

· 研究报告 ·

“质量源于设计”在制备 *N*-乙酰半胱氨酸注射液中的应用

张莉燕, 宋金春 (武汉大学人民医院药学部, 湖北 武汉 430060)

[摘要] **目的** 基于质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念优化 *N*-乙酰半胱氨酸 (NAC) 注射液的处方及制备工艺。**方法** 以 QbD 理念为核心, 通过查阅文献获得关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs), 采用鱼骨图结合失效模式与效应分析法 (failure mode and effects analysis, FMEA) 筛选影响注射液质量的关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs), 使用 Minitab 软件进行试验设计, 建立设计空间。**结果** 以灭菌前后 pH 值变化量, 以主药含量为评价指标, 通过鱼骨图结合 FMEA 确定了依地酸钙钠添加量、配液温度和灭菌条件为影响实验结果的关键工艺参数, 方差分析结果显示建立的工艺参数与评价指标的数学模型 *P* 值均小于 0.05, 表明预测能力较好, 得到的最佳参数为: 依地酸钙钠添加量 0.049 192%, 最佳配液温度 60℃, 灭菌条件 116℃, 40 min。**结论** 基于 QbD 理念设计的 NAC 注射液处方合理, 工艺参数稳定, 建立的设计空间提高了工艺的耐用性, 保证了制剂质量的均一可控。

[关键词] 质量源于设计; *N*-乙酰半胱氨酸; 试验设计

[中图分类号] R944.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)06-0552-07

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.016

Preparation of *N*-acetylcysteine injection based on quality by design

ZHANG Liyan, SONG Jinchun (Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the formulation and preparation technology of *N*-acetylcysteine (NAC) injection based on the concept of quality by design (QbD). **Methods** Using QbD as the guidance, the critical quality attributes affecting the quality of the injection were determined through literature and the critical process parameters were determined by fishbone diagram and failure mode and effects analysis. Minitab was applied to design experiments and analyze results and design space was established. **Results** The evaluation indexes were the pH changes before and after sterilization and the concentration of NAC. The addition of sodium calcium edetate, preparation temperature and sterilization condition were determined as the critical quality attributes by fishbone diagram and FMEA. The results of variance analysis showed that the *P* value of the established mathematical models of the process parameters and evaluation indexes were less than 0.05, which indicated that the models had good prediction ability. The optimal parameters were the addition amount of calcium edetate was 0.049 192%, the preparation temperature was 60 °C, and the sterilization condition was 116 °C, 40 min. **Conclusion** The prescription was reasonable, the process was stable and the established design space based on the concept of QbD improved the durability of the process and ensured uniform and controllability of the quality of the injection.

[Key words] quality by design; *N*-acetylcysteine; design of experiment

2004年9月,美国食品药品监督管理局(FDA)提出将质量源于设计(QbD)理念应用于药品的研发和生产^[1];2006年,人用药品注册技术标准国际协调会(ICH)Q8指南指出,QbD是从预定义产品目标开始,基于科学和风险管理的方法,加强对产品的理解及过程控制的一种系统的开发方法^[2]。基于QbD理念建立满足预定义目标且工艺稳健的设计

空间,对相关工艺参数或物料属性的超限范围进行界定^[3],重点关注控制策略和工艺的耐用性,参数在设计空间内变动时,产品质量也能保持一致。

N-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)是半胱氨酸的乙酰基衍生物^[4],作为对乙酰氨基酚过量的解毒剂被广泛认可^[5],可通过作用于谷氨酸能和多巴胺能神经传递、氧化应激、神经发生、线粒体障碍和炎症途径等发挥作用^[6-7]。在国内,其注射液用于肝衰竭早期治疗,以降低胆红素、提高凝血酶原活力;但在滴注时可出现恶心、呕吐、皮疹、瘙痒、支气管痉挛、头痛头晕、发热、过敏反应等。实验参考Cumberland Pharmaceuticals Inc.原研制剂的处方

[作者简介] 张莉燕,硕士研究生,研究方向:药剂学研究, Tel: 13297990501, Email: 1203337432@qq.com

[通讯作者] 宋金春,博士,教授,研究方向:药物新剂型的开发和研究, Tel: (027)88047471, Email: songjc1234@126.com

组成,基于 QbD 理念对处方因素进行优化和选择,保障注射液质量。

1 仪器与试剂

CPA225D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); ZNCL-GS 智能磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);BF2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);雷磁 PHS-3E 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);砂芯过滤器(天津市津腾实验设备有限公司);SK5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国密理博公司);安捷伦 1100 高效液相色谱仪(配有 G1379A 真空脱气机、G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B-DAD 检测及 Agilent 化学工作站,美国 Agilent 公司)。

N-乙酰半胱氨酸原料药(武汉远大弘元股份有限公司)、依地酸钙钠(上海易恩化学技术有限公司);磷酸二氢钠、磷酸均为分析纯;甲醇为色谱纯[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];水为超纯水。

2 试验方法

2.1 定义目标产品的质量概况

通过查阅原研产品说明书、文献信息,查询目标产品的临床给药特点、给药途径、剂型、规格、容器密闭系统等信息,进行前瞻性的总结,定义目标产品的质量特性(quality target product profile, QT-PP)^[8],如表 1 所示。

表 1 NAC 注射剂的目标产品质量概况

项目	目标
剂型	注射剂
给药途径	静脉给药
装量/剂量	4 g/20 ml
外观	无色澄明溶液
pH	6.5~7.5
可见异物	无明显可见和微细可见异物
含量	标示量的 95.0%~105.0%
杂质限度	N,N-二乙酰-L-半胱氨酸≤1% L-胱氨酸≤0.5% L-半胱氨酸≤0.5% 其他杂质≤1%
包装	I 类硼硅玻璃西林瓶、胶塞、铝盖
储存条件	避光储存于 20~25℃,有效期至少 24 个月

2.2 识别产品关键质量属性

注射剂的关键质量属性(CQAs)通常包括:①无菌保证;②热原或细菌内毒素;③外源性杂质;④注射液的稳定性(如 pH 值、颜色、有关物质、含量等)以及复溶性等^[8]。NAC 易氧化变色,进行处方开发时,将注射液灭菌前后 pH 值的变化量及主药含量作为关键评价指标,即响应。

2.3 风险评估

根据实验过程绘制鱼骨图筛选出影响制剂质量的因素(图 1),主要包括处方因素及工艺因素两部分。

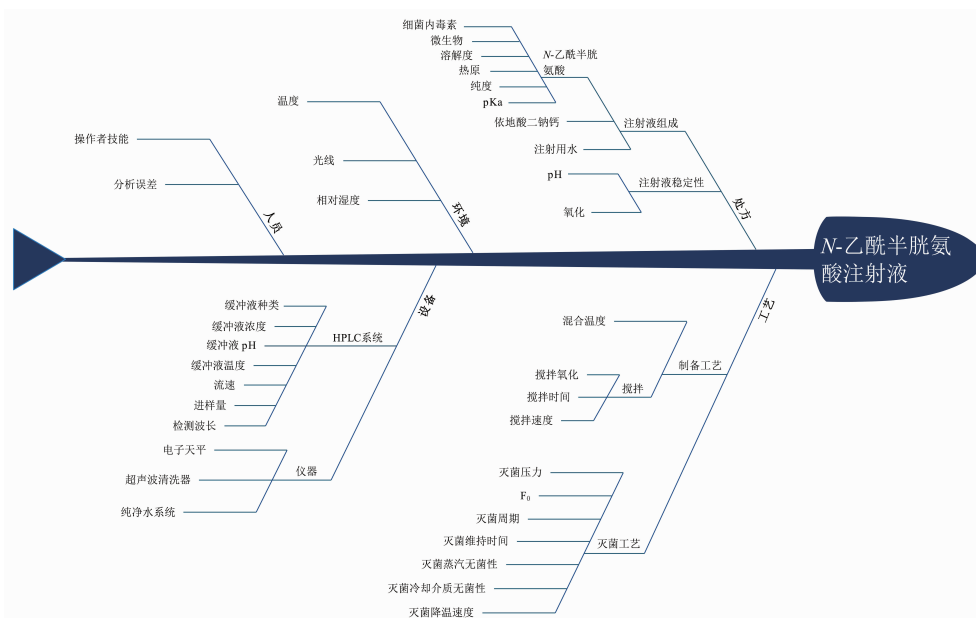


图 1 影响制剂质量因素的鱼骨图

采用失效模式与效应分析(FMEA)对各因素风险进行定量评估^[9],根据风险评估系数值(risk priority number, RPN)确定关键工艺参数。RPN值是由各因素严重程度(S)、发生率(O)和检测难易程度

(D)的得分值相乘得到^[3],当某参数的 RPN 值大于 8 时,则被确定为关键工艺参数。S、O、D 评分原则及参数 RPN 见表 2 和图 2。

表 2 严重程度(S)、发生率(O)和检测难易程度(D)的评分原则

属性	评分等级	评分标准
S	3	高:参数小的波动就能对制剂质量产生严重的影响
	2	中:只有参数在较大范围内波动时才能对制剂质量产生严重影响
	1	低:参数的波动对制剂质量的影响始终较小
O	3	引入或产生较大波动的可能性较大
	2	引入或产生较大波动的可能性较小
	1	始终很稳定,不易引入或产生波动
D	2	发生异常时,很难被检测到
	1	只要发生异常,就能被检测到

注:由于本试验中影响制剂质量的因素或可通过仪器检测间接评估,或为特性参数可直接直观判断(图 1、图 2),故对于检测难易程度(D)只设置了容易检测到和很难被检测到两种情况

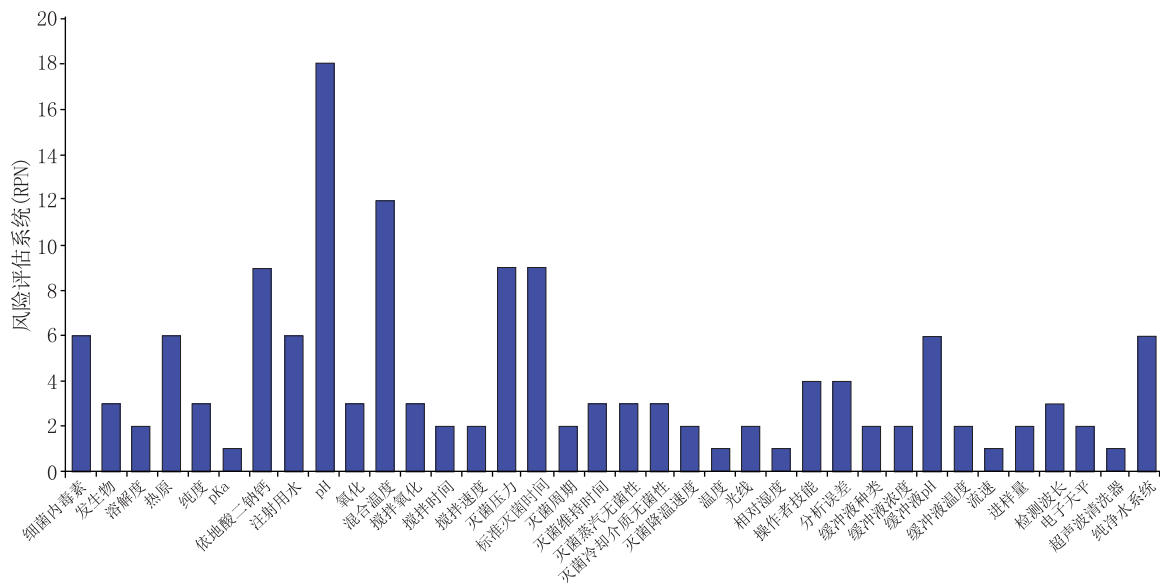


图 2 FMEA 风险评估结果

2.4 关键工艺参数

由风险评估结果(图 2)可知,依地酸钙钠、pH 值、配液温度、灭菌压力、标准灭菌时间的 RPN 值较大,pH 值由预实验结果已确定,因此,本实验选取依地酸钙钠添加量、配液温度及灭菌条件作为影响制剂质量的关键工艺参数。

2.5 试验设计

对 3 个关键工艺参数:依地酸钙钠添加量(A)、配液温度(B)、灭菌条件(C)用 Minitab 软件做全因子试验设计,以灭菌后 pH 值变化量(Y_1)、主药含量

(Y_2)为响应,试验设计因子水平和响应(表 3、表 4),各序列处方见表 5。

2.6 注射剂的制备

量取约 80%处方量的注射用水,通氮气饱和后加入处方量的 NAC 和不同比例的依地酸钙钠,在氮气条件下搅拌使之溶解,加入饱和 NaOH 溶液,调节 pH 为 6.5~7.5,加入氮气饱和的注射用水至处方量,0.45 μm 微孔滤膜过滤,检查滤液澄明度后灌封,通氮气于上部空间,灭菌后灯检,按照规定方法进行可见异物检查,合格样品即为成品。

表3 试验设计因子水平表

因素	水平		
	-1	0	+1
A(依地酸钙钠/%)	0.03	0.04	0.05
B(配液温度/°C)	40	50	60
C(灭菌条件)	116°C, 40 min	121°C, 15 min	121°C, 30 min

表4 相应目标值与可接受范围

指标	目标值	范围
Y ₁ (pH值变化量)	0	<0.5
Y ₂ (含量/%)	100	95~105

表5 析因试验设计表

试验号	A	B	C
1	0	0	0
2	1	-1	1
3	1	1	-1
4	-1	1	1
5	0	0	0
6	-1	-1	-1
7	1	1	1
8	-1	-1	1
9	1	-1	-1
10	-1	1	-1
11	0	0	0

2.7 分析方法

2.7.1 色谱条件

色谱柱: Wondasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(浓磷酸调节 pH 至 2.15)-甲醇(90:10, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μl。

2.7.2 对照品溶液的制备

取 NAC 对照品适量, 精密称定, 加流动相制成 0.08 mg/ml 的溶液, 按上述色谱条件进样。

2.7.3 供试品溶液的制备

量取制备的 NAC 注射剂适量, 加流动相制成 2 mg/ml 的溶液, 再精密量取上述溶液适量, 加流动相制成 0.08 mg/ml 的溶液, 按上述色谱条件进样。

2.7.4 线性关系考察

制备不同浓度的 NAC 对照品溶液, 按上述色谱条件进样, 以 NAC 对照品峰面积(Y)对质量浓度(X)作图, 进行线性回归, 得 NAC 的标准曲线回归方程为 $Y = 14\,679X - 99.267$, 相关系数 $R^2 = 0.999\,7$ 。

3 结果

3.1 试验设计结果

按表5设计的试验顺序进行试验, 结果见表6。对结果进行分析, 各响应的因子效应图见图3、图4, 方差分析结果见表7。

因子效应图表明, 因子 A、B、C 及其相互作用产生的复合因子 AB、AC、BC 均对响应 Y₁、Y₂ 有显著影响。相关性好的模型 R² 应大于 0.8, 本试验 Y₁、Y₂ 模型的 R² 分别为 0.994 0 和 0.989 0, 且与 R²(调整)接近, 表明回归模型对试验拟合较好, 可以信赖; Y₁、Y₂ 模型弯曲 P 值大于 0.05, 表明模型不存在弯曲; 失拟 P 值大于 0.05, 表明不存在更高阶的相互作用, 构建模型合适。

表6 试验设计结果

试验号	A 因素(%)	B 因素(°C)	C 因素	Y ₁	Y ₂
1	0.04	50	121°C, 15 min	0.39	106.21
2	0.05	40	121°C, 30 min	0.25	110.96
3	0.05	60	116°C, 40 min	0.46	100.63
4	0.03	60	121°C, 30 min	0.62	98.12
5	0.04	50	121°C, 15 min	0.45	104.83
6	0.03	40	116°C, 40 min	0.31	109.04
7	0.05	60	121°C, 30 min	0.79	96.70
8	0.03	40	121°C, 30 min	0.29	109.42
9	0.05	40	116°C, 40 min	0.63	97.60
10	0.03	60	116°C, 40 min	0.01	119.92
11	0.04	50	121°C, 15 min	0.41	104.14

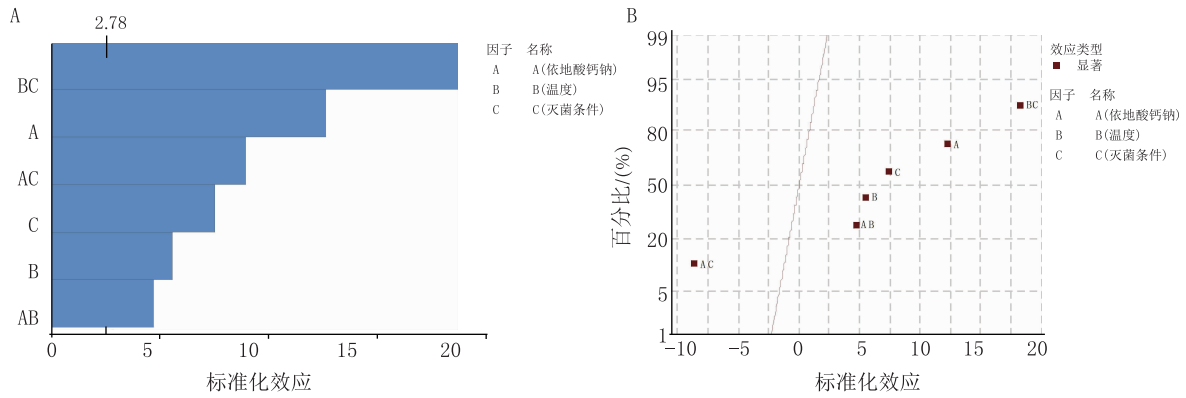


图 3 Y₁ 因子效应图 (α=0.05)
A. 标准化效应的 Pareto 图; B. 标准化效应的正态图

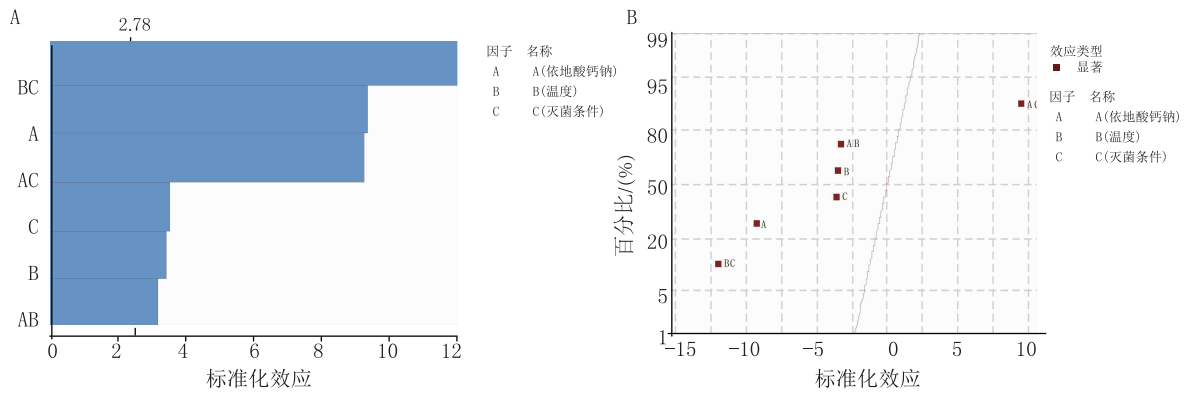


图 4 Y₂ 因子效应图 (α=0.05)
A. 标准化效应的 Pareto 图; B. 标准化效应的正态图

表 7 结果方差分析

来源	模型 P 值	弯曲 P 值	失拟 P 值	R ² (%)	R ² (调整)(%)
Y ₁ 全模型	0.000	0.879	0.452	99.40	98.51
Y ₂ 全模型	0.001	0.806	0.243	98.90	97.25

注:α=0.05

表 8 NAC 设计空间验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

关键评价指标	预测值	实验值
pH 值变化量	0.45	0.47±0.07
主药含量	102.89%	(103.09±0.80)%

由图 5 可见,残差均在正常范围内,且满足正态分布,最终得到响应 Y₁、Y₂ 的回归方程:

$$Y_1 = 0.419\ 09 + 0.112\ 50A + 0.050\ 00\ B + 0.067\ 50C + 0.042\ 50AB - 0.080\ 00AC + 0.167\ 50\ BC$$

$$Y_2 = 105.234 - 3.826A - 1.456B - 1.499C - 1.351AB + 3.856AC - 4.934BC$$

从输出的 Y₁、Y₂ 等值曲线图(图 6)可见,较浅区域的响应更满足要求,对响应进行叠加得到等值曲线叠加图(图 7),确定可接受范围。图中白色区域为可行区域,即建立的设计空间。最后运用响应

优化器进行优化,如图 8 所示,A、B、C 因素分别从低水平变化到高水平时,两个响应的变化趋势相反;由预实验结果已知注射液最适合的 pH 值在 6.5~7.5,虽然注射液灭菌前后的 pH 值变化较大,但仍处于上述范围内,故对响应 Y₂ 给予更多的关注。将 Y₂ 和 Y₁ 的权重比调至 9:1 进行优化时,复合合意性为 0.7269,表明两个响应均获得较好的结果,从而得出最佳工艺参数:依地酸钙钠添加量(A)为 0.049 192%,配液温度(B)为 60℃,灭菌条件(C)为 116℃,40 min。

3.2 设计空间的验证

为了验证设计空间的可靠性,选择空间内的点(0.5,0.0),即依地酸钙钠添加量为0.045%,配液温度为50℃,灭菌条件为116℃,40 min进行验证,

平行3次测定,结果显示,实验值与预测值相近,表明建立的模型具有较好的预测能力,且在设计空间内改变生产工艺和参数时能保证制剂质量的均一可控。

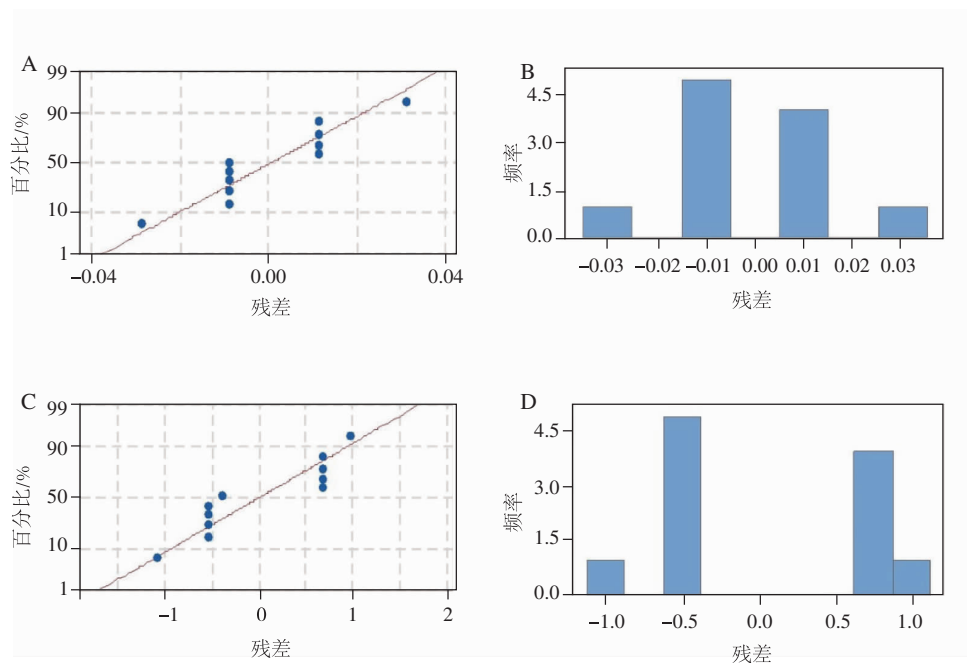


图5 Y_1 、 Y_2 残差图

A. Y_1 残差正态概率图; B. Y_1 残差直方图; C. Y_2 残差正态概率图; D. Y_2 残差直方图

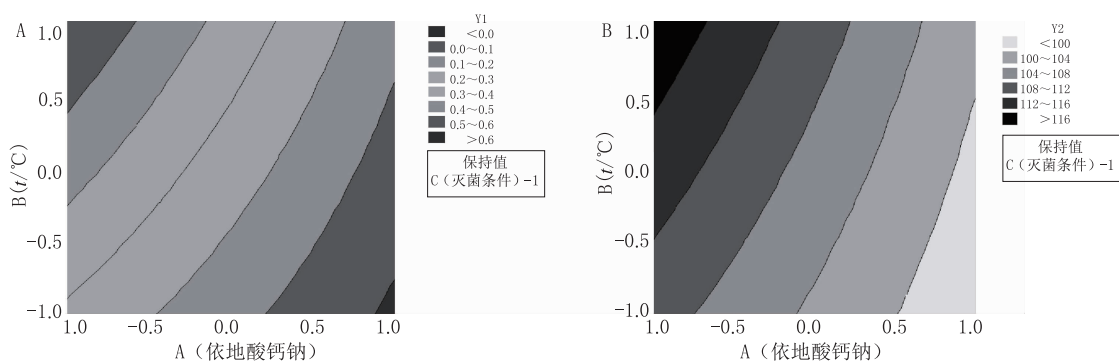


图6 Y_1 、 Y_2 等值线图

A. Y_1 与 $B(t/^\circ\text{C})$ 、 A (依地酸钙钠)的等值线图; B. Y_2 与 $B(t/^\circ\text{C})$ 、 A (依地酸钙钠)的等值线图

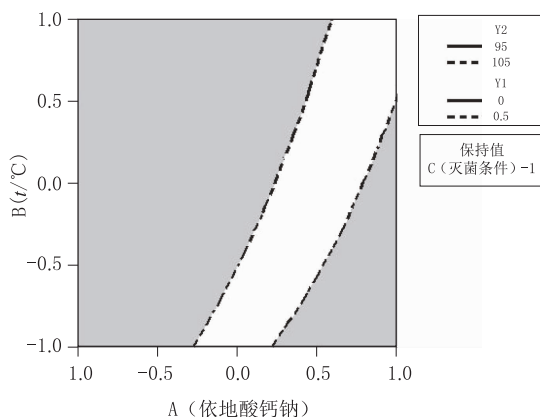


图7 Y_1 、 Y_2 等值曲线叠加图

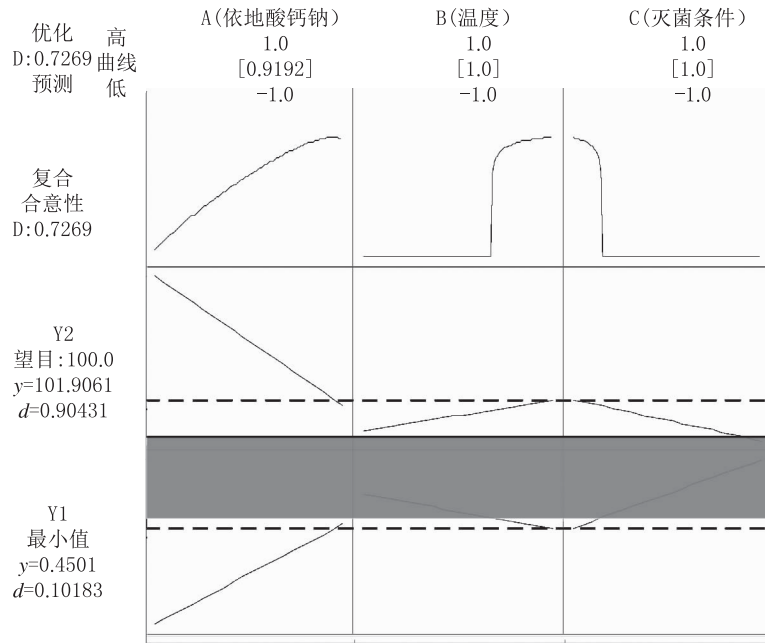


图8 多响应优化图

4 讨论

本实验参考 Cumberland Pharmaceuticals Inc. 原研制剂处方组成, 基于 QbD 理念, 开发了稳定性好、致敏性低的注射液。绘制鱼骨图结合 FMEA 法进行因子风险评估, 确定了依地酸钙钠添加量、配液温度及灭菌条件作为影响制剂质量的关键工艺参数; 通过析因实验设计研究了 CPPs 对响应的影响, 最终得到最佳工艺参数及设计空间, 且验证空间结果与预测值接近。按照 QbD 理念设计的注射液, 其工艺参数在设计空间内变化时, 质量仍能保持均一稳定, 从而保障了药品质量。

【参考文献】

- [1] FDA. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century-A Risk Based Approach [EB/OL]. US, 2004, [2019-02-22]. <https://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm128080.htm>.
- [2] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Harmonized Tripartite Guideline. Q8, Pharmaceutical Development, Current Step 4 Version [EB/OL]. US, 2004 (2009-08). [2019-02-22]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/

Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf.

- [3] 陈桢, 李冰韶, 王永洁, 等. 设计空间法优化红花温浸提取工艺[J]. 中草药, 2018, 49(19): 4544-4551.
- [4] ARAKAWA M, ITO Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases; basic and clinical pharmacology[J]. Cerebellum, 2007, 6(4): 308-314.
- [5] GREEN J L, HEARD K J, REYNOLDS K M, et al. Oral and intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen toxicity: a systematic review and meta-analysis[J]. West J Emerg Med, 2013, 14(3): 218-226.
- [6] BAVARSAD SHAHRIPOUR R, HARRIGAN M R, ALEXANDROV A V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders; mechanisms of action and therapeutic opportunities [J]. Brain Behav, 2014, 4(2): 108-122.
- [7] MINARINI A, FERRARI S, GALLETTI M, et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders; current status and future prospects[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(3): 279-292.
- [8] 蒋煜, 杨建红, 王亚敏. “质量源于设计”在仿制注射剂处方工艺研究中的应用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(8): 921-924, 954.
- [9] 崔向龙, 徐冰, 孙飞, 等. 质量源于设计在银杏叶片制剂工艺中的应用(III): 基于设计空间的过程控制策略[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1048-1054.

[收稿日期] 2019-03-03 [修回日期] 2019-04-28

[本文编辑] 李睿旻