

利用平行人工膜比较硝苯地平缓释片的生物等效性

宋菁景¹, 张丹丹², 崔景霞¹, 陈德俊², 李华¹, 刘伟^{1*} (1. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250000; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250000)

摘要 目的: 采用平行人工膜对硝苯地平缓释片渗透速率进行研究, 比较仿制药一致性评价前后样品的渗透速率, 预测其人体生物等效性。方法: 利用MacroFluxTM药物渗透性测定仪, 测定通过一致性评价的制剂和未通过一致性评价的制剂的渗透速率。结果: 通过一致性评价的制剂渗透速率为84.3%~113.2%, 累积渗透量为85.9%~110.9%; 未通过一致性评价的制剂渗透速率为73.7%~94.1%, 累积渗透量为71.8%~92.6%。结论: 初步预测通过一致性评价的制剂与参比制剂生物等效, 仿制药一致性评价工作提升了产品质量。

关键词: 平行人工膜; 硝苯地平缓释片; 渗透速率; 生物等效性; 仿制药一致性评价

中图分类号: R969.1; R972 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)02-0192-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.02.010

Bioequivalence of Comparative Formulations Based on Parallel Artificial Membrane Permeability Assay of Nifedipine Sustained-release Tablets

Song Jingjing¹, Zhang Dandan², Cui Jingxia¹, Chen Dejun², Li Hua¹, Liu Wei^{1*} (1. Jinan Center for Food and Drug Control, Jinan 250000, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250000, China)

Abstract Objective: To study the permeation rate of nifedipine sustained-release tablets by using parallel artificial membranes, to compare the permeation rates of samples before and after the consistency evaluation of generic drugs, and to predict their bioequivalence in humans. **Methods:** Using the MacroFluxTM drug permeability tester, the permeation rates of the preparations that passed the consistency evaluation and the preparations that did not pass the consistency evaluation were measured. **Results:** The permeation rate of the preparations that passed the consistency evaluation was 84.3%-113.2%, the cumulative permeation was 85.9%-110.9%, the permeation rate of the preparations that did not pass the consistency evaluation was 73.7%-94.1%, and the cumulative permeation was 71.8%-92.6%. **Conclusion:** It is preliminarily predicted that the preparations that pass the consistency evaluation are bioequivalent to the reference preparations, and the consistency evaluation of generic drugs improves the product quality.

Keywords: PAMPA; nifedipine sustained-release tablet; permeation rates; bioequivalence; consistency evaluation of generic drugs

根据国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见要求,应采用体内生物等效性试验的方法进行一致性评价,实现仿制药与原研药质量和疗效一致^[1]。生物药剂学分类系统(Biological Pharmacy Classification System, BCS)理论认为药物的溶出度、溶解性和肠道膜渗透性是衡量生物利用度的三个重要指标^[2]。口服固体剂在人体肠道内的吸收与制剂的溶出行为与药物的渗透性有关^[3]。在实际测定中,难免会因为增加药物表观溶解度而忽视了药物渗透性的改变^[4]。平行人工膜渗透性模型(Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA)是近几年在体外渗透应用不断成熟的评价技术,可以高效低耗测定通过被动渗透机制吸收的药物渗透性。付晖等^[5]采用 μ Flux™型药物渗透性测定仪和Macro Flux™光纤药物溶出度及渗透性测定仪,考察了双氯芬酸钠生物药剂学分类及不同产地的双氯芬酸钠肠溶片的体外溶出和体外渗透行为;王琳等^[5-6]考察了孟鲁司特钠咀嚼片、左炔诺孕酮的渗透速率;牛剑钊等^[7]考察了螺内酯的渗透速率,为仿制药一致性评价中不同制剂之间的评估提供了参考。

本文研究的硝苯地平缓释片为2021年山东省药品质量风险监测品种。硝苯地平属于二氢吡啶类钙离子阻滞剂,能松弛血管平滑肌,扩张冠脉和周围小动脉,降低外周阻力,是目前公认的安全有效的一线降压药物之一。硝苯地平半衰期较短,仅为1.7~3.4小时,为克服这一缺点,缓控释制剂逐渐成为主流产品,开展仿制药一致性评价工作前,常采用膜包衣、骨架、渗透泵等技术^[8];开展仿制药一致性评价工作后,采用控制原辅料粒度的工艺。因硝苯地平低溶解、高渗透及光不稳定性等特征,使在生产过程中不确定因素过多^[9-10],国产药品中有29个批准文号,仅6个通过仿制药一致性评价^[11]。本文选择同厂家通过仿制药一致性评价前(以下简称“过评前”)的样品和通过仿制药一致性评价后(以下简称“过评后”)的样品,通过研

究其渗透速率,结合体外溶出曲线,初步比较制剂的生物等效性,以期仿制药一致性评价提供有效的参考。

1 材料

Macro Flux™型光纤药物溶出度与渗透速率测试系统(美国Pion Inc公司);仿生膜(Macro Flux Vial 8 Pack,美国Pion Inc公司,批号520926);智能溶出仪(860DL,美国Logan公司);酸度计(PB-10,德国Sartorius公司);电子分析天平(MS205DU,瑞士Mettler Toledo公司);Milli-Q实验室超纯水系统(Merck Millipore公司)。

硝苯地平缓释片(Ⅱ)参比制剂(20 mg,批号JPS2884,Adalat-L20),受试制剂(过评前样品,20 mg,批号2101430,企业提供;过评后样品,20 mg,批号2105459,企业提供)。硝苯地平对照品(99.9%,批号100338-201806,中国食品药品检定研究院);药物溶出模拟液固体粉末(批号FFF-1219-A,北京牛牛基因技术有限公司);ASB缓冲液(批号520729,美国Pion Inc公司);胃肠道模拟脂质体(批号520852,美国Pion Inc公司);二甲基亚砜为色谱纯,氢氧化钠、氯化钠、乙酸为分析纯,均由国药集团提供;水为超纯水,实验室自制。

2 方法

2.1 Macro Flux™型药物溶出度与渗透速率测试系统原理

该系统可以模拟人体的胃肠道环境,通过原位光纤DAD检测器实时检测,实现药物溶出和渗透吸收的同时监测。

系统由溶出杯和受体室两部分组成,中间隔以仿生膜(如图1)。口服药物递送时,药物置于溶出杯中,溶出杯作为供体室代表胃肠道,模拟药物的溶出过程;溶解后的药物通过涂有脂质体的胃肠道仿生人工膜,进入受体室,模拟药物的吸收过程。

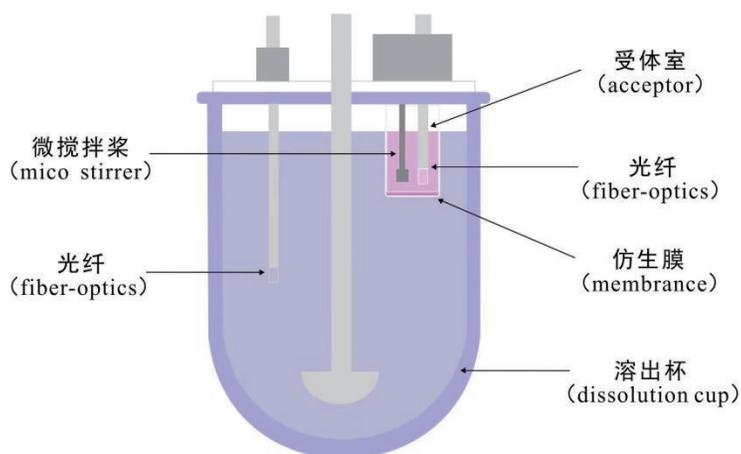


图1 Macro Flux™ 药物溶出度与渗透速率测试系统示意图

2.2 硝苯地平标准曲线的制备

取硝苯地平对照品20.00 mg, 精密称定, 置10 mL量瓶中, 加二甲基亚砷溶解并定容至刻度。精密量取对照品溶液适量, 分别用饱腹小肠模拟液 (pH 5.0) 和ASB缓冲液 (pH 7.4) 稀释制成每1 mL中约含硝苯地平1~30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 作为标准曲线溶液, 按紫外-可见分光光度法 (《中国药典》2020年版四部通则0401), 在200~400 nm内分别测定, 数据分析采用AuPRO™ 型软件 (美国Pion Inc公司), 二阶导数法校正后进行线性回归。

2.3 溶出行为与渗透速率考察

采用图1所示装置, 避光操作。取本品, 按溶出度与释放度测定法 (《中国药典》2020年版四部通则0931第二法), 在溶出杯中以饱腹小肠模拟液 (pH 5.0) 1000 mL 为溶出介质, 转速为75 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 依法操作; 精密量取 ASB 缓冲液 (pH 7.4) 12 mL, 置于受体室中, 两室间以面积为3.88 cm^2 的仿生膜 (事先用50 μL 胃肠道模拟脂质体溶液浸润) 相隔, 受体室微搅拌桨转速为450 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$; 采集时间为300 min, 采样间隔60 s。按紫外-可见分光光度法 (《中国药典》2020年版四部通则0401), 采用光纤探头分别测定溶出杯和受体室中200~400 nm内的吸光度, 按公式(1)计算药物的人工膜渗透速率J (Flux), 按公式(2)计算最大渗透量Amount:

$$J = \frac{dc}{dt} \times \frac{V}{A} \quad \text{公式(1)}$$

其中, J (Flux): 渗透速率, 即药物在单位时间通过单位膜面积的量 ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$);

$\frac{dc}{dt}$: 单位时间内受体室中药物浓度的变化速率 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$); V: 受体室中缓冲液体积 (mL); A: 平行人工膜面积 (cm^2)。

$$\text{Amount} = CV \quad \text{公式(2)}$$

其中, Amount: 最大渗透量, 药物在一定时间内透过受体室的总量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$); C: 反应终点受体室中的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); V: 受体室体积 (mL), 本次试验受体室体积为12 mL。

3 结果

3.1 溶出度与渗透速率测定结果

硝苯地平标准曲线线性相关系数均在0.998以上, 符合测试需要。硝苯地平缓释片在饱腹小肠模拟液 (pH 5.0) 中的溶出度与渗透速率测定结果见图2。随着检测时间的增加, 药物在溶出杯中逐渐溶出, 并通过模拟的胃肠道细胞膜由溶出杯转移到受体室中。通过检测受体室中的药物浓度, 根据公式(1)可计算出药物在被动转运中的渗透速率。本试验中, 200 min时硝苯地平溶出量达90%以上, 渗透速率呈线性相关。因此选取200 min后的数据, 在254~264 nm下进行二阶导数校正, 以排除辅料的干扰。根据受体室中测得的药物浓度, 以时间对浓度进行线性回归, 参比制剂和受试制剂的线性关系方程见表1, 线性相关系数均大于0.99, 可用于药物平行人工膜渗透速率的测定。将表1线性回归方程中的斜率带入公式(1)中, 可计算出药物的渗透速率 (见表2)。

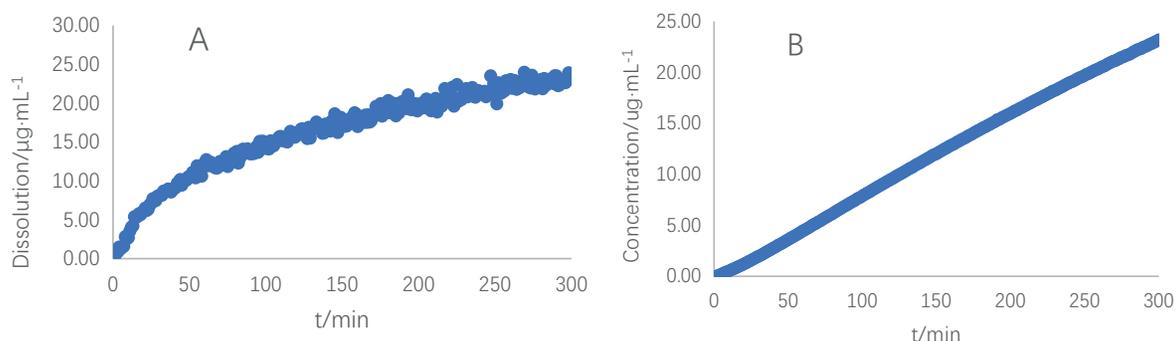


图2 溶出量(A)和渗透速率(B)典型图例

表1 参比制剂和供试制剂测定的线性方程

样品信息	线性方程	R ²
参比 JPS2884 (n=3)	$y=0.0698x+2.0430$	0.9965
	$y=0.0780x+3.6921$	0.9990
	$y=0.0718x+1.7239$	0.9995
供试 2105459 (n=3)	$y=0.0718x+1.7603$	0.9990
	$y=0.0788x+1.7364$	0.9950
	$y=0.0663x+2.0684$	0.9996
供试 2101430 (n=3)	$y=0.0632x+1.7085$	0.9965
	$y=0.0647x+1.7789$	0.9908
	$y=0.0564x+1.4813$	0.9932

3.2 参比制剂与供试制剂渗透速率及最大渗透量计算

饱腹小肠模拟液 (pH 5.0) 中, 硝苯地平缓释片参比制剂与供试制剂的渗透速率见表2。采集时

间为300 min时, 在12 mL受体室中硝苯地平缓释片参比制剂与供试制剂的累积渗透量即最大渗透量计算见表3。

表2 参比制剂与供试制剂渗透速率计算

样品信息	dc/dt	渗透膜面积/cm ²	受体室缓冲液体积/mL	渗透速率 J (Flux) / (μg·min ⁻¹ ·cm ⁻²)
参比 JPS2884 (n=3)	0.0698	3.88	12	0.2159
	0.0780	3.88	12	0.2412
	0.0718	3.88	12	0.2221

续表 2

样品信息	dc/dt	渗透膜面积 /cm ²	受体室缓冲液体积 /mL	渗透速率 J (Flux) / ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)
供试 2105459 (n=3)	0.0718	3.88	12	0.2437
	0.0788	3.88	12	0.2221
	0.0663	3.88	12	0.2051
供试 2101430 (n=3)	0.0632	3.88	12	0.1955
	0.0647	3.88	12	0.2001
	0.0564	3.88	12	0.1744

表 3 参比制剂与供试制剂最大渗透量计算

样品信息	反应终点的药物浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	受体室缓冲液体积 V/mL	最大渗透量 Amount/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
参比 JPS2884 (n=3)	22.9593	12	275.5110
	26.9747	12	323.6968
	23.2102	12	278.5222
供试 2105459 (n=3)	24.8347	12	298.0164
	25.2048	12	302.4576
	21.9061	12	262.8731
供试 2101430 (n=3)	20.5693	12	246.8322
	21.1905	12	254.2864
	18.3296	12	219.9558

3.3 参比制剂与供试制剂渗透速率比较

运用双向单侧T检验方法, 通过参比制剂和供试制剂的渗透速率J (Flux) 和最大渗透量 (Amount) 90%置信区间进行比较, 计算供试制剂

和参比制剂比值的90%置信区间, 结果见表4。只有90%置信区间的上下限都位于80%~125%之间时, 才可认为供试制剂与参比制剂生物等效。

表 4 参比制剂与供试制剂渗透速率比较

样品信息	J (Flux) 90% 置信区间		Amount 90% 置信区间		初步结论
	下限	上限	下限	上限	
供试 2105459	84.34	113.20	85.87	110.86	生物等效
供试 2101430	73.74	94.11	71.75	92.56	存在风险

比较供试制剂与参比制剂的渗透速率（见图3），截取200~300 min数据，以及在300 min时受体室中测得的有效吸收的硝苯地平药物总含量。结果表明，过评后的供试制剂与参比制剂渗透曲线基本一致，渗透速率90%置信区间为84.3%~113.2%、最大渗透量90%置信区间为

85.9%~110.9%，认为过评后的制剂与参比制剂生物等效。过评前的供试制剂与参比制剂渗透曲线存在差异，渗透速率90%置信区间为73.7%~94.1%、最大渗透量90%置信区间为71.8%~92.6%，认为过评前的制剂与参比制剂存在生物等效风险。

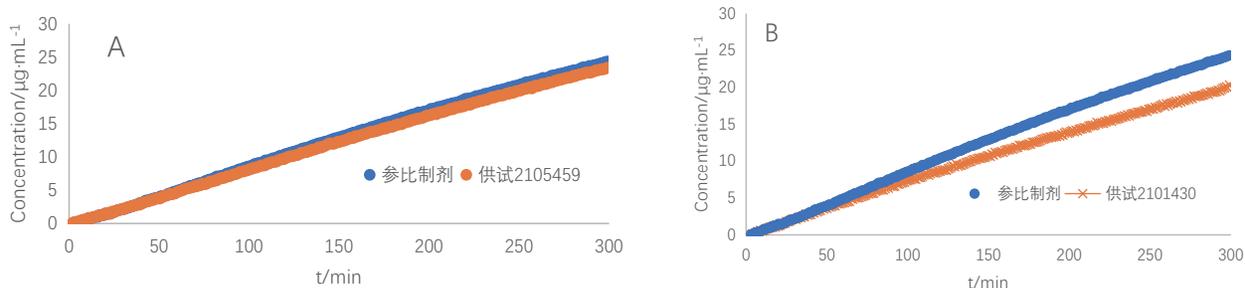


图3 通过仿制药一致性评价前(B)后(A)制剂渗透曲线比较

4 讨论

本文在研究渗透性以前，征集了多厂家的硝苯地平缓释片（Ⅱ），包括通过仿制药一致性评价的样品和非通过仿制药一致性评价的样品，经检查释放度，通过仿制药一致性评价的样品与参比制剂溶出曲线相似；非通过仿制药一致性评价的样品虽然都在限度内，但不同厂家的产品差异较大，与参比制剂差异也较大，溶出曲线不相似。本文选用的过评前的供试样品，溶出曲线优于其他厂家样品，但渗透曲线与参比制剂依然有差异。

经查阅文献并结合企业调研了解到，在开展仿制药一致性评价工作前，我国硝苯地平缓释制剂多为骨架型缓释片，释药速度与外界环境变量有较大关系，很难做到与原研制剂释放行为完全一致。开展仿制药一致性评价工作后，参考原研制剂处方工艺，控制原料粒径，调整原辅料比例，使工艺控制更加严格，制剂处方更加合理^[9-10,12]。

综上，本试验通过建立体外溶出度-渗透速率测试结果的模型，初步比较了通过仿制药一致性评价前后的样品体外溶出与体内吸收相关性，认为通过仿制药一致性评价工作，供试制剂溶出度与渗透速率均接近参比制剂。该模型可以更高效地筛选处方，有针对性地考察制剂溶出行为和渗透速率对药物生物利用度的影响，为仿制药一致性评价工作提

供技术参考。

参考文献：

- [1] 国务院办公厅. 关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见（国办发〔2016〕8号）[EB/OL]. (2016-03-05) [2022-01-27]. <https://www.cde.org.cn/yzxpj/news/viewInfoCommon/3a6783492677782323998ac4643321bc>.
- [2] Gordon L, Amidon, Hans Lennernäs, Vinod P, et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification: The Correlation of invitro Drug Product Dissolution and in vivo Bioavailability[J]. *Crison Pharmaceutical Research*, 1995, 12: 413-420.
- [3] 付晖, 王琳, 胡琴, 等. 双氯芬酸钠肠溶片的溶出与渗透行为研究[J]. *中国药理学杂志*, 2018, 16: 1778-1784.
- [4] 章溢, 崔天, 李姝璇, 等. 通过增加溶解度提高BCS II类药物口服吸收: 常常被忽略的药物渗透性[J]. *药理学学报*, 2019, 54(1): 1-7.
- [5] 王琳, 吴斌, 王铁松, 等. 基于孟鲁司特钠咀嚼片渗透速率分析初步预测制剂的生物等效性[J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(18): 1511-1514.
- [6] 王琳, 吴斌, 王铁松, 等. 基于溶解性、渗透性分析技术的左炔诺孕酮生物药剂学分类及制剂的渗透速率研究[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(1): 104-110.
- [7] 牛剑钊, 张广超, 刘倩, 等. 采用平行人工膜测定螺

- 内酯片体外渗透速率的研究[J]. 中国药事, 2021, 35 (4): 415-421.
- [8] 徐华枫. 硝苯地平缓控释片释放度测定方法的探讨[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [9] 赵先亮, 刘茜英, 许俊博, 等. 硝苯地平缓释片(II)的制备工艺及其对释放度的影响[J]. 中国医药导报, 2020, 17(36): 41-44.
- [10] 谢升谷, 张丽娟, 陈悦, 等. 不同辅料对硝苯地平缓释片光稳定性影响研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1557-1559.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品目录集 [EB/OL]. [2022-02-21]. <https://www.cde.org.cn/hymlj/listpage/9cd8db3b7530c6fa0c86485e563f93c7>.
- [12] 刘洁, 方晶, 庙宇阳, 等. 硝苯地平不同粒度对其缓释片剂质量的影响[J]. 中国药师, 2018, 21(6): 1108-1111.

(收稿日期 2022年3月1日 编辑 邹宇玲)