

匹伐他汀钙片溶出度一致性评价研究

张莉, 高扬, 李浩然, 张志清*

河北医科大学第二医院 药学部, 河北 石家庄 050000

摘要: 目的 建立匹伐他汀钙片溶出度测定方法, 评价国内仿制药与原研药溶出曲线的相似性。方法 建立高效液相色谱(HPLC)法测定匹伐他汀钙片含量, 并进行专属性、回收率、精密度、重复性、稳定性等方法学考察。以原研药为参比制剂, 采用桨法, 转速50 r/min, 测定仿制药与原研药在4种不同pH溶出介质(pH 1.2盐酸溶液、pH 4.5醋酸盐缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液、水)中的溶出度, 绘制溶出曲线, 采用相似因子(f_2)法分析溶出曲线相似性。结果 色谱条件为: 色谱柱Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 醋酸盐缓冲液(冰醋酸500 μL、醋酸铵140.6 mg, 加水至1 000 mL)-乙腈(15:85)为流动相, 波长244 nm。方法学验证结果均符合检测要求。其中3家仿制药与原研药溶出行为基本一致, 另外1家仿制药在水和pH 4.5醋酸盐缓冲液中均与原研药溶出曲线不相似。结论 大部分厂家仿制药体外溶出与原研药一致。所建HPLC法适用于匹伐他汀钙片的浓度测定, 可为今后匹伐他汀钙片溶出度一致性评价提供参考。

关键词: 匹伐他汀钙片; 高效液相色谱法; 溶出曲线; 一致性评价

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)04-0751-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.011

Evaluation of dissolution consistency of pivastatin calcium tablets

ZHANG Li, GAO Yang, LI Haoran, ZHANG Zhiqing

Department of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of dissolution curve of pivastatin calcium tablets, and evaluate the similarity of dissolution curve of domestic generic drugs and the original drugs. **Methods** The concentrations of samples were detected by HPLC. The specificity, recovery, precision, repeatability, stability and other methodological studies were carried out. The paddle method was using for the dissolution process. The rotation speed of paddle was 50 r/min. To determine the dissolution profiles of generic pivastatin calcium tablets and the original product in four dissolution mediums (the pH 1.2 hydrochloric acid solution, the pH 4.5 acetate buffer solution, the pH 6.8 phosphate buffer solution and water). The f_2 factor method was used for analyze the similarity of dissolution curves. **Results** A Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Mobile phase consisted of a mixture of acetate buffer(acetic acid 500 μL and ammonium acetate 140.6 mg were added to 1 000 mL water)-acetonitrile(15: 85), and UV detection wavelength was 244 nm. The results of methodology validation met the detection requirements. The dissolution profile of three generic tablet were similar to the original tablet in the four dissolution media. The dissolution of the other company's products was inconformity to the innovator drug in the water dissolution media and pH 4.5 acetate buffer solution. **Conclusion** The *in vitro* dissolution of some generic drugs was significantly different from the original drug. The HPLC method be appropriate for the determination of the concentration of pivastatin calcium tablets, which can provide a reference for further consistency evaluation of pivastatin calcium tablets.

Key words: pivastatin calcium tablets; HPLC; dissolution profiles; consistency evaluation

匹伐他汀(pitavastatin)为HMG-CoA还原酶抑制剂,对低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)有显著的降

低效果,用于治疗动脉粥样硬化、高胆固醇血症和家族性高胆固醇血症^[1-2]。匹伐他汀钙片是由日本

收稿日期: 2020-08-16

基金项目: 河北省卫健委医学科学研究课题计划(20200916)

第一作者: 张莉(1988—),女,石家庄人,硕士,主管药师,主要从事药物制剂及药物安全性评价研究。Tel: (0311)66002773

E-mail: LZ19881209@126.com

*通信作者: 张志清,主任药师。Tel: (0311)66002771 E-mail: 777yyy@sina.cn

日产化学工业株式会社与兴和株式会社共同开发的第三代他汀类药物,于2003年在日本上市。针对我国部分仿制药质量与国际先进水平存在一定差距的现状,对市售药品开展“一致性评价”已经成为迫切需要完成的工作。对于口服制剂,溶出度是评价其内在质量的重要指标,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]。

本实验以匹伐他汀钙片为模型药物,首先建立HPLC法来检测匹伐他汀钙含量,然后测定原研和仿制匹伐他汀钙片在多个pH溶出介质(pH 1.2盐酸溶液、pH 4.5醋酸盐缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液和水)中的溶出度,并对溶出曲线进行相似性对比^[3]。以此来对市售匹伐他汀钙片进行质量考察,建立匹伐他汀钙片的体外溶出度一致性评价方法,希望能为匹伐他汀钙片工艺改进和临床用药提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters); 2489UV/Vis 检测器(美国 Waters); ZRS-4 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); CPA225D 型电子分析天平(德国 Sartorius); pH213 型台式酸度计(罗马尼亚 HANNA); YB-II 型澄明度检测仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 药品与试剂

匹伐他汀钙对照品(中国食品药品检定研究院,批号 101245-201801,质量分数 96.2%); 匹伐他汀钙片(兴和株式会社,规格每片 2 mg,批号 DL8A-E02、FM9W-E01、GL9M-E01); 匹伐他汀钙片(仿制药 A,华润双鹤药业股份有限公司,规格每片 2 mg,批号 190601、200408、200505); 匹伐他汀钙片(仿制药 B,深圳信立泰药业股份有限公司,规格每片 2 mg,批号 BU19001、B200327、B200361); 匹伐他汀钙片(仿制药 C,江苏万邦生化医药集团有限责任公司,规格每片 2 mg,批号 1907710、62006705、62006723); 匹伐他汀钙片(仿制药 D,山东齐都药业有限公司,规格每片 1 mg,批号 1D1906021、1D2006050、1D2007021); 乙腈(色谱纯,赛默飞,批号 194210); 水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:醋酸盐缓冲液(冰醋酸 500 μL、醋酸铵 140.6 mg,加水至 1 000 mL)(85:15); 体积流量

1.0 mL/min; 柱温 35℃; 检测波长 244 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液配制 精密称取匹伐他汀钙对照品 15 mg 于 100 mL 量瓶中,流动相溶解定容,得质量浓度为 150 μg/mL 的对照品储备液;取储备液适量,用流动相稀释成质量浓度为 2.1 μg/mL 的匹伐他汀钙对照品溶液。

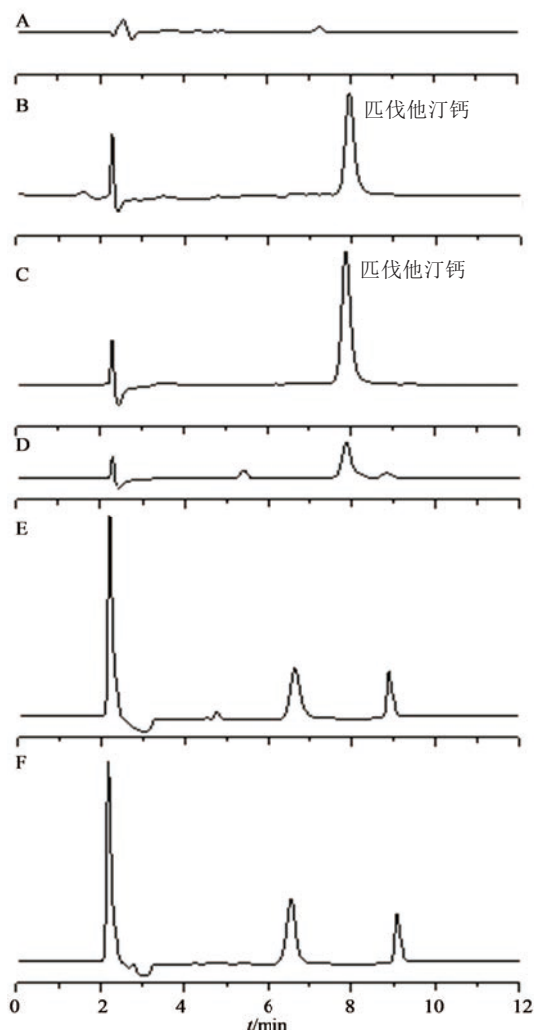
2.2.2 供试品溶液配制 将 1 片匹伐他汀钙片(2 mg)溶解于 900 mL 流动相溶液中,滤过,即为质量浓度为 2.1 μg/mL 的匹伐他汀钙片供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 取空白流动相溶液、“2.2.1”项下匹伐他汀钙对照品溶液、“2.2.2”项下匹伐他汀钙片供试品溶液,按上述“2.1”项色谱条件测定。结果显示,流动相溶液在主成分处不出峰,对主成分含量测定无干扰。见图 1。配制“2.2.2”项下供试品溶液适量(约相当于匹伐他汀钙 2 mg),平行 6 份,进行破坏性试验。光照破坏:供试品溶液于 4 500 lx 下照射 24 h;高温破坏:供试品溶液沸水浴约 4 h;酸破坏:供试品溶液中加入 5 mL 1 mol/L 盐酸,再置沸水浴中 10 min 后,放冷,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH,至中性;碱破坏:供试品溶液中加入 5 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠,再置沸水浴中 10 min 后,放冷,用 1 mol/L 盐酸调节 pH,至中性。以上经破坏的样品按照“2.1”项下色谱条件进行测定。本品在经光照后,匹伐他汀钙主峰面积下降,增加了 2 个杂质峰,见图 1-D;经高温破坏后,主峰面积下降;经酸和碱破坏后,主峰消失,生成 2 个杂质峰,见图 1-E、F。实验说明,匹伐他汀钙片供试品对光照、高温、酸和碱均不稳定,所产生的杂质峰与主峰分离度较好,该方法的专属性强。

2.3.2 线性范围 精密称取匹伐他汀钙对照品 15 mg,于 100 mL 量瓶中,流动相溶解定容,得质量浓度为 150 μg/mL 的对照品储备液;取储备液适量,用流动相稀释成质量浓度分别为 0.30、0.75、1.05、1.50、2.10、3.00 μg/mL 的系列对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件测定。以匹伐他汀钙质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,标准曲线方程: $Y = 55\,344 X + 1\,941$ ($R^2 = 0.999\,5$),匹伐他汀钙在 0.30~3.00 μg/mL 线性关系良好。

2.3.3 回收率 精密称取 8.90、11.10、13.35 mg 匹伐他汀钙对照品各 3 份,分别置于 100 mL 量瓶中,加入溶出介质振摇溶解,定容。精密量取其



A-流动相溶液; B-匹伐他汀钙对照品; C-匹伐他汀钙供试品; D-光照破坏; E-酸破坏; F-碱破坏

A-mobile phase solution; B-reference substance of pivalastatin calcium; C-test solution of pivalastatin calcium tablet; D-destroyed by light; E-destroyed by acid; F-destroyed by alkali

图1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

中2 mL,置100 mL量瓶中,加入溶出介质定容。配制成测定浓度80%(1.78 $\mu\text{g/mL}$)、100%(2.22 $\mu\text{g/mL}$)、120%(2.67 $\mu\text{g/mL}$)的溶液,按“2.1”项下色谱条件测定溶液中匹伐他汀钙峰面积,带入“2.3.2”项中标准曲线方程,计算得质量浓度 $C_{\text{测定}}$,计算回收率= $m_{\text{测定}}/m_{\text{称量}}$ 。结果显示,pH 1.2盐酸介质下低、中、高3种质量浓度平均回收率95.13%,RSD为1.66%;pH 4.5醋酸盐介质下3种质量浓度平均回收率96.61%,RSD为1.98%;pH 6.8磷酸盐介质下3种质量浓度平均回收率95.99%,RSD为1.72%;水介质下3种质量浓度平均回收率97.98%,RSD为1.11%。实验表明,在所选择的溶出条件及测定条件下,方法准确度良好。

2.3.4 精密度考察 取“2.2.2”项下供试品溶液1份,按照“2.1”项下色谱条件测定含量,连续进样6次,RSD为0.56%。再取“2.2.2”项下供试品溶液1份,按照“2.1”项下色谱条件,连续测定3 d,RSD为0.98%。

2.3.5 重复性试验 按照“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法,平行制备6份供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件分别测定含量,测得6份供试品溶液的峰面积RSD为0.91%。

2.3.6 滤膜吸附试验 取“2.2.2”项下供试品溶液2份,其中一份用0.45 μm 的尼龙滤膜滤过,弃去不同体积的初滤液,取续滤液测定药物含量。另一份供试品溶液做离心处理,取上清液测定药物含量。各个续滤液样品浓度与离心的样品浓度相比较,计算回收率。以上操作重复3次,测得平均回收率为99.81%,RSD为0.79%。结果显示,滤膜对匹伐他汀钙的吸附作用基本无影响,样品溶液在滤过时均无需弃去初滤液。

2.3.7 稳定性考察 将4片供试品分别投入4种介质(900 mL)中,超声15 min加速溶解,取出少量溶液过膜,在室温下放置0、2、4、6、8、12 h,按照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图和峰面积。将0 h的峰面积计为100%,计算每个时间点样品峰面积变化情况。

匹伐他汀钙片在3种介质(pH 4.5、pH 6.8和水)中,12 h内质量分数稳定在95%以上,而在pH 1.2介质中稳定性较差。见表1。

表1 匹伐他汀钙片在4种溶出介质中的稳定性考察
Table 1 Study on stability of pivalastatin calcium tablets in four dissolution mediums

溶出介质	匹伐他汀钙片溶出样品质量分数/%					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
pH 1.2盐酸溶液	100	95.18	93.97	93.32	92.97	91.91
pH 4.5醋酸盐缓冲液	100	99.29	99.93	99.83	99.94	95.02
pH 6.8磷酸盐缓冲液	100	99.90	99.05	98.45	98.50	96.36
水	100	100.00	99.89	99.69	99.37	98.73

因此,本实验选择氢氧化钠作为碱性调节剂。在pH 1.2介质下的溶出样品(500 μL)中加入氢氧化钠,并对加入量进行摸索,结果见表2。结果显示,向pH 1.2样品(500 μL)中加入0.1 mol/L氢氧化钠500 μL ,4 h后药品质量分数维持在97%以上,稳定性有显著提高。由于加碱后的样品放置12 h后,质量分数仍会降低4.08%,所以全部样品在取样后

表2 在pH1.2介质中匹伐他汀钙片溶出样品的稳定性考察

Table 2 Study on stability of pivalstatin calcium tablets in pH 1.2 hydrochloric acid solution

pH 1.2 溶出样品中加入 0.1 mol/L NaOH 的量/ μL	匹伐他汀钙片溶出样品质量分数/%					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
0	100	95.18	93.97	93.32	92.97	91.91
250	100	97.36	95.63	94.68	93.75	92.87
400	100	97.95	96.26	95.67	94.37	93.23
500	100	99.17	97.18	97.58	96.59	95.92

4 h 内测定。

2.4 溶出度测定

2.4.1 溶出介质选择^[3] 分别以 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、水为溶出介质。

2.4.2 溶出曲线测定方法^[4] 取本品, 分别以 4 种溶剂(pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水)各 900 mL 为溶出介质, 桨法, 转速为 50 r/min, 经 5、10、15、20、30、45 min 时, 取溶液适量(10 mL), 滤过, 并即时补充相同温度相同体积的溶出介质。对于 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、水为溶出介质时, 直接取续滤液作为供试品溶液, 而对于 pH 1.2 盐酸溶液为溶出介质时, 精密量取续滤液 500 μL , 立即加入 0.1 mol/L 氢氧化钠 500 μL , 摇匀, 作为供试品溶液。进样量 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件测定含量, 用外标法以峰面积计算各时间点的溶出量, 再计算各时间点的累积溶出量(对于 pH 1.2 介质下各时间点的溶出量要进行体积折算)。以 18 片(每批 6 片)的平均累积溶出量为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制溶出曲线。

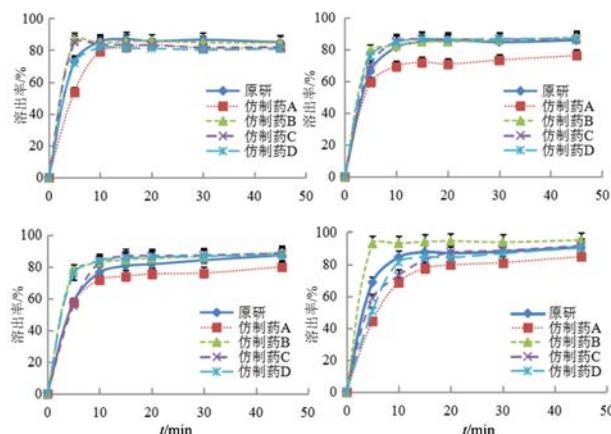
溶出率 = 每个时间点的累积溶出量/标示量

匹伐他汀钙片在不同介质中的溶出曲线见图 2。

2.4.3 批间差异考察 计算每个取样时间点下, 同一厂家 3 批样品的溶出度相对标准偏差, 以考察其溶出行为的批间均一性。

原研药在 4 种介质中, 每个时间点溶出度 RSD 均小于 10%, 批间差异较小; 所有仿制药第一个时间点 RSD 不超过 20%, 后面的点不超过 10%。仿制药 A 在 4 种介质中, 第一个点溶出度 RSD 均大于其他 3 种仿制药, 批间差异最大。

2.4.4 溶出曲线的相似性判定^[5] 采用相似因子(f_2)法判定仿制药与原研药之间溶出曲线的相似性, 即将原研药的平均溶出度(R_t)、仿制药的平均溶出度(T_t)和平均溶出时间点的数量($n=18$), 分别带入以下公式, 计算 f_2 值:



A-pH 1.2 盐酸溶液; B-pH 4.5 醋酸盐缓冲液; C-pH 6.8 磷酸盐缓冲液; D-水

A - pH 1.2 hydrochloric acid solution; B - pH 4.5 buffer solution; C - pH 6.8 buffer solution; D - water

图2 匹伐他汀钙片在4种不同介质中的溶出曲线 ($n=18$)
Fig. 2 Dissolution profiles of pivalstatin calcium tablets in four kinds of dissolution mediums ($n=18$)

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

当两条溶出曲线 f_2 值不小于 50 时, 表示两药品的溶出度相似。原研和仿制药累积释放度在 85% 以上的取样点应不多于 1 个, 一般除 0 时外, 选择 3 点以上进行比较。普通制剂若 15 min 内溶出量达 85% 以上, 可认为溶出曲线相似。

匹伐他汀钙片仿制药与原研药在 4 种溶出介质中的 f_2 值计算结果, 见表 3。

表3 匹伐他汀钙片仿制药与原研药溶出曲线的 f_2 值

Table 3 f_2 between test medicine and reference medicine

溶出介质	f_2 值			
	仿制药 A	仿制药 B	仿制药 C	仿制药 D
pH 1.2 盐酸缓冲液	52.16	64.11	65.68	72.76
pH 4.5 醋酸盐缓冲液	46.81	61.84	80.43	68.73
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	60.60	65.16	67.10	69.06
水	44.59	15 min 释放 > 85%	58.87	56.64

结果表明,仿制药B、C和D与原研药在4种介质中 f_2 值均大于50,溶出曲线均相似。但是,仿制药A在pH 4.5醋酸盐溶液和水中, f_2 值小于50,与原研药溶出曲线不相似。

3 讨论

由于匹伐他汀钙在低pH环境中稳定性较差,如何提高匹伐他汀钙在pH 1.2介质中的稳定性成为实验难点之一。本实验选择氢氧化钠作为碱性调节剂,向pH 1.2介质样品中加入等体积0.1 mol/L氢氧化钠500 μ L,混合后的样品pH接近7,稳定性有显著提高^[6]。但也并不是加入氢氧化钠的量越大越好,色谱柱的耐受pH值为2~11,当加入0.1 mol/L氢氧化钠750 μ L后,样品pH值接近11,碱性过大会损坏色谱柱,故不采用。

匹伐他汀钙结构中的3,5-二羟基-6-庚烯酸对于光、热均比较敏感,因此原研药的处方中采用了特殊作用的辅料(pH辅助化剂及多价金属盐)来防止形成内酯和氧化产物,而仿制品中的关键辅料可能与原研不同,或采取其他方法来防止产品降解。这些因素都可能会影响片剂的质量和溶出过程。^[7]

通过比较国产样品与原研药在4种溶出介质中的溶出度,可见有些市售国产仿制药与原研药溶出曲线不相似,存在一定质量差异。分析其原因可能出现在仿制药的原辅料种类、质量和生产工艺等诸多方面,而这些差异很可能是导致体内生物等效性试验失败的原因。

针对仿制药重复品种过多,质量参差不齐的情况,开展仿制药一致性评价可有效地提高仿制药质量,提升仿制药体内生物等效性试验成功率,降低医疗总费用支出^[8]。本研究建立HPLC法和溶出方法对于匹伐他汀钙片仿制药质量与疗效一致性评价具有一定的参考意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 荆珊,孙宁玲,王鸿懿,等.匹伐他汀钙片治疗原发性高胆固醇血症疗效和安全性[J].中国新药杂志,2008,17(9): 775-777, 786.
Jing S, Sun N L, Wang H Y, et al. The efficacy and safety of pitavastatin in treatment of hypercholesterolemia [J]. Chin New Drugs J, 2008, 17(9): 775-777, 786.
- [2] Masao M, Daiji N, Fumihiko H, et al. Outcome of pitavastatin versus atorvastatin therapy in patients with hypercholesterolemia at high risk for atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Int J Cardiol, 2020, 305: 139-146.
- [3] 国家食品药品监督管理局.普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则[EB/OL].(2016-03-18)[2016-07-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanli/ypqxgg/ggzchcf/20160318210001633.html>.
SFDA. Guidance for dissolution curve determination and comparison of oral dosage [EB/OL].(2016-03-18)[2016-07-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanli/ypqxgg/ggzchcf/20160318210001633.html>
- [4] 国家食品药品监督管理局.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[EB/OL].(2015-02-05)[2015-07-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20151030120001291.html>.
SFDA. Guidelines for the dissolution test of oral solid dosage forms [EB/OL].(2015-02-05)[2015-07-07].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/120001291.html>.
- [5] 谢沐风.溶出曲线相似性的评价方法[J].中国医药工业杂志,2009,40(4): 308-310.
Xie M F. Evaluation methods of comparability of dissolution curve [J]. Chin J Pharm, 2009, 40(4): 308-310.
- [6] 村松丰二郎,真下克己,筱田泰雄,等.用碱性试剂稳定的药物组合物:日本,1189098A[P].1998-07-29.
Ramen J, Katsumi M, Yasuo K, et al. Pharmaceutical composition stabilized with alkaline reagent: Japan, 1189098A [P]. 1998-07-29.
- [7] 石靖,许真玉.口服固体制剂一致性评价处方工艺研究的常见问题分析[J].中国新药杂志,2019,13: 1561-1566.
Shi J, Xu Z Y. Common problems analyses in the formulation and process research on consistency evaluation of oral solid dosage form [J]. Chin New Drugs J, 2019, 13: 1561-1566.
- [8] 王俏瑾,陈珏.仿制药一致性评价工作的进展与展望[J].中国现代应用药学,2019,36(4): 499-502.
Wang Q J, Chen J. Progress and Prospect of generic drug consistency evaluation [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2019, 36(4): 499-502.

[责任编辑 兰新新]