

泼尼松缓释片中泼尼松的测定及其体外释放度研究

贾春建¹, 王雪芹², 赵军霞³, 闫芳³, 岳红春⁴

1. 漯河市药品检测检验中心, 河南 漯河 462008

2. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003

3. 河南中帅医药科技股份有限公司, 河南 郑州 450000

4. 河南中帅药业有限公司, 河南 安阳 456150

摘要: 目的 制订泼尼松缓释片中泼尼松及其体外释放度的测定方法。方法 采用高效液相色谱法, C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (24:76); UV 检测器检测波长: 240 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C。对泼尼松缓释片 3 批样品和 1 批参比制剂进行了泼尼松的测定。采用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 作为释放介质, 以第二法 (桨法) 装置, 转速为 75 r/min, 分别在 3、3.5、4、4.5、5、7 h 取样, 采用高效液相色谱法测定泼尼松缓释片中泼尼松的体外释放度。**结果** 泼尼松的线性范围为 5~100 μg/mL。平均回收率为 99.69%, RSD 值为 0.78%。泼尼松缓释片自制样品与参比制剂中泼尼松的测定结果一致。样品在 3.5 h 内无释放、7 h 内释放基本完成; 自制样品与参比制剂的体外释放度结果一致, 且批间重现性良好。**结论** 建立的泼尼松缓释片中泼尼松和体外释放度测定方法简便、快速, 易于操作。样品和参比制剂中泼尼松测定和体外释放度测定结果均一致。

关键词: 泼尼松缓释片; 泼尼松; 体外释放度; 高效液相色谱

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)05-0892-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.05.006

Determination and *in vitro* release of prednisone in Prednisone Sustained-release Tablets

JIA Chun-jian¹, WANG Xue-qin², ZHAO Jun-xia³, YAN Fang³, YUE Hong-chun⁴

1. Luohe Center for Drug Testing, Luohe 462008, China

2. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China

3. Henan Zhongshuai Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

4. Henan Zhongshuai Pharmaceutical Co., Ltd., Anyang 456150, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of prednisone in Prednisone Sustained-release Tablets and its release *in vitro*. **Methods** The separation by HPLC method was performed on C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile - water (24:76). The UV detection wavelength was set at 240 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 °C. The contents of prednisone in 3 batches of Prednisone Sustained-release Tablets samples and 1 batch of reference preparation were determined. Phosphate buffer (pH 6.8) 500 mL was used as the release medium, the second method (paddle method) device was carried on, and the speed was 75 r/min. The samples were collected at 3, 3.5, 4, 4.5, 5, and 7 h, and the *in vitro* release of prednisone in Prednisone Sustained-release Tablets was determined by HPLC method. **Results** The content of prednisone had good linear range of 5 μg/mL to 100 μg/mL. The average recovery was 99.69% with RSD value of 0.78%. The determination results of prednisone in the self-made Prednisone Sustained-release Tablets sample and the reference preparation were consistent. The sample was not released within 3.5 h, but it was released within 7 h. *In vitro* releases of the self-made samples were consistent with those of the reference preparations, and the reproducibility between batches was good. **Conclusion** The established method for the determination and its *in vitro* release of prednisone in Prednisone Sustained-release Tablets is simple, rapid, and easy to operate. Determination and *in vitro* release of prednisone in samples and reference preparations were consistent.

Key words: Prednisone Sustained-release Tablets; prednisone; *in vitro* release; HPLC

收稿日期: 2020-11-17

作者简介: 贾春建, 男, 副主任药师, 主要从事药品检验、注册核查、评价及监督管理工作。E-mail: jiachunjian9@163.com

泼尼松又名强的松、1-烯可的松，为人工合成的中效糖皮质激素，临床应用甚广，具有抗炎、抗病毒、抗过敏和抑制免疫作用^[1]，临床上主要用于急性炎症、器官移植排斥反应、风湿热、自身免疫性疾病、变态反应性疾病等。Rayos^[2]在以每日 22:00 随餐 1 次口服方案用药时，因其控释性质能在午夜细胞因子水平较高期间达到并维持治疗性血药浓度，故可获得较即释泼尼松早晨或同时用药更好的抗炎效果。

泼尼松缓释片与速释的泼尼松制剂相比呈现出滞后将近 4 h 的药动学特征。给予具有缓释作用的泼尼松有助于泼尼松在细胞因子水平开始上升的次日凌晨逐渐达到治疗效果的血药浓度。泼尼松缓释片符合时间药理学^[1]，即人体内皮质激素分泌的自然峰值为早晨 7:00~8:00 时，临睡前 22:00 时左右口服本品，择时延迟近 4 h 后释放，与人体内皮质激素分泌高峰时段基本一致，这样可以发挥药物的最佳治疗效果，减少给药次数和药物的总剂量，显著提高患者的依从性，降低毒副作用、减少不良反应，提高用药的安全性，减少耐药性的发生^[3]。避免口服普通片剂半衰期短、需要每日服药 2~3 次、患者特别是小儿患者的依从性差、患者易漏服药、副作用明显、超出治疗剂量有中毒危险等的情况。目前国内上市的只有泼尼松普通片，泼尼松缓释剂型没有国产和进口产品，市场尚属空白，亟待研究开发；前期对临床用药情况进行了调研分析，泼尼松缓释剂型品种市场潜力巨大，属于“境内申请人仿制境外上市但境内未上市原研药品的药品”，按照化学药品注册分类规定为 3 类新药。《中国药典》2015 年版二部^[4]、2020 年版二部^[5]仅收载泼尼松原料药，未收载其他剂型；泼尼松缓释片为美国 FDA 批准上市药品^[6]，但美国药典 43 版未收载泼尼松缓释片的质量标准，仅收载了泼尼松原料药和泼尼松片质量标准^[7]；英国药典 2020 年版仅收载泼尼松原料药质量标准^[8]。本研究制订了泼尼松缓释片中泼尼松的测定及其体外释放度的测定方法，并参考相关文献进行了验证^[9]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AUW120D 十万分之一分析天平（日本岛津公司）；U3000 高效液相色谱仪、紫外检测器（赛默飞世尔科技）；ZRS-4 型智能溶出度测定仪（天津大学无线电厂）；pHS-25 型 pH 计（上海雷磁仪器厂）；

DHG-9140A 型干燥箱（巩义市予华仪器有限责任公司）。

1.2 试剂

乙腈为色谱纯；重蒸馏水；磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯；泼尼松原料（质量分数为 99.8%，河南利华制药有限公司，批号 01A20190304）；泼尼松对照品（质量分数为 99.6%，中国食品药品检定研究院，批号 100199-201503，使用前不需干燥处理）；可的松对照品（质量分数为 97.2%，中国食品药品检定研究院，批号 101128-201001，使用前不需干燥处理）；参比泼尼松缓释片[规格 5 mg/片，Horizon Pharma USA Inc，批号 U1908511，与国家药品监督管理局 2020 年 4 月 30 发布的《关于发布仿制药参比制剂目录（第二十七批）的通告（2020 年第 30 号）》中指定的参比制剂一致，序号 27-278，未进口原研药品]；聚维酮 K30、交联聚维酮 XL、羟丙基纤维素、山嵛酸甘油酯、二氧化钛、欧巴代（英国卡乐康公司）。

2 方法与结果

2.1 泼尼松缓释片的制备

处方（1 万片）为：泼尼松 50 g、羟丙基纤维素 300 g、聚维酮 K30 80 g、交联聚维酮 XL 100 g、山嵛酸甘油酯 900 g、二氧化钛 800 g、欧巴代 107.2 g、硬脂酸镁 10 g、乳糖 960 g、水、乙醇（制粒）适量。处方与参比制剂处方一致。制备中试规模的 3 批泼尼松缓释片，批号分别为 20190911、20190915、20190918，规格 5 mg/片，由河南中帅医药科技股份有限公司制备。

2.2 泼尼松缓释片中泼尼松的 HPLC 法测定^[4]

2.2.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（24：76）；UV 检测器检测波长：240 nm；体积流量：1.0 mL/min；柱温：30 ℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 取泼尼松对照品 101.17 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释制成约含泼尼松 1.0 mg/mL 的溶液，摇匀，即得对照品贮备液；精密量取贮备液 5 mL，置 100 mL 量瓶中，加流动相稀释并制成约含泼尼松 50 μg/mL 的溶液，摇匀，即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 取泼尼松、可的松对照品适量，精密称定，加流动相溶解并稀释制成各约含 50 μg/mL 的溶液，摇匀，备用。

2.2.4 供试品溶液的制备 取泼尼松缓释片 20 片，

精密称定，计算平均片质量，研细，精密称取适量（约相当于泼尼松 5 mg），置 100 mL 量瓶中，加流动相适量超声使溶解，加流动相稀释至刻度，摇匀，经 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.5 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取混合辅料细粉约 0.35 g，置 100 mL 量瓶中，加流动相适量超声使溶解，加流动相稀释至刻度，摇匀，经 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.6 系统适用性试验及专属性试验 分别取阴性样品、混合对照品、对照品、供试品溶液各 20 μL，进样测定，记录色谱图，见图 1。结果辅料不干扰主成分测定，泼尼松峰、可的松峰的分离度大于 3.4。

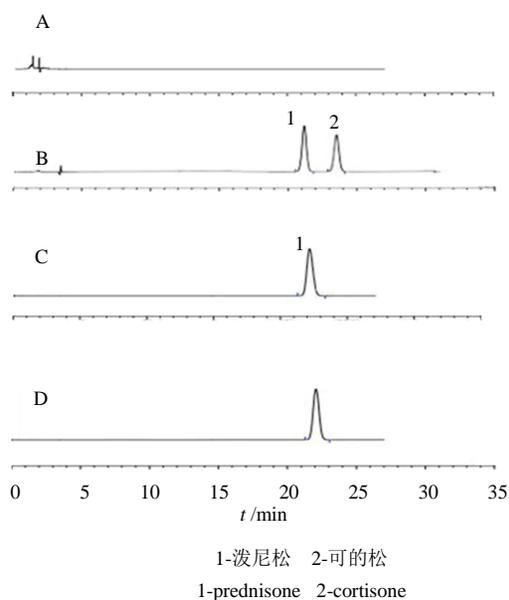


图 1 阴性样品 (A)、混合对照品 (B)、对照品 (C)、泼尼松缓释片样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample (A), mixed reference substances (B), prednisone reference substance (C), and Prednisone Sustained-release Tablets sample (D)

2.2.7 线性关系 精密称取泼尼松对照品约 25 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，依次稀释制成约含泼尼松 5、30、50、70、100 μg/mL 系列质量浓度的溶液，进样 20 μL，记录泼尼松的峰面积。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，得泼尼松线性方程 $A = 0.7931C - 0.2303$ ($r = 0.9999$)，结果表明，泼尼松的线性范围为 5~100 μg/mL。

2.2.8 重复性试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品 6 份，制备供试品溶液，进样 20 μL，依法测定，记录泼尼松峰面积，结果泼尼松峰面积的

RSD 值为 0.67%。

2.2.9 精密度试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品制备的供试品溶液，于同日内重复测定 6 次及连续 6 d 各重复测定 1 次，记录泼尼松的峰面积，结果泼尼松峰面积的日内、日间 RSD 值分别为 0.03%、0.68%。

2.2.10 稳定性试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品制备的供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12、14 h 依法测定，记录泼尼松峰面积，结果泼尼松峰面积的 RSD 值为 0.54%，表明供试品溶液在 14 h 内稳定。

2.2.11 回收率试验 取泼尼松原料药（质量分数为 99.8%，批号 01A20190304）细粉适量，精密称取约 8、10、12 mg，各 3 份，分别置于 9 个 200 mL 量瓶中，分别加入约 2 片处方量的混合辅料细粉，精密加入泼尼松对照品贮备液 5 mL，加流动相超声使溶解，加流动相稀释至刻度，摇匀，经 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液；取供试品溶液、泼尼松对照品溶液各 20 μL，依法测定，记录色谱图。按外标法以峰面积计算，减去供试品的本底量，计算回收率。结果泼尼松的平均回收率为 99.69%，RSD 值为 0.78%。

2.2.12 耐用性试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品制备的供试品溶液和泼尼松对照品溶液，依法测定，在设定体积流量、柱温、流动相比比例 3 种因素变动的情况下，按外标法以峰面积计算泼尼松的质量分数，结果其 RSD 值分别为 0.50%、0.53%、0.51% ($n = 3$)。

2.2.13 样品测定结果 按照上述方法对 3 批自制泼尼松缓释片样品和 1 批泼尼松缓释片参比制剂进行测定，按外标法以峰面积计算泼尼松的质量分数，结果见表 1。可以看出，泼尼松缓释片自制样品与参比制剂中泼尼松的测定结果一致。

表 1 泼尼松缓释片自制样品和参比制剂中泼尼松的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Contents of prednisone in sample and reference preparation ($n = 3$)

批号	泼尼松标示量/%
20190911	99.5
20190915	100.1
20190918	100.3
U1908511	99.7

2.3 泼尼松缓释片中泼尼松的体外释放度测定

FDA 收载的泼尼松缓释片采用 500 mL 水为释放介质、转速 100 r/min、浆法、分别在 1、2、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8、10 h 取样,采用高效液相色谱法测定体外释放度^[6]。综合 FDA 收载的泼尼松缓释片释放度的测定方法和《中国药典》2015 年版四部^[10]、《中国药典》2020 年版四部^[11]溶出度、释放度测定法项下要求,采用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 作为释放介质,以第二法(浆法)装置,转速为 75 r/min,分别在 3、3.5、4、4.5、5、7 h 取样,采用高效液相色谱法测定泼尼松缓释片中泼尼松的体外释放度。

2.3.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(24:76);检测波长:240 nm;体积流量:1.0 mL/min;柱温:30 ℃。

2.3.2 对照品溶液的制备 取泼尼松对照品 101.03 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加释放介质溶解并稀释制成约含泼尼松 1.0 mg/mL 的溶液,摇匀,即得对照品贮备液;精密量取贮备液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加释放介质稀释制成约含泼尼松 10 μg/mL 的溶液,摇匀,备用。

2.3.3 混合对照品溶液的制备 取泼尼松、可的松对照品适量,精密称定,加释放介质溶解并稀释制成各约含 10 μg/mL 的溶液,摇匀,备用。

2.3.4 供试品溶液的制备 取泼尼松缓释片 6 片,按溶出度与释放度测定法^[10]第二法(浆法)装置,以 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 为释放介质,转速 75 r/min,分别在 3、3.5、4、4.5、5、7 h 取溶液 5 mL,同时补入等体积同温度的释放介质,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.5 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取混合辅料细粉约 70 mg,置 100 mL 量瓶中,加释放介质 75 mL,超声使溶解,加释放介质稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.6 系统适用性试验及专属性试验 按照以上条件依法试验,结果辅料不干扰主成分测定,泼尼松峰与可的松峰的分离度大于 3.4。

2.3.7 线性关系考察 精密称取泼尼松对照品约 10 mg,置 200 mL 量瓶中,加释放介质溶解并稀释至刻度,依次稀释制成含泼尼松 0.2、1、2、5、10、15 μg/mL 系列质量浓度的溶液,进样 20 μL,记录峰面积。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得线性方程 $A=0.815 0 C-0.036 2$

($r=0.999 3$),结果表明,泼尼松检测质量浓度线性范围为 0.2~15 μg/mL。

2.3.8 重复性试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品 6 份,制备供试品溶液,进样 20 μL,依法测定,记录泼尼松峰面积,结果泼尼松峰面积的 RSD 值为 0.46%。

2.3.9 精密度试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品供试品溶液,于同日内重复测定 6 次及连续 6 d 各重复测定 1 次,记录泼尼松峰面积,结果日内、日间 RSD 值分别为 0.56%、0.89%。

2.3.10 稳定性试验 取批号 20190911 泼尼松缓释片样品供试品溶液,分别在 0、3、6、9、11、12 h 依法测定,记录泼尼松峰面积,结果泼尼松峰面积 RSD 值为 1.19%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.11 回收率试验 取泼尼松原料药(质量分数为 99.8%,批号 01A20190304)细粉适量,精密称取约 8、10、12 mg 各 3 份,分别置于 9 个 200 mL 量瓶中,分别加入约 2 片处方量的混合辅料细粉,精密加入泼尼松对照品贮备液 2 mL,加释放介质 150 mL,超声使溶解,加释放介质稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,精密量取续滤液 10 mL,置 50 mL 量瓶中,加释放介质至刻度,摇匀,即得供试品溶液;取供试品溶液、泼尼松对照品溶液各 20 μL,依法测定,记录色谱图。按外标法以峰面积计算,减去供试品的本底量,计算回收率。结果泼尼松平均回收率为 99.61%,RSD 值为 0.99%。

2.3.12 耐用性试验 取泼尼松缓释片样品,分别以水、pH 1.0 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液各 500 mL 为释放介质,结果体外释放度测定结果基本一致;采用 75、100 r/min 不同转速,结果体外释放度测定结果基本一致。

2.3.13 体外释放度测定 按照上述方法对自制泼尼松缓释片 3 批样品和 1 批参比制剂进行体外释放度测定,依据测定数据绘制释放曲线,结果见图 2。可以看出,样品在 3.5 h 内无释放、7 h 内释放基本完成;自制样品与参比制剂的体外释放度结果一致,且批间重现性良好。

取批号 20190911 泼尼松缓释片样品 6 片,测定体外释放度,以判断各取样时间点的释放均一性,结果见表 2。可见,同一批样品在 3、3.5 h 各取样时间点无释放,在 4、4.5、5、7 h 各取样时间点释放度的 RSD 值分别为 1.46%、2.36%、1.56%、1.08%,表明泼尼松缓释片的批内释放均一性良好。

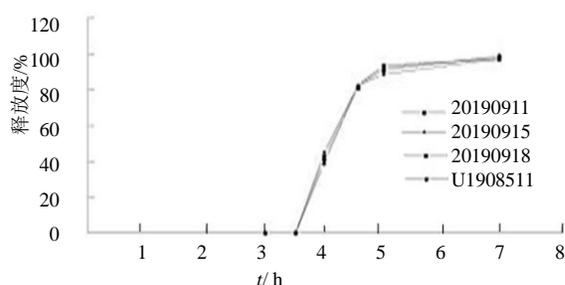


图 2 泼尼松缓释片样品与参比制剂的体外释放曲线

Fig. 2 *In vitro* release curves of prednisone in Prednisone Sustained-release Tablets samples and reference preparation

表 2 同一批泼尼松缓释片样品(批号 20190911)的体外释放度结果

Table 2 *In vitro* release of the same batch of Prednisone Sustained-release Tablets sample (batch 20190911)

t/h	体外释放度/%	RSD/%
3	0	0
3.5	0	0
4	40.27±0.59	1.46
4.5	83.69±1.97	2.36
5	92.28±1.44	1.56
7	99.54±1.07	1.08

3 讨论

利用时间药理学确定最佳给药时间是临床合理用药发展的方向之一,择时释药制剂是缓释、控释、迟释制剂中需要研究开发的新剂型之一,也是药品生产、科研单位和医药工作者研究的重要方向之一^[10-11]。泼尼松缓释片具有择时释药的特点,符合时间药理学。

由于泼尼松为难溶性药物,故采用羟丙基纤维素作为骨架材料制备亲水性凝胶缓释片;包缓释衣和薄膜衣采用糖衣锅包衣用时长、污染大、效率低

等缺点,故采用高效包衣锅包衣;重复性、稳定性和精密度试验时,不必换算为占标示量,以色谱峰面积计算即可;进行回收率试验时,取已知含量的泼尼松原料药细粉和处方量比例相当的混合辅料细粉替代了泼尼松缓释片,加入定量的对照品溶液可克服称量时的误差;由于 FDA 收载测定释放度的取样时间点为 12 个,点多时间过长,经试验比较,选择 6 个取样时间点基本可代表释放过程,可减少近 3 h;分别以水、pH 1.0 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为释放介质进行比较试验时,释放曲线基本一致,故选择与人肠道环境接近的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为释放介质;采用紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法测定体外释放度比较试验时,由于在较低浓度溶液(2 μg/mL)吸光度值约在 0.07,超出了 0.3~0.7,故选择与含量测定方法相同的高效液相色谱法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高允生. 临床药理学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 132-376.
- [2] 马培奇. 美 FDA 批准泼尼松控释片 Rayos 择时给药治疗广泛炎症相关疾病 [J]. 上海医药, 2012, 33(21): 37.
- [3] 韦超, 侯飞燕. 药剂学 [M]. 第 3 版. 郑州: 河南科学技术出版社, 2019: 378.
- [4] 中国药典 [S]. 二部. 2015: 706.
- [5] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 861.
- [6] Prednisone Delayed-release Tablets. Dissolution Methods for Drug Products. (http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm?PrintAll=1).
- [7] USP43-NF38 [S]. 2020: 3670-3672.
- [8] BP 2020 [S]. 2020: II-701.
- [9] 杭太俊. 药物分析 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 164-169.
- [10] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 59, 121, 368.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 61, 132, 472.

[责任编辑 解学星]