

相似因子法评价雷美替胺片自研制剂与原研制剂溶出曲线的相似性

张琳^{1*}, 刘葵葵¹, 李欣¹, 邢雪敏¹, 王伶^{2#} (1. 山东省药学科学院/山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 2. 山东福瑞达医药集团公司/山东省黏膜与皮肤给药技术重点实验室, 济南 250101)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4307-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.43

摘要 目的: 评价雷美替胺片自研制剂与原研制剂体外溶出行为的一致性。方法: 采用桨法, 转速为 50 r/min, 分别以水、pH1.2 盐酸溶液、pH4.0 乙酸盐缓冲液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质, 用高效液相色谱法(HPLC)测定雷美替胺片自研制剂与原研制剂中主成分在不同时间点的累积溶出度, 并绘制溶出曲线, 进而采用相似因子(f_2)法评价二者溶出曲线的相似性。结果: 在 4 种溶出介质中, 雷美替胺片自研制剂与原研制剂的 f_2 分别为 62.8、80.0、77.7、76.2, 说明二者溶出曲线具有相似性。结论: 所建立的 HPLC 法适用于雷美替胺片的溶出度测定; 自研制剂与原研制剂的体外溶出行为相似, 初步说明自研制剂的处方和工艺具有合理性。

关键词 雷美替胺片; 自研制剂; 原研制剂; 高效液相色谱法; 相似因子; 溶出曲线; 评价

Similarity Evaluation of the Dissolution Profiles of Self-made and Original Preparation of Ramelteon Tablet by f_2

ZHANG Lin¹, LIU Kuikui¹, LI Xin¹, XING Xuemin¹, WANG Ling² (1. Shandong Academy of Pharmaceutical Science/Shandong Provincial Key Laboratory for Chemical Drug, Jinan 250101, China; 2. Shandong Freda Pharmaceutical Group Company/Shandong Provincial Key Laboratory of Mucosal and Transdermal Drug Delivery Technology, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the similarity of in vitro dissolution of self-made and original preparation of Ramelteon tablet. METHODS: The paddle method was adopted with rotational speed of 50 r/min, using water, pH1.2 hydrochloric acid solution, pH4.0 acetate buffer solution and pH6.8 phosphate buffer solution as dissolution media, HPLC was used to determine the cumulative dissolution of main components of self-made and original preparation of Ramelteon tablet at different time points, dissolution profile was drew, then f_2 was used to evaluate its similarity. RESULTS: In the 4 dissolution media, the f_2 of self-made and original preparation of Ramelteon tablet was 62.8, 80.0, 77.7, 76.2, respectively, which indicated that the dissolution profiles showed similarity. CONCLUSIONS: The established HPLC is suitable for the dissolution determination of Ramelteon tablet; the dissolution profiles of the self-made and original preparations are similar, it preliminary indicates the prescription and technological rationality of self-made preparation.

KEYWORDS Ramelteon tablet; Self-made preparation; original preparation; HPLC; f_2 ; Dissolution curve; Evaluation

雷美替胺(Ramelteon)是一种口服催眠药,由日本武田公司首研成功,于 2005 年 7 月通过美国食品与药品管理局(FDA)批准上市,片剂批准的规格为 8 mg,商品名 Rozerem[®][1]。该药是第一个临床应用于治疗失眠的褪黑素受体激动药,对褪黑素 MT₁和 MT₂受体具有高度亲和性,对 MT₃受体的亲和力很弱[2],主要用于治疗难以入睡型失眠症,对慢性失眠和短期失眠也有确切疗效[3-4]。

目前,国内尚未有雷美替胺片仿制制剂获批上市,也未见雷美替胺片溶出度测定或溶出曲线考察的相关文献报道。本研究建立了雷美替胺片溶出度测定的高效液相色谱法(HPLC),并考察了其自研制剂(受试制剂)与原研制剂(参比制剂)在 4 种溶出介质中的溶出曲线;同时,采用相似因子(f_2)法评价了二者溶出曲线的相似性,旨在为其自研制剂与原研制剂的质量一致性评价提供依据。

1 材料

* 工程师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话 0531-88562280。E-mail: watasumi@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 新药研发。电话: 0531-88562280。E-mail: lw6624@126.com

1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪, 包含二极管阵列检测器(DAD)、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱等(美国 Agilent 公司); ZRS-8G 型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司); BT125D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); pHSJ-3F 型酸度计(上海雷磁仪器厂); KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 200 W, 频率: 40 kHz)。

1.2 药品与试剂

雷美替胺对照品(上海医药工业研究院, 批号: 131224, 纯度: 99.57%); 雷美替胺片(山东省药学科学院自制批号: 20130901, 规格: 8 mg); 雷美替胺片(原研制剂, 美国武田制药公司, 批号: C18882, 规格: 8 mg); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent-ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH5.0)-甲醇(30:70, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 288 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 50 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取样品细粉适量(约含雷美替胺8 mg),精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm混合纤维素酯滤膜滤过,精密量取续滤液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 取对照品约8 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取上述贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品处方比例称取除雷美替胺外的各辅料制备混合粉末,取约0.16 g,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm混合纤维素酯滤膜滤过,精密量取续滤液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 溶出介质 水:纯化水;pH1.2盐酸溶液:精密量取盐酸7.65 ml,加水稀释至1 000 ml;pH4.0乙酸盐缓冲液:称取乙酸钠1.22 g,冰乙酸2.46 g,加水950 ml搅拌使乙酸钠溶解后再加水稀释至1 000 ml;pH6.8磷酸盐缓冲液:取磷酸二氢钾6.8 g、氢氧化钠0.896 g,加水适量搅拌使溶解后再加水稀释至1 000 ml。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液(自研制剂)和阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,该色谱条件下,供试品溶液中主峰保留时间与对照品溶液中主峰保留时间一致,而阴性对照在该保留时间处无干扰,说明本方法的专属性良好。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液1、2、4、6、8、10、15 ml,置于100 ml量瓶中,分别用“2.2.4”项下4种溶出介质稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得雷美替胺在水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液、pH6.8磷酸盐缓冲液中的回归方程分别为 $y=30.178x+0.6285$ ($r=0.9999$)、 $y=30.176x+0.5698$ ($r=0.9999$)、 $y=30.179x+0.7698$ ($r=0.9999$)、 $y=30.181x+0.8856$ ($r=0.9999$)。结果表明,4种溶出介质中雷美替胺检测质量浓度线性范围均为0.7963~11.94 μg/ml。

2.5 定量限考察

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别稀释100倍、250倍和500倍后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,当信噪比为10:1时,测得雷美替胺的定量限为0.80 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,雷美替胺峰面积的RSD=1.14% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.10”项下自研制剂样品在4种溶出介质中30 min时的溶出液为供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,4种溶出介质制备的供试品溶液中雷美替胺峰面积的RSD分别为1.17%、1.38%、1.26%、1.54% ($n=6$),表明4种溶出介质制备

的供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

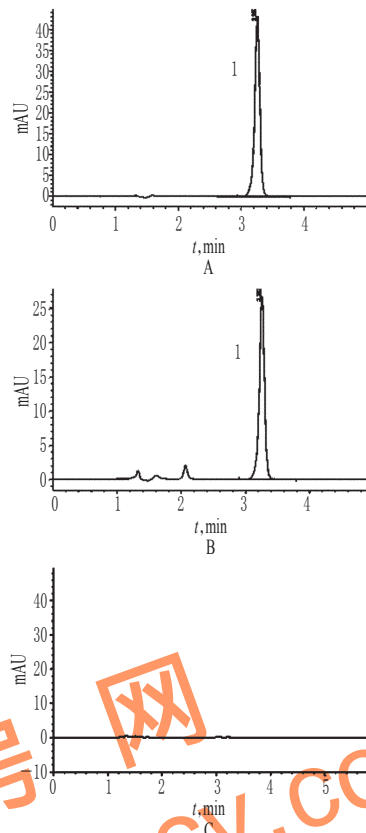


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.雷美替胺

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance solution; B.test sample solution; C.negative control solution; 1.ramelteon

2.8 重复性试验

精密称取自研制剂样品1.3 g,共6份,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,雷美替胺的平均含量为6.04 mg/g, RSD=1.14% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取对照品约12、16、20 mg,各3份,精密称定,分别置于100 ml量瓶中,并按样品处方比例分别加入各辅料的混合粉末适量,再加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,制成含雷美替胺低、中、高3种质量浓度的溶液,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 ml,共4份,置于不同的25 ml量瓶中,分别用“2.2.4”项下4种溶出介质稀释至刻度,摇匀,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算雷美替胺的回收率,结果见表1。

2.10 溶出度测定及溶出曲线绘制

参考FDA溶出度方法数据库中雷美替胺片的溶出度测定条件^[9]及2015年版《中国药典》(四部)“0931溶出度与释放度测定法”的要求^[6],并参考《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》附录中的规定,本试验采用浆法,分别选用水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液、pH6.8磷酸盐缓冲液4种溶出介质进行溶出试验,溶出介质体积为900 ml,转速为50 r/min,温度为37 ℃,依法操作,分别于5、10、15、20、30、45、60 min时取溶出液5 ml(取液后及时补充溶出介质5 ml),用0.45 μm混合纤维素酯滤膜滤过,取续滤液适量,按“2.1”项下色谱条

表1 回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery test(n=9)

溶出介质	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
水	12.28	12.19	99.27	99.55	0.35
	12.11	12.06	99.59		
	12.06	12.09	100.25		
	16.15	16.04	99.32		
	16.03	15.89	99.13		
	16.08	16.04	99.75		
	20.09	20.01	99.60		
	20.10	20.03	99.65		
	20.16	20.04	99.40		
	pH1.2盐酸溶液	12.05	12.02		
12.07		11.99	99.31		
12.59		12.69	100.79		
16.57		16.33	98.53		
16.59		16.52	99.58		
16.72		16.59	99.22		
20.03		19.79	98.80		
19.96		19.63	98.35		
20.09		19.77	98.41		
pH4.0乙酸盐缓冲液		12.13	12.09	99.67	99.30
	12.25	12.23	99.84		
	12.37	12.31	99.51		
	16.06	16.01	99.69		
	16.39	16.24	99.08		
	15.98	15.91	99.56		
	20.17	20.07	99.50		
	20.03	19.69	98.30		
	20.07	19.78	98.56		
	pH6.8磷酸盐缓冲液	12.58	12.51	99.44	
11.97		11.95	99.83		
12.16		12.06	99.18		
16.14		16.15	100.06		
16.25		16.17	99.51		
16.03		15.94	99.44		
20.03		19.94	99.55		
20.08		19.89	99.05		
20.19		20.12	99.65		

件进样测定,记录峰面积并按外标法计算雷美替胺在各时间点的累积溶出度,并绘制溶出曲线。雷美替胺片自研制剂与原研制剂(各取12片进行试验)在各溶出介质中的平均累积溶出度测定结果见表2,溶出曲线见图2。

2.11 f_2 法评价溶出曲线的相似性

f_2 法是美国FDA推荐的用于评价两条溶出曲线是否具有相似性的方法,其通过将自研制剂(受试制剂)与原研制剂(参比制剂)两组累积溶出度数据代入公式进行计算,得到 f_2 。若 f_2 在50~100之间,即可认为两条溶出曲线相似;若 $f_2 < 50$,即可认为两条溶出曲线不相似^[7]。 f_2 计算公式如下:

$$f_2 = 50 \lg \sqrt{\frac{100}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2}{n}}}$$

式中, R_i 和 T_i 分别代表参比和受试制剂第*t*时间点的平均累积溶出度; n 代表选取计算时间点数。本试验选取雷美替胺片自研制剂与原研制剂5~20 min时的平均累积溶出度进行 f_2 计算和相似性评价,结果见表3。

3 讨论

表2 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的平均累积溶出度测定结果(n=12, %)

Tab 2 Determination results of average cumulative dissolution of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium (n=12, %)

溶出介质	样品	平均累积溶出度						
		取样时间, min						
水	原研制剂	12.3	47.1	74.0	88.1	94.1	97.1	97.0
	自研制剂	19.7	49.1	80.5	92.3	97.2	98.4	99.1
pH1.2盐酸溶液	原研制剂	16.3	52.1	79.3	87.4	92.7	94.1	94.4
	自研制剂	18.6	54.7	80.8	90.1	93.7	94.9	96.7
pH4.0乙酸盐缓冲液	原研制剂	16.0	53.1	82.2	90.8	95.4	95.6	97.6
	自研制剂	17.3	57.5	80.5	92.6	97.4	98.3	99.1
pH6.8磷酸盐缓冲液	原研制剂	20.4	68.1	89.1	93.8	95.2	95.7	98.1
	自研制剂	24.9	65.5	89.4	92.7	97.1	96.8	99.1

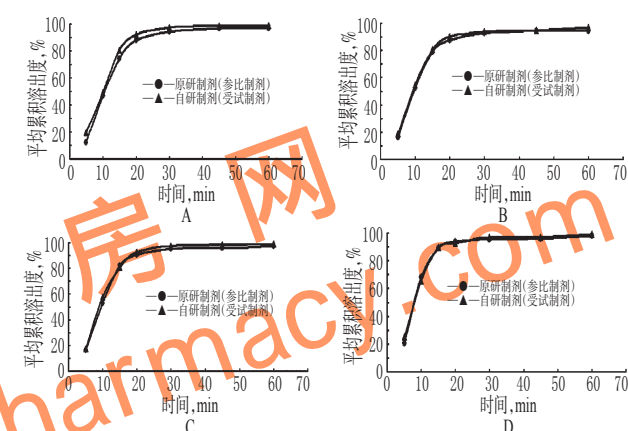


图2 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的溶出曲线(n=12)

A.水; B.pH1.2 盐酸溶液; C.pH4.0 乙酸盐缓冲液; D.pH6.8 磷酸盐缓冲液

Fig 2 The cumulative dissolution profiles of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium (n=12)

A. water; B. pH1.2 hydrochloric acid solution; C. pH4.0 acetate buffer solution; D. pH6.8 phosphate buffered solution

表3 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的溶出曲线相似性评价结果

Tab 3 Results of similarity evaluation of dissolution profiles of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium

溶出介质	f_2	相似性评价
水	62.8(n=4)	相似
pH1.2 盐酸溶液	80.0(n=4)	相似
pH4.0 乙酸盐缓冲液	77.7(n=4)	相似
pH6.8 磷酸盐缓冲液	76.2(n=3)	相似

3.1 流动相的选择

雷美替胺解离常数(pKa)为-0.84^[8],流动相pH调节至弱酸性范围内均可得到较理想的色谱峰形。本试验以pH5.0的磷酸二氢钠缓冲液与甲醇体系为流动相,得到的色谱峰理论板数可达8 000以上,对称因子在0.90~1.10之间,可对色谱峰进行准确积分。另外,因溶出曲线考察测定样本数量较多,为了达到大量样品快速分析的目的,该流动相中有机相占有较

高的比例(70%),可加快主峰的洗脱,缩短运行时间。

3.2 测定波长的选择

采用HPLC法进行试验前,应首先对其测定波长进行确定。取“2.2”项下对照品贮备液、供试品溶液和阴性对照溶液制备过程中的过滤液,在200~400 nm波长范围内扫描。结果显示,对照品和供试品中雷美替胺的最大吸收波长均为288 nm,阴性对照在288 nm波长处无干扰,因此本试验选择288 nm为溶出度测定波长。

3.3 过滤器吸附量的研究

进行溶出试验时,过滤装置对主成分可能有一定的吸附作用,因此有必要研究在取续滤液进行测定前需要弃除多少体积的初滤液,以保证续滤液中主成分的质量浓度与过滤前主成分的质量浓度一致。取“2.2.1”项下供试品溶液适量,用过滤器(内含直径为25 mm、孔径为0.45 μm混合纤维素酯滤膜)滤过,分别弃除0、1、2、3、4 ml的初滤液,取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积分别为357.03、356.91、356.50、355.32、353.40。可见峰面积无明显变化,说明过滤器对雷美替胺几乎无吸附作用,取溶出液经滤过后弃除适量初滤液即可。

3.4 自研制剂与原研制剂溶出曲线相似性评价的意义

由雷美替胺片原研制剂在4种溶出介质中的溶出曲线考察结果可知,20 min时其在4种介质中的平均累积溶出度均>85%,在30 min后其累积溶出度到达平台期;且其在水、pH1.2盐酸溶液及pH4.0乙酸盐缓冲液中各时间点的平均累积溶出度无明显差别,在pH6.8磷酸盐缓冲液中15 min之前的平均累积溶出度略高于其他3种介质(这可能与雷美替胺的pKa有关)。研究人员在进行雷美替胺片自研制剂的处方工艺研究时应以原研制剂为目标,确保自研制剂至少在上述4种介质中均与原研制剂保持溶出一致性,从而为实现二者的生物等效奠定基础。本试验溶出曲线相似性评价结果显示,雷美替胺片自研制剂与原研制剂在4种不同溶出介质中的溶出曲线具有相似性,可初步判断该自研制剂处方和工艺具有合理性。

3.5 f_2 计算选取时间点原则的探讨

进行 f_2 计算时,选取计算的时间点有一定原则,所选时间点间隔可不相等,但两对比制剂所取的时间点必须一致,计算时间点为3~5个之间,且需选择平均累积溶出度>85%的时间点应不多于1个^[9]。根据雷美替胺片在4种溶出介质中的不同累积溶出度数据,笔者最终选取的计算时间点分别为:水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液介质中选取了5、10、15、20 min 4个时间点,pH6.8磷酸盐缓冲液介质中选取了5、10、15 min 3个时间点。

3.6 仿制药的质量一致性评价及目前的要求

目前,国家食品药品监督管理总局开始要求对2007年前

获得生产批件的口服固体药物仿制制剂进行质量和疗效一致性评价^[10],要求通过采用全面的体外溶出度试验来对其内在质量进行评估,主要目的是保证其对于不同患者均能具有较高的生物利用度。另外,国内申报仿制药时均要求对自研制剂与原研制剂进行多介质的溶出曲线对比,以保证自研制剂在体外溶出行为上与原研制剂的一致性,从而初步反映自研制剂的处方和工艺的合理性,由此给仿制药初期的工艺开发提供一种快速、便捷的指导。

参考文献

- [1] 叶敏,吕林,徐啸晨.治疗失眠症新药雷美替胺[J].中国新药杂志,2006,15(15):1309.
- [2] Nancy N, Nguyen SS, Jessica C. Ramelteon: a novel melatonin receptor agonist for the treatment of insomnia[J]. *Formulary*, 2005, 40(5):358.
- [3] Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, et al. Melatonin and sleep in aging population [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(2):911.
- [4] FDA. Rozerem™(ramelteon tablets) Label[EB/OL].(2010-09-11)[2014-05-11].http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021782s011lbl.pdf
- [5] FDA. Dissolution methods database[EB/OL].(2014-11-13)[2015-09-26].http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm.
- [6] 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.
- [7] 程怡,裘建设,胡瑞标,等. f_2 因子法评价头孢克洛干混悬剂溶出曲线的相似性[J].中国新药杂志,2012,21(20):2437.
- [8] Reddy IU, Rao PN, Reddy VR, et al. Stability-indicating UPLC determination of Ramelteon and their degradation products in active pharmaceutical ingredients[J]. *J Liq Chromatog RT*, 2012, 35(5):688.
- [9] 谢沐风,操洪欣.溶出度测定中的若干问题[J].中国医药工业杂志,2006,37(12):859.
- [10] 国家食品药品监督管理总局.国家食品药品监督管理总局关于征求《关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见(征求意见稿)》意见的公告:2015年第231号[EB/OL].(2015-11-18).[2016-03-26].<http://www.sda.gov.cn/W501/CL0778/135400.html>.

(收稿日期:2015-10-31 修回日期:2016-09-09)

(编辑:周 箐)