

HPLC法测定仿制与原研安立生坦片的体外溶出度

陈保来^{1,2*}, 孙霞², 仲艳², 李家春², 秦建平², 黄文哲¹, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2#} (1.南京中医药大学, 南京 210000; 2.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2128-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.41

摘要 目的:建立测定安立生坦片体外溶出度的方法,并将安立生坦片仿制与原研药的溶出曲线进行比较。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Gemini C₁₈,流动相为乙腈-0.02%三氟乙酸水溶液(60:40, V/V),流速为1.2 ml/min,检测波长为220 nm,柱温为40 ℃,进样量为100 μl。溶出度测定以水、0.1 mol/L盐酸溶液(pH=1.0)、醋酸盐缓冲液(pH=5.0)、磷酸盐缓冲液(pH=6.8)为溶出介质,转速为50 r/min,5~120 min分别取样。结果:安立生坦质量浓度在1.14~6.83 μg/ml范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<0.3%;平均回收率为99.38%,RSD为0.50%($n=9$);在4种溶出介质中,仿制与原研安立生坦片的溶出曲线相似因子(f_2)均>50,酸值(AV)均<15。结论:仿制与原研安立生坦片的体外溶出行为一致。该方法可用于安立生坦片仿制药的一致性评价。

关键词 安立生坦片;溶出曲线;相似因子法;AV值;高效液相色谱法

Comparison of *in vitro* Dissolution between Domestic and Original Ambrisentan Tablets

CHEN Bao-lai^{1,2}, SUN Xia², ZHONG Yan², LI Jia-chun², QIN Jian-ping², HUANG Wen-zhe¹, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2} (1.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000; 2.Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Lianyungang 222001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the dissolution of Ambrisentan tablet *in vitro*, and compare the dissolution profiles between the domestic and original products. METHODS: HPLC method was adopted. The column was Phenomenex Gemini C₁₈, mobile phase was acetonitrile-0.02% aqueous trifluoroacetic acid (60:40, V/V) with a flow rate of 1.2 ml/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 40 ℃, the injection volume was 100 μl. The dissolution was determined in water, 0.1 mol/L hydrochloric acid solution (pH=1.0), acetate buffer (pH=5.0) and phosphate buffer (pH=6.8) with speed of 50 r/min. The samples were taken at 5 to 120 min. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of ambrisentan and peak area in the range of 1.14-6.83 μg/ml ($r=0.9999$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.3%. The average recovery was 99.38%, RSD was 0.50% ($n=9$). In 4 kinds of mediums, the value of f_2 was more than 50 and the average AV value was less than 15 in domestic Ambrisentan tablets and its original product. CONCLUSIONS: The dissolution profiles of domestic Ambrisentan tablets are consistent with its original product *in vitro*. The method can be used for the consistency assessment of domestic Ambrisentan tablets.

KEYWORDS Ambrisentan tablets; Dissolution curves; Similar factor; AV value; HPLC

安立生坦是一种选择性内皮素受体拮抗药,可强效抑制内皮素所致的血管收缩,其片剂口服可用于肺动脉高压(PAH)的治疗^[1-2]。目前,国内有进口安立生坦片上市。安立生坦为弱酸性(pK_a为4.0),在水、0.1 mol/L盐酸溶液中几乎不溶,因此安立生坦片的溶出行为可直接影响其体内生物利用度。本研究建立了测定安立生坦片体外溶出度的试验方法,并考察仿制与原研安立生坦片在不同溶出介质中的溶出曲线。溶出曲线的相似性评价方法较多,主要有模型依赖法(如Weibull分布模型等)和非模型依赖法[如相似因子(f_2)法、溶出效率评价法、偏离度法、酸值(AV)法等]。美国食品药品监督管理局(FDA)及日本厚生劳动省均推荐相似因子法^[4]。鉴于单一使用相似因子法的缺陷,本文同时采用 f_2 法与AV值法^[4]对其进行相似性

评价,为仿制药质量一致性评价提供参考。

1 材料

LC-20AB HPLC仪,包括LC-20AB泵、SIL-20A自动进样器、CTO-20AC柱温箱、SPD-20AV检测器及LC-Solution工作软件(日本岛津公司);8CZ-8M溶出试验仪及RZQ-8D取样收集系统(天津市天大天发科技有限公司);BP211D电子天平(北京赛多利斯公司);KQ-250DB超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

安立生坦对照品(批号:120501-DZ,纯度:99.95%)、安立生坦原料(批号:121001,纯度:99.86%)、安立生坦片(批号:131001,规格:5 mg)均由江苏康缘药业股份有限公司提供;原研安立生坦片(葛兰素史克股份有限公司,批号:HPXY,规格:5 mg);乙腈、三氟乙酸为色谱纯,盐酸、冰醋酸、氢氧化钾、苯二甲酸氢钾、磷酸二氢钾均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

* 中级工程师。研究方向:药物分析。电话:0518-81152321。E-mail: cbl0501@163.com

通信作者:研究员级高级工程师,博士。研究方向:中药新药的研究与开发。电话:0518-81152337。E-mail: wzhzh-nj@163.com

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.02% 三氟乙酸水溶液(60:40, V/V); 流速:1.2 ml/min; 检测波长:220 nm; 柱温:40 ℃; 进样量:100 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取安立生坦对照品约11 mg, 置于100 ml 量瓶中, 加乙腈50 ml, 超声(功率:250 W, 频率:40 kHz)处理2 min 使溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀; 精密量取适量, 用水、0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0)、醋酸盐缓冲液(pH=5.0)、磷酸盐缓冲液(pH=6.8)4种溶出介质稀释制成每1 ml 中约含安立生坦5.6 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 根据美国FDA公布的安立关系到坦片溶出方法, 并参考相关文献^[5-8], 溶出方法选择浆法, 转速为50 r/min, 分别加入“2.2.1”项下4种溶出介质, 溶出体积为900 ml, 于5、10、15、20、30、45、60、90、120 min 时分别取样2 ml, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液 取不含安立生坦的空白辅料14 mg, 置于100 ml 量瓶中, 加“2.2.1”项下4种溶出介质溶解并稀释至刻度, 滤过, 即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液及空白辅料溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样, 色谱见图1。结果表明, 空白辅料溶液不干扰测定。

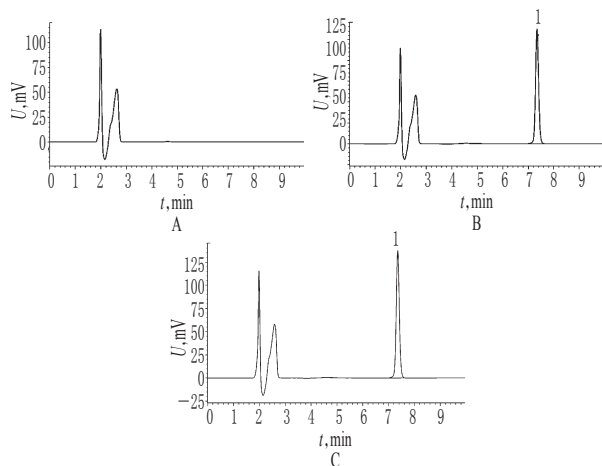


图1 高效液相色谱图

A.空白辅料; B.对照品; C.供试品; 1.安立生坦

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank control; B.substance control; C.test sample; 1.ambriestentan

2.4 线性关系考察

精密称取安立生坦对照品5.61 mg, 置于100 ml 的量瓶中, 加入乙腈50 ml 溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得对照品贮备液。精密量取对照品贮备液, 加入醋酸盐缓冲液(pH=5.0) 稀释至质量浓度为1.14、2.28、2.85、4.55、5.69、6.83 μg/ml 的系列对照品溶液。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得安立生坦回归方程为 $y=201\ 403x+10\ 162$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 安立生坦质量浓度在1.14~6.83 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 安立生坦峰面积的RSD为0.18%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取安立生坦片细粉(批号:131001)适量(约相当于安立生坦5.6 mg), 置于1 000 ml 溶出杯中, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置5、30、60、90、120、240、360 min 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 安立生坦峰面积的RSD为0.23%, 表明供试品溶液在4种溶出介质中6 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取安立生坦片细粉(批号:131001)适量, 按“2.2.2”项下方法制备6份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 安立生坦含量的RSD为0.26%, 表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

取安立生坦对照品约2.8、4.2、5.6 mg, 各平行3份, 置于1 000 ml 量瓶中, 加入140 mg 空白辅料, 加入醋酸盐缓冲液(pH=5.0) 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算回收率, 结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
2.88	2.86	99.31		
2.85	2.82	98.95		
2.87	2.84	98.95		
4.21	4.20	99.76		
4.16	4.15	99.76	99.38	0.50
4.14	4.12	99.52		
5.64	5.61	99.47		
5.63	5.62	99.82		
5.57	5.51	98.92		

2.9 与原研药溶出曲线的比较

取仿制药(批号:131001)与原研药(批号:HPXY)各12片, 测定每片不同时间的溶出度。平均累积溶出度结果见表2、图2。

参考相关指导原则及文献, 笔者采用 f_2 法及 AV 值法两种互补的非模型依赖法, 对仿制药与原研药间溶出曲线的相似性进行评价, 结果见表3。在0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0)、醋酸盐缓冲液(pH=5.0)溶出介质中, 全部有效点的 AV 值均小于15, 表明两条溶出曲线整体相似; f_2 值大于50, 亦表明两条溶出曲线相似。在水中, 存在 AV 值大于15的有效点, 但平均 AV 值小于15, 表明两条溶出曲线基本相似; f_2 值大于50, 亦表明两条溶出曲线相似。在磷酸盐缓冲液(pH=6.8)溶出介质中, 15 min 内容出度达90%以上, 表明该溶出介质对两种产品无区分效应, 可判定溶出行为相似, 无需进行溶出曲线相似性计算。

3 讨论

3.1 溶出介质的选择

安立生坦 pK_a 为4.0, 可看作中性药, 溶出介质pH应选择1.0或1.2、3.0~5.0、6.8和水^[9]。进口安立生坦片溶出度检测方

表2 仿制药及原研药在4种溶出介质中的累积溶出度测定结果($\bar{x} \pm s, n=12, \%$)

Tab 2 Accumulative dissolution of domestic and original products of products in 4 kinds of dissolution mediums ($\bar{x} \pm s, n=12, \%$)

时间, min	0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0)		水		醋酸盐缓冲液(pH=5.0)		磷酸盐缓冲液(pH=6.8)	
	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10.6±1.5	16.0±3.0	29.7±1.9	47.5±2.7	39.1±2.4	46.0±3.8	60.1±5.2	91.4±2.2
10	29.4±2.2	29.5±3.1	60.6±1.6	63.3±1.3	75.3±2.2	70.3±2.6	90.6±2.6	99.6±1.9
15	42.4±2.5	39.3±2.6	72.0±2.1	70.7±1.7	84.0±2.4	79.3±2.3	94.2±1.9	100.3±2.3
20	50.8±2.1	46.6±2.6	78.1±1.6	74.8±0.9	87.7±2.3	83.0±2.0	95.6±1.6	100.4±2.3
30	60.6±1.6	55.1±1.8	83.7±2.3	79.5±1.0	91.3±2.2	88.6±1.8	97.8±1.7	100.4±2.5
45	70.2±2.0	63.4±1.5	85.9±0.8	85.1±1.2	92.7±1.5	93.2±1.8	99.6±1.6	100.3±2.5
60	74.2±1.6	68.2±1.8	86.9±0.8	87.0±1.4	94.7±1.0	95.0±1.6	99.8±1.7	100.2±2.4
90	80.2±1.1	83.6±1.3	-	-	-	-	-	-
120	85.3±1.2	85.7±1.0	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示该时间点未取样测定溶出度

Notes:“-”represents dissolution was not determined at that time point

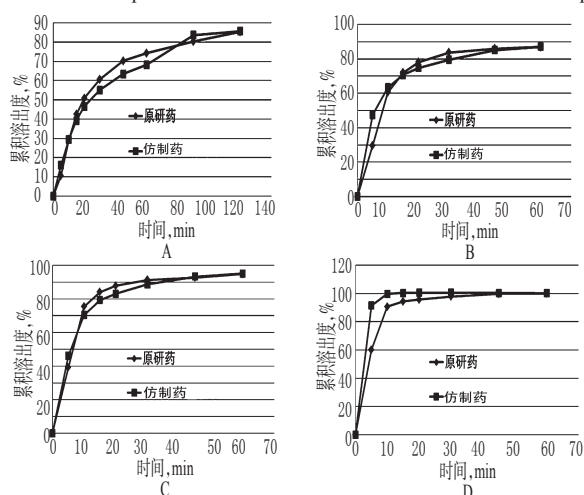


图2 仿制药及原研药在4种溶出介质中的溶出曲线

A.0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0); B.水; C.醋酸盐缓冲液(pH=5.0); D.磷酸盐缓冲液(pH=6.8)

Fig 2 Dissolution curves of domestic and original products in 4 kinds of dissolution mediums

A.0.1 mol/L hydrochloric acid solution (pH=1.0); B.water; C.acetate buffer solution (pH=5.0); D.phosphate buffer solution(pH=6.8)

表3 仿制药及原研药在4种溶出介质中的AV值与f₂值比较

Tab 3 Comparison of f₂ and AV value of domestic and original products in 4 kinds of dissolution mediums

方法	时间, min	0.1 mol/L 盐酸溶液 (pH=1.0)	水	醋酸盐缓冲液 (pH=5.0)	磷酸盐缓冲液 (pH=6.8)
AV值	5	10.8	23.7	14.3	40.5
	10	8.7	6.5	10.7	-
	15	9.4	6.9	10.2	-
	20	9.9	6.7	9.8	-
	30	9.6	8.4	-	-
	45	10.9	5.8	-	-
	60	10.0	5.0	-	-
	AV平均值		9.9	9.0	11.3
f ₂		63.5	57.1	64.6	不适用

注:“-”表示该时间点溶出度大于90%,其AV值忽略不计

Notes:“-”represents the AV value can be neglected, because its dissolution were more than 90% at that time point

法及美国FDA网站公布的安立生坦片溶出度条件均选择醋酸盐缓冲液(pH=5.0)。此外,安立生坦pH-溶解度曲线测试结果显示其溶解度与pH有相关性。综合考虑上述因素,确定溶出介质为水、0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0)、醋酸盐缓冲液(pH=5.0)、磷酸盐缓冲液(pH=6.8)。

3.2 取样时间点的确定

安立生坦片在水、醋酸盐缓冲液(pH=5.0)、磷酸盐缓冲液(pH=6.8)中在60 min内均能满足连续两点的溶出度在85%以上,且差值在5%以内,取样时间点选择为5、10、15、20、30、45、60 min。在0.1 mol/L 盐酸溶液(pH=1.0)的溶出介质中,选择的时间点增加90、120 min。

参考文献

- [1] Vatter H, Seifert V. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006, 24 (1):63.
- [2] Frampton JE. Ambrisentan[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2011, 11(4):215.
- [3] 牛剑钊,林兰,张启明.美国和日本溶出曲线相似性判定方法介绍[J].*中国药物评价*, 2013, 30(2):67.
- [4] 姜雄平,魏立平.一种新的溶出曲线比较方案[J].*药物分析杂志*, 2010, 30(6):1 026.
- [5] 唐了平,产运霞,马贵红,等.阿齐沙坦片国产品溶出度试验方法的建立及与原研品体外溶出行为比较[J].*中国药房*, 2014, 25(17):1 609.
- [6] 中国食品药品检定研究院.普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则:草案[S].2013-12-31.
- [7] 国家食品药品监督管理局药品审评中心.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[S].2012-11-19.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010:附录85-87.
- [9] 谢沐风.如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J].*中国医药工业杂志*, 2012, 43(3):23.

(收稿日期:2014-10-21 修回日期:2014-12-18)

(编辑:余庆华)