

环孢素眼用乳剂体外释放方法研究

董双涛¹, 李宝霞¹, 马郑^{2*}

(1. 山西药科职业学院, 太原 030030; 2. 浙江亚瑟医药有限公司, 嘉兴 314001)

摘要 目的: 建立环孢素眼用乳剂体外释放方法。**方法:** 采用 Franz 扩散池, 聚偏氟乙烯膜滤膜, 以缓冲盐-无水乙醇(40:60)为接收液, 时间点为 60、125、190、255、320、385 min。**结果:** 方法学验证表明, 体外释放方法的滤膜惰性、专属性、灵敏度、选择性均符合规定。测定方法的定量限为 $0.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 $0.07 \sim 44.62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围呈现良好的线性关系, 回收率为 98.9%。依据 FDA 的判定原则, 自研制剂与参比制剂体外释放行为一致。**结论:** 本法适合环孢素眼用乳剂的体外释放度评价。

关键词: 环孢素眼用乳剂; 体外释放(IVRT); 参比制剂; 自研制剂; 方法学验证

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)06-1082-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.06.20

IVRT study on cyclosporine ophthalmic emulsion

DONG Shuang-tao¹, LI Bao-xia¹, MA Zheng^{2*}

(1. Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030030, China; 2. Zhejiang Arthur Pharmaceutical Co., Ltd., Jiaxing 314001, China)

Abstract Objective: To develop a method for characterizing *in vitro* release of cyclosporine ophthalmic emulsion. **Methods:** The Franz diffusion cell and the polyvinylidene fluoride membrane were adopted with buffer-ethanol (40:60) as receiving media. The sampling time was set at 60, 125, 190, 255, 320, 385 min, respectively. **Results:** The *in vitro* release method showed that the inertia of membrane, specificity, sensitivity and selectivity met the requirements. The validation of HPLC showed that the quantitative limit of the method was $0.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and a good linear relationship between the concentration range of $0.07 \sim 44.62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The average recovery was 98.9%. Compared with the original preparation by FDA guideline, the *in vitro* release of the self-developed preparation was the same as the reference preparation. **Conclusions:** This method is suitable for the *in vitro* release evaluation of cyclosporine eye drops.

Keywords: cyclosporine ophthalmic emulsion; *in vitro* release (IVRT); reference preparation; self-developed preparation; method validation

环孢素是一种免疫抑制剂, 由一组具有已知免疫抑制活性的非极性环状寡肽组成, 用于多种组织、器官移植预防排斥反应和免疫性疾病的治疗, 同时还具有增强或恢复泪腺的撕裂的药理作用^[1-2]。环

孢素眼用乳剂是一种眼用纳米型混悬乳剂。由美国 Allergen. Inc. 研发上市, 2002 年 12 月获得 FDA 的上市批准, 商品 RESTASIS(0.05%)。

眼用乳剂不是真溶液, 存在药物释放的过程, 属

* 通信作者 Tel:18698603117; E-mail:20483047@qq.com

第一作者 Tel:13133316199; E-mail:holy@126.com

于一种复杂制剂。为达到质量和疗效一致,应进行生物等效性研究。眼用制剂的生物等效性(bioequivalence, BE)评价方法主要有体外释放试验、临床终点实验、药动学实验等。常规的药动学实验是一项极具挑战性的工作。一方面,眼用制剂 BE 研究不合适测定血中药物浓度的方法来开展。另一方面,由于房水取样量有限,难以多次取样,因此测定眼内房水中的药物浓度缺乏可操作性。体外释放试验(*in vitro* release test, IVRT)作为一种可替代的 BE 评价方法,逐渐被世界各国监管部门所接受。2016 年, FDA 修订了相关指导原则^[3], 建议通过预测体内性能的体外释放度研究和物理特性研究方法, 代替生物等效性实验。即:若自研制剂与参比制剂处方的 Q1 和 Q2 一致,再证明自研制剂与参比制剂的体外释放行为一致,则可豁免生物等效性试验。2018 年和 2019 年相继修改了氯替泼诺碳酸乙酯眼用混悬剂、醋酸泼尼松龙眼用混悬剂的生物等效性要求,由原来的“以 PK 为终点指标的生物等效性实验”修订为“体外实验或以 PK 为终点指标的生物等效性实验”。

本研究开展了环孢素眼用乳剂的体外释放研究。采用干加热透皮扩散系统,以 Franz 扩散池,依据 FDA 相关指导原则的要求^[4-10],建立了环孢素眼用乳剂体外释放实验的评价方法,并进行了验证,包括 IVRT 方法的滤膜惰性、专属性、灵敏度、选择性,建立了 HPLC 法测定接收液中的环孢素方法,然后对自研制剂体外释放等效性进行了评价。

1 仪器与试剂

SYSTEM 918-6 干加热透皮扩散系统(LOGAN 公司);DF-101S 型水浴锅(巩义市予华仪器公司);1260 Infinity II 高效液相色谱(安捷伦公司);XSR205DM 分析天平(梅特勒公司);S210pH 计(梅特勒公司);HWS-26 型恒温水浴锅(上海一恒有限公司),水为超纯水。

环孢素对照品(福建科瑞有限公司,批号 211201,纯度 99.1%);自研环孢素滴眼剂(实验室自制,规格 0.05%、批号 21090513,),环孢素滴眼剂(Allergan 公司,规格 0.05%,批号 T3352);氯化钠(上海泰坦科技有限公司,批号 201916,分析纯);磷酸二氢钾(上海泰坦科技有限公司,批号 201811,分析纯);磷酸氢二钠(上海泰坦科技有限公司,批号 201919,分析纯);氢氧化钠(上海泰坦科技有限公司,批号 201421,分析纯);无水乙醇(Fisher 公司,批

号 210754, HPLC 级);甲醇(康科德公司,批号 2020MH012, HPLC 级);乙腈(康科德公司,批号 2020AH012HPLC 级);磷酸(Fisher 公司,批号 210944, HPL 级);一次性注射器(济南泰医生物技术,1 mL,批号 P1905249);滤膜(聚醚砜膜和聚偏氟乙烯膜,天津市津腾实验设备有限公司生产,孔径均为 0.45 μm);硝酸纤维素膜, Cytiva 公司,孔径为 0.45 μm)。

2 测定方法

2.1 体外释放试验

2.1.1 测定法 采用 Franz 扩散池,接收池容量 12 mL,有效扩散面积为 1.5 cm^2 。水浴温度为 35 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$,转速 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。试验开始前,安装预处理后的滤膜,开启搅拌,排除滤膜下的气泡。量取环孢素服用剂样品 300 μL ,缓慢加入到 6 个扩散池滤膜上,于 60、125、190、255、320、385 min 时取样 8 mL,并即时补充相同温度相同体积介质。

2.1.2 接收液配制 称取氯化钠 16.76 g,磷酸二氢钾 3.4 g,磷酸氢二钠 3.55 g,用 1 L 超纯水超声(功率 600 W,频率 40 kHz)溶解,再用 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8 \pm 0.05,得磷酸盐缓冲溶液。取磷酸盐缓冲溶液 1.5 L 和无水乙醇 1.5 L,混匀,超声 15 min,即得。

2.1.3 滤膜预处理 取滤膜,剪成直径为 25 mm 的圆形,用超纯水淋洗后,在接收液中浸泡 30 min 后备用。

2.1.4 数据处理 按以下公式计算单位面积累计释放量:

$$Qn = C_n \frac{V_c}{A_c} + \frac{V_s}{A_c} \sum_{i=1}^n C_{i-1}$$

Qn = 每单位面积在时间 (n) 释放的量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$); C_n = 不同采样时间 (n) 下接受介质中的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$); V_s = 样品体积 (cm^3); V_c = 接受室容积 (cm^3); A_c = 有效扩散面积 (cm^2)。

以每个扩散池单位扩散面积释放的药物量 ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) 为纵坐标,时间的平方根 ($\text{h}^{1/2}$) 为横坐标,作直线,计算该直线的斜率。药物释放应遵守 Higuchi 方程^[4],即释放达稳态后单位面积累计释放量于时间的平方根呈线性关系,直线部分的斜率代表药物的释放速率。

2.2 体外释放方法学验证

2.2.1 接收液 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下,测得环孢素在“2.1.2”

项下接收液的饱和溶解度浓度为 $0.814 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当上药量为 $300 \mu\text{L}$ 时(相当于约 0.3 g , 本品的规格为 0.05% , 接受池体积为 12 mL), 则介质中理论最大浓度为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此该接收液能够符合漏槽条件。

称取环孢素对照品适量, 加接收液溶解并稀释成含环孢素为 $5.621 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液。室温放置 8 h , 测得浓度为 $5.644 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 回收率为 100.4% , 说明环孢素在接收液中室温放置 8 h 稳定。上述结果表明, 该溶液适合作为环孢素眼用乳剂体外释放接收液。

2.2.2 滤膜惰性 取“2.1.1”项下对照品溶液 12 mL , 分别浸入待考察的滤膜, 于 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下浸泡 6 h 。照“2.3.1”色谱条件依法测定, 并将结果与未经滤膜浸泡的溶液相比较, 同时观察膜的状态。每种滤膜均平行考察 3 份。浸泡 6 h 后, 硝酸纤维素膜表明有起泡现象, 说明与接收液不相容, 不再考察。滤膜惰性测定结果见表 1。由结果可知, 采用聚醚砜膜回收率在 93% 左右, 说明该种类滤膜对环孢素有一定程度的吸附。采用聚偏氟乙烯膜, 溶液中环孢素的回收率均值为 99% 。在 $100\% \pm 5\%$ 的范围内^[11], 说明滤膜惰性符合要求。

表 1 滤膜惰性研究结果

Tab. 1 The results of membrane inertness

| 滤膜材质 (filter material) | 测定量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | 回收率 (recovery)/ % | 平均回收率 (average recovery)/% |
|---------------------------|--|-------|-------------------------|-------------------------------|
| | 0 h | 6 h | | |
| 聚偏氟乙烯膜(PVDF) | 5.621 | 5.568 | 99.1 | 99.0 |
| | | 5.569 | 99.1 | |
| | | 5.606 | 99.7 | |
| 聚醚砜膜(PES) | | 5.201 | 92.5 | 93.0 |
| | | 5.212 | 92.7 | |
| | | 5.219 | 92.8 | |

2.2.3 专属性 依据等比例处方, 制备等比例 3 个规格 (0.025% 、 0.05% 、 0.075%) 的环孢素眼用乳剂 (批号 21090513、21090514、21090515)。按照“2.1”项下体外释放实验方法, 进行体外释放试验。结果见表 2。

以斜率 Y 为纵坐标, 规格 X 为横坐标, 计算线性相关性。得回归方程:

表 2 体外释放专属性结果
Tab. 2 IVRT results of specificity

| 批号 (batch) | 规格 (specification)/ % | 6 个扩散池斜率 (slopes of the six diffusion) | 斜率平均值 (average slopes) |
|---------------|-----------------------------|--|------------------------------|
| 21090513 | 0.025 | 0.009 3 | 0.010 1 |
| | | 0.010 0 | |
| | | 0.009 9 | |
| | | 0.010 8 | |
| | | 0.010 7 | |
| | | 0.009 7 | |
| 21090514 | 0.05 | 0.023 7 | 0.022 8 |
| | | 0.023 1 | |
| | | 0.022 6 | |
| | | 0.021 3 | |
| | | 0.023 0 | |
| | | 0.022 9 | |
| 21090515 | 0.075 | 0.032 0 | 0.032 0 |
| | | 0.032 8 | |
| | | 0.031 7 | |
| | | 0.030 5 | |
| | | 0.031 9 | |
| | | 0.033 0 | |

$$Y = 0.4405X - 0.0004000 \quad r = 0.9925$$

结果表明, 体外释放方法的专属性良好。

2.2.4 灵敏度 取 3 个规格 (0.025% 、 0.05% 、 0.075%) 的环孢素眼用乳剂 (批号 21090513、21090514、21090515)。按照“2.11”项下体外释放实验方法, 和“2.1.4”项下的方法, 计算斜率, 如图 1 所示。由图中可知, 不同浓度水平的自研制剂释放均符合 Higuchi 方程。同时, 不同规格制剂的释放速率不同, 且释放速率随着样品规格的增大而增大, 说明本法灵敏度良好。

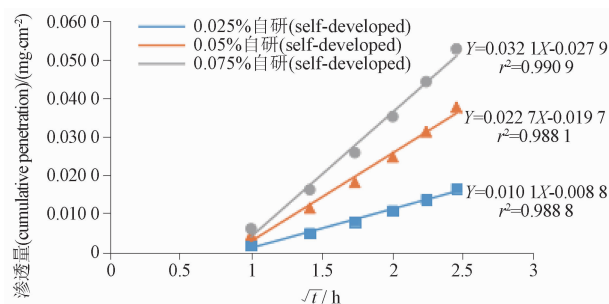


图 1 体外释放灵敏度测定结果

Fig. 1 The IVRT results of sensitivity

2.2.5 选择性 采用0.05%自研制剂为受试制剂,原研制剂作为参照制剂。依据 SUPAC - SS 指南中所述的统计方法,将6个扩散池上的受试制剂释放速率分别与参照制剂的释放速率做比值,得到36个数值,按照从小到大的顺序排列,其中第8个数值和第29个数值的百分数形式应落在75%~133.33%的范围。再制备0.025%、0.075% 2个规格自研制剂作

为受试制剂,同法实验并计算结果,2个规格(0.025%、0.075%)90%置信区间计算结果不应落在75%~133.33%的范围,结果见表3。由结果可知,0.05%环孢素眼用乳剂自研制剂的90%置信区间落在75%~133.33%的范围,另外2个规格(0.025%、0.075%)制剂90%置信区间不落在75%~133.33%的范围,符合指导原则要求。本法选择性良好。

表3 IVRT 选择性结果

Tab.3 IVRT results of selectivity

| 受试制剂 (tested preparation) | 批号 (lot No.) | 置信下限 (low CI)/% | 置信上限 (high CI)/% | 等效性 (equivalency) |
|-----------------------------|--------------|-----------------|------------------|-------------------|
| 0.5% 规格 (strength;0.05%) | 21090513 | 101.87 | 111.40 | 合格 (pass) |
| 0.025% 规格 (strength;0.025%) | 21090514 | 41.79 | 45.81 | 不合格 (not pass) |
| 0.075% 规格 (strength;0.075%) | 21090515 | 135.93 | 145.81 | 不合格 (not pass) |

2.3 高效液相色谱测定方法

2.3.1 色谱条件 采用 ODS Hypersil (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈 - 超纯水 - 甲醇 - 磷酸 (750:200:50:0.5),流速 1.0 mL · min⁻¹,进样体积 50 μL,柱温 80 °C,波长 210 nm,运行时间 15 min。

2.3.2 专属性 对照品溶液:取“2.2.1”项下的对照品溶液。

供试品溶液:按“2.1.1”项下的方法,依法操作,取接收液作为供试品溶液。

空白溶液:取空白辅料 0.3 g,按“2.1.1”项下的方法,依法操作,取接收液作为空白溶液。

取上述溶液和接收液适量,照“2.3.1”项下的方法依法测定。结果表明:上述溶液均不干扰主峰的测定。

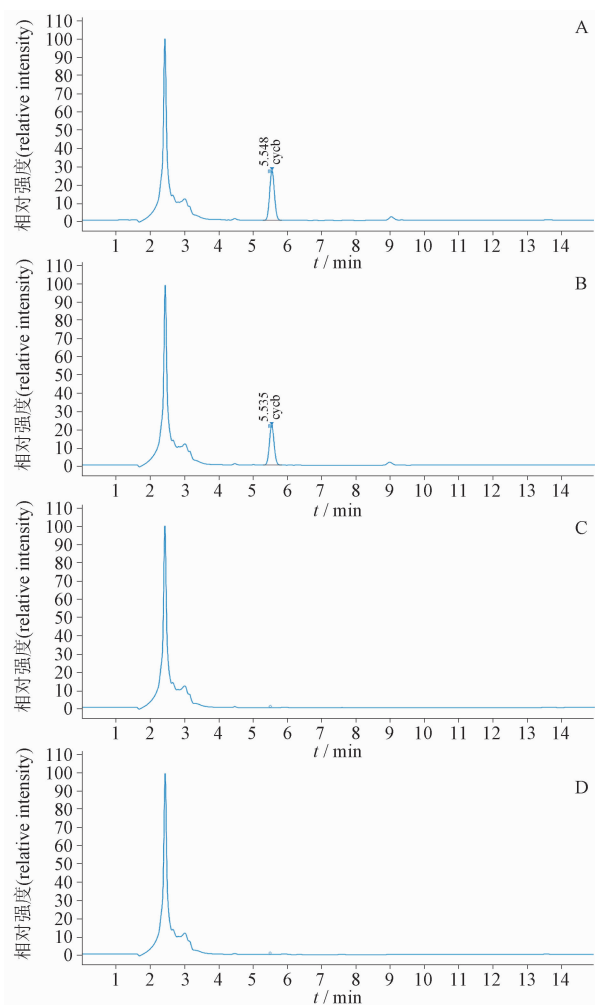
2.3.3 定量限 取“2.2.1”项对照该溶液逐级稀释,测得信噪比的约 10 倍作为定量限浓度,测得本法的定量限浓度为 0.07 μg · mL⁻¹。

2.3.4 线性与范围 精密量取“2.3.3”项下对照品储备溶液适量,加接收液稀释成浓度分别为 44.62、17.85、8.93、1.79、0.45、0.14、0.07 μg · mL⁻¹ 的溶液,以峰面积 *Y* 为纵坐标,以浓度 *X* 为横坐标,绘制标准曲线

$$Y = 125.4537X + 0.0727 \quad r = 0.9998$$

环孢素线性范围在 0.07 ~ 44.62 μg · mL⁻¹ 呈良好线性关系。

2.3.5 回收率 精密量取“2.3.3”项下对照品储备溶液适量,加空白辅料稀释成浓度分别 8.93、1.79、



A. 对照品 (standard sloution) B. 样品 (sample) C. 辅料 (placebo) D. 空白 (blank)

图2 HPLC 专属性色谱图

Fig.2 The specificity chromatograms of HPLC

0.07 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为低、中、高 3 个浓度水平的回收率溶液,每个浓度水平平行制备 3 份。以外标法计算回收率分别为 100.7%、98.1%、97.9%,平均回收率为 98.9%,RSD 分别为 1.4%、2.1% 和 3.5%,结果表明,含量方法的回收率良好。

2.3.6 溶液稳定性 取供试品溶液,分别考察室温放置 0、2、4、6、8 h 后峰面积的变化,计算峰面积的 RSD,结果表明 RSD 为 1.7%,表明供试品溶液室温

放置 8 h 稳定。

3 体外释放等效性评价

采用间隔上样,进行自研制剂与原研制剂对比研究,得出单位面积下的累积渗透量和斜率。采样时间点为 60、125、190、255、320、385 min。结果见表 4,将自研制剂的 6 个斜率分别与原研制剂受试制剂的 6 个斜率做比值,得到 36 个数值(见表 5)。

表 4 参比制剂(批号 T3352)与自研制剂(批号 21090513)单位面积下的累积释放量

Tab.4 Cumulative penetration of reference preparaton (lot T3352) and self-develop preparation (lot 21090513)

| 样品组 (group) | 时间的平方根 (square of time) | 单位面积下的累计释放量(cumulative release per unit area)/($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) | | | | | | 斜率 (slope) |
|-------------------------------|----------------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | |
| 参比制剂(reference preparaton) | 1.0 | 0.004 | 0.011 9 | 0.018 9 | 0.025 1 | 0.031 4 | 0.037 4 | 0.022 9 |
| | 1.4 | 0.003 8 | 0.011 2 | 0.016 4 | 0.022 4 | 0.028 5 | 0.034 4 | 0.021 1 |
| | 1.7 | 0.004 1 | 0.010 7 | 0.016 7 | 0.022 8 | 0.03 | 0.035 | 0.021 4 |
| | 2 | 0.003 6 | 0.010 1 | 0.016 3 | 0.022 6 | 0.028 9 | 0.034 8 | 0.021 6 |
| | 2.2 | 0.003 5 | 0.009 7 | 0.016 1 | 0.022 1 | 0.028 1 | 0.034 | 0.021 |
| | 2.4 | 0.003 4 | 0.008 2 | 0.014 9 | 0.021 | 0.027 | 0.032 8 | 0.020 4 |
| | 平均值(average) | 0.003 7 | 0.010 3 | 0.016 6 | 0.022 7 | 0.029 0 | 0.034 7 | 0.021 4 |
| 自研制剂(self-develop preparaton) | 1.0 | 0.004 2 | 0.010 4 | 0.016 2 | 0.022 0 | 0.027 6 | 0.033 2 | 0.020 0 |
| | 1.4 | 0.004 2 | 0.010 6 | 0.016 7 | 0.022 9 | 0.029 0 | 0.034 8 | 0.021 2 |
| | 1.73 | 0.004 3 | 0.010 7 | 0.016 7 | 0.022 6 | 0.028 4 | 0.034 1 | 0.020 6 |
| | 2 | 0.003 4 | 0.009 0 | 0.014 5 | 0.020 0 | 0.025 5 | 0.030 7 | 0.018 9 |
| | 2.2 | 0.004 1 | 0.010 3 | 0.016 1 | 0.021 8 | 0.027 6 | 0.033 2 | 0.020 1 |
| | 2.4 | 0.003 5 | 0.009 4 | 0.015 0 | 0.020 6 | 0.026 1 | 0.031 7 | 0.019 4 |
| | 平均值(average) | 0.003 9 | 0.010 1 | 0.015 9 | 0.021 6 | 0.027 4 | 0.033 0 | 0.020 0 |

表 5 自研制剂与参比制剂的斜率比值

Tab.5 Slope ratio of self-developed preparation to reference preparaton

| 参比制剂斜率 (slope of reference preparaton) | 自研制剂斜率(slope of self developed reference preparaton) | | | | | |
|---|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0.020 0 | 0.020 0 | 0.021 2 | 0.020 6 | 0.018 9 | 0.020 1 | 0.019 4 |
| 0.022 9 | 1.145 0 | 1.080 2 | 1.111 7 | 1.211 6 | 1.139 3 | 1.180 4 |
| 0.021 1 | 1.055 0 | 0.995 3 | 1.024 3 | 1.116 4 | 1.049 8 | 1.087 6 |
| 0.021 4 | 1.070 0 | 1.009 4 | 1.038 8 | 1.132 3 | 1.064 7 | 1.103 1 |
| 0.021 6 | 1.080 9 | 1.019 7 | 1.049 4 | 1.143 8 | 1.075 5 | 1.114 3 |
| 0.021 0 | 1.050 0 | 0.990 6 | 1.019 4 | 1.111 1 | 1.044 8 | 1.082 5 |
| 0.020 4 | 1.020 0 | 0.962 3 | 0.990 3 | 1.079 4 | 1.014 9 | 1.051 5 |

将以上 36 个数值按照从小到大的顺序排列,其中第 8 个和第 29 个数值的下限为 101.97%、上限为 111.43%,落在 75%~133.33% 的范围内,表明自研制剂与原研制剂体外释放行为一致。

4 讨论

4.1 IVRT 关键参数

眼用制剂体外释放研究,尚无明确规范的装置和接收液。相较成熟的口服制剂溶出度实验而言,

体外释放实验可借鉴的不多,因而是一项有创新性 的研究。表 6 中对比了关键试验参数。

表 6 口服制剂溶出曲线与体外释放试验特点对比

Tab. 6 The different characteristics between oral preparation dissolution curve and IVRT

| 特点(characteristic) | 口服制剂溶出曲线 (dissolution curve of oral preparations) | 眼用制剂体外释放 (IVRT of eyes preparations) |
|--|--|--|
| 试验目的(objective) | 区分工艺和处方;模拟体内药动学,提高 BE 实验成功率;豁免 BE ^[12] 需谨慎,依据 BCS 分类和指导原则(distinguish between process and prescription; evaluate pharmacokinetics <i>in vivo</i> to improve the success of BE experiments; exemptions from BE ^[12] require caution and are based on BCS classification and guidelines) | 表征药物释放性能;区分工艺和处方;当 Q1、Q2、Q3 一致,且与原研制剂体外释放速率无明显差异,可豁免 BE ^[13] (characterize drug release properties; differentiate between process and prescription; exempt from BE when Q1, Q2, and Q3 are consistent and not significantly different from the <i>in vitro</i> release rate of the original developer ^[13]) |
| 方案设计(program design) | 各国指导原则均明确规定,文献报道较多(clearly defined in national guidelines, with more reported in the literature) | 无明确规定,实验设计具备创新性(no clear regulations, experimental design is innovative) |
| 仪器设备(instruments and equipment) | 篮法、桨法等。药典均有收载(basket, paddle method, etc. are included in Pharmacopoeia) | 立式扩散池;流通池;Franz 扩散池。药典没有收载(vertical diffusion cell; flow cell; Franz diffusion cell. Not included in the Pharmacopoeia) |
| 人工膜(synthetic membrane) | 不需要(no need) | 为重点考察的关键内容(key item for focused research) |
| 介质(medium) | 溶出介质:指导原则明确规定 4 种(dissolution medium; the guidelines specify four types) | 接受液:为重点考察的实验参数。应满足漏槽条件和稳定性(acceptor fluid; is the key experimental parameter to be examined. Should meet leaky tank conditions and stability) |
| 介质温度 medium temperature | 37 °C | 35 °C |
| 介质 pH (medium pH) | 1.0/1.2, 4.5, 6.8, 水(1.0/1.2, 4.5, 6.8, water) | 未明确规定。可模拟人工泪液 6.5 ~ 7.5 (not specified. simulate artificial tears 6.5 to 7.5) |
| 转速(rotation speed) | 篮法 100 r · min ⁻¹ ; 桨法 50/75 r · min ⁻¹ (basket 100 r · min ⁻¹ ; paddle 50/75 r · min ⁻¹) | Franz 扩散池通常为 600 r · min ⁻¹ (Franz diffusion cells are typically 600 r · min ⁻¹) |
| 测试数量(number of tests) | 12 个制剂单位。原研制剂与自研制剂依次操作(12 formulation units. sequential operation of original and self-developed formulations) | 参考半固体制剂:一般为 6 个。原研与自研制剂交叉上样(reference semi-solid formulations: typically 6. Cross-sampling of originator and self-developed formulations) |
| 上样量(sample size) | 不涉及(not applicable) | 参考半固体制剂,为 0.3 g (reference semi-solid formulation, as 0.3 g) |
| 采样时间(sampling time) | 5, 10, 15, 20, 30, 45 min | 无明确规定(no clear regulations) |
| 评价方式(evaluation methods) | f ₂ 相似因子比较(comparison of f ₂ similarity factors) | 依据 Higuchi 方程,依据统计学原理,第 8 个和第 29 个数值落在 75%~133.33% 的范围内(based on the Higuchi equation, the 8th and 29th values fall within the range of 75% to 133.33% based on statistical principles) |
| 方法建立的一般流程 (general process of method establishment) | 溶出方法一般不需要筛选,参数相对固定 ^[14] (dissolution methods generally do not require screening and have relatively fixed parameters ^[14]) | 首先筛选接收液、人工膜,然后进行 IVRT 方法学验证,需满足 Higuchi 方程。然后进行方法学验证 ^[15-16] (receiving solution and artificial membrane were first screened, and then IVRT methodology validation was performed, which needed to satisfy the Higuchi equation. Then perform methodology validation) |
| 方法学验证(methodology validation) | 测定方法依照色谱法要求进行方法学验证,溶出度方法本身一般无需验证(determination methods are methodologically validated according to the requirements of the chromatographic method, and the dissolution method itself is generally not required to be validated) | 考察选择性、专属性、灵敏度,且与色谱学方法概念不同 ^[17] (examines selectivity, specificity, sensitivity, and is conceptually different from chromatographic methods) |

4.2 接收液选择

不同于口服制剂溶出度试验,眼用制剂的接收液可以使用少量有机溶剂,一般以乙醇最为常见,但比例不宜过高,否则容易引起反渗透。另外,过量的有机溶剂会降低方法的灵敏度和选择性。除乙醇外,实验中还考察了表面活性剂如 SDS。由于不同批

次 SDS 具有比较大的变异性,同时容易产生气泡,气泡附着在滤膜下方,妨碍药物的释放行为,故最终选择磷酸盐-乙醇体系。接收液在使用前需要进行脱气。接收液的温度,一般为模拟药动学行为,采用 35 °C,与眼表温度一致。研究结果显示,药物在介质中的稳定性好,且对测定无干扰,适用于本品的体外

释放研究。

4.3 人工膜的选择

理想的人工膜,要兼顾膜惰性和透过率。通过对人工膜浸泡处理,可提高膜的稳定性,降低膜批间差异性。本研究结果表明,选择的人工膜惰性良好。选择0.45 μm 孔径的人工膜使得释放速度适中,透过性良好。

4.4 IVRT 方法学意义

IVRT 的验证内容包括选择性、灵敏度、专属性等。选择性是指在拟定实验条件下,不同规格和工艺的释放速率应该有所差异,且与原研制剂不等效。但目标规格的自研制剂应与原研制剂等效。灵敏度是指不同规格的制剂释放速率应有所差异。专属性是指释放速率应与不同规格处方的制剂有一定的比例关系^[18]。方法学验证表明,上述内容均符合 FDA 指导原则的相关要求。

综上,采用该法对自研制剂和参比制剂进行了体外释放研究,结果表明,自研制剂和参比制剂体外释放一致,本法适用于环孢素眼用乳剂的体外释放研究。

参考文献

- [1] 林琳,曹俊昌,杨政,等. 0.05% 环孢素 A 纳米粒滴眼液治疗干眼症的实验研究[J]. 中医眼耳鼻喉杂志,2021,11(1):1
LIN L, CAO YC, YANG Z, *et al.* The treatment of 0.05% cyclosporine a nanoparticle eys drops on dry eye disease[J]. *J Chin Ophthalmol Otorhinolaryngol*, 2021, 11(1):1
- [2] 程林,张娴,李玉凤,等. 环孢素软胶囊在中国健康受试者中的生物等效性研究[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(4):342
CHENG L, ZHANG X, LI YF, *et al.* Bioequivalence of cyclosporine soft capsule in healthy Chinese subjects[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(4):342
- [3] FDA. Draft Guidance on cyclosporine[S]. 2016
- [4] FDA. Draft Guidance on Acyclovir[S]. 2019
- [5] FDA. Draft Guidance on Clindamycin Phosphate[S]. 2020
- [6] FDA. Draft Guidance on Metronidazole[S]. 2019
- [7] FDA. Draft Guidance on Tretinoin[S]. 2020
- [8] FDA. Draft Guidance on Bexarotene[S]. 2019
- [9] FDA. Draft Guidance on Docosanol[S]. 2017
- [10] FDA. SUPAC – SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms; Scale – Up and Postapproval Changes; Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In Vitro* Release Testing and *In Vivo* Bioequivalence Documentation[S]. 1997
- [11] IFFNER K I, KANFER I, AMGMSTIN T, *et al.* A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an *in vitro* release test (IVRT) method for acyclovir cream, 5[J]. *Int J Pharm*, 2018, 535(1/2):217
- [12] 胡昌勤,潘瑞雪. 溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2014,23(1):44
HU CC, PAN RX. Progress in evaluation/prediction of bioequivalence of solid oral preparations by dissolution test[J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23(1):44
- [13] 世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会. 皮肤和黏膜用半固体制剂体外释放试验技术规范专家共识[J]. 中国现代应用药学,2022,39(20):2707
The Transdermal Drug Delivery Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies. Expert consensus on technical practice for the *in vitro* release test of topical semisolid dosage forms for skin and mucous membrane preparations[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(20):2707
- [14] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:132
Chp 2020. Vol IV[S]. 2020:132
- [15] 石玲玲,陈轶嘉,朱云龙. 奥泽沙星皮肤外用制剂体外释放的对比研究 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (11): 1989
SHI LL, CHEN YJ, ZHU YL. Study on *in vitro* release test conditions of the topical product of Ozenoxacin[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43 (11): 1989
- [16] 殷连珍,李慧敏,苏梅,等. 外用药物制剂体外释放试验技术要求概况 [J]. 中南药学, 2024, 22 (03): 741 – 747
YIIN LZ, LI HM, SU M, *et al.* Technical requirments of *in vitro* release test studies for topical drug products [J]. *Cent South Pharm*, 2024, 22 (3): 741
- [17] 凌霞,叶晓霞,张弢,等. 苦参软膏体外释放评价方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (8): 1408
LING X, YE XX, ZHANG T, *et al.* Investigation on evaluation of *in vitro* release test for Kushen ointment[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43 (08): 1408
- [18] 邵鹏,郑金琪,潘芳芳,等. 外用半固体制剂的体外释放试验和等效性评价[J]. 中国现代应用药学,2021,38(20):2481
SHAO P, ZHENG JQ, PAN FF, *et al.* *In Vitro* release tests and equivalence evaluation for topical semisolid dosage forms[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(20):2481

(本文于 2023 年 9 月 12 日收到)