

盐酸马尼地平片仿制药与原研药的溶出度一致性评价

吕亚军*, 蚩晓娜, 谷志勇(许昌恒生制药有限公司, 河南 许昌 461003)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4291-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.41

摘要 目的:建立盐酸马尼地平片的溶出度测定方法,并评价仿制药与原研药的质量一致性。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈,流动相为磷酸二氢钾溶液(磷酸二氢钾 6.8 g 溶于 1 000 ml 水中,用氢氧化钾溶液调节 pH 至 4.6)-乙腈(49:51, V/V),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 228 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 20 μl。以 0.1 mol/L 盐酸溶液、醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.8,加入 0.5% 十二烷基硫酸钠)为溶出介质,溶出介质体积为 900 ml,转速为 50 r/min,分别考察盐酸马尼地平片仿制药与原研药的溶出度,并通过计算相似因子(f_2)评价二者溶出曲线的相似性。结果:盐酸马尼地平片检测质量浓度线性范围为 0.625~20 μg/ml;仪器精密度、稳定性试验的 RSD<2.0%;3种溶出介质中的回收率为 92.86%~102.97%,RSD 分别为 1.9%、1.8%、2.7%($n=9$)。3批盐酸马尼地平片仿制药与原研药在 0.1 mol/L 盐酸溶液中 15 min 时溶出度均大于 85%,在醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0)和磷酸盐缓冲液(pH 6.8,加入 0.5% 十二烷基硫酸钠)中 f_2 值均 >50。结论:该方法适用于测定盐酸马尼地平片的溶出度;同时,盐酸马尼地平片仿制药与原研药的体外溶出曲线具有相似性,故认为质量一致性较好。

关键词 盐酸马尼地平片;仿制药;原研药;高效液相色谱法;溶出曲线;相似因子

Cosistency Evaluation of Dissolubility of Manidipine Hydrochloride Tablet Generic and Original Preparation
LYU Ya-jun, CHI Xiao-na, GU Zhi-yong (Xuchang Hengsheng Pharmaceutical Co., Ltd., Henan Xuchang 461003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the dissolubility determination of Manidipine Hydrochloride tablet and evaluate the quality consistency of generic and original preparation. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters Symmetry C₁₈ column with mobile phase of potassium phosphate monobasic solution (potassium phosphate monobasic 6.8 g was well-mixed with water 1 000 ml, and pH was adjusted to 4.6 by potassium hydroxide solution)-acetonitrile (49:51, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 228 nm, column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 20 μl. The dissolution mediums were 0.1 mol/L hydrochloric acid solution, acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.0) and phosphate buffer solution [pH 6.8, adding into 0.5% sodium dodecyl sulfonate(SDS)], volume of dissolution medium was 900 ml and rotating rate was 50 r/min, and the dissolubility of Manidipine hydrochloride tablet generic and original preparation was investigated and the similarity of dissolution profile was evaluated by calculating similar factor (f_2). RESULTS: The linear range of manidipine hydrochloride was 0.625-20 μg/ml; RSDs of instrument precision and stability tests were lower than 2.0%; recoveries of 3 dissolution mediums were 92.86%-102.97% (RSD=1.9%, 1.8% and 2.7%, $n=9$), respectively. The dissolubility of 3 batches of Manidipine hydrochloride tablet generic and original preparations was higher than 85% in 0.1 mol/L hydrochloric acid solution in 15 min; f_2 was >50 in acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.0) and phosphate buffer solution (pH 6.8, adding into 0.5% SDS). CONCLUSIONS: The method is suitable for the dissolubility determination of Manidipine hydrochloride tablet; meanwhile, the dissolution profile in vitro of Manidipine hydrochloride tablet generic and original preparations has similarities, so the quality consistency is good.

KEYWORDS Manidipine hydrochloride tablet; Generic preparation; Original preparation; HPLC; Dissolution profile; f_2 factor

盐酸马尼地平是一种二氢吡啶类钙拮抗药(CCB),抑制L型、T型钙离子双通道^[1],可平稳降压^[2],对血管平滑肌中的压力敏感性钙离子内流具有高度选择性和持久性抑制作用^[3-4]。研究表明,该药对心脏的抑制作用(体外)可忽略^[5],可降低胰岛素抵抗和提高血浆脂联素水平^[6],对肾动脉有着更高的选择性,可抑制5-羟色胺诱导的肾动脉收缩,用于伴有早期肾病的

糖尿病、高血压患者的效果优于氨氯地平^[7]。

盐酸马尼地平在水中溶解度极小、疏水性强。溶出度是影响口服固体制剂生物吸收性能的重要参数,而在多种pH溶出介质中溶出曲线的考察是评价口服固体制剂内在质量的一种有效手段。盐酸马尼地平片原研企业为武田药品工业株式会社,许昌恒生制药有限公司为国内首仿企业。为进一步考察盐酸马尼地平片仿制药与原研药的质量一致性,本研究建立了盐酸马尼地平片溶出度的高效液相色谱(HPLC)测定方

* 工程师。研究方向:药物分析。电话:0374-5692999。E-mail:lvayajun@126.com

法,并以被普遍采用的美国食品与药品管理局(FDA)推荐使用的相似因子(f_2)法评价了二者在3种不同介质中溶出曲线的相似性。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695型HPLC仪,配有二极管阵列检测器(美国Waters公司);Agilent 1260型HPLC仪,配有紫外检测器(美国Agilent公司);AUW20D型万分之一电子天平(日本岛津公司);ZRS-8G型智能溶出度仪(天津天大天发科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸马尼地平对照品(许昌恒生制药有限公司,批号:HS-B20110318,纯度:99.5%);盐酸马尼地平片(许昌恒生制药有限公司,规格:5 mg,批号:20140701,20140702,20140703);盐酸马尼地平片(武田药品工业株式会社,批号:0128);乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:磷酸二氢钾溶液(磷酸二氢钾 6.8 g溶于1 000 ml水中,用氢氧化钾溶液调节pH至4.6)-乙腈(49:51, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:228 nm;柱温:25 °C;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,理论板数按盐酸马尼地平峰计算应不低于1 500,盐酸马尼地平峰与相邻杂质峰之间分离度不小于1.5。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 取盐酸马尼地平对照品约25 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加乙腈-水(1:1, V/V)溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液1 ml置于100 ml量瓶中,分别用0.1 mol/L盐酸溶液、醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0,下同)、磷酸盐缓冲液[pH 6.8,加入0.5%十二烷基磺酸钠(SDS),下同]3种溶出介质稀释并定容,经一次性针式过滤器(水系,0.45 μm)滤过,精密量取续滤液2 ml和甲醇2 ml混匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取盐酸马尼地平片12片,照溶出度测定法(2015年版《中国药典》(四部)“0931”第二法)^[8],分别以“2.2.1”项所述3种溶出介质(以下同)各900 ml,转速50 r/min,依法操作,分别于5、10、15、30、45、60 min时,取溶出液10 ml,并即时补充溶出介质10 ml。将所取的10 ml溶出液经一次性针式过滤器(水系,0.45 μm)滤过,弃去3 ml初滤液,精密量取续滤液2 ml和甲醇2 ml混匀,作为供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液 按处方比例,取空白辅料0.14 g,分别投入3种溶出介质中,按照“2.2.2”项下溶出度试验方法操作,于45 min时取样10 ml,经一次性针式过滤器(水系,0.45 μm)滤过,弃去3 ml初滤液,精密量取续滤液2 ml和甲醇2 ml混匀,作为空白辅料溶液。

2.3 滤膜吸附试验

取“2.2.1”项下对照品溶液制备第二步操作“精密量取该溶液1 ml置于100 ml量瓶中,分别用……3种溶出介质稀释并定容”所得对照品溶液2 ml和甲醇2 ml混匀,按“2.1”项下色谱条件直接进样;并经一次性针式过滤器(水系,0.45 μm)滤过,弃去3 ml初滤液,取续滤液2 ml和甲醇2 ml混匀,按“2.1”项下色谱条件进样。结果,3种对照品溶液滤过前、后的峰面积均

无明显变化,说明一次性针式过滤器(水系,0.45 μm)对盐酸马尼地平没有吸附。

2.4 专属性试验

取“2.2”项下3种对照品溶液、3种空白辅料溶液、45 min时取样的3种供试品溶液和乙腈-水(1:1, V/V)溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱,详见图1[注:由于3种溶出介质不含空白辅料,对照品色谱基本一致,此处只提供醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0)介质中的对照品色谱]。结果表明,溶出介质及辅料对主成分的测定均无干扰。

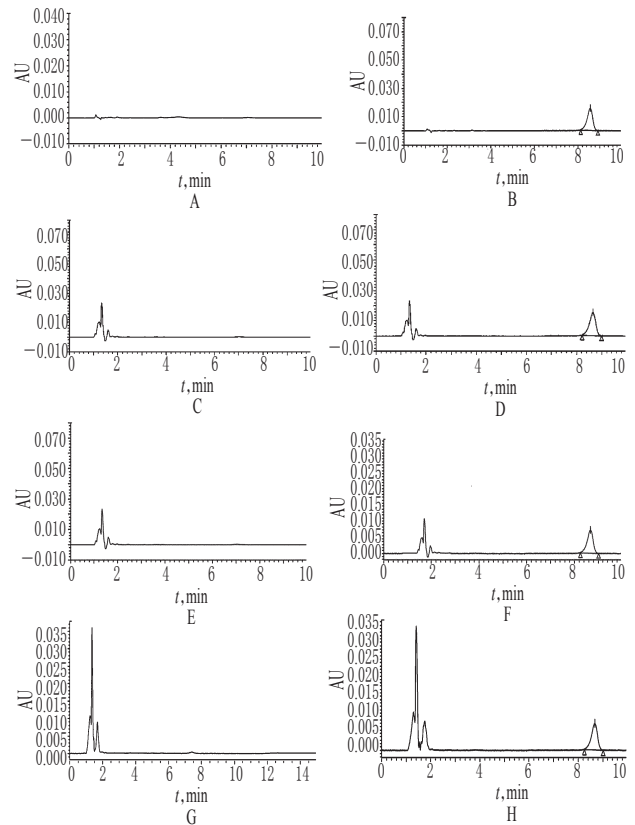


图1 高效液相色谱图

A. 乙腈-水;B.对照品;C.盐酸溶液介质中空白辅料;D.盐酸溶液介质中供试品;E.醋酸-醋酸钠缓冲液介质中空白辅料;F.醋酸-醋酸钠缓冲液介质中供试品;G.磷酸盐缓冲液介质中空白辅料;H.磷酸盐缓冲液介质中供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. acetonitrile-water; B. reference substance; C. blank accessory in hydrochloric acid solution; D. test sample in hydrochloric acid solution; E. blank accessory in acetic acid-sodium acetate buffer solution; F. test sample in acetic acid-sodium acetate buffer solution; G. blank accessory in phosphate buffer solution; H. test sample in phosphate buffer solution

2.5 线性关系考察

精密称取盐酸马尼地平对照品适量,共3份,先用乙腈-水(1:1, V/V)溶液溶解,再分别加入0.1 mol/L盐酸溶液、醋酸-醋酸钠缓冲液、磷酸盐缓冲液稀释并定容于100 ml量瓶中,分别精密移取上述溶液各适量,加入等体积甲醇,混合均匀并定量制成每1 ml中分别含盐酸马尼地平0.625、1.25、2.5、5、10、20 μg的溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样,记录峰面积。以盐酸马尼地平峰面积(y)对质量浓度(x , μg/ml)进行线性回归,得

0.1 mol/L 盐酸溶液中的回归方程为 $y=55\ 056x-1\ 751.8$ ($r=0.999\ 7$), 醋酸-醋酸钠缓冲液中的回归方程为 $y=53\ 209x-1\ 140.3$ ($r=0.999\ 9$), 磷酸盐缓冲液中的回归方程为 $y=50\ 216x+597.62$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明, 盐酸马尼地平在 3 种溶出介质中的检测质量浓度在 0.625~20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积均呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

2.6.1 仪器精密度 取“2.5”项下 3 种质量浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录峰面积。结果, 峰面积 RSD 分别为 0.9%、0.3%、0.3% ($n=5$), 说明仪器精密度良好。

2.6.2 中间精密度 取同一批样品(批号: 20140701)各适量, 分别在不同的仪器上(Waters 和 Agilent), 由不同的人员投 6 片于醋酸-醋酸钠缓冲液介质中, 测定并计算溶出度和 RSD 值。结果, 平均溶出度分别为 100.0%、99.6%, RSD 分别为 2.2%、2.3% ($n=6$), 说明本方法的中间精密度良好。

2.7 稳定性试验

分别取“2.2.2”项下 45 min 时取样的 3 种供试品溶液(批号: 20140701)适量, 分别于放置 0、2、4、6、8 h 时注入 HPLC 仪, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 峰面积的 RSD 分别为 1.8%、1.6%、1.9% ($n=5$), 说明 3 种溶出介质制备的供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验

分别将低、中、高浓度设为相当于处方量的 50%、75%、100%。将空白辅料按照处方比例进行混合, 精密称取 20 片量的盐酸马尼地平对照品(分别按 3 个水平: 50、75、100 mg)及 20 片量的空白辅料(约 2.8 g), 分别置研钵中, 混匀, 共 3 份。精密称取约 1 片量(约 0.14 g)的混合粉末样品, 每个水平的混合粉末样品各平行称取 3 份, 分别在 3 种溶出介质中进行回收率试验, 按“2.2.2”项下方法操作, 于 45 min 时单点取样制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率和 RSD 值, 结果详见表 1。

2.9 样品溶出度测定

取 3 批样品各适量, 按“2.2.2”项下步骤, 以醋酸-醋酸钠缓冲液 900 ml 为溶出介质, 转速为 50 r/min, 依法操作, 经 45 min 时取溶出液 10 ml, 经一次性针式过滤器(水系, 0.45 μm)滤过, 弃去 3 ml 初滤液, 取续滤液 2 ml 和甲醇 2 ml 混匀, 作为供试品

表 3 盐酸马尼地平片仿制药与原研药在各溶出介质中的累积溶出度测定结果 ($n=12$, %)

Tab 3 Determination results of cumulative dissolution of Manidipine hydrochloride tablet generic and original preparations in different dissolution mediums ($n=12$, %)

时间/min	0.1 mol/L 盐酸溶液			醋酸-醋酸钠缓冲液				磷酸盐缓冲液				
	仿制		原研	仿制		原研		仿制		原研		
	20140701	20140702	20140703	0128	20140701	20140702	20140703	0128	20140701	20140702	20140703	0128
5	42.8	53.1	53.5	43.4	38.7	40.1	39.1	35.7	25.1	26.3	26.6	23.4
10	73.5	81.6	81.2	69.5	75.0	72.2	77.2	64.9	52.3	52.8	54.3	47.2
15	86.6	92.7	90.1	88.6	89.1	93.0	92.6	83.5	79.2	83.4	88.1	75.8
30	89.5	96.0	91.3	100.1	97.7	98.7	100.3	98.1	89.0	89.8	90.8	88.2
45	91.0	98.6	94.5	98.1	98.5	100.4	101.6	99.0	89.9	90.4	92.2	90.3
60	94.2	98.6	93.4	99.0	100.2	100.6	101.3	99.1	91.2	92.3	92.8	92.3

采用 f_2 法评价仿制药与原研药溶出曲线的相似性^[8]。对于普通制剂, 如 15 min 内溶出率均达到 85% 以上, 则无需计算,

溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算溶出度, 结果见表 2。

表 1 回收率试验结果 ($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)

溶出介质	相当于处方量	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %			
0.1 mol/L 盐酸溶液	50%	2.540	2.510	98.82	99.0	1.9			
		2.521	2.519	99.92					
		2.493	2.567	102.97					
	75%	3.657	3.602	98.50					
		3.657	3.605	98.58					
		3.633	3.604	99.20					
	100%	4.911	4.860	98.96					
		4.917	4.718	95.95					
		4.887	4.807	98.36					
	醋酸-醋酸钠缓冲液	50%	2.429	2.432			100.12	98.0	1.8
			2.444	2.421			99.06		
			2.467	2.444			99.07		
75%		3.613	3.569	98.78					
		3.613	3.523	97.51					
		3.587	3.549	98.94					
100%		4.884	4.744	97.13					
		4.844	4.558	94.10					
		4.805	4.659	96.96					
磷酸盐缓冲液		50%	2.512	2.480	98.73	96.7	2.7		
			2.509	2.481	98.88				
			2.504	2.484	99.20				
	75%	3.626	3.556	98.07					
		3.624	3.535	97.54					
		3.607	3.531	97.89					
	100%	4.903	4.601	93.84					
		4.942	4.613	93.34					
		4.958	4.604	92.86					

表 2 样品溶出度测定结果 ($n=6$)

Tab 2 Determination results of samples dissolubility ($n=6$)

项目	20140701	20140702	20140703	0128
溶出度, %	99.8	97.4	100.6	98.5

2.10 溶出曲线的绘制

按“2.2.2”项下方法操作, 分别用 3 种溶出介质对 3 批盐酸马尼地平片仿制药和 1 批盐酸马尼地平片原研药(各 12 片)进行体外溶出试验, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 并计算各时间点的累积溶出度, 绘制溶出曲线, 结果见表 3 和图 2。

可直接判定为相似; 若 15 min 时溶出率没有达到 85%, 需选取间隔相近的 4~5 个时间点的溶出率(溶出率在 85% 以上的时

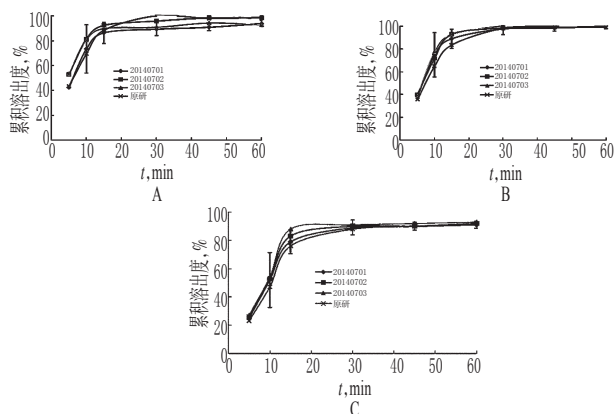


图2 盐酸马尼地平片仿制药与原研药在3种溶出介质中的溶出曲线

A. 溶出介质为0.1 mol/L 盐酸溶液; B. 溶出介质为醋酸-醋酸钠缓冲液; C. 溶出介质为磷酸盐缓冲液

Fig 2 Dissolution profiles of Manidipine hydrochloride tablet generic and original preparations in 3 dissolution mediums

A. dissolution medium was 0.1 mol/L Hydrochloric acid solution; B. dissolution medium was acetic acid - Sodium acetate buffer solution; C. dissolution medium was Phosphate buffer solution

间点仅能选取1个)计算 f_2 ,如 $f_2 \geq 50$,可判定为相似。相似度计算公式如下(式中, R_i 和 T_i 分别表示两制剂在第 n 个取样点的溶出率):

$$f_2 = 50 \log \left| \frac{100}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2}{n}} \right|$$

由表3可知,3批盐酸马尼地平片仿制药与原研药在0.1 mol/L 盐酸溶液中15 min时溶出率均大于85%,可直接判定为相似。并且,经计算,3批盐酸马尼地平片仿制药与原研药在醋酸-醋酸钠缓冲液中溶出曲线的 f_2 分别为62、61、56,在磷酸盐缓冲液中溶出曲线的 f_2 分别为75、66、57,故也可判定为相似。

3 讨论

3.1 仿制药与原药的质量一致性

溶出度试验技术是评价口服固体制剂内在质量的一种重要手段,而且有望成为评价口服固体制剂质量的简易、有效、可行的方法^[9]。本试验以本公司中试生产的3批盐酸马尼地平片仿制药与原研药分别在3种溶出介质中进行溶出度试验并绘制溶出曲线。结果发现,两种制剂在3种溶出介质中的溶出曲线均具有相似性,说明盐酸马尼地平片仿制药与原研药质量一致性较好。

3.2 溶出介质的选择

盐酸马尼地平片为国内首家仿制3.1类新药,目前并无国家食品药品监督管理局(CFDA)颁布的标准曲线,故笔者分别采用3种溶出介质进行溶出试验并绘制溶出曲线。前2种溶出介质分别为0.1 mol/L 盐酸溶液、醋酸-醋酸钠缓冲液;第3种介质最初采用磷酸缓冲液(pH 6.8),由于溶解性原因溶出度均较小,其60 min溶出度小于10%,故前期试验尝试通过对缓冲液中加入表面活性剂改善其溶解性。通过反复尝试筛选吐

温80和SDS,分别加入0.01%、0.1%、0.5%、1.0% 4个浓度进行溶出度测定,按“2.2.2”项下方法操作,于45 min时取样测定。结果,加入0.5%吐温80时溶出度约75%,加入1.0%吐温80时溶出度约85%,加入0.5% SDS时溶出度约92%,加入1.0% SDS时溶出度约94%。由于1.0% SDS相对于0.5% SDS对溶出度无明显提高,并且溶液黏度相对较大,故最终确定磷酸缓冲液(pH 6.8,加入0.5% SDS)为第3种溶出介质。结果表明,盐酸马尼地平片在3中溶出介质中溶出效果均良好, f_2 均达到相关要求。另外,多次预试验发现,盐酸马尼地平片在水体系中的溶出度试验重复性差,故本试验最终没有采用水体系。

3.3 溶出度检测方法的选择

紫外光谱法测定盐酸马尼地平片的溶出度存在溶出介质易干扰、溶液体系常温放置稳定性差及精密性差等缺陷。本试验溶出度测定方法采用HPLC法,经方法学验证,与紫外光谱法相比,精密度和准确度更高,溶液稳定性更好。

综上所述,该方法适用于测定盐酸马尼地平片的溶出度;同时,盐酸马尼地平片仿制药与原研药的体外溶出曲线具有相似性,故认为质量一致性较好。

参考文献

- [1] Watanabe H. Block of T-type calcium channel by dihydropyridine calcium antagonists[in Japanese][J]. *Teikyo Medical Journal*, 2003, 26(6): 425.
- [2] Reams GP, Villarreal D, Wu Z, et al. An evaluation of the renal protective effect of manidipine in the uninephrectomized spontaneously hypertensive rat[J]. *American Heart*, 1993, 125(2): 630.
- [3] Shibouta Y, Kitayoshi T, Kitoh G, et al. Calcium channel blocking action of franidipine hydrochloride (CV-4093.2HCl) *in vitro* and *in vivo*[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1988, 48(4): 463.
- [4] Okabe K, Terada K, Kitamura K, et al. Selective and long lasting inhibitory actions of the dihydropyridine derivative, CV-4093, on calcium currents in smooth muscle cells of the rabbit pulmonary artery [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, 243(2): 703.
- [5] Nakaya H, Hattori Y, Nakao Y, et al. Cardiac versus vascular effects of a new dihydropyridine derivative, CV-4093. *In vitro* comparison with other calcium antagonists [J]. *Eur J Pharmacol*, 1988, 146(1): 35.
- [6] McKeage K, Scott LJ. Manidipine: a review of its use in the management of hypertension[J]. *Drugs*, 2004, 64(17): 1923.
- [7] 佚名.马尼地平对伴有早期肾病的糖尿病、高血压患者的效果优于氨氯地平[J].世界核心医学期刊文摘:心脏病学, 2005, 8(1): 16.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 121-124.
- [9] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志, 2009, 40(12): 946.

(收稿日期:2015-03-11 修回日期:2015-08-07)

(编辑:周 箐)