

自制恩替卡韦片与上市对照制剂体外溶出度对比研究

李瑞芳,程秀民*

(山东大学药学院,济南 250012)

摘要 目的:比较自制恩替卡韦片与对照制剂体外溶出行为。方法:参照日本《医疗用药品品质情报集》中的溶出度试验条件,分别考察自制制剂与对照制剂在 pH1.2 的人工胃液、pH4.0 的醋酸盐缓冲液、pH6.8 的磷酸盐缓冲液及水中的体外溶出行为,溶出方法为桨法,转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果:自制制剂与对照制剂在 4 种不同的溶出介质中溶出曲线均相似。结论:自制制剂与对照制剂体外溶出度基本一致。

关键词: 恩替卡韦; 溶出度; 对比研究

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2011)07-1333-04

The comparative study of dissolution of Self-made Entecavir tablets and contrast agents

LI Rui-fang, CHENG Xiu-min*

(College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract Objective: To compare the in vitro dissolution behavior of Self-made entecavir tablets and the control agents. **Methods:** According to the dissolution test conditions of carbamazepine tablets in Japan's "quality of medical drugs information set", different carbamazepine products were inspected in pH1.2 solution, pH4.0 acetate buffer, pH6.8 phosphate buffer and water (paddle, $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$). **Results:** The in vitro dissolution of self-made preparations and control preparations in 4 different dissolution media were similar. **Conclusion:** Self-made preparations and control preparations consistent dissolution.

Key words: entecavir; dissolution; comparative study

恩替卡韦为环氧羟碳脱氧鸟苷,是一种能有效抑制乙肝病毒复制的脱氧鸟核苷类似物,具有较强的抗 HBV 作用。体外试验表明,恩替卡韦、拉米夫定和泛昔洛韦抑制 HBV 的半数有效浓度(EC_{50})分别为 $0.00375 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.116 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\geq 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [1]。动物模型和人体临床研究结果显示,恩替卡韦具有极强的抑制乙型肝炎病毒复制,降低血清病毒 DNA 水平的作用,对耐拉米夫定的突变病毒株仍然有效,且未见明显的不良反应和线粒体毒性 [2]。2005 年美国食品与药品监督管理局(FDA)与中国国家食品药品监督管理局(SFDA)相继批准恩替卡韦(ETV)用于慢性乙型肝炎(CHB)治疗。为考察自制制剂与对照制剂的质量一致性,本实验采用日本“药品品质再评价”工程在溶出度研究中所拟定的模拟人体消化道内体液的 4 种基本介质进行试验研究。

1 仪器与试药

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪,SPD-10A 紫外-可见检测器;METTLER AB135-S 电子天平;RCZ-8B 智能溶出仪。

盐酸,氯化钠,冰醋酸,醋酸钠,磷酸二氢钾,无水磷酸氢二钠,以上试剂均为分析纯。

恩替卡韦对照品,自制,批号:20100409,纯度:99.95% (HPLC 法测定,按面积归一化计算),水分 6.52%。

自制恩替卡韦片批号:20100722,规格 0.5 mg。

恩替卡韦片对照制剂:中美上海施贵宝制药有限公司,批号:1002663,规格 0.5 mg。

2 色谱条件

流动相 [3]: 乙腈-水(8:92); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

* 通讯作者 Tel: (0531) 88380526 Fax: (0531) 88382014; E-mail: minn@sdu.edu.cn

mim⁻¹; 检测波长 254 nm; 进样量: 100 μL。

色谱柱: 岛津 VP-ODS(150 L × 4.6)。

3 溶出介质的配制^[4]

水: 纯净水。

pH 1.2 的人工胃液: 取氯化钠 2.0 g, 加水适量溶解后, 加盐酸 7 mL, 再加水稀释至 1000 mL, 混匀, 即得。

pH 4.0 醋酸盐溶液: 将 0.05 mol · L⁻¹ 醋酸溶液与 0.05 mol · L⁻¹ 醋酸钠溶液按 16.4:3.6 比例混合, 即得。

pH 6.8 磷酸盐缓冲液: 取磷酸二氢钾 1.7 g 和

无水磷酸氢二钠 1.775 g, 加水溶解并定容至 1000 mL 即得。

4 标准曲线的制备

取恩替卡韦对照品约 12.5 mg(按无水物计), 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液; 精密量取储备液适量, 分别用溶出介质稀释制成每 1 mL 含 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 μg 的溶液, 精密量取上述溶液各 100 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积对浓度进行线性回归, 结果各条件下线性关系均良好。见表 1。

表 1 标准曲线试验结果

Tab 1 Results of standard curve

介质 (medium)	标准曲线 (linear equation)	相关系数 (correlation)
水 (water)	$A = 291275 \times C + 4205.8$	0.9999
pH 1.2 人工胃液 (pH 1.2 artificial gastric juice)	$A = 294611 \times C + 3992.5$	0.9998
pH 4.0 醋酸盐缓冲液 (pH 4.0 acetate buffer solution)	$A = 287653 \times C + 5476.8$	0.9997
pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8 phosphate buffer solution)	$A = 289217 \times C + 4572.4$	0.9999

5 空白干扰考察

取空白辅料约 0.1 g, 置 500 mL 量瓶中, 加溶出介质适量, 振摇 10 min, 加溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 100 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果: 各溶出介质条件下辅料均不干扰本品溶出度的测定。

6 精密度试验

量取用各溶出介质稀释制成的 0.5 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液分别连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算各组峰面积的 RSD, 结果表明: 各条件下精密度均良好。见表 2。

表 2 精密度试验结果

Tab 2 Results of precision test

介质(medium)	峰面积(area)			RSD/%
水 (water)	149928 148905	149230 149278	149351 149282	0.22
pH 1.2 人工胃液 (pH 1.2 artificial gastric juice)	150287 150703	151264 151289	151178 151024	0.26
pH 4.0 醋酸盐缓冲液 (pH 4.0 acetate buffer solution)	150461 151227	149875 150719	150256 149278	0.45
pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8 phosphate buffer solution)	149006 148075	148217 148908	149306 149183	0.35

7 回收率试验

取恩替卡韦对照品约 12.5 mg(按无水物计),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液;精密量取储备液 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加溶出介质稀释至刻度,摇匀,备用($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);精密量取 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 2.5,4.0,5.0 mL 各 3 份,分别置 100mL 量瓶中,加处方比例的空白辅料,用溶出介质稀释

至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。另精密称取对照品适量,加流动相适量使溶解,用溶出介质稀释制成 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为对照品溶液。精密量取上述各溶液 100 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算测得量,并计算回收率。结果表明:各溶出介质中回收率试验结果均良好。见表 3。

表 3 恩替卡韦在不同溶出介质中回收率试验结果

Tab 3 Results of recovery test in 4 mediums for entecavir tablets

介质(medium)	回收率(%) (recovery)			RSD/ %
	$0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
水 (water)	99.45	98.84	99.27	0.75
	100.02	99.38	98.03	
	99.63	100.35	98.35	
pH1.2 人工胃液 (pH1.2 artificial gastric juice)	98.30	99.78	100.16	0.70
	99.25	99.85	100.38	
	99.12	99.01	100.27	
pH4.0 醋酸盐缓冲液 (pH4.0 acetate buffer solution)	99.11	98.90	99.15	0.46
	100.14	100.01	99.76	
	99.68	99.16	99.92	
pH6.8 磷酸盐缓冲液 (pH6.8 phosphate buffer solution)	99.87	99.23	99.30	0.61
	99.62	100.35	98.63	
	98.56	100.02	99.24	

8 溶液稳定性

取回收率试验中浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,

分别于 0,1,2,4,6 h 进样测定,记录峰面积并计算 RSD,结果见表 4。

表 4 恩替卡韦在不同溶出介质中稳定性试验结果

Tab 4 Results of stability test in 4 mediums for entecavir

介 质(medium)	峰面积(Area)					RSD/ %
	0h	2h	4h	6h	8h	
水 (water)	148705	149022	148283	149102	149740	0.36
pH1.2 人工胃液 (pH1.2 artificial gastric juice)	150041	151589	150372	150101	151038	0.44
pH4.0 醋酸盐缓冲液 (pH4.0 acetate buffer solution)	149430	148392	149127	149025	148298	0.33
pH6.8 磷酸盐缓冲液 (pH6.8 phosphate buffer solution)	149605	150027	149803	148966	149052	0.31

结果表明: 恩替卡韦在各溶出介质 8h 内稳定。

9 溶出曲线测定

取自制制剂与对照制剂, 照中国药典 2010 年版二部附录 X C 第二法试验。溶出介质 1000 mL; 转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$; 温度 37°C ; 分别于 5, 10, 15, 30, 45, 60 min 时取样 10 mL (并及时补充溶出介质 10

mL), 滤过, 取续滤液作为供试品溶液另精密称取对照品适量, 加流动相适量使溶解, 用溶出介质稀释制成 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为对照品溶液。精密量取上述各溶液 100 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算溶出量。结果见图 1 - A ~ D。

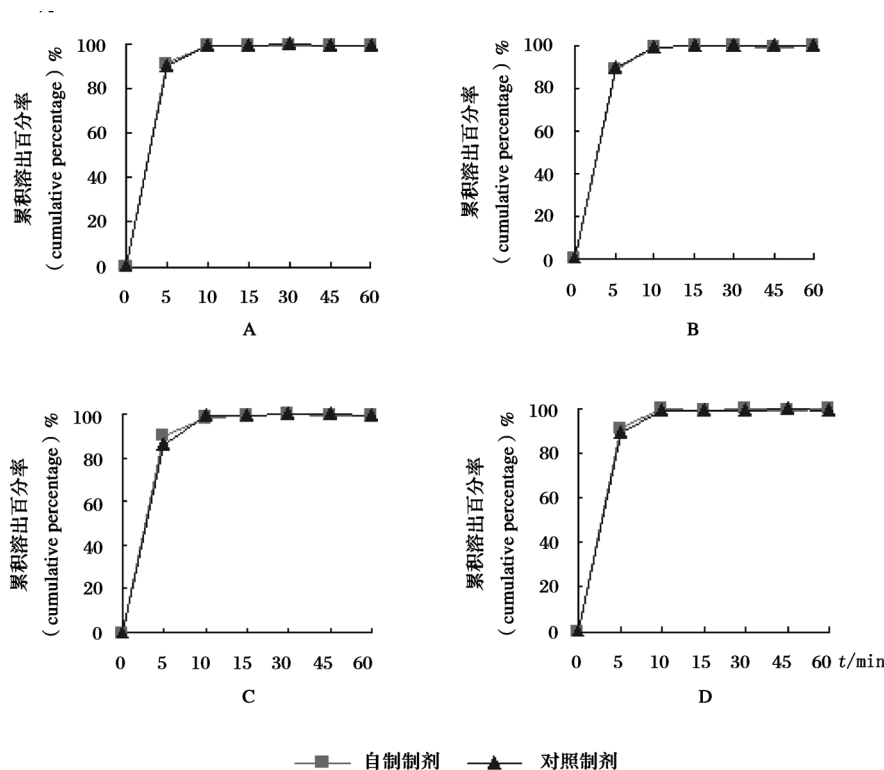


图 1 自制制剂与对照制剂在不同溶出介质中溶出曲线

Fig 1 Dissolving curve of homemade preparations and contrast agents in the different midums

A. pH6.8 磷酸盐缓冲液 (pH6.8 phosphate buffer solution)

B. pH4.0 醋酸盐缓冲液 (pH4.0 acetate buffer solution)

C. pH1.2 人工胃液 (pH1.2 artificial gastric juice)

D. 水 (water)

10 结果分析与讨论

从自制制剂与对照制剂在不同溶出介质中溶出曲线对比结果可知: 在以上 4 种溶出介质中, 5 min 时自制制剂与对照制剂的溶出度均大于 85%, 参考文献^[4], 可以判定自制制剂与对照制剂在以上 4 种溶出介质中的溶出曲线相似, 在一定程度上反映了自制制剂与对照制剂的处方工艺的一致性, 进一步的生物等效性还待深入研究。

目前, 我国药品申报中仿制药申请占据了较大比例, 保证仿制药品与上市药品具有“质量等同性”是仿制药研究应该遵循的基本原则, 仿制研究时应该进行多层面的质量对比研究, 其中溶出度对比研究是工艺处方筛选的重要依据之一, 该试验还可为

建立体内外相关性提供基础数据。

参考文献

- SHI Qi-long (石奇龙), Edit and translante (编译). (美国 FDA 批准治疗慢性乙肝的新药物恩替卡韦). *Shanghai Med Pharm J* (上海医药), 2005, 26(5): 231
- DENG Zhong-ping (邓中平). Efficacy and safety of entecavir onhep-atitis B (恩替卡韦治疗乙型肝炎的疗效及安全性). *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2005, 24(4): 326
- SFDA (国家食品药品监督管理局), Entecavir Tablets (恩替卡韦片). YBH33292005
- XIE Mu-feng (谢沐风). Evaluation Methods of Comparability of Dissolution Curve (溶出曲线相似性的评价方法). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, 40(4): 308

(本文于 2010 年 9 月 26 日收到)