

腺苷钴胺胶囊仿制药与原研药的溶出度一致性评价

黄美容, 王欣, 曹阳, 黄顺旺, 曹明成(合肥创新医药技术有限公司, 合肥 230088)

摘要: 目的 建立腺苷钴胺胶囊溶出度检查方法, 评价其与原研药体外溶出的一致性。方法 采用 HPLC 测定腺苷钴胺胶囊溶出度, 并进行方法学验证。分别以水、pH 1.2 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为溶出介质, 溶出介质体积为 500 mL, 转篮法, 转速 $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 分别测定腺苷钴胺胶囊仿制药与原研药的溶出曲线, 比较其体外溶出的一致性。结果 腺苷钴胺质量浓度和峰面积在一定范围内呈良好的线性关系($r \geq 0.999$), 进样精密度、溶液稳定性、重复性试验结果均符合要求(RSD 均 $< 2\%$); 4 种介质中的平均回收率分别为 98.6%, 99.6%, 99.3%, 101.2%, RSD 分别为 1.2%, 0.9%, 1.5%, 1.8%($n=9$)。在 4 种溶出介质中, 3 批腺苷钴胺胶囊与 2 批原研药在 15 min 内, 累积溶出度均能 $> 85\%$, 均与原研药溶出曲线一致。结论 该方法可用于腺苷钴胺胶囊溶出度的检查, 3 批腺苷钴胺胶囊仿制药与 2 批原研药的体外溶出均相似, 可作为体外一致性评价的方法。

关键词: 腺苷钴胺胶囊; 原研药; 仿制药; 溶出曲线; 一致性评价

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)02-0187-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.02.008

引用本文: 黄美容, 王欣, 曹阳, 等. 腺苷钴胺胶囊仿制药与原研药的溶出度一致性评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 187-191.

Consistency Evaluation of the Dissolution of Generic and Original Preparations of Cobamamide Capsules

HUANG Meirong, WANG Xin, CAO Yang, HUANG Shunwang, CAO Mingcheng(Hefei Innovative Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hefei 230088, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the dissolution test method of cobamamide capsules and evaluate its consistency with the original preparation *in vitro*. **METHODS** The dissolution of cobamamide capsules was determined by HPLC. The methodology was verified. Water, hydrochloric acid solution(pH 1.2), acetate buffer(pH 4.5) and phosphate buffer(pH 6.8) were used as dissolution medium, the volume of dissolution medium was 500 mL, basket method, rotating speed was $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$. The dissolution curves of cobamamide capsules generic and the original drug were measured, respectively. And the *in vitro* dissolution consistency was compared. **RESULTS** The linear relationship between mass concentration and peak area of cobamamide was good within a range($r \geq 0.999$). The injection precision, solution stability and repeatability test results meet the requirements(RSD was all $< 2\%$). The average recoveries of cobamamide capsules were 98.6%, 99.6%, 99.3% and 101.2% in four kinds of medium, with RSD of 1.2%, 0.9%, 1.5% and 1.8%($n=9$), respectively. In four kinds of medium, within 15 min the cumulative dissolution rate was $> 85\%$, which was consistent with the dissolution curve of the original preparation. **CONCLUSION** This method can be used to test the dissolution of cobamamide capsules. The dissolution *in vitro* of three batches of cobamamide capsules are similar to that of the original preparation, which can be used as a method to evaluate the consistency *in vitro*.

KEYWORDS: cobamamide capsule; original preparation; generic preparation; dissolution curve; consistency evaluation

腺苷钴胺胶囊是日本卫材株式会社研制的维生素 B12 同系物, 该药于 1967 年 1 月在日本批准上市, 其适应证主要有以下方面: ①维生素 B12 缺乏症的预防和治疗; ②当人体对维生素 B12 的需求增加, 而从食物中摄入不足时的补充(消耗性疾病、甲状腺功能亢进症、孕妇、哺乳期妇女等); ③巨幼红细胞性贫血; ④恶性贫血伴随的神经病变; ⑤吸收不良综合征(口炎性腹泻等)^[1-5]。目前腺苷钴胺胶囊尚未在国内上市, 合肥创新医药技术有限公司研制的腺苷钴胺胶囊属于化学药品

仿制药 3 类, 即仿制境外上市、境内未上市的药品。本品为小规格药物(规格 0.5 mg), 中国药典 2015 年版第二部收录的腺苷钴胺片^[6]未有制定溶出度检查, 亦未见腺苷钴胺胶囊溶出度的文献报道。为评价腺苷钴胺胶囊仿制制剂与原研药体外溶出的一致性, 本研究采用 HPLC 测定腺苷钴胺胶囊的溶出度, 并进行方法学验证, 分别测定 3 批腺苷钴胺胶囊仿制药与 2 批原研药在水、pH 1.2 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中的溶出曲线, 比较其体

作者简介: 黄美容, 女, 主管药师 E-mail: 1153451444@qq.com

外溶出的一致性^[7-13]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AG135 电子天平、XP-6 电子天平(METTLER TOLEDO); 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-20A 检测器, SIL-20AC 进样器, 岛津 LabSolutions DB Essentia 工作站; 708-DS 全自动智能溶出仪(Agilent 公司)、FADT-1202 全自动智能溶出仪(上海富科思分析仪器有限公司)。

腺苷钴胺胶囊(批号:180901,180902,180903, 批量 60 万粒, 工艺验证批次, 福建古田药业有限公司); 腺苷钴胺对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 140658-201302; 含量: 98.3%); 腺苷钴胺胶囊(日本卫材株式会社, 批号: 7ZGH2F, 83GH2F); 乙腈(色谱纯, Adamas); 超纯水, 自制; 磷酸二氢钾、磷酸均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 溶出度测定方法

1.2.1 操作注意事项 由《日本医用医药品品质情报集 2010-01-27》知, 腺苷钴胺对光极其敏感, 在光强约 850 lx 的白色荧光灯下, 37 °C 的水溶液在 30 min 时降解约 95%。因此, 检测全过程均需在暗处红光(15 lx)下避光操作。

1.2.2 色谱条件 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.60 mm, 5 μm); 流动相为 50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.2)-乙腈(85 : 15); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 100 μL; 柱温为 35 °C; 检测波长为 260 nm。

1.2.3 溶液的制备 取腺苷钴胺对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水适量超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。取腺苷钴胺胶囊, 按中国药典 2015 年版第四部通则 0931 溶出度测定法, 介质为水, 体积 500 mL, 转篮法, 转速为 50 r·min⁻¹, 水温(37±0.5)°C。依法操作, 15 min 时, 取溶液 5 mL, 滤过, 弃去初滤液 2 mL, 取续滤液作为供试品溶液; 按制剂处方配比制备空白辅料(含空白囊壳), 精密称取适量, 同供试品溶液的制备方法制成空白辅料溶液。

1.2.4 标准曲线的绘制 精密量取“1.2.3”项下对照品储备溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5 mL, 分别置 100 mL 棕色量瓶中, 加水稀释定容至刻度,

摇匀, 制成系列浓度的溶液, 进样 100 μL, 记录色谱图, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归分析。同法绘制 pH 1.2 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液的标准曲线。

1.2.5 溶出曲线的绘制 取 3 批自制腺苷钴胺胶囊与 2 批原研药品各 12 粒, 以水为溶出介质, 体积 500 mL, 转篮法, 转速为 50 r·min⁻¹, 温度(37±0.5)°C, 取样时间点设为 5, 10, 15, 30 min, 每个时间点取溶液 5 mL(同时补充等量等温的介质), 滤过, 弃去初滤液 2 mL, 精密量取续滤液 100 μL 进样测定; 另精密量取“1.2.2”项下对照品储备溶液 1 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 同法测定, 按外标法以峰面积计算各个时间点的溶出量, 以取样时间为横坐标, 累积溶出量为纵坐标, 绘制溶出曲线。同法考察 pH 1.2 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液的溶出曲线。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

取“1.2.3”项下的对照品溶液、供试品溶液及空白辅料溶液, 进行紫外光谱扫描(波长范围 200~400 nm), 结果对照品、供试品均在 261 nm 与 525 nm 处有最大吸收, 空白辅料无干扰, 故选取 260 nm 作为检测波长。

2.2 系统适用性试验

精密量取“1.2.3”项下的对照品溶液 100 μL, 进样测定, 结果主峰峰形良好(拖尾因子 1.05), 理论板数 5 248, 系统适用性良好。

2.3 专属性考察

精密量取“1.2.3”项下的对照品溶液、供试品溶液及空白辅料溶液各 100 μL, 进样, 记录色谱图, 见图 1。结果供试品溶液主峰与对照品溶液主峰的保留时间一致, 空白辅料对主峰无干扰, 专属性良好。

2.4 线性范围考察

按“1.2.4”项下绘制标准曲线, 所得线性方程见表 1。结果 4 种溶出介质的对照品浓度与峰面积线性关系均良好($r \geq 0.999$)。

2.5 仪器精密度试验

精密量取“1.2.5”项下对照品溶液 100 μL, 进样测定, 重复操作 6 次, 计算峰面积的 RSD, 结果 4 种溶出介质的 RSD 分别为 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.4%, 均符合仪器精密度试验要求(RSD ≤ 1%)。

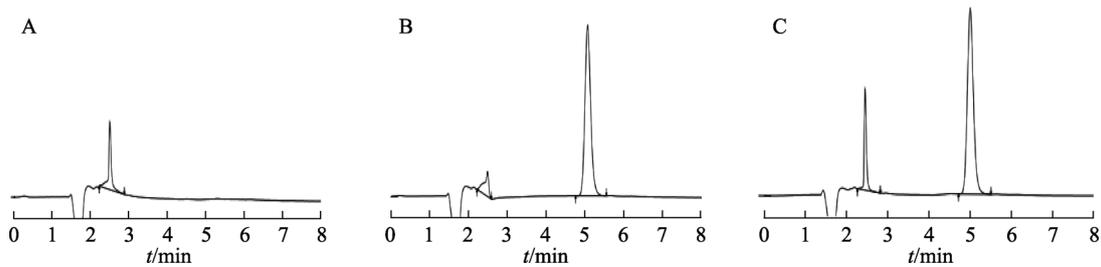


图1 空白辅料(A)、腺苷钴胺对照品(B)和腺苷钴胺胶囊供试品(C)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank(A), cobamamide reference substance(B) and cobamamide capsule sample(C)

表1 腺苷钴胺线性方程

Tab. 1 Linear equation of cobamamide

溶出介质	线性范围/ μg·mL ⁻¹	回归方程	相关系数
水	0.12~1.62	$\hat{y}=126\ 571.9x-99.5$	0.999 8
pH 1.2的盐酸溶液	0.11~1.58	$\hat{y}=132\ 436.5x-121.4$	0.999 9
pH 4.5的醋酸盐缓冲液	0.13~1.92	$\hat{y}=128\ 344.4x-100.4$	0.999 6
pH 6.8的磷酸盐缓冲液	0.10~1.54	$\hat{y}=123\ 673.9x-104.8$	0.999 7

2.6 溶液稳定性试验

取“1.2.5”项下4种溶出介质15 min时的供试品溶液, 2~8 °C条件下放置, 分别在0, 1, 2, 4, 6 h取样100 μL, 进样测定, 计算峰面积的RSD分别为0.8%, 1.8%, 1.1%, 0.7%(n=5)。由此判定4种溶出介质的供试品溶液在6 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

取腺苷钴胺胶囊内容物适量, 精密称定6份, 加水适量使溶解并定量稀释制成每1 mL约含1 μg的溶液, 作为供试品溶液, 对照品溶液同“1.2.2”项下。分别精密量取上述溶液, 进样测定, 按外标法计算含量的RSD。同法考察pH 1.2的盐酸溶液、pH 4.5的醋酸盐缓冲液、pH 6.8的磷酸盐缓冲液的重复性。结果RSD分别为1.2%, 1.6%, 0.9%, 1.2%(n=6), 重复性良好。

2.8 回收率试验

取腺苷钴胺对照品约10 mg, 精密称定, 置200 mL棕色量瓶中, 加水适量使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。按腺苷钴胺胶囊标示含量的60%, 80%和100%, 分别精密量取上述对照品储备液6, 8, 10 mL, 置500 mL棕色量瓶中, 各3份, 每份加入相当于腺苷钴胺胶囊标示含量100%的空白辅料, 分别加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为各供试品溶液, 对照品溶液同“1.2.3”项下。分别精密量取上述溶液, 进样测定, 按外标法计算回收率。同法考察pH 1.2的盐酸溶液、pH 4.5的醋酸盐缓冲液、pH 6.8的

磷酸盐缓冲液的回收率, 结果见表2。上述4种介质中的平均回收率依次分别为98.6%, 99.6%, 99.3%, 101.2%, RSD依次分别为1.2%, 0.9%, 1.5%, 1.8%(n=9)。

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests(n=9)

溶出介质	相当标示量/%	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%			
水	60	306	301.3	98.5	98.6	1.2			
			295.3	96.5					
			305.6	99.9					
	80	408	402.8	98.7					
			405.4	99.4					
			408.5	100.1					
	100	510	503.6	98.8					
			501.4	98.3					
			496.2	97.3					
	pH 1.2 盐酸溶液	60	312	306.3			98.2	99.6	0.9
				310.6			99.5		
				312.5			100.2		
80		416	418.1	100.5					
			418.4	100.6					
			417.3	100.3					
100		520	518.1	99.6					
			510.0	98.1					
			518.6	99.7					
pH 4.5 醋酸盐缓冲液		60	297	286.5	96.5	99.3	1.5		
				291.8	98.2				
				293.0	98.6				
	80	396	398.0	100.5					
			391.7	98.9					
			392.7	99.2					
	100	495	501.4	101.3					
			495.1	100.0					
			496.8	100.4					
	pH 6.8 磷酸盐缓冲液	60	318	318.2	100.1			101.2	1.8
				329.8	103.7				
				317.8	99.9				
80		424	424.6	100.1					
			435.1	102.6					
			428.2	101.0					
100		530	521.7	98.4					
			548.3	103.5					
			537.6	101.4					

2.9 溶出曲线的绘制

取腺苷钴胺胶囊自制 3 批样品与 2 批原研药品, 按“1.2.5”项下方法操作, 计算各取样时间点的累积溶出度, 并以时间(min)为横坐标, 平均累积溶出度(%)为纵坐标绘制溶出曲线, 见表 3、图 2。结果自制 3 批样品与 2 批原研药品 15 min 时, 腺苷钴胺的累积溶出量均>85%, 且 15 min 均已基本达到溶出平台, 且同批次的不同样品之间以及不同批次的样品之间的溶出曲线无显著差异, 本品的批内均一性及批间均一性均良好。

3 讨论

3.1 溶出方法的选择

中国药典、美国药典、欧洲药典、英国药典、日本药典均未收载腺苷钴胺胶囊质量标准, 中国药典 2015 年版第一增补本收载的腺苷钴胺片质量标准中无溶出度检查项。腺苷钴胺片溶出度测定的文献报道选用小杯法(200 mL)^[14], 不符合《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》溶出介质体积的要求(500, 900, 1 000 mL), 而参考《日本医疗用医药品品质情报集 2010-01-27》腺苷

钴胺胶囊的溶出度方法, 即溶出介质水 900 mL, 浆法(使用沉降篮)50 r·min⁻¹, 结果溶出过程中辅料堆积, 批内粒间溶出差异较大。考虑到本品规格较小(每粒 0.5 mg), 选择 500 mL 作为溶出介质的体积, 转篮法 50 r·min⁻¹测定, 结果批内溶出均一性良好, 批间溶出均相似。

3.2 流动相体系的选择

曾采用日本《日本医疗用医药品品质情报集 2010-01-27》溶出度测定色谱条件, 即 C₁₈ 柱, 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)-乙醇(17:3), 结果显示空白辅料峰与主成分峰分离度<1.5, 不符合要求。后参照中国药典 2015 年版第二部腺苷钴胺含量测定方法, 采用其流动相作为本品溶出度测定的流动相, 结果空白辅料峰和主成分峰的分度度>10, 拖尾因子、理论板数均符合要求。

3.3 进样量的选择

本研究中腺苷钴胺胶囊为小规格药物(规格 0.5 mg), 采用 20, 50 μL 进样, 腺苷钴胺峰响应较低, 而提高进样量为 100 μL 时, 腺苷钴胺峰响应较高, 进样精密度符合要求, 故选择进样量为 100 μL。

表 3 4 种介质中仿制药与原研药的累积溶出度($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 3 Accumulative dissolution of generic and original preparation in four media($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

溶出介质	批号	累积溶出度/%			
		5 min	10 min	15 min	30 min
水	7ZGH2F	38.6±10.6	75.1±6.5	89.9±5.9	96.8±2.9
	83GH2F	45.3±12.8	81.6±5.6	96.7±3.6	100.8±3.2
	180901	54.3±9.5	82.0±4.8	99.0±2.4	102.3±2.6
	180902	54.9±8.6	85.7±5.7	99.6±2.9	103.6±1.6
	180903	56.2±10.5	83.8±3.9	98.1±2.1	101.5±1.9
pH 1.2 盐酸溶液	7ZGH2F	41.5±15.8	79.6±8.7	96.2±4.6	100.3±3.6
	83GH2F	48.3±13.1	76.3±6.5	94.7±3.6	99.8±2.8
	180901	55.4±11.2	81.7±5.7	100.8±3.8	101.4±2.5
	180902	48.8±8.5	82.6±5.1	102.2±2.9	101.4±2.5
	180903	53.2±7.8	87.9±4.2	99.0±2.9	101.1±1.8
pH 4.5 醋酸盐缓冲液	7ZGH2F	36.8±12.4	74.9±7.5	88.6±4.1	97.4±2.6
	83GH2F	45.1±9.5	77.5±5.2	96.8±3.6	99.8±2.7
	180901	56.5±7.3	81.9±5.3	102.0±2.9	102.5±2.3
	180902	56.3±8.6	87.8±4.7	96.8±3.2	101.6±2.9
	180903	52.8±9.6	83.7±4.8	98.8±3.5	101.5±2.3
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	7ZGH2F	43.6±12.4	78.6±7.8	91.5±4.9	95.8±3.5
	83GH2F	52.6±11.2	77.5±6.2	98.8±4.1	99.8±2.8
	180901	53.3±12.4	86.8±7.5	100.4±3.9	101.4±2.6
	180902	48.7±10.8	86.0±7.6	102.2±4.4	101.9±3.2
	180903	47.5±8.9	84.8±6.5	97.4±4.1	102.0±2.8

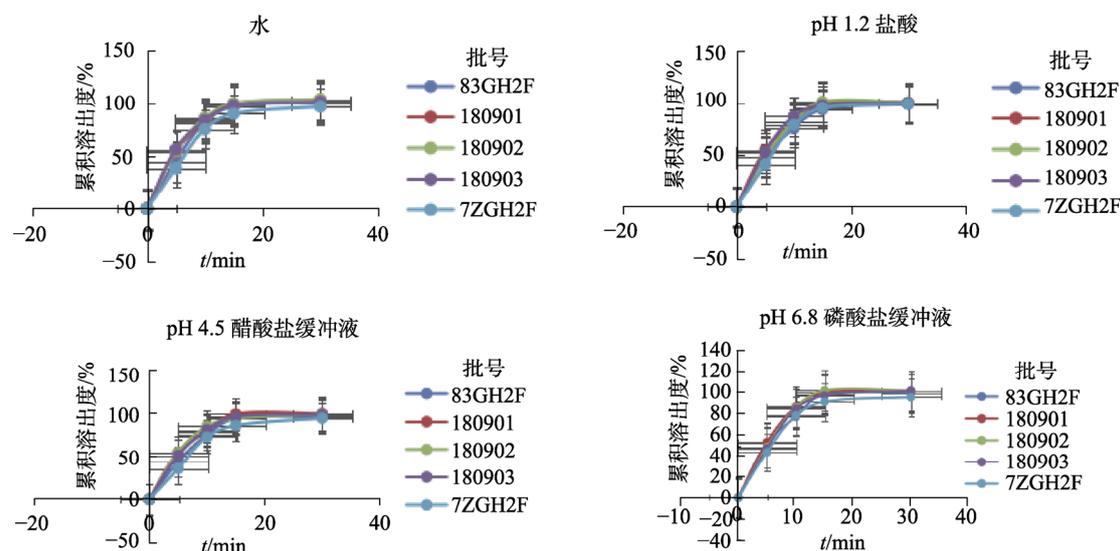


图2 腺苷钴胺胶囊在4种溶出介质中的溶出曲线

Fig. 2 Dissolution curves of cobamamide capsules in four dissolution media

3.4 不同溶出介质对腺苷钴胺胶囊溶出曲线的影响

由《日本医疗用医药品品质情报集 2010-01-27》知,腺苷钴胺原料药在溶出介质(pH 1.2、pH 4.0、pH 6.8、水)中的溶解度(37 °C)均 $> 1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,属于高溶解性药物,本品溶出度方法选择转篮法 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,很好地解决了溶出过程中辅料堆积的问题,因此本品在溶出介质(pH 1.2、pH 4.0、pH 6.8、水)中的溶出速率,主要跟胶囊壳的破裂速率有关,不同溶出介质对腺苷钴胺胶囊溶出曲线基本无影响。

综上所述,采用 HPLC 测定腺苷钴胺胶囊的溶出度,该方法切实可行,3批腺苷钴胺胶囊仿制药与原研药在4种溶出介质中的溶出曲线相似性均较好,体外溶出基本一致,仿制药物质量能达到原研药水平。

REFERENCES

[1] 赵玉兰, 沈桂生, 袁本前. 前列地尔联合腺苷钴胺与硫酸联合甲钴胺治疗糖尿病性周围神经病变的疗效对比[J]. 实用糖尿病杂志, 2020, 16(6): 65-66.
 [2] TANG J, WANG X D, YANG W M. An observation of the clinical efficacy of cobamamide for acupoint injection combined with electroacupuncture against lumbar disc herniation[J]. China Med Pharm(中国医药科学), 2020, 10(17): 99-101, 134.
 [3] ZHANG L. Adenosine cobalamin combined with dexamethasone in the treatment of idiopathic facial palsy[J]. Contemp Med Symp(当代医药论丛), 2020, 18(10): 29-30.
 [4] 王淑楠. 巴氯芬联合腺苷钴胺治疗三叉神经痛的效果研究

[J]. 临床研究, 2020, 28(5): 105-106.

[5] TANG D Y. Clinical analysis of sodium hyaluronate and adenosylcobalamin in the treatment of knee joint[J]. Guid China Med(中国医药指南), 2020, 18(2): 11.
 [6] 中国药典. 二部[S]. 2015: 附录 1484-1485.
 [7] MEI M, ZHANG M, LI Y, et al. Similarity evaluation of dissolution curves of simvastatin tablets and study on dissolution method with discriminatory power[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 816-819.
 [8] SHAO P, JING Y, CHEN S, et al. Study on consistency evaluation of the dissolution of generic and original preparations of clozapine tablet[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(2): 177-181.
 [9] YOU J, SHENG K S, HUANG P. *In vitro* consistency evaluation between generic and original TS-1 preparations[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(5): 604-608.
 [10] ZHANG L, GAO Y, LI H R, et al. Evaluation of dissolution consistency of pivalstatin calcium tablets[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2021, 44(4): 751-755.
 [11] NIE Z L, MA J, WANG X L, et al. Consistency evaluation of dissolution of generic and original preparations of paracetamol tablet[J]. J Chengdu Univ: Nat Sci Ed(成都大学学报: 自然科学版), 2020, 39(1): 32-36.
 [12] 赵雪磊, 杨淑慎. 盐酸贝那普利片仿制药与原研药的溶出度一致性评价[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(22): 162.
 [13] GUO Y Y, DING Y H, ZHANG T, et al. Consistency evaluation of the dissolution of generic and original drugs of fluoxetine hydrochloride capsules[J]. Shanghai Chem Ind(上海化工), 2020, 45(1): 31-35.
 [14] YANG G Y, DONG K, GONG X P, et al. Establishment of the method for dissolution test of cobamamide tablets[J]. China Pharm(中国药房), 2014, 25(25): 2376-2378.

收稿日期: 2021-05-08

(本文责编: 陈怡心)