

格列喹酮片体外溶出度测定方法的建立与溶出曲线评价

刘欢^{1,2}, 池慧波^{1,2}, 张宁³, 杨昕³

1. 天津药物研究院 制剂中心, 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. 天津药物研究院药业有限公司 技术部, 天津 300301

摘要: 目的 建立格列喹酮片体外溶出度 HPLC 检测方法及其溶出曲线评价。方法 色谱柱为 Diamonsil@Plus C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为磷酸二氢铵溶液 (取磷酸二氢铵 1.725 g, 加水 300 mL 溶解后, 用磷酸调节 pH 值至 3.5 ± 0.1) - 乙腈 (3 : 5); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 310 nm, 进样量 20 μL, 柱温为 35℃, 外标法计算。结果 空白辅料、溶出介质不干扰测定; 格列喹酮在 3.13~50.02 μg/mL 线性关系良好 ($r=0.999\ 8$, $n=7$); 格列喹酮平均回收率为 100.2% (RSD = 0.83%, $n=9$); 格列喹酮溶出度溶液在 0~24 h 内稳定性良好 (RSD = 0.51%, $n=7$); 弃去 10 mL 初滤液后滤膜吸附达到饱和。自研品和参比制剂在 7 种不同 pH 溶出介质中溶出行为一致。结论 经方法学考察, 反相高效液相色谱法测定格列喹酮片溶出度专属性强, 准确可靠, 易于操作。

关键词: 格列喹酮; 溶出度; HPLC; 参比制剂; 外标法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)07-1251-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.016

Establishment of dissolution test method of gliquidone tablets and evaluation of dissolution profiles

LUI Huan^{1,2}, CHI Huibo^{1,2}, ZHANG Ning³, YANG Xin³

1. Center of Pharmaceutics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

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

3. Department of Technology, TIPR Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To develop a HPLC method for determining the dissolution of gliquidone tablet in vitro and evaluate the dissolution profiles. **Methods** The chromatographic conditions included Colum Diamonsil@Plus C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and 0.05 mol/L NH₄H₂PO₄ (adjusted to pH 3.5 ± 0.1 with diluted phosphoric acid) - acetonitrile (3 : 5) as the mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL/min, detected at 310 nm, injection volume was 20 μL, the column temperature was 35℃, using external standard method to calculate. **Results** gliquidone could be determined really, blank excipients and dissolution media were uninfluenced for determination. There was a good linearity in the range of 3.13—50.02 μg/mL ($r = 0.999\ 8$, $n = 7$), the average recovery of gliquidone was 100.2% (RSD = 0.83%, $n = 9$). Through 48 h stability test, the solution of gliquidone was good. The adsorption of the filter membrane reached saturation after abandoning 10 mL initial filtrate. The self-prepared formulation and reference preparation are consistent dissolution behavior in different seven media. **Conclusion** The established method is high selective, simple and accurate. The method can be used for the determination of dissolution for gliquidone tablets.

Key words: gliquidone; HPLC; reference preparation; external standard method

格列喹酮 (Gliquidone, GLQD) 为第二代口服磺脲类降糖药, 为高活性亲胰岛 β 细胞剂, 与胰岛 β 细胞膜上的特异性受体结合, 可诱导产生适量胰岛素, 以降低血糖浓度^[1]。口服吸收完全, 一次口

服 30 mg 格列喹酮后 2~3 h 血药浓度达到最高水平, 血浆半衰期为 1.5 h, 作用可持续 2~3 h, 代谢完全。不论给药量如何, 仅平均 5% 的药量在尿中以代谢产物存在。多次重复给药后, 肾脏排泄仍然

收稿日期: 2018-03-14

第一作者: 刘欢 (1976—), 女, 副研究员, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: (022)23006851 E-mail: liuh@tjipr.com

极少。大部分代谢产物经胆道系统从粪便中排泄。随着近年来新靶点降糖药物的涌现, 格列喹酮以它确切的疗效和独特的代谢特点, 自问世以来一直沿用至今^[2]。

格列喹酮属于难溶性药物, 并且它在不同介质中的溶解度具有 pH 相关性。对于口服固体制剂, 溶出度是产品的关键质量属性之一, 用来评价或生产中控制制剂的内在质量。溶出度是体外试验, 但与生物利用度紧密相关, 是仿制药一致性评价的关键指标^[3]。格列喹酮片的质量标准只收载于 2015 版《中国药典》和 2017 版《英国药典》, 溶出度测定方法均采用桨法 75 r/min、紫外分光光度法^[4-5]。但由于溶出液中药物浓度和药物对紫外波长的响应值低于 0.2, 导致生产过程中检验偏差较大, 因此需要建立一个准确、简单的方法来测定格列喹酮片溶出度。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695-e2489 高效液相色谱仪(沃特世公司); AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); FE20pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司); RC12AD 溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司); ZWY-240 温控往复式振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司)

1.2 药物与试剂

格列喹酮原料药(天津药物研究院药业有限责任公司, 批号 161103); 格列喹酮片(天津药物研究院制剂中心, 规格 30 mg/片, 批号 S170302); 参比制剂 Glurenorm(Astellas Pharma GmbH, 希腊产, 规格 30 mg/片, 批号 476013A); 格列喹酮对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100280-201403, 纯度 99.8%) 盐酸、氢氧化钠、磷酸、磷酸二氢铵、乙酸钠、磷酸二氢钾、无水柠檬酸、无水磷酸氢二钠购自天津市光复科技发展有限公司, 分析纯; 冰醋酸(天津市康科德科技有限公司, 分析纯); 乙腈(天津市康科德科技有限公司, 色谱纯)。

2 方法与结果

2.1 “pH-溶解度”曲线的测定

2.1.1 系列 pH 溶液的配制 配制 pH1.0~8.0 系列溶液, pH1.0 盐酸溶液、pH4.5 醋酸盐缓冲液、pH6.8 磷酸盐缓冲液参照《中国药典》2015 版^[4], pH8.5 磷酸盐缓冲液采用《中国药典》2015 版^[4]格列喹酮片溶出介质的配制方法(取磷酸氢二钠 71.2 g,

加水 1 000 mL 使溶解, 用 10%枸橼酸溶液调节 pH 值至 8.5), 其他 pH 溶液采用《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[7](用 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液和 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液混合配制)。

2.1.2 “pH-溶解度”曲线的测定 将过量的格列喹酮原料置于 50 mL 量瓶中, 以上述 pH1.0~8.0 系列溶液配制过饱和溶液, 将量瓶置于温控往复式振荡器中, 设定温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 经 24 h 后取样滤过, 取续滤液, 稀释, 参照“溶出度测定方法”项下色谱条件, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 计算格列喹酮在不同 pH 溶液中的溶解度 (S), 结果见表 1。以 pH 为横坐标, 以 $\lg S$ 值为纵坐标, 绘制格列喹酮“pH-溶解度”曲线, 结果见图 1。

结果表明, 格列喹酮为难溶性药物, 其溶解性具有 pH 相关性, 随 pH 增加溶解度亦增加, pH6.8 为转折点, 之后的溶解度陡然增加。

表 1 格列喹酮在不同 pH 溶液中的溶解度 (37°C)

Table 1 Solubility of GLQD in different pH buffer (37°C)

溶液 pH	溶液类型	溶解度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
1.01	0.1 mol/L 盐酸溶液	0
4.50	醋酸盐缓冲液	0
6.82	磷酸盐缓冲液	2.31
7.40	磷酸盐缓冲液	9.69
7.59	磷酸盐缓冲液	13.94
7.79	磷酸盐缓冲液	21.08
7.96	磷酸盐缓冲液	37.28
8.33	磷酸盐缓冲液	70.79
8.51	磷酸盐缓冲液	82.51

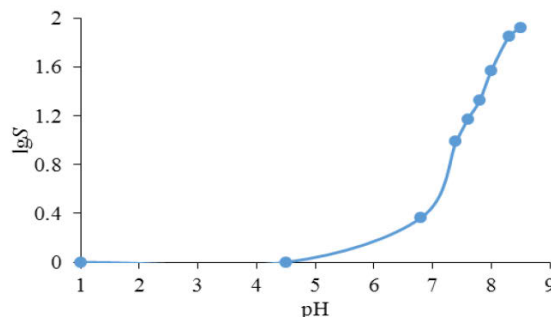


图 1 pH-溶度曲线 (37°C)

Fig. 1 pH Solubility profile of GLQD at 37°C

2.2 参比制剂的选择

本品的原研制剂为德国勃林格殷格翰药厂, 现已停产。SFDA 公布的参比制剂为德国安斯泰来制药公司 (Astellas Pharma GmbH) 希腊产

Glurenorm[®]。

2.3 溶出度测定方法的确立

2.3.1 溶出介质的选择 参照《中国药典》2015版、《英国药典》2017版、《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[6]及格列喹酮“pH-溶解度”曲线测定结果,选择4种不同pH溶液作为溶出介质:pH8.5磷酸盐缓冲液、pH8.0磷酸盐缓冲液、pH7.4磷酸盐缓冲液和蒸馏水。

2.3.2 色谱条件 照高效液相色谱法(《中国药典》2015版四部通则0512)进行测定。Diamondsil@Plus C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),以磷酸二氢铵溶液(取磷酸二氢铵1.725 g,加水300 mL溶解后,用磷酸调节pH值至3.5±0.1)-乙腈(3:5)为流动相,流速为1.0 mL/min,检测波长为310 nm,进样量20 μL,柱温为35℃,运行时间8 min。

2.3.3 专属性 分别取流动相、4种溶出介质、混合辅料、格列喹酮对照品溶液、格列喹酮片粉溶液各20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见表2。结果表明,在该色谱条件下,流动相、溶出介质、混合辅料保留时间(t_R)<3.2 min,格列喹酮与各峰分离度良好,不干扰格列喹酮片溶出度测定。

表2 格列喹酮片溶出度测定方法学专属性结果

Table 2 Specificity results of GLQD Tablets resolution method

样品名称	背景 t_R /min	格列喹酮 t_R /min
流动相	—	—
pH8.5 磷酸盐缓冲液	1.473	—
pH8.0 磷酸盐缓冲液	1.516	—
pH7.4 磷酸盐缓冲液	1.563	—
pH6.8 磷酸盐缓冲液	1.527	—
蒸馏水	—	—
pH4.5 醋酸盐缓冲液	1.512, 2.976	—
pH1.0 盐酸溶液	1.625	—
混合辅料	1.420	—
对照品溶液	1.423	5.210
供试品溶液	1.421	5.218

2.3.4 线性范围 精密称取格列喹酮对照品约10 mg,置100 mL量瓶中,加5 mL *N,N*-二甲基甲酰胺超声溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,分别精密量取0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL置10 mL量瓶中,加pH8.5磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为: $Y=5.72 \times 10^3 X +$

642.3, $r=0.999\ 8$;结果表明,在pH8.5磷酸盐缓冲液中格列喹酮3.13~50.02 μg/mL线性关系良好。

2.3.5 回收率 精密称取格列喹酮对照品适量,置量瓶中,按处方量加入空白混合辅料,先加入加10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺超声溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,再用pH8.5磷酸盐缓冲液配制成浓度为16.7、26.7、33.3、40.0 μg/mL的样品,每个质量浓度平行操作3份,滤过,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算回收率。结果表明,格列喹酮在pH8.5磷酸盐缓冲液中回收率为100.2%,RSD为0.83%,回收率良好($n=12$)。

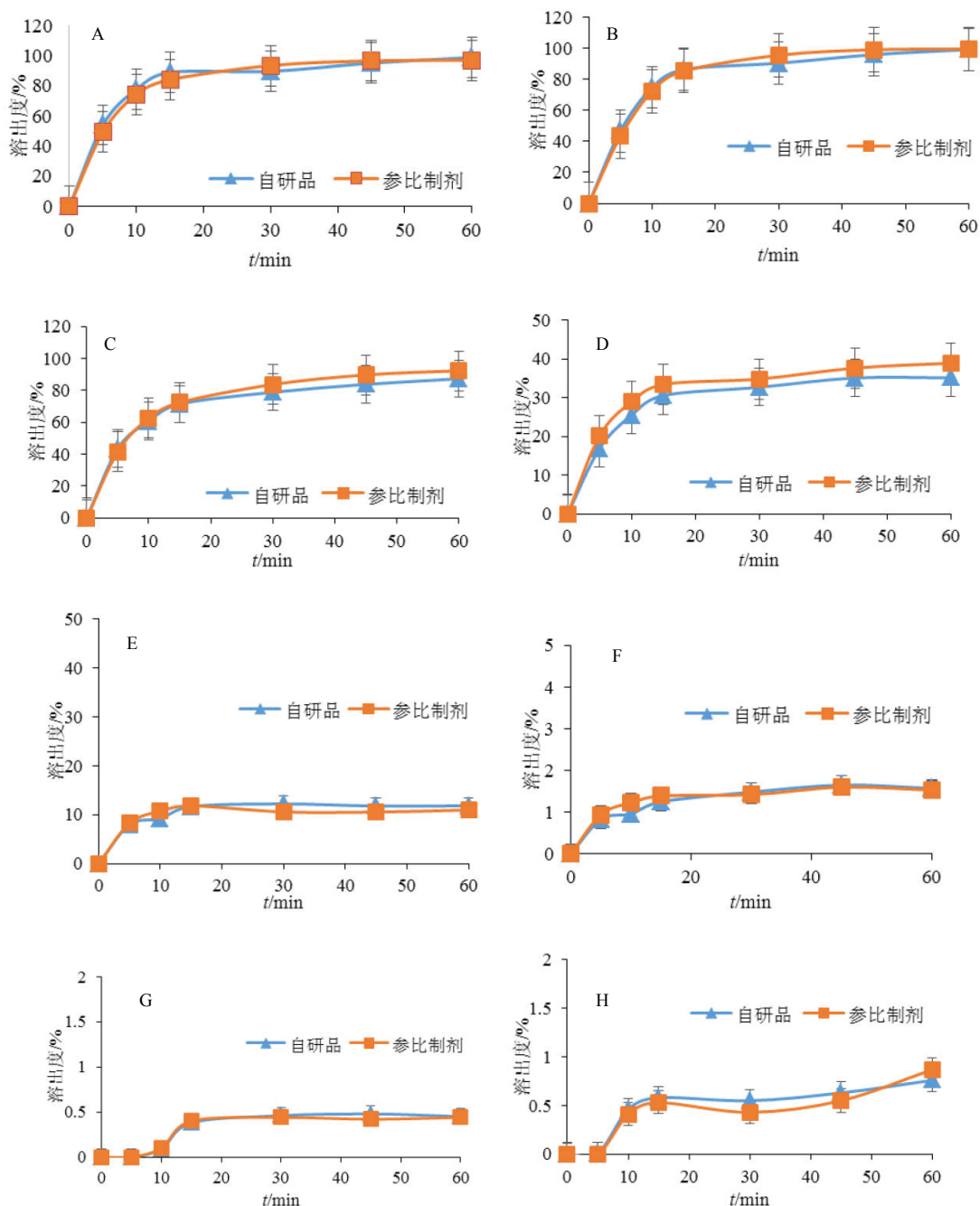
2.3.6 滤膜干扰性 取格列喹酮片1片置溶出仪中,事先加入900 mL pH8.5磷酸盐缓冲液,预热至(37±0.5)℃,桨法,30 min取样。用一次性针筒过滤器(水系25 mm×0.45 μm)滤过,分别弃去初滤液0、2、5、10、15、20 mL,取上述溶液的续滤液分别注入液相色谱仪,记录色谱图,考察滤膜干扰情况。结果表明,使用0.45 μm微孔滤膜滤过,弃去滤液10 mL后滤膜吸附达到饱和,不干扰测定。

2.3.7 溶液稳定性 将格列喹酮对照品溶液,样品溶液置样品仓(25±5)℃放置,于0、1、2、4、6、8、12、24、48 h取样20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,将对对照品溶液、样品溶液于样品仓内放置48 h,峰面积RSD分别为0.74%和0.68%,溶液稳定性良好。

2.3.8 耐用性 改变高效液相色谱条件,考察色谱系统参数变化的耐用性,包括:体积流量±0.1 mL/min、柱温±2℃,波长±2 nm、流动相比比例±2%、流动相pH±0.2。设置HPLC系统参数,分别取对照品溶液和供试品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,计算含量。结果表明,色谱系统参数微调情况下,格列喹酮测定结果的RSDB值均小于1.2%($n=6$),色谱系统参数耐用性良好。

2.4 自研品与参比制剂在不同pH溶出介质中溶出曲线测定结果

照溶出度测定法(《中国药典》2015版四部通则0931第二法),用上述7种溶媒900 mL作为溶出介质,温度(37±0.5)℃,转速75 r/min,取自研品12片,依法操作,分别在5、10、15、30、45、60 min取续滤液2 mL作为供试品溶液。格列喹酮自研品和参比制剂在7种不同pH溶出介质中的平均溶出度曲线($n=12$)见图2,相似因子见表3,



A- pH8.5 磷酸盐缓冲液 (中国药典); B- pH8.5 磷酸盐缓冲液 (英国药典); C- pH8.0 磷酸盐缓冲液; D- pH7.4 磷酸盐缓冲液; E- pH6.8 磷酸盐缓冲液; F- 蒸馏水; G- pH4.5 醋酸盐缓冲液; H- pH1.0 盐酸溶液

A- pH8.5 phosphate buffer media (CHP); B- pH8.5 phosphate buffer media (BP); C- pH8.0 phosphate buffer media; D- pH7.4 phosphate buffer media; E- pH6.8 phosphate buffer media; F- water; G- pH4.5 acetate buffer media; H- pH1.0 phosphate buffer media

图2 格列喹酮自研品和参比制剂在不同溶出介质中的溶出曲线

Fig.2 Dissolution curves of the self-prepared formulation and reference preparation in different dissolution medium

由于自研品和参比制剂在蒸馏水、pH4.5 醋酸盐缓冲液和 pH1.0 盐酸溶液中几乎不溶出, 未计算相似因子。

3 讨论

虽然生物利用度的高低最终是以临床数据来衡

量的, 但在很大程度上可以依赖体外溶出度试验来评价^[7]。从生物等效性的风险评估分析, 格列喹酮生物药剂学分类不明确^[8], 从“pH-溶解度”曲线可知, 格列喹酮片为 pH 值相关性制剂, 并且格列喹酮为难溶性药物, 从而大大增加了其体内生物不等

表3 格列喹酮自研品与参比制剂在各介质中溶出曲线相似因子

Table 3 f_2 similar factor of the self-prepared formulation and reference preparation in different buffer media

溶出介质	f_2	n
pH8.5 磷酸盐缓冲液(ChP)	67.45	3
pH8.5 磷酸盐缓冲液(BP)	78.70	3
pH8.0 磷酸盐缓冲液	69.66	6
pH7.4 磷酸盐缓冲液	74.69	6
pH6.8 磷酸盐缓冲液	91.26	6

效的风险。作为难溶性药物,控制原料药的粒径是重要的制剂工艺策略,其次体外建立具有区分力的溶出曲线是评价仿制制剂和原研制剂体外溶出行为的关键。药物 pH-溶解度曲线反映了药物在不同 pH 值缓冲液中的溶解度变化趋势,为选择具有区分力的体外溶出介质提供一定参考^[9]。

综合“pH-溶解度”曲线结果及药典方法和相关指导原则,对于 pH 相关性药物,需在多种 pH 值的溶出介质中进行考察。因此本文选择了 pH8.5 磷酸盐缓冲液(高、低离子强度)、pH8.0 磷酸盐缓冲液、pH7.4 磷酸盐缓冲液、pH6.8 磷酸盐缓冲液、pH4.5 醋酸盐缓冲液、pH1.0 盐酸溶液和蒸馏水 7 种溶出介质,满足了人体内消化道各器官的变化范围。结果表明,经 f_2 相似因子计算自研品与参比制剂在上述多种 pH 溶出介质中溶出行为一致。格列喹酮片在 pH 大于 6.8 的溶出介质中有一定的溶出,且溶出速度与“pH-溶解度”测定结果相一致: pH8.5 磷酸盐缓冲液 > pH8.0 磷酸盐缓冲液 > pH7.4 磷酸盐缓冲液 > pH6.8 磷酸盐缓冲液 > 蒸馏水。

比较《中国药典》2015 版和《英国药典》2017 版中格列喹酮片溶出介质可知,两者均为 pH8.5 磷酸盐缓冲液,但《中国药典》2015 版的离子强度是《英国药典》2017 版的两倍,在高离子强度的溶出

介质中格列喹酮片前 10 min 溶出略快 7%,但在高低两种离子强度的 pH8.5 磷酸盐缓冲液中 15 min 溶出度均大于 85%,不存在差异。

在 pH1.0~pH6.8 的溶出介质中,格列喹酮 60 min 溶出度小于 2%,为了更好地表现制剂的体外溶出行为,可以在溶出介质中加入适量的表面活性剂(如聚山梨酯、十二烷基硫酸钠)以获得较好的溶出曲线。

由于溶出液中药物浓度和药物对紫外波长的响应值小于 0.2,导致生产过程中样品间的检验偏差较大,容易发生误判。因此本文建立了专属性更强、准确度更高的 HPLC 法,并进行了方法验证。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会.格列喹酮临床应用中国专家共识(2017 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(5): 363-366.
- [2] Malaisse W J. Gliquidone contributes to improvement of type 2 diabetes mellitus management: a review of pharmacokinetic and clinical trial data [J]. Drugs R D, 2006, 7(6): 331-337.
- [3] 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则 [S]. 2017.
- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [5] 英国药典 [S]. 2017.
- [6] 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则 [S]. 2015.
- [7] 仿制药参比制剂目录(第八批)通告 [S]. 2017.
- [8] FDA. Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System [S/OL]. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Evaluation and Research: 2015http://www.fda.gov/oc/ohrt/bioequivalence/bioequivalence_guidance.pdf
- [9] 谢沐风. 具有区分力的溶出曲线 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(7): 687-S83.