitoring; drug quality test; exploratory research; standard improvement; Esmolol Hydrochloride Injection

盐酸艾司洛尔注射液(Esmolol Hydrochloride Injection)于1986年在美国问世,原研药由美国百特医疗用品公司生产。1996年在我国以新药开发上市。为超短效的选择性 β_1 受体阻滞剂。该药在临床上使用面广,且量大,广泛用于预防器官插管的心血管反应,预防和治疗室上性心率失常以及协同硝酸甘油控制血压等。该品种为2016年国家评价性抽验标准提高品种,涉及3家生产企业的75批样

品。笔者分别采用法定标准检验及有针对的探索性研究,结合统计学分析对该品种的总体质量进行评价,为提高完善质量标准和提升产品质量提供参考^[1-8]。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC-G₂-Q-TOF 液质联用仪; Agilent 7890A 气相色谱仪; Ultimate-3000 高效液相色谱仪; Mettler Toledo XS205DU 电子天平; 梅

收稿日期: 2019-04-18

第一作者: 章 为, 副主任药师, 主要从事药品检验工作。Tel: (0731)82275861 E-mail: zw5890@qq.com

*通信作者: 刘雁鸣, 主任药师。Tel: (0731)82275838 E-mail: 380852839@qq.com

特勒 SevenMulti pH 计; 天大天发 SMC-30 渗透压摩尔浓度测定仪; MTG 拉曼光谱仪。

甲醇(色谱纯, 4L, 美国 Burdick & Jackson 公司), 乙腈(色谱纯, 4L, 美国 Burdick & Jackson 公司), 乙腈(质谱纯, 4L, 美国 ThermoFisher 公司), 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯; 盐酸艾司洛尔对照品(批号 100749-200501, 含量 100%) 由中国食品药品检定研究院提供; 盐酸艾司洛尔注射液原研药(批号 026395, 规格 100 mg/10 mL) 由美国百特医疗用品公司提供; 盐酸艾司洛尔注射液(3 家生产企业, 共 75 批次); 盐酸艾司洛尔原料药(1 家生产企业, 共 2 批次)。

2 现行质量标准

盐酸艾司洛尔注射液的现行质量标准有 2 个, 分别为《国家药品标准》新药转正标准 42 册(以下简称“新药转正 42 册”)^[3]和国家食品药品监督管理局标准 YBH12282005(以下简称“YBH12282005”), 两者主要区别为有关物质检查和含量测定。(1)有关物质: 新药转正 42 册检查项下有关物质项缺失, YBH12282005 有关物质项采用 HPLC 法, 仅控制总杂(1.5%); (2)含量测定: 新药转正 42 册采用 HPLC 法, CN 柱, 以非那西丁为内标, 280 nm 波长处按内标法计算含量; YBH12282005 采用 HPLC 法, CN 柱, 280 nm 波长处按外标法计算含量。详见表 1。

表 1 盐酸艾司洛尔注射液现行标准比较

Table 1 The comparison of the current standards of Esmolol Hydrochloride Injection

检验项目	《国家药品标准》新药转正标准 42 册	国家食品药品监督管理局标准 YBH12282005
性状	无色或微带黄色的澄明液体	无色或微带黄色的澄明液体
鉴别	(1)化学 (2)紫外 (3)液相色谱法	(1)化学 (2)紫外 (3)液相色谱法
pH 值	4.5~5.5	4.5~5.5
有关物质	/	LC 法; CN 柱; 流动相: 甲醇-冰醋酸-0.2% 醋酸钠溶液(45:1:55); 检测波长 280 nm; 限度为总杂质不得超过 1.5%
热原	应符合规定	应符合规定
装量	应符合规定	应符合规定
可见异物	应符合规定	应符合规定
不溶性微粒	应符合规定	应符合规定
无菌	应符合规定	应符合规定
含量测定	LC 法; CN 柱; 流动相为甲醇-冰醋酸-0.14% 醋酸钠溶液(60:1:40); 检测波长 280 nm; 以非那西丁为内标, 限度为标示量的 90.0%~110.0%	LC 法; CN 柱; 流动相为甲醇-冰醋酸-0.2% 醋酸钠溶液(45:1:55); 检测波长 280 nm; 限度为标示量的 90.0%~110.0%

3 法定标准检验结果

本次国家评价性抽验的 75 批样品依据现行法定质量标准进行全检, 71 批符合规定, 合格率为 94.7%。4 批次样品的不合格项目均为有关物质检查项。

3.1 pH 值

按法定标准检测, 各批次样品 pH 值均在 4.6~5.1, 平均值为 4.8。采用单因素方差法分析生产企业与 pH 值关系, 结果表明不同生产企业的 pH 值无显著性差异, 该制剂 pH 值相对稳定。

3.2 有关物质

按照现行标准, 仅 4 批次样品需进行有关物质检查, 杂质总量结果依次为 5.0%、4.6%、5.4%、

8.1%(限度规定: 杂质总量不得超过 1.5%), 均不符合规定。

3.3 含量测定

75 批样品均符合规定, 按生产企业进行统计分析, 结果详见表 2。

表 2 含量测定结果统计(n=2)

Table 2 The statistical analysis of assay (n=2)

生产企业	批次	结果范围/%	平均值/%
企业 1	66	92.3~103.5	99.0
企业 2	5	99.5~100.4	99.5
企业 3	4	91.6~95.8	93.0

4 检验中发现问题

4.1 有关物质

凡法定标准需检查有关物质项的样品,其结果

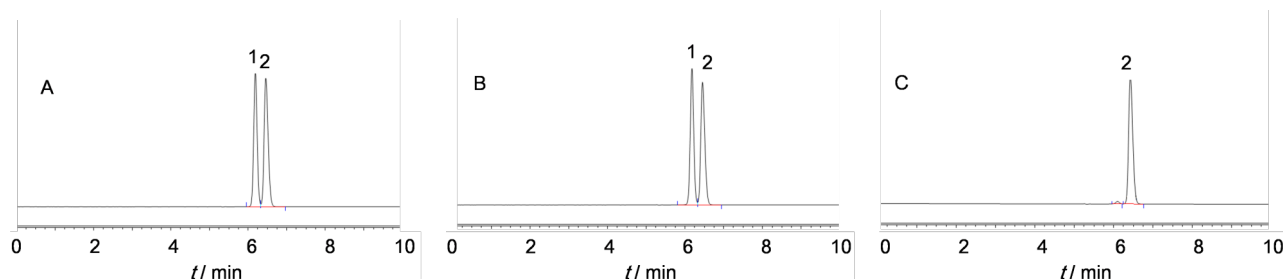
4.2 含量测定

检验中发现,新药转正标准42册色谱条件下,杂质峰与内标峰未完全分离,且不含内标的供试品溶液中的杂质峰与内标峰出峰时间重叠(图1);

均不符合规定,且结果数值超出限度3~5倍。

执行新药转正标准42册法定标准的样品,因标准无有关物质项,其杂质未有效控制,存在安全隐患。

YBH12282005 色谱条件下,溶剂峰干扰主峰测定(图2)。以上问题均在一定程度上影响了盐酸艾司洛尔含量测定的准确性。

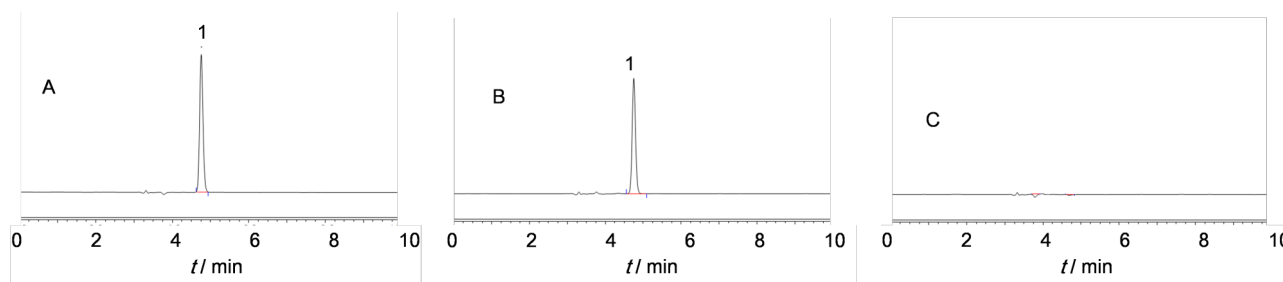


A-对照品;B-供试品;C-供试品(不含内标);1-内标;2-盐酸艾司洛尔

A-The reference solution; B- The test solution; C- The test solution without internal standard; 1- The internal standard; 2- Esmolol Hydrochloride

图1 HPLC 色谱图(新药转正42册WS1-(X-272)-2003Z)

Fig. 1 HPLC chromatogram (WS1-(X-272)-2003Z)



A-对照品;B-供试品;C-溶剂;1-盐酸艾司洛尔

A-The reference solution; B- The test solution; C- The blank solution; 1-Esmolol Hydrochloride

图2 HPLC 色谱图(YBH12282005)

Fig. 2 HPLC chromatogram(YBH12282005)

5 探索性研究^[4-11,12]

5.1 有关物质方法的建立

参考 USP39 和《中国药典》2015 年版二部盐酸艾司洛尔原料的有关物质检查方法,建立盐酸艾司洛尔注射液的有关物质 HPLC 的测定方法,并进行方法学验证。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇为流动相进行梯度洗脱,检测波长 222 nm。采用建立的方法对 2 批原料药、1 批原研药和 3 个生产企业 75 批盐酸艾司洛尔注射液进行测定。结果显示,盐酸艾司洛尔原料药单个最大杂质(杂质 I)与总杂质均小于 1.0%,原研药和 75 批样品均检出含量较高的单个杂质(杂质 I),含量在 1.5%~7.1%,平均值为 2.5%;杂质总量在

2.3%~8.4%,平均值为 3.1%。盐酸艾司洛尔注射液有关物质测定研究表明,盐酸艾司洛尔原料药质量相对稳定,但盐酸艾司洛尔水溶液不稳定,降解明显。调研发现,为保证产品含量在效期内合格,许多企业采用增加投料的方法,但未考虑降解杂质,故有必要对该产品的有关物质进行控制。

5.2 含量测定方法的改进

针对检验中发现的含量测定方法的问题,建立新的盐酸艾司洛尔注射液的含量测定方法,并进行方法学验证。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇为流动相,检测波长 222 nm,外标法计算。采用建立的方法对 3 个生产企业 75 批盐酸艾司洛尔注射液进行测定。结果显

示,75批样品盐酸艾司洛尔在92.8%~102.4%,均值为96.6%,均符合规定。将含量方法改变前后的结果进行配对 t 检验,结果 $P=0.015<0.05$,可以认为方法改变前后的含量测定数据是有显著差异的。故改进该产品的含量测定方法能使结果更准确。

5.3 甲醇量检查方法的建立

据文献报道^[9],盐酸艾司洛尔水解后产生甲醇,从用药安全角度出发,建立盐酸艾司洛尔注射液甲醇量的测定方法,并进行方法学验证。采用直接进样法,DB-624毛细管色谱柱;进样口温度为250℃;程序升温:起始温度50℃,保持4 min,然后以40℃/min的速率上升到200℃,保温4 min;FID检测器,检测器温度为250℃;载气为氮气,体积流量为2.0 mL/min;进样量为1 μ L;分流进样,分流比为10:1。采用建立的方法对2批原料药、1批原研药和3个生产企业75批盐酸艾司洛尔注射液进行测定。结果显示,盐酸艾司洛尔原料的甲醇量均小于0.03%,盐酸艾司洛尔注射液有2个厂家6批甲醇量>0.3%(《中国药典》2015年版四部残留溶剂项下规定:甲醇量不得过0.3%),原研药甲醇量为0.3%。说

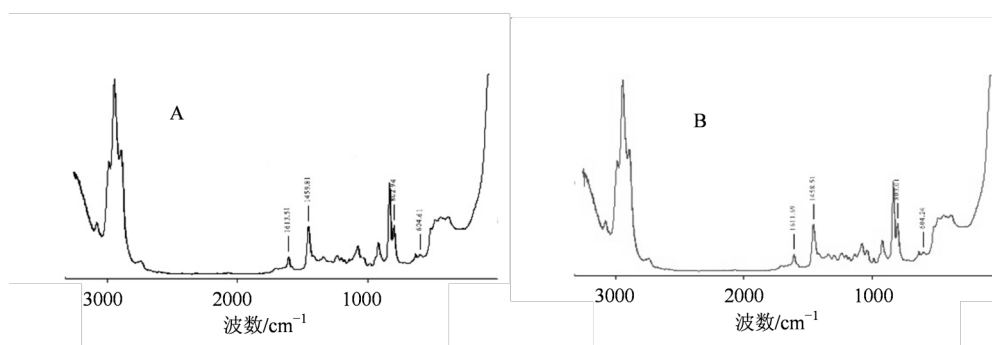
明所建立的方法能体现产品质量的优劣。又因本产品可用于直接静脉注射,增加甲醇量的检查十分必要。

5.4 细菌内毒素检查方法研究

经方法学研究,细菌内毒素检查法可拟定为:取本品,依法检查,每毫克盐酸艾司洛尔中细菌内毒素含量应小于0.25 EU。按此方法测定75批次样品细菌内毒素项目,结果均符合规定。该探索性研究为增加细菌内毒素检查项提供依据。

5.5 快检方法研究

采用MTG拉曼光谱仪,光纤探头测试,785 nm激光波长,激光功率400 mW,总积分时间100 s,谱区范围3 000~200 cm^{-1} 。根据扫描所得图谱分析:盐酸艾司洛尔(API)选用0.1 g/mL的质量浓度较为合适,盐酸艾司洛尔的特征峰在1 614、1 460、803、605 cm^{-1} 附近;辅料的特征峰与盐酸艾司洛尔的特征峰干扰较小;可以通过直接对比原料药图谱与注射剂图谱的特征峰对该品种定性(图3);但不同厂家或者同一厂家不同规格之间的辅料配方组成差异,难以通过拉曼定性模型进行区分。



A-对照图谱;B-样品图谱

A-Reference spectrum; B-Sample spectrum

图3 拉曼光谱图

Fig.3 Raman spectrum

5.6 稳定性研究

5.6.1 pH值影响 取盐酸艾司洛尔原料药,加水溶解,调节pH值分别为4.0、4.5、5.0、5.5和6.0,最终稀释配制质量浓度为0.01 g/mL的溶液各5份。放置于4℃冰箱内保存,于12和24 h分别取样,按新建立的有关物质方法测定pH值与杂质动力学变化情况。结果显示,随着放置时间的增加,溶液的稳定性仅略有降低。故认为在标准规定的pH值范围内(4.5~5.5),pH值影响不大。

5.6.2 灭菌温度的影响 盐酸艾司洛尔注射液采

用终端灭菌,条件为110℃、15 min。经计算,该条件 F_0 值小于8。考虑是否可改变条件,使 F_0 值大于8。故考察110℃/15 min、115℃/30 min和121℃/8 min不同灭菌温度对有关物质的影响。结果显示,灭菌温度的升高和灭菌时间的增加均使杂质质量增加显著,不利于制剂的稳定性,详见表3。

5.6.3 影响因素试验 按照《中国药典》2015年版四部通则9001,将盐酸艾司洛尔注射液制剂进行高温试验和强光照射试验。结果显示,性状、pH值、不溶性微粒和无菌均无明显变化;强光试验中含量测

定和有关物质结果变化不大;高温试验中含量测定结果下降,有关物质杂质质量增加显著,详见表4。提示该品种对光稳定,对温度较敏感。

表3 灭菌条件与有关物质变化

Table 3 The relationship between sterilization conditions and related substances

灭菌条件	杂质I/%	其他单杂/%	总杂质/%
灭菌前	0.2	0.1	0.8
110°C/15 min	1.1	0.1	1.7
115°C/30 min	2.1	0.2	2.8
121°C/8 min	1.9	0.2	2.6

表4 影响因素试验

Table 4 The stress testing

条件	杂质I/%	其他单杂/%	总杂质/%	质量分数/%
未破坏	2.2	0.2	2.6	97.1
高温 5 d	2.7	0.2	3.8	95.5
高温 10 d	3.1	0.3	4.3	94.6
光照 5 d	2.3	0.2	2.7	97.2
光照 10 d	2.3	0.2	2.8	96.9

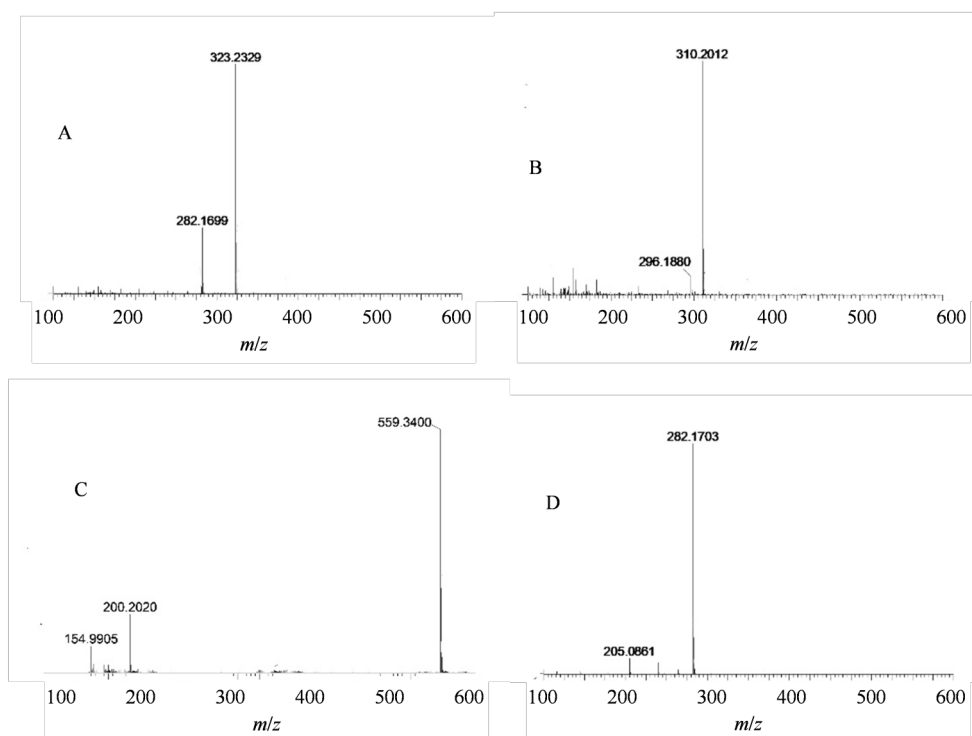
5.7 杂质谱的研究

结合有关物质测定结果和LC-MS分析结果,分析样品中主要降解产物的来源。LC-MS采用的流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱;紫外检测波长222 nm。ESI电喷雾电离源;极性模式:正离子模式。依据原料药合成工艺来分析可能产生的降解产物有酰胺类杂质(分子离子峰为323.2329),乙酯杂质(分子离子峰为310.2012)、二聚物杂质(分子离子峰为559.3400);基于原料药的结构特征来分析可能产生的降解产物有盐酸艾司洛尔水解酸——杂质I(分子离子峰为282.1730),详见图4。

6 讨论

本次评价性抽验采取法定检验结合探索性研究的模式对盐酸艾司洛尔注射液从标准到质量现状、质量影响因素各方面进行了较全面的分析和评价。由法定检验可知,目前绝大部分国产盐酸艾司洛尔注射液均符合现行质量标准要求,合格率为94.7%。但现行质量标准存在一定不完善性,有关物质检查项的部分缺失,造成杂质漏检无法真正控制产品安全性;含量测定方法的缺陷,造成测量数据的偏差无法真实反应产品有效性。

经探索性研究,新建立了该产品的有关物质、



A-酰胺类杂质;B-乙酯杂质;C-二聚物杂质;D-杂质I

A.- Amide impurity; B- Ethyl ester impurity; C- Dimer impurity; D- ImpurityI

图4 相关杂质一级质谱图

Fig.4 MS spectrum of impurities

甲醇量和细菌内毒素检查法,改进了含量测定法,考察了pH值、灭菌条件和高温强光稳定性影响因素,并建立了拉曼光谱快检模型。

针对原质量标准的不完善,建议增修订该品种质量标准中有关物质、甲醇量和含量测定。盐酸艾司洛尔易水解,导致盐酸艾司洛尔注射液产生的单个杂质(杂质I)含量过高(1.5%~7.1%),是该品种不合格的主要原因,应引起重视并加大监管力度。建议生产企业考察延缓盐酸艾司洛尔注射液水解的产品工艺,或是充分研究杂质I药理毒理性质,合理制定其限度;根据国家食品药品监督管理局2008年7号文的要求,注射液应首选终端灭菌工艺,并保证 $SAL \leq 10^{-6}$, F_0 值 >8 。本次国家评价抽验样品涉及生产企业虽均采用了终端灭菌工艺,但灭菌工艺 F_0 值均未达8。稳定性研究已证实灭菌温度和时长均对稳定性有影响,故建议生产企业进一步研究改进该制剂的灭菌工艺,需兼顾产品的稳定性和灭菌效果;该制剂现行标准中的贮藏条件为“遮光,密封保存”,并未对环境温度做出规定。探索性研究已证明该品种对温度敏感,故建议考虑修改贮藏条件。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 二部. 2015.
- [2] The United States Pharmacopoeia[S]. 2016: 3770-3771.
- [3] «国家药品标准»新药转正42册[S]. 2004: 149-151.
- [4] 敖玲玲. 高效液相色谱法测定盐酸艾司洛尔的含量及有关物质[J]. 中国医药指南, 2013, 11(29): 328-329.
- [5] 肖小武, 李婷婷, 程奇珍, 等. 顶空-毛细管柱气相色谱法测定盐酸艾司洛尔中有机溶剂的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2012, 48(7): 848-850.
- [6] 王贵发. 顶空毛细管气相色谱法测定盐酸艾司洛尔有机溶剂残留量[J]. 医药导报, 2008, 27(5): 596-597.
- [7] 孙建合. 顶空气相色谱法测定盐酸艾司洛尔中有机溶剂残留量[J]. 齐鲁药事, 2013, 31(1): 19-20.
- [8] 奚伟国, 贾红圣. 盐酸艾司洛尔注射液的处方工艺研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(10): 7-9.
- [9] 庞文, 李斌, 黄惠锋, 等. 对注射用盐酸艾司洛尔与相关物质的含量测定及其稳定性考察[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(5): 388-390.
- [10] 赵慧玲. 盐酸艾司洛尔注射剂有关物质检查的商榷药物分析杂志[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1594-1595.
- [11] 张弛, 朱嘉亮, 郭志鑫, 等. 我国药品质量分析研究的方法和策略[J]. 中国药事, 2011, 25(1): 63-64.