

自制与原研托拉塞米缓释片体外释放行为的一致性评价

韩 颜¹, 马 超², 杨 丹³, 孟 策², 任晓文^{2*}

1. 天津中医药大学 研究生部, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 河南大学药学院, 河南 开封 475000

摘 要: **目的** 建立托拉塞米缓释片的体外释放度检测方法并进行方法学研究, 以所建立方法对自制与原研托拉塞米缓释片体外释放行为的一致性进行评价。**方法** 采用 HPLC 法分别测定托拉塞米自制片与原研制剂在水、0.1 mol/L 盐酸溶液、pH4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液以及 0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸盐缓冲液中的累积释放度, 并用相似因子 (f_2) 法对释放曲线的相似性进行评价。**结果** 当托拉塞米质量浓度在 1.0~12.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系 ($r=0.999\ 5$); 精密度试验、溶液稳定性试验良好, 供试液色谱峰峰面积的相对标准偏差均小于 2.0%; 准确度试验平均回收率为 100.04%, 相对标准偏差为 0.54% ($n=12$); 自制片的批内均一性符合技术要求, 6 个溶出杯内各取样点的相对标准偏差均 $<10\%$; 托拉塞米缓释自制片与原研制剂在 5 种不同的释放介质中 f_2 因子分别为 72、60、77、66、60。**结论** 本文所建立方法可用于托拉塞米缓释片释放度的检测, 托拉塞米缓释片自制产品与原研产品体外释放行为一致。

关键词: 托拉塞米缓释片; 体外释放度; 一致性评价; 相似因子

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)02-0174-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.006

Study on *in vitro* release consistency between self-prepared Torasemide Sustained-Release Tablet and original preparation

HAN Yan¹, MA Chao², YANG Dan³, MENG Ce², REN Xiao-wen²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technologies and Drug Metabolism, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. The Pharmacy Faculty of Henan University, Kaifeng 475000, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the dissolution of torasemide sustained-release tablet *in vitro* and study the methodology of the determination. The consistency of the *in vitro* release behavior between self-prepared torasemide sustained-release tablet and original preparation were evaluated by constructed method. **Methods** HPLC method was applied to detect the cumulative release percentage of self-prepared torasemide sustained-release tablet and original preparation in five kinds of release media (water, 0.1 mol/L hydrochloric acid solution, pH 4.5 acetate buffer, pH 6.8 phosphate buffer, and 0.1 mol/L hydrochloric acid solution turn to pH 6.8 phosphate buffer). Similarity factor (f_2) was used to evaluate the similarity of release curves. **Results** There was a good linear relationship between the quality concentration of torasemide and peak area in the range of 1.0—12.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 5$). Results of precision and stability tests were good, and the RSDs for probational liquid were all lower than 2.0%. The average recovery of accuracy test was 100.04%, and RSD was 0.54% ($n = 12$). The homogeneity of within group of self-prepared preparation met the technical requirement, RSDs of each sampling points in six Dissolution Vessels were lower than 10.0%. The f_2 factors of self-prepared torasemide sustained-release tablet and original preparation were 72, 60, 77, 66, and 60 in five kinds of release media. **Conclusion** The method in the paper is suitable for the release test of torasemide, meanwhile, the self-prepared tablet shows consistent *in vitro* release behavior with that of the original preparation.

Key words: Torasemide Sustained-Release Tablet; dissolution *in vitro*; consistency evaluation; similarity factor

收稿日期: 2016-11-12

作者简介: 韩 颜 (1991—), 女, 在读硕士, 主要从事药物制剂、分析相关研究。Tel: 13516112562

*通信作者 任晓文, 主要从事缓释制剂研究。Tel/Fax: (022)23006953

托拉塞米 (Torasemide) 是一种长效吡啶磺酰脲类降压利尿药^[1], 主要用于治疗高血压、急慢性心力衰竭、肝硬化腹水、尿崩症和肾衰, 为呋塞米的更新换代产品。托拉塞米与呋塞米相比利尿作用更强, 效果更持久, 可用于呋塞米治疗无效的患者^[2-3]。托拉塞米是两性物质, 在胃和肠道环境中均有一定的吸收, 且半衰期较长, 故为避免其在体内的峰谷现象, 减少其不良反应, 宜将其做成缓释制剂^[4]。体外溶出试验是口服固体制剂质量评价的一种重要手段, 在某种意义上与制剂的生物利用度有很大的关联性^[5-6]。通过评价仿制药与参比制剂在多种 pH 介质中溶出行为的一致性, 有利于控制和提高仿制药质量, 降低其体内生物等效性试验的失败率。本研究通过托拉塞米缓释片自制产品与原研产品在 5 种不同 pH 值的溶出介质中的释放行为一致性的考察, 为其体内一致性评价工作的开展提供一些有益的探索。

1 材料

1.1 仪器

LabAlliance Series III 高效液相色谱泵、Spectra 100 检测器、LabAlliance HPLC 工作站; ZRS-8G 智能溶出仪 (天津市天大天发科技有限公司); RC12AD 溶出试验仪 (天津市天大天发科技有限公司); Anke KA-1000 飞鸽牌离心机 (上海安宁科学仪器厂制造); Sartorius BP211D 电子天平 (德国赛多利斯公司); Sartorius BS124S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); AS3120 超声仪 (奥特赛恩斯仪器有限公司); Evolution 220 紫外-可见分光光度计 (Thermo Scientific); Mettler (FE20) 台式 PH 计 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂

托拉塞米对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100605-200401); 原研制剂为 Sutril neo (批号 H022, 由 Ferrer Internacional, S.A. 公司生产, 规格 5 mg, 铝塑包装); 自制托拉塞米缓释片 (批号 140401, 由天津药物研究院有限公司生产, 规格 5 mg, 铝塑包装); 盐酸、醋酸、醋酸钠、磷酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠和磷酸三钠均为分析纯, 甲醇为色谱纯。

2 释放度测定方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用

磷酸调节 pH3.0) (55:45); 检测波长 290 nm; 柱温 35℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 60 μL。

2.2 释放度测定法

方法 1: 取托拉塞米原研片和自制片, 根据 2015 年版《中国药典》四部通则 0931 溶出度与释放度测定法 (第一法和第二法项下缓释制剂或控释制剂), 采用 0931 溶出度和释放度测定法仪器装置项下第二法装置, 分别以水、0.1 mol/L 盐酸溶液、pH4.5 醋酸盐缓冲液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 为释放介质, 调节转速为 50 r/min, 依法操作, 于 0.5、1.0、1.5、2、4、6、8、12、24 h 时分别取溶液 5 mL, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 2 mL, 作为供试品溶液, 并及时补充等温等体积的释放介质。照 HPLC 法, 于 290 nm 波长处测定。

方法 2: 取托拉塞米原研片和自制片, 采用 0931 溶出度和释放度测定法仪器装置项下第二法装置, 调节转速为 50 r/min, 先于 750 mL 0.1 mol/L 的盐酸溶液中溶出 2 h, 再加入等温 0.2 mol/L 磷酸钠溶液 250 mL 继续进行试验, 依法操作, 于 0.5、1.0、1.5、2、4、6、8、12、24 h 时分别取溶液 5 mL, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 2 mL, 作为供试品溶液, 并及时补充等温等体积的释放介质。照 HPLC 法, 于 290 nm 波长处测定。

对照品溶液: 精密称取托拉塞米对照品 10.00 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 15 min, 使其完全溶解, 取出, 静置至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取上述溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 分别以水、0.1 mol/L 盐酸溶液, pH4.5 醋酸盐缓冲液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 照 HPLC 法, 于 290 nm 波长处测定。

3 方法学研究结果

3.1 释放方法学研究

3.1.1 检测波长的确定 精密称取托拉塞米对照品 10 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 15 min, 使其完全溶解, 取出放至室温, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 精密量取 5 mL 于 50 mL 量瓶中, 加水 (0.1 mol/L 盐酸溶液、pH4.5 醋酸盐缓冲液或 pH6.8 磷酸盐缓冲液) 稀释至刻度摇匀, 配得质量浓度为 20.0 μg/mL 溶液, 照紫外可见分光光度法, 于 200~400 nm 波长处扫描, 结果显示供试品溶液在 290 nm 左右均存在最大吸收, 故最终选择 290 nm 作为检测波长, 结果见表 1。

3.1.2 辅料干扰性试验 称取托拉塞米空白辅料约

表1 托拉塞米在4种介质中的紫外吸收波长汇总

Table 1 Summary of UV absorption wavelength of torasemide in four kinds of release media

释放介质	最大吸收波长/nm	最小吸收波长/nm
水	288	248
0.1 mol/L 盐酸溶液	285	244
pH4.5 醋酸盐缓冲液	286	246
pH6.8 磷酸盐缓冲液	289	248

300 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 15 min, 取出放至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 3 500 r/min 离心 15 min, 精密移取上清液 5 mL 于 100 mL 量瓶中, 加水 (0.1 mol/L 盐酸、pH4.5 醋酸盐缓冲液或 pH6.8 磷酸盐缓冲液) 稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 进样结果表明辅料在 290 nm 波长处不干扰结果测定。

3.1.3 线性关系考察 精密称取托拉塞米对照品 10 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 15 min, 使其完全溶解, 取出放至室温, 加甲醇稀释至刻度摇匀。精密量取 5 mL 于 50 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度摇匀, 配得质量浓度为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 作为母液, 精密移取母液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 分别加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度摇匀, 作为供试品溶液, 照 HPLC 法, 各进样 60 μL , 记录色谱图。以托拉塞米质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得线性方程: $A=20\ 756\ C-1\ 845.1$ ($r=0.999\ 5$), 表明本品浓度在 1.0~12.0 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好。

3.1.4 准确度试验 精密称取托拉塞米原料药 5、8、10、12 mg 各 3 份, 置 50 mL 量瓶中, 向各量瓶中加入约 300 mg 空白辅料, 加甲醇适量, 超声 15 min, 使主药完全溶解, 取出放至室温, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 3 500 r/min 离心 10 min, 精密量取上清液 5 mL 于 100 mL 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度并摇匀, 作为供试品溶液; 另精密称取托拉塞米对照品 10.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声使其溶解, 取出放至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。再精密量取上述溶液 5 mL 置 100 mL 量瓶中, 加释放介质 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。照 HPLC 法, 各进样 60 μL , 记录色谱图。回收率平均值为 100.04%, 相对标准偏差为 0.54%, 表明本法准确度良好。

3.1.5 精密度试验 取托拉塞米自制片, 照“2.3”项下释放度测定方法一, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液为释放介质, 于 1、4 和 12 h, 取续滤液 6 份作为供试液, 另配制对照品溶液, 照 HPLC 法, 各进样 60 μL , 记录色谱图并计算 RSD。1、4 和 12 h 的 RSD 分别为 0.99%、1.41%、0.74%, 表明本法精密度良好。

3.1.6 滤膜吸附试验 取托拉塞米自制片, 照“2.3”项下释放度测定方法一, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液为释放介质, 于 1、4 和 12 h 时取样, 分别过滤初滤液 3 mL 和 5 mL, 取续滤液适量; 同时取 1、4 和 12 h 释放液适量, 进行 3 500 r/min 离心处理, 取上清液, 所得上述样品作为供试品, 照 HPLC 法, 各进样 60 μL , 记录色谱图。1、4 和 12 h 释放液过滤 3 mL 和过滤 5 mL 样品液与离心样品液相比较, RSD 分别为 1.59%、0.83%、0.87%, 表明滤膜吸附对本品释放度测定无干扰。

3.1.7 溶液稳定性试验 取对照品溶液于室温条件下放置, 分别于 0、1、2、4、8、12、24、36、48 h 时测定, 记录色谱图, 计算峰面积 RSD。对照品峰面积 RSD 为 1.44%, 表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

3.1.8 不同转速下的释放曲线比较 取自制片, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液 500 mL 为溶出介质, 分别调节转速为 50 r/min 和 75 r/min, 照“2.3”项下释放度测定方法一和对照品溶液配制方法取样和配制对照品溶液, 照 HPLC 法, 于 290 nm 波长处测定。考察结果表明, 两种转速条件下自制片的溶出行为基本一致 ($f_2=84$), 差异不显著。桨法常用转速在 50~100 r/min, 考虑到某些患者胃肠蠕动功能较差等原因, 本品释放度试验的转速选择 50 r/min。

3.1.9 均一性考察 取托拉塞米自制缓释片 (批号 140401) 6 片, 照“2.3”项下释放度测定方法一, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液 500 mL 作为释放介质, 经 0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 取样, 滤过, 照 HPLC 法, 各进样 60 μL , 记录色谱图。6 个溶出杯各个取样点 RSD 均 < 10%, 表明本品均一性良好。

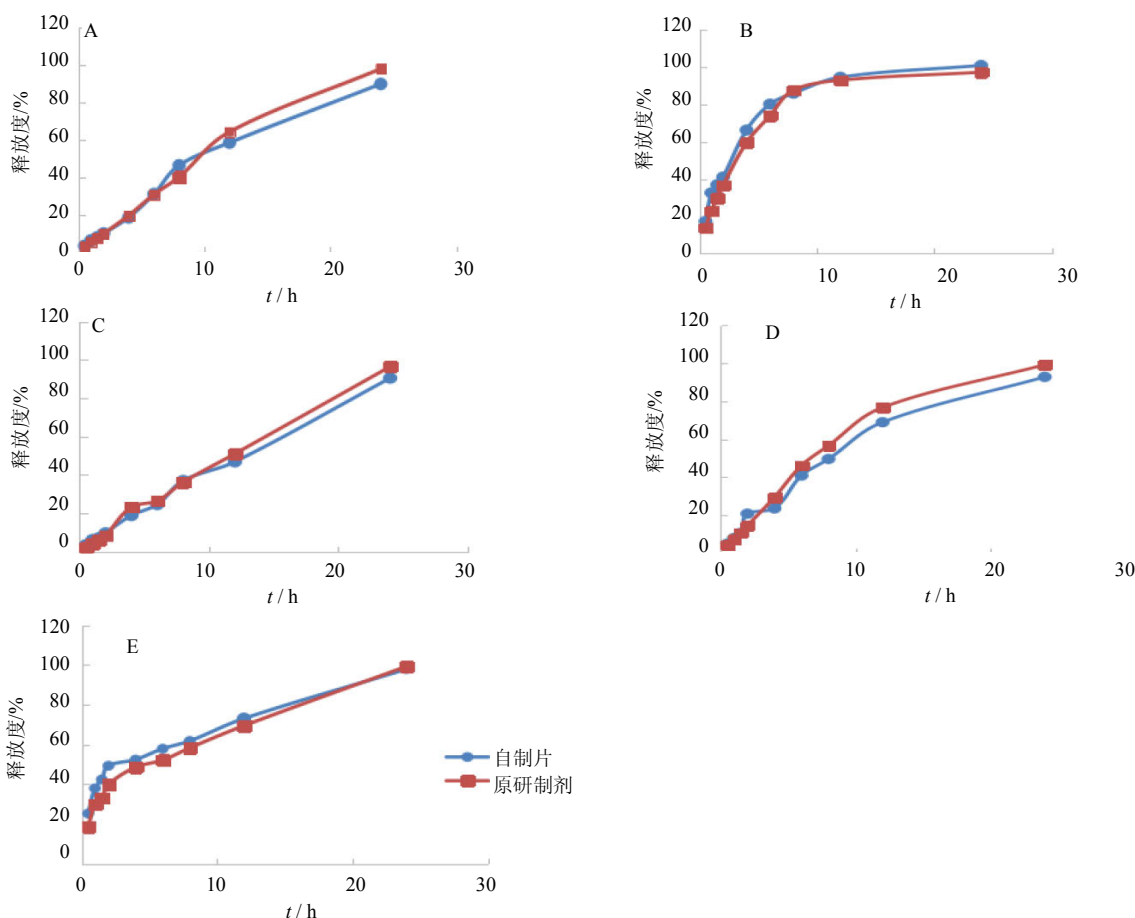
3.2 释放曲线测定结果

3.2.1 自制片与原研制剂释放曲线比较 取托拉塞米缓释自制片 (批号 140401) 与原研制剂 (批号 H022) 各 6 片, 照“2.3”项下释放度测定方法测定自制片与原研制剂在 5 种不同的释放介质中不同时间点的累积释放度, 平均累积释放度结果见表 2。托拉塞米缓释自制片与原研制剂在 5 种不同的释放介质中的释放曲线见图 1。

表 2 托拉塞米自制片与原研制剂在 5 种介质中累积释放度结果比较

Table 2 Comparison on cumulative release percentage of self-prepared Torasemide Sustained-Release Tablet and original preparation in five kinds of release media

介质	样品	累积释放度/%									
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h	
水	自制片	3.19	5.77	7.70	10.06	19.83	30.98	40.34	64.34	97.98	
	国外市售片	3.61	6.50	8.13	10.19	18.78	31.21	46.53	58.62	89.90	
0.1 mol/L 盐酸溶液	自制片	13.94	23.01	29.85	36.71	59.68	74.14	87.82	93.15	97.44	
	国外市售片	17.34	32.72	37.09	41.19	66.39	80.34	86.16	94.76	101.10	
pH4.5 醋酸盐缓冲液	自制片	2.29	4.24	6.21	8.41	23.32	26.55	36.26	51.10	96.58	
	国外市售片	3.63	6.30	7.22	9.76	18.89	24.61	37.08	46.92	90.59	
pH6.8 磷酸缓冲液	自制片	4.36	7.32	10.77	14.63	29.51	46.18	56.70	76.69	99.14	
	国外市售片	5.08	8.04	10.81	20.89	23.67	40.92	49.62	68.93	92.74	
0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸缓冲液	自制片	18.66	29.86	33.16	39.94	48.63	52.19	58.33	69.49	99.35	
	国外市售片	25.31	38.00	42.42	49.35	52.48	57.92	61.84	73.12	97.94	



A-水; B- 0.1 mol/L 盐酸溶液; C- pH4.5 醋酸盐缓冲液; D- pH6.8 磷酸盐缓冲液; E- 0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸盐缓冲液

A- water; B- 0.1 mol/L hydrochloric acid solution; C- pH4.5 acetate buffer; D- phosphate buffer pH6.8; E- 0.1 mol/L hydrochloric acid solution to pH6.8 phosphate buffer

图 3 托拉塞米缓释自制片与原研制剂在 5 种不同的释放介质中的释放曲线比较

Fig. 3 Comparison on release curve of self-prepared Torasemide Sustained-Release Tablet and original preparation in five kinds of release media

3.2.2 自制片与原研制剂释放相似性比较 采用美国 FDA 推荐的相似因子 (the similarity factor, f_2) 法^[7]对托拉塞米自制缓释片 (批号 140401) 与原研制

剂 (批号 H022) 在上述 5 种释放介质中的释放结果进行相似性比较, f_2 大于等于 50 时, 认为受试制剂与参比制剂溶出过程相似, f_2 越趋于 100, 相似性

越好。由于托拉塞米在 0.1 mol/L 盐酸溶液 8 h 时释放量已达到 85%以上, 因此选取 1、2、4、6、8 h 的释放结果进行对比, 其他介质选取 1、2、4、6、8、12 h 的释放结果进行对比, 结果见表 3。

表 3 自制片与原研制剂释放行为一致性比较

Table 3 Comparison on release behavior of self-prepared Torasemide Sustained-Release Tablet and original preparation

释放介质	f_2	结果判定
水	72	一致
0.1 mol/L 盐酸溶液	60	一致
pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液	77	一致
pH6.8 磷酸盐缓冲液	66	一致
0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸缓冲液	60	一致

4 结论

托拉塞米的 pK_a 有两个: 2.24 和 7.99, 是两性物质, 因此可推测其在胃、小肠、结肠均有一定的吸收。托拉塞米的半衰期为 2.2~5 h, 且降压作用可持续 24 h, 因此可设计成每 24 h 服用 1 次的缓释制剂^[4]。人体胃肠道环境有很大的个体差异性, 因此本研究选择托拉塞米缓释自制片与原研制剂在水、0.1 mol/L 盐酸溶液、pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液、pH6.8 磷酸盐缓冲液中的释放曲线进行比较。考虑到缓释制剂一般在胃液中 2 h 排空, 因此增加托拉塞米缓释自制片与原研制剂在 0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸缓冲液中的释放曲线的比较, 能更全面地反映两组缓释片在人体内的实际吸收情况。

本研究通过相似因子法进行托拉塞米缓释自制片与原研制剂的释放度评价, 以确定它们的相似性。受试或参比制剂的药物累积释放度在 85%以上的取

样点应不多于一个, 否则, 将会给判定结果带来误差^[7]。因此选择 0.1 mol/L 盐酸溶液中 1、2、4、6 和 8 h 时的释放结果进行对比, 其他介质选取 1、2、4、6、8 和 12 h 的释放结果进行对比, 结果显示托拉塞米缓释自制片与原研制剂在水、0.1 mol/L 盐酸溶液、pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液、pH6.8 磷酸盐缓冲液以及 0.1 mol/L 盐酸溶液转 pH6.8 磷酸缓冲液中的 f_2 均大于 50, 溶出行为相似, 从而证明了两组缓释片内在质量相近, 也为本品自制片与原研制剂将要进行的人体生物等效性试验提供了依据。

参考文献

- [1] 段志浩, 陈 慧, 胡廷熹. 托拉塞米注射液临床使用注意事项与配伍禁忌 [J]. 上海医药, 2015, (19): 53-54.
- [2] Ogawa R, Stachnik J M, Echizen H. Clinical pharmacokinetics of drugs in patients with heart failure: an update (part 2, drugs administered orally) [J]. Clin Pharmacokinet, 2014, 53(12): 1083-1114.
- [3] Arumugam S, Sreedhar R, Miyashita S, et al. Comparative evaluation of torasemide and furosemide on rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(1):137-143.
- [4] 吉连军. 托拉塞米缓释片的研究 [D]. 开封: 河南大学, 2007.
- [5] 安佰平, 柴龙龙, 柳玉英. 不同厂家双氯芬酸钠缓释胶囊释放曲线比较研究 [J]. 中国药业, 2016, 25(13): 34-36.
- [6] 陈加飞, 王 平, 赵 昕, 等. 国产与原研洛索洛芬钠片的体外溶出曲线一致性的比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2): 198-199.
- [7] 罗 平. 尼可地尔缓释片制备工艺及其体内外释药研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.