

利用近红外光谱法评价劳拉西洋片生产过程的控制能力

赵瑜^{1,2}, 尹利辉¹, 尹婕¹, 胡昌勤^{1*}, 凌笑梅^{2*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京大学, 北京 100088)

摘要:目的 评价国内劳拉西洋片生产过程的控制能力。方法 利用近红外光谱法结合聚类分析和主成分分析法表征国内生产的劳拉西洋片不同生产工艺和工艺控制空间;建立近红外光谱通用定量模型,获取样品每个独立单位(片)的含量预测值,通过单变量统计分析获得描述批内、批间工艺均值和变异以及分布情况的统计量,用于相同产品不同工艺的评价。结果 聚类分析和主成分分析法对劳拉西洋片的3个不同生产工艺进行分类表征,主成分2、3重构的工艺控制空间显示B厂家的工艺比A厂家的工艺具有较小的变异范围;劳拉西洋通用定量模型主成分数5, r^2 值93.89%,偏差-0.00856;劳拉西洋含量统计分布结果显示,27个批次中有9个批次具有较大的批内差异,B厂家比A厂家具有较小的批间差异。结论 本实验所建方法能反应劳拉西洋片的不同工艺控制水平,为仿制药一致性评价提供一种有效的药品质量一致性评价方法。

关键词:近红外光谱法;主成分分析;单变量统计分析;制剂质量一致性评价;劳拉西洋片

doi:10.11669/cpj.2019.02.008 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)02-0117-06

Evaluation of the Process Control Capability of Lorazepam Tablets by Near-Infrared Spectroscopy

ZHAO Yu^{1,2}, YIN Li-hui¹, YIN Jie¹, HU Chang-qin^{1*}, LING Xiao-mei^{2*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Peking University, Beijing 100088, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To evaluate the process control capability of lorazepam tablets produced in China. **METHODS** Near-infrared spectroscopy combined with cluster analysis (CLA) and principal component analysis (PCA) were used to characterize the different processes and process control space of lorazepam tablets produced in China. Universal quantitative model was built to obtain the content predictions of individual units (tablets), on base of which process mean value, intra-batch and inter-batch differences and distribution status were calculated by univariate statistics analysis methods. **RESULTS** Three different manufacturing processes of lorazepam tablets were characterized by both CLA and PCA. The process control spaces reconstructed by the second and third principal components indicated that the process of manufacturer B had smaller variation than that of manufacturer A. The universal quantitative model had a principal component number of 5, r^2 square value of 93.89% and bias of -0.00856. The statistic distribution of API contents showed that 9 batches out of the total 27 batches had relative larger intra-batch differences and manufacturer B had better inter-batch differences than manufacturer A. **CONCLUSION** The method this study established can reveal the control levels of different processes of lorazepam tablets, which provide an efficient quality consistency evaluation means for generic drug consistency assessment.

KEY WORDS: near-infrared spectroscopy; principle component analysis; univariate analysis; formulation quality consistency evaluation; lorazepam tablets

劳拉西洋是苯二氮䓬类 (benzodiazepine, BZD) 药物,自1971年问世以来,在抗癫痫持续发作、抗焦虑、抗躁狂症和抗其他激越行为等病症的效果较传统一线药物更佳^[1-2],惠施阿尔斯特公司开发的劳拉西洋片曾被列为2000年世界畅销药物^[3]。劳拉西洋作用于中枢神经系统,存在依赖作用,在我国作为二类精神药品管理^[3]。随着社会经济的发展和水平的提高,在我国心理疾病越来越受到关注和重视,近年国内劳拉西洋片的普及程度有所上升^[4]。2002年以前,我国劳拉西洋片主要依靠进

口,2003年我国批准了首个劳拉西洋片剂,目前国内有3家药厂生产^[5]。

2016年2月,国务院办公厅发布了《关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见》提出“化学药品新注册分类实施前批准上市的仿制药,凡未按照与原研药品质量和疗效一致原则审批的,均须开展一致性评价”^[6]。质量的一致性是药品安全性和有效性的保证,是仿制药一致性评价中的重要部分。《中国药典》2015年版提倡的质量源于设计(QbD)理念,对生产工艺的控制提出了新要求,但如何评价

作者简介:赵瑜,女,副主任药师 研究方向:仿制药一致性评价 * **通讯作者:**胡昌勤,男,研究员 研究方向:仿制药一致性评价,抗生素杂质谱分析 Tel:(010)53851531 E-mail:bjhcq@263.net;凌笑梅,女,教授 研究方向:药物分析新技术和新方法 Tel:(010)82388316 E-mail:pkulxm@126.com

相同产品的不同工艺,目前还没有共性的规律和方法。美国食品药品监督管理局(FDA)提出了“设计空间(design space)”的概念,将其运用于过程分析技术(PAT)和实时放行(RR)中。设计空间可以提供生产过程中保证产品质量的质量属性(如原材料属性)、工艺参数及其相互作用的多维组合空间,它定义了已知影响单元操作或单个生产过程的工艺参数范围,是工艺评价的一个有效的方法^[7]。过去十年国内很多学者在PAT领域的研究虽取得了很多成果,但鉴于国内药品管理和审评政策的限制,目前并没有制药企业在大批量生产中通过PAT的参数实现实时放行,应用设计空间的理念评价工艺在国内尚为空白,因此直接转化国外的工艺评价方法存在技术壁垒和实施难度。

本实验从监管的角度应用设计空间的概念,利用国内生产的劳拉西洋片的国家评价性抽验数据,从药品标准的含量值反向获取药品生产的工艺控制信息,用于对其生产过程的评价;以近红外光谱(NIR)表征相同产品的不同生产工艺和工艺控制空间,探索对药物制剂生产过程控制能力的评价方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

实验仪器:傅里叶近红外光谱仪(型号 Matrix-F, Bruker 公司, 德国), 钠钨灯光源, 迈克尔逊干涉仪, InGaAs 检测器, 石英光纤探头采样方式, 背景聚四氟乙烯。光谱工作站 OPUS (Bruker 公司, 德国), 计算软件 Matlab2017a。

劳拉西洋片样品信息:A 厂家,规格 1 mg, 15 批次, 抽样量 27 个样本; B 厂家,规格 1 mg, 11 批次, 抽样量 42 个样本; C 厂家,规格 0.5 mg, 1 批次, 抽样量 1 个样本。处方信息见表 1。

表 1 劳拉西洋片处方信息

Tab. 1 Prescription information of lorazepam tablets

Prescription	Manufacture A	Manufacture B	Manufacture C
Raw material	lorazepam	lorazepam	lorazepam
Excipients	lactose	starch	lactose
	starch	crosslinked PVP	starch
	carboxymethyl starchsodium	PVP	MCC
	Magnesium stearate	magnesium stearate	magnesium stearate
		ethanol solution	ethanol solution
	Silica		
	crosslinked CMC		

1.2 实验方法

1.2.1 劳拉西洋片含量 按《中国药典》2015 年版 HPLC 测定^[8], 用纯度值(%, $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)作为 NIR 建模的参考化学值。

1.2.2 NIR 光谱采集 ①测试条件:分辨率 8 cm^{-1} , 背景扫描 32 次, 样品扫描 32 次, 谱区范围 $12\,000 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ 。②原辅料测试:采集厂家提供的原料药和辅料的 NIR 光谱。③样品测试:每个样品取 6 个独立单位(片), 使用 3 台相同型号的近红外光谱仪采集光谱, 每片测 3 次取平均光谱。

1.2.3 实验设计 针对劳拉西洋片属管制药品, 生产量少, 市场抽验中部分企业仅抽取到 1 个批次的样品, 其样本量也较少之特点, 结合 NIR 分析的具体要求, 本实验以每个样品的独立单位(片)为研究对象, 设计 NIR 建模实验:使用 3 台相同型号的近红外光谱仪采集近红外光谱, 其中两台仪器采集的近红外光谱作为建模光谱集, 用于建立并优化 NIR 模型;第 3 台仪器采集的近红外光谱作为样品光谱集, 用于计算每个样本 6 片的含量。

根据同一厂家每批次的抽样量将建模光谱集划分为训练集和验证集, 见表 2, 其中, 每个自然批次抽样量仅为 1 个样本的, 计算该样本同一仪器的平均光谱, 取其中一台仪器的平均光谱放入验证集, 另一台仪器的平均光谱放入训练集; 每个自然批次抽样量 2~4 个样本的, 计算每个样本两台仪器的平均光谱, 取其中 1 个样本的平均光谱放入验证集, 其余样本的平均光谱放入训练集; 每个自然批次抽样量 5~7 个样本的, 计算每个样本两台仪器的平均光谱, 取其中 2 个样本的平均光谱放入验证集, 其余样本的平均光谱放入训练集; 每个自然批次抽样量在 8 个样本以上的(含 8 个), 计算每个样本两台仪器的平均光谱, 取其中 3 个样本的平均光谱放入验证集, 其余样本的平均光谱放入训练集。

表 2 近红外建模实验设计

Tab. 2 Experimental design for NIR model

Sample volume of each batch	Sample size of training set	Sample size of validation set	Spectral averaging
1	1	1	1 instrument
2	1	1	2 instruments
3	2	1	2 instruments
4	3	1	2 instruments
5	3	2	2 instruments
6	4	2	2 instruments
7	5	2	2 instruments
8	5	3	2 instruments
9	6	3	2 instruments
10	7	3	2 instruments

1.2.4 劳拉西洋 NIR 含量预测模型 用训练光谱集和 HPLC 含量测定值作为真值,采用偏最小二乘法(PLS)建立模型,并用验证集进行验证,优化模型参数;用定量模型预测每批样品中每片的劳拉西洋含量,依据片重换算成标示量百分含量,并按各样品的厂家和自然批次信息进行汇总。

1.2.5 工艺分类表征和评价 对 70 个样本的近红外光谱分别使用聚类分析(CLA)和主成分分析(PCA),对 3 个厂家不同处方工艺的产品进行分类表征。CLA 用欧氏距离计算光谱距离(公式 1),Ward's 算法度量簇(cluster)之间的距离,即以离差平方和(公式 2)描述簇间的不均匀性(heterogeneity, H),逐一合并 H 增加最小的簇,划分结果。

$$D = \sqrt{\sum_k [a(k) - b(k)]^2} \quad (\text{公式 1})$$

$$H = \sum_{k \in c_1, c_2} D(x, \mu_{c_2})^2 \quad (\text{公式 2})$$

其中, c_1 和 c_2 是待合并的两簇光谱, x 是 c_1 和 c_2 中所有光谱, μ_{c_1, c_2} 是合并后新簇的平均光谱, $D(x, \mu_{c_1})$ 则为每张光谱 x 到平均光谱的距离。

PCA 分析将光谱按厂家划分组别,提取主成分光谱,根据每个样本与该组平均光谱的距离计算平均光谱距离;使用变异最大点(D_{Max})与组内光谱距离的标准偏差(S_{Dev})计算阈值($D_{\text{threshold}}$)(公式 3);根据阈值对工艺的控制空间进行描述,获得工艺分类和工艺变异范围信息。

$$D_{\text{threshold}} = D_{\text{Max}} + 0.25 * S_{\text{Dev}} \quad (\text{公式 3})$$

1.2.6 工艺批内、批间差异的表征和评价 用同一个批次中每一片劳拉西洋的 NIR 含量预测值计算该批样品的均值、标准偏差(SD)和相对标准偏差

(RSD)等统计量;对 A 和 B 两个企业产品,用每一批次劳拉西洋片 NIR 含量预测值的均值计算批间的均值、SD 和 RSD 等统计量;并用盒须图表征批内和批间 API 含量的分布差异,并识别异常值。盒须图中利用中位数(Median)、第一四分位数(Q1)、第三四分位数(Q3)、内限与外限 5 个要素来描述离散数据的分布(图 1),其中 Q1 和 Q3 构成的箱体(四分位间距 $IQR = Q3 - Q1$),代表了 50% 的分布;两个 T 形的盒须是内限,覆盖了 99.4% 的分布,用于界定异常值,其上限为 $Q3 + 1.5IQR$ 和剔除异常值后的极大值二者取最小,下限为 $Q1 - 1.5IQR$ 和剔除异常值后的极小值取最大;此外, $Q3 + 3IQR$ 和 $Q1 - 3IQR$ 被定义为外限(一般不标出)。处于内限以外位置的数据点为异常值,其中在内限与外限之间的点有 99.4% 的概率为异常值,称轻微异常值(mild outliers, MO);而在外限以外的点则 100% 为异常值,称极端异常值(extreme outliers, EO)。

2 结果和讨论

A 厂家与 C 厂家的处方构成较为相近见表 1。用 3 个厂家 70 个样本的近红外光谱进行聚类分析,用矢量归一化和一阶导数(13 点平滑)的光谱预处理方法,计算谱区 $7501 \sim 4486 \text{ cm}^{-1}$,结果见图 1,3 个厂家的样品聚为两类,A 厂家和 C 厂家的异质性结果较近(< 1),与 B 厂家的异质性结果较远(> 7),与表 1 中的处方工艺信息一致。因此,可以使用近红外光谱结合聚类分析方法对不同生产工艺的产品进行分类表征。

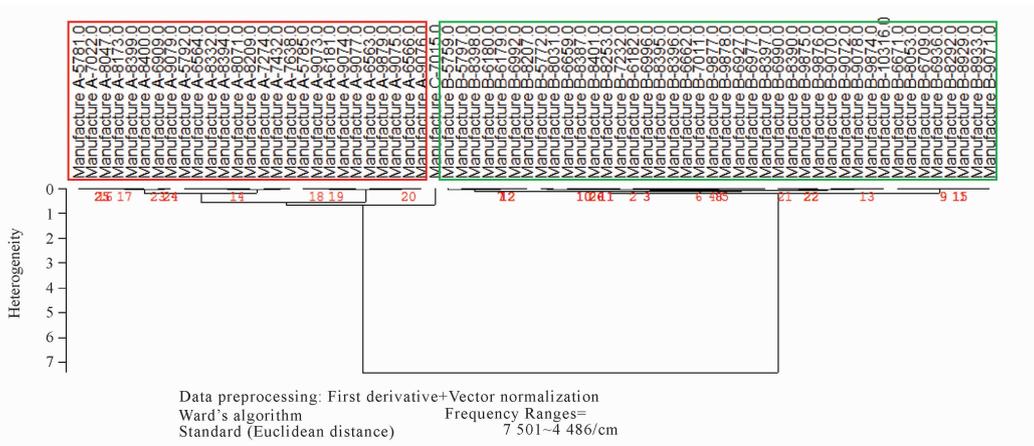


图 1 3 个厂家 70 个样本的近红外光谱聚类分析树状图
红框内光谱为 A 厂家;绿框内光谱为 B 厂家

Fig. 1 NIR Spectra cluster analysis tree of 70 samples from 3 manufacturers

red frame-spectra of manufacturer A ; green frame-spectra of manufacturer B

将 70 个样本的近红外光谱按厂家划分为 3 组, 用主成分分析(PCA)算法, 提取 $7\ 501 \sim 4\ 486\ \text{cm}^{-1}$ 谱区的第 1、2、3 主成分, 厂家 A 平均光谱距离为 0.097 35, SDev 值为 0.118 6, 阈值 0.313 7, 置信水平 99.95%; 厂家 B 平均光谱距离为 0.060 94, SDev 值 0.068 94, 阈值 0.145 9, 置信水平 99.71%。用主成分 2 和 3 的得分(score)重构主成分空间, 即可将 3 个组别原光谱和阈值投影到该主成分空间, 厂家 A 和厂家 B 两个组别完全分离无重叠, 厂家 C 的一个点不属于上述任一组别, 分类结果与厂家归属一致; B 厂家较 A 厂家具有较小的工艺控制范围。因此, PCA 对相同产品的不同工艺控制空间实现了可视化表征, 可同时获得分类和变异范围信息用于评价, 见图 2。

优化的劳拉西洋 NIR 含量预测模型参数(图 3): 计算谱区 $7\ 500 \sim 4\ 600\ \text{cm}^{-1}$, 光谱预处理方法: 矢量归一化, 主成分数 5, r^2 值 93.89%, RMSEP 值 0.019 2, RPD 值 4.52, 偏差 $-0.008\ 56$ (图 4)。

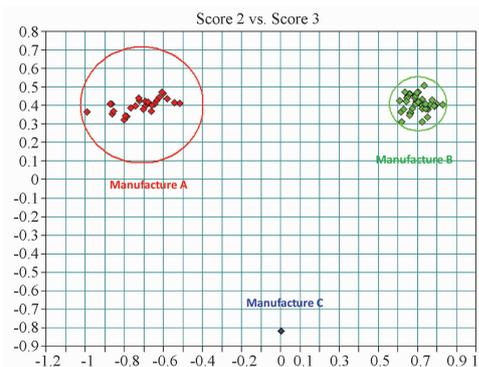


图 2 主成分 2、3 重构工艺控制空间

圆表示该组阈值在该主成分空间上的投影

Fig. 2 Process control spaces restructured using the 2nd and 3th principle components

where the circle is the projection of thresholds on the new space

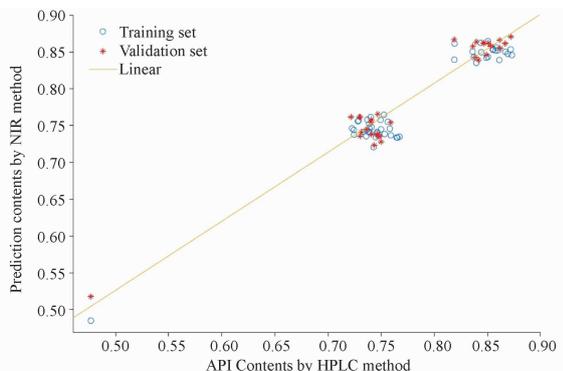


图 3 PLS 模型拟合验证结果和线性图

Fig. 3 Fitting and validation results and linearity of PLS model

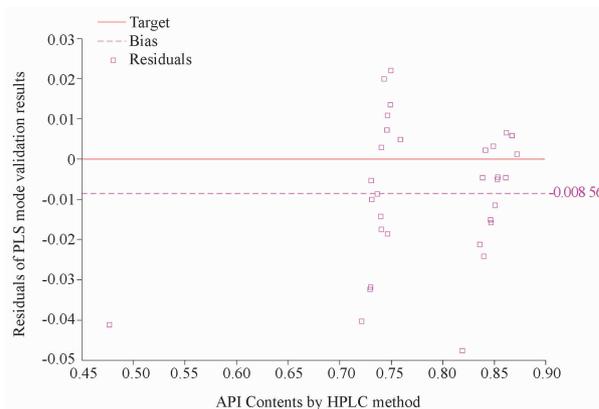


图 4 PLS 模型验证结果残差分布和偏差

Fig. 4 Residual distribution and bias of PLS model validation results

用劳拉西洋定量模型预测全部劳拉西洋片的 API 含量, 共计 284 个结果; 按样品的厂家和自然批次信息进行汇总, 每个批次内各样品的均值、s、RSD 等统计量见表 3, 批内变异最小的是 A 厂家的 B151128 批次, 批内变异最大的是 B 厂家的 160402 批次。但同时我们发现样品量与 RSD 之间具有相关性, 说明仅使用 RSD 无法全面表征产品的质量一致性, 需要结合批次内产品的质量(含量)分布情况进行表征。

采用盒须图表征每个批次内劳拉西洋含量的分布情况, 见图 5, 批次 4、6、9、10、12、13、21、22、23 呈现较大的批内变异, 其中 A 厂家 6 批, B 厂家 2 批; 共出现 6 个统计异常值, 其中 2 个极端异常值 EO, 样品分别属于 A 厂家的 B160214 批次和 B 厂家的 160102 批次; 中位数线分布显示, A 厂家各批次之间波动较 B 厂家各批次之间的波动大, 显示批间变异的差异。

对 A 厂家和 B 厂家各批次间劳拉西洋含量进行统计检验, 结果见表 4, 二者均值差异不明显, 峰度(Kurtosis)值显示 B 厂家批间 API 含量分布更接近于正态分布(正态分布峰度 = 3), 偏度(Skewness)均大于 0, 说明 API 含量位于均值右侧(大于均值)的批次偏多, 双样本方差分析结果显示二者具有显著性差异。用盒须图表征两个厂家批次间劳拉西洋含量的分布情况, 见图 6, 3 个厂家均值处同一水平, A 厂家和 B 厂家两个厂家批间差存在明显差异, 与 F 检验结果一致; B 厂家表现出较小的批间差异, 两个厂家各有一个极端异常值, 分别来自 B160214 批次和 160102 批次, 与图 4 观察的结果一致。

表3 各批次近红外法劳拉西洋含量均值、标准偏差和变异系数

Tab.3 Mean, SD and RSD values of lorazepam contents of different batches of samples determined by NIR method

No.	Batches	Manufacturers	Sample number(count by tablet)	Label content mean/%	s	RSD/%
1	B150140	A	6	95.58	1.35	1.41
2	B150308	A	6	94.58	1.22	1.29
3	B151128	A	6	95.24	0.86	0.90
4	B151132	A	12	94.90	2.62	2.76
5	B160207	A	6	97.50	1.71	1.75
6	B160208	A	24	95.10	2.24	2.35
7	B160209	A	6	99.11	1.42	1.43
8	B160214	A	24	95.99	2.18	2.27
9	B160301	A	18	95.57	2.72	2.84
10	B160328	A	12	93.32	2.52	2.71
11	B160329	A	6	92.11	1.65	1.80
12	B160537	A	12	95.66	2.37	2.48
13	B160605	A	12	95.19	2.37	2.49
14	B160607	A	6	94.13	1.30	1.38
15	B160609	A	6	93.82	1.79	1.91
16	151001	B	6	94.77	2.13	2.25
17	160101	B	24	94.79	1.90	2.00
18	160102	B	6	95.06	1.30	1.37
19	160202	B	36	94.49	1.66	1.76
20	160301	B	12	97.24	2.03	2.09
21	160401	B	36	99.11	2.78	2.81
22	160402	B	60	96.27	3.15	3.27
23	160403	B	36	98.22	2.66	2.71
24	160502	B	24	94.52	1.87	1.98
25	160503	B	6	95.58	2.53	2.64
26	160602	B	6	95.35	2.29	2.40
27	20150702	C	6	95.99	1.53	1.59

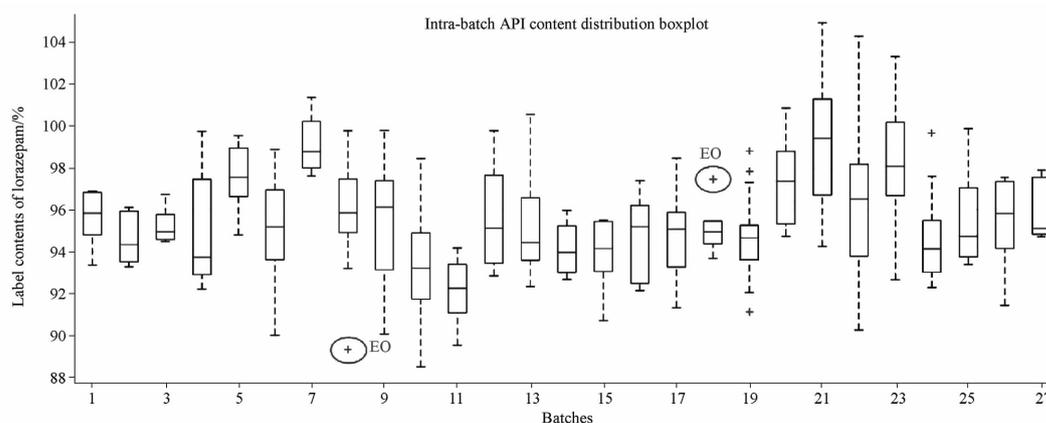


图5 各批次劳拉西洋含量分布情况

1~15 - A 厂家; 16~26 - B 厂家; 27 - C 厂家; + - 异常值, 其中圈中的是极端异常值 EO; n - 同表 3

Fig.5 Intra-batch lorazepam content distribution

1~15 - manufacturer A; 16~26 - manufacturer B; 27 - manufacture C; + - outliers, and those in the circles are extreme outliers, EO; n - same as Tab.3

3 结论

在生产控制能力的评价中,关注的是产品的批内、批间变异,在单变量统计分析变异中个体数据的获取和累积至关重要。本实验利用了 NIR 法定量模型能快速无损检测到每一个独立单位制剂含量的优势,实现了个体数据的获取和累积。本实验所建方法又与以往的 NIR 应用不同,

定量模型的准确度在本方法中可看作系统偏差,对产品变异性评价的结果影响较小,因此本方法对定量模型的准确度具有一定的容忍度。此外,本实验使用含量值作为评价的指标,但本方法同样适用于质量标准中其他指标控制程度的评价,如水分、杂质等,通过这些指标的评价可以寻求关键控制指标,进而指导生产。

表 4 A 厂家和 B 厂家批次间劳拉西泮含量统计检验结果

Tab. 4 Statistic test results of inter-batch lorazepam contents of manufacturers A and B

Statistics	Manufacture A	Manufacture B
Mean	95.46	95.82
SE	0.42	0.20
Medium	95.58	95.93
s	1.64	0.68
RSD/%	1.72	0.70
Variance	2.70	0.46
Kurtosis	1.30	2.81
Skewness	0.21	0.95
Max value	92.11	94.77
Min value	99.11	97.41
Observations	15	11

F test—Two-sample analysis of variance

F	5.93	$F > F_{\text{single-tailed critical}}$
$F_{\text{single-tailed critical}}$	2.86	There are significant differences

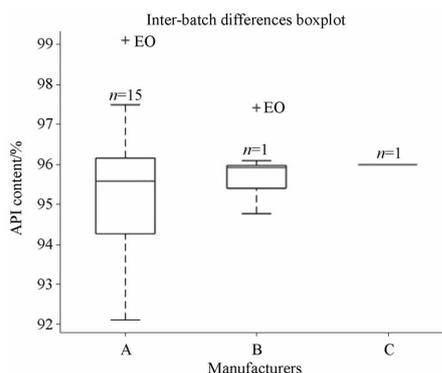


图 6 各厂家劳拉西泮片批间差

厂家 C 为个体样本, 对于个体样本仅描述大小特征不描述离散特征

Fig. 6 Inter-batch differences of lorazepam tablets from different manufacturers

Manufacturer C is an individual sample that only feature of discreteness is described other than feature of size

综上所述,使用近红外光谱法结合聚类分析和主成分分析法能有效表征劳拉西泮片的不同生产工艺和工艺控制空间,建立的劳拉西泮通用 NIR 定量模型能获取样品每个独立单位的含量值,通过统计分析获得描述批内、批间工艺均值和变异以及分布情况的统计量,用于工艺评价,既为仿制药一致性评价提供一种有效的药品质量一致性评价方法,也可用于 PAT 指导生产。

REFERENCES

- [1] CAI Z. Clinical analysis of low-dose of mirtazapine and lorazepam in the treatment for chronic insomnia[J]. *Pract Pharm Clin Remedies*(实用药物与临床), 2013, 16(9): 821-823.
- [2] TANG Q P, LI H, YANG L F, *et al.* A controlled study of venlafaxine and lorazepam in the treatment of generalized anxiety disorder[J]. *Shanghai Arch Psychiatry*(上海精神医学), 2006, 18(4): 228-229.
- [3] LI Y. The status quo and prospects of lorazepam[J]. *Chin J Med Guide*(中国医药导刊), 2000, 2(6): 30-31.
- [4] China market research online. Global and China lorazepam industry development survey and investment outlook analysis report from 2017 to 2023 [EB/OL]. [2018-2-3]. <http://www.cninfo360.com>.
- [5] China Food and Drug Administration. Public Enquiry Platform [DB/OL]. [2018-2-3]. <http://app2.sfda.gov.cn/datasearch/gzcxSearch.do?formRender=cx>.
- [6] Office of the State Council. "Opinions on the consistency assessment of quality and efficacy of generic drugs" [Z]. 2016. 8.
- [7] SHOET S, COGDILL R P, D'AMICO F, *et al.* Performance-based quality specifications: the relationship between process critical control parameters, critical quality attributes, and clinical performance[J]. *J Pharm Sci*, 100(4):1566-1575, 2011.
- [8] *Ch. P*(2015) Vol II (中国药典 2015 年版, 二部) [S]. 2015: 452-453.

(收稿日期:2018-04-25)