平行人工膜渗透性测定法初步预测格列吡嗪片的生物等效性

王　松，于明艳，张丹丹，刘文坤，陈德俊 *

（山东省食品药品检验研究院国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心，山东济南 250101）

摘要：采用平行人工膜渗透性测定（PAMPA）法对药物的体外溶出与渗透速率进行研究，初步预测格列吡嗪片仿制制剂的生物等效性。使用 Macro Flux 型药物生物等效性预测系统，考察 3 个厂家受试制剂与参比制剂在空腹和饱腹条件下的溶出与渗透过程，通过比较渗透速率和总渗透量 2 个关键质量参数，预测受试制剂是否与参比制剂生物等效。已通过一致性评价的 1 批受试制剂关键质量参数的几何均值比的 90％置信区间在 80.00％～ 125.00％，另外 2 批受试制剂未在此区间，但其中 1 批受试制剂与参比制剂的溶出曲线相似。所建立的 PAMPA 可为制剂的处方筛选与生物等效性风险评价提供技术支持。

关键词：格列吡嗪片；平行人工膜渗透性测定；体外溶出；渗透速率；生物等效性

中图分类号：R917；R977.1^{+}5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)09-1244-06

引用：王　松，于明艳，张丹丹，等．平行人工膜渗透性测定法初步预测格列吡嗪片的生物等效性［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(9): 1244-1249．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.09.011

Preliminary Prediction of Bioequivalence of Glipizide Tablets Based on Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

WANG Song, YU Mingyan, ZHANG Dandan, LIU Wenkun, CHEN Dejun*

(*Shandong Research Center of Engineering and Technology for Consistency Evaluation of Generic Drugs, NMPA Key Lab. for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101*)

ABSTRACT: To preliminarily predict the bioequivalence of glipizide tablets, the *in vitro* dissolution and permeation rates were studied with the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). The Macro Flux system for drug bioequivalence prediction was used to investigate the dissolution and permeability processes of three test preparations and the reference preparation in the fasting and fed states. To predict whether the test preparations were bioequivalent to the reference preparation, two key quality parameters, namely the permeation rate and the total permeation amount, were compared. The 90% confidence interval of the geometric mean ratio of the quality parameters that passed the consistency evaluation was in the range of 80.00% – 125.00% . For the others that did not fall into this interval, one batch of the test preparation had a similar dissolution curve to the reference preparation. The PAMPA may provide support for the prescription screening and bioequivalence risk assessment of preparations.

Key Words: glipizide tablet; parallel artificial membrane permeability assay; *in vitro* dissolution; permeation rate; bioequivalence

格列吡嗪（glipizide，**1**）为第 2 代磺酰脲类口服降糖药，通过刺激胰岛 β 细胞分泌内源性胰岛素，抑制肝糖原分解，促进肌肉对葡萄糖的利用，从而达到降血糖作用，对非胰岛素依赖型糖尿病有效[1]。**1** 属于 BCS Ⅱ类药物，溶解度低、渗透性高[2]。**1** 片于 1971 年 4 月在巴西上市，后于 1984 年 5 月在美国获批上市，原研公司是辉瑞，商品名为 Glucotrol。

口服给药与其他给药途径相比，具有用药方便、依从性强、耐受性好等特点，是长期用药患者的首

收稿日期：2023-12-25

作者简介：王　松（1987—），男，副主任药师，从事抗菌药、抗肿瘤药及药用辅料的质量控制及研究工作。

通信作者：陈德俊（1976—），男，主任药师，从事药物和辅料的质量分析研究工作。

E-mail：277486921@qq.com

选给药形式。药物进入体内崩解后的溶解、解离以及渗透情况均会影响其在体内的吸收。溶出度试验可用于体外模拟胃肠道的崩解和溶出，但在建立体内外相关性（*in vitro-in vivo* correlation，IVIVC）方面仍存在缺陷，例如：机械装置运动状态单一，溶出介质的组成、pH 值不随时间而变化，与胃肠道内层流液体的状态和实际情况差异较大。因此，预测药物的体内行为还应进行渗透性考察。平行人工膜渗透性测定（parallel artificial membrane permeability assay，PAMPA）是一种较为快速、可靠、可预测的药物渗透性测定方法[3]。该法可在体外模拟人体胃肠道细胞膜，测定药物被动转运时的有效渗透性[4]。将 PAMPA 的渗透性数据与人体小肠灌流法的数据对比，具有高度的相关性[5]。另有研究[6]表明，PAMPA 和人克隆结肠腺癌细胞（Caco-2 细胞）模型对口服被动吸收有相似的预测作用。当溶出方法同时具有体内吸收预测能力时，才能够用于指导制剂处方筛选及生物等效性预测[7—9]。

本研究采用 PAMPA 法，建立空腹和饱腹状态下 **1** 片体外溶出 - 渗透模型，考察了 3 个不同厂家受试制剂与参比制剂在空腹与饱腹条件下溶出和渗透的差异，并初步预测了受试制剂与参比制剂的生物等效性。

1 仪器与试药

Macro Flux 型药物生物等效性预测系统（美国 Pion 公司）；Model 2500 型溶出仪（美国 Distek 公司）；MS205DU 型电子天平、S400-K 型酸度计（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 99.9%，批号 100281-201905）；**1** 片［参比制剂（美国 Pfizer 公司，商品名 Glucotrol，规格 5 mg，批号 R93091）；受试制剂 A（批号 200401，规格 5 mg，已通过一致性评价），受试制剂 B（批号 53719002，规格 5 mg），受试制剂 C（批号 9C016302，规格 5 mg）］；接收池漏槽条件缓冲液［acceptor sink conditioned buffer（ASB），pH 7.4，批号 520945］、磷脂溶液（批号 520852）均购自美国 Pion 公司；药物溶出模拟液固体粉末（英国 Biorelevant 公司，批号 FFF-0421-B）；无水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、氯化钠、冰乙酸、盐酸、二甲基亚砜均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 Macro Flux 型药物生物等效性预测系统

图 1 为本研究使用的体外溶出 - 渗透速率测定装置，通过在线、实时浓度监测功能，可同步考察制剂的溶出和渗透行为。溶出杯作为供体室，内置生理相关溶媒以模拟胃肠道的 pH 环境，受体室中使用模拟血液漏槽条件的 ASB（具有可以与药物结合的蛋白，pH 7.4），中间由涂有磷脂溶液的人工仿生膜隔开，模拟人体小肠表皮细胞的环境，同时模拟脂溶性的磷脂双分子层及水溶性的细胞膜前端的绒毛层。药物在供体室和受体室中的浓度变化通过原位光纤实时检测。采用 Au PRO 5.5.2.4019 分析软件进行数据处理，选取特定的波长范围进行二阶导数校正，可排除不溶辅料颗粒的散射干扰，保证数据的准确性。该装置通过模拟药物在体内吸收的评估，建立了更易实现的 IVIVC 模型。

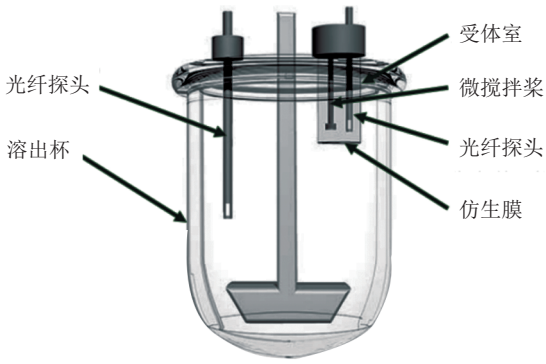


图 1 Macro Flux 药物生物等效性预测系统
Fig.1 Macro Flux for Drug Bioequivalence Prediction System

2.2 溶液配制

对照品溶液：取 **1** 对照品适量，精密称定，用 DMSO 溶解并稀释制成每 1 mL 含 **1** 1 mg 的溶液，作为对照品溶液。

空腹胃模拟液（pH 1.6）：取氯化钠 4.5 g，加水 900 mL 使溶解，用 1 mol/L 盐酸调至 pH 1.6，加水稀释至 1 000 mL。

空腹肠模拟液：取氢氧化钠 0.420 g、氯化钠 6.186 g 和无水磷酸二氢钠 3.438 g，加水溶解并稀

释至 1 000 mL，作为肠缓冲液。取药物溶出模拟液固体粉末 22.4 g，加入上述肠缓冲液 1 000 mL 使溶解，继续超声（500 W，40 ℃以下）30 min，静置 30 min，即得。

磷酸盐缓冲液：取无水磷酸氢二钠 42.6 g 和氯化钾 20.0 g，加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 40 mL，用水溶解并稀释至 1 000 mL，摇匀。

空腹肠模拟液（pH 6.5）：取空腹胃模拟液（pH 1.6）、空腹肠模拟液与磷酸盐缓冲液以体积比 8 ∶ 1 ∶ 1 混匀，现配现用。

饱腹胃肠模拟液（pH 5.0）：取氢氧化钠 4.040 g、氯化钠 11.874 g 和冰乙酸 8.650 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL。取药物溶出模拟液固体粉末 11.2 g，加入上述溶液 1 000 mL 使溶解，静置 2 h。

2.3 标准曲线的建立

供体室标准曲线的建立：将光纤探头置空腹胃模拟液（pH 1.6）200 mL 中，依次精密加入对照品溶液适量，得到每 1 mL 含 **1** 0.3 ～ 1.5 μg 的系列标准曲线溶液，采集数据后选取 274 ～ 284 nm 的波长范围，以二阶导数法校正后进行线性回归，得到供体室标准曲线。

同法建立在空腹肠模拟液（pH 6.5）与饱腹胃肠模拟液（pH 5.0）中的标准曲线，标准曲线溶液的质量浓度均为含 **1** 1.0 ～ 5.0 μg/mL。以上标准曲线在相应质量浓度范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.999 9。

受体室标准曲线的建立：将光纤探头置 ASB（pH 7.4）50 mL 中，依次精密加入对照品溶液适量，得到每 1 mL 含 **1** 0.1 ～ 0.5 μg 与 0.6 ～ 3.1 μg 系列标准曲线溶液，采集数据后选取 274 ～ 284 nm 的波长范围，以二阶导数法校正后进行线性回归，分别作为空腹与饱腹条件下受体室的标准曲线。以上标准曲线在相应质量浓度范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.999 9。

2.4 测定方法

照 ChP 2020 年版四部通则 0931 第二法测定溶出度。溶出介质选用饱腹胃肠模拟液（pH 5.0）1 000 mL，或先采用空腹胃模拟液（pH 1.6）800 mL，测试 30 min 后加入空腹肠模拟液与 PBS 的等比混合溶液 200 mL，以转换为空腹肠模拟液（pH 6.5）；转速设置为 50 r/min；精密量取 ASB（pH 7.4）12 mL，置受体室中；微搅拌桨转速设置为 450 r/min；两室间以面积为 3.88 cm^2 的仿生膜（预先用磷脂溶液 50 μL 浸润）隔离；采集时间为 240 min（饱腹）与 200 min（空腹）；采样间隔为 1 min。照 ChP 2020 年版四部通则 0401 紫外 - 可见分光光度法，在 240 ～ 400 nm 的检测波长范围内，采用光纤探头分别测定供体室和受体室中的吸光度，按式①、式②分别计算药物的渗透速率和总渗透量。

$$J=\frac{V}{A}\times\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}t} \qquad ①$$

式中：J/（μg·min^{-1}·cm^{-2}），为渗透速率（Flux），即药物在单位时间内通过单位面积的速率；$\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}t}$/（μg·$mL^{-1}$·$min^{-1}$），为单位时间内受体室中药物浓度变化速率；$V$/mL，为缓冲液的体积；$A$/$cm^2$，为仿生膜的面积。

$$T=c\times V \qquad ②$$

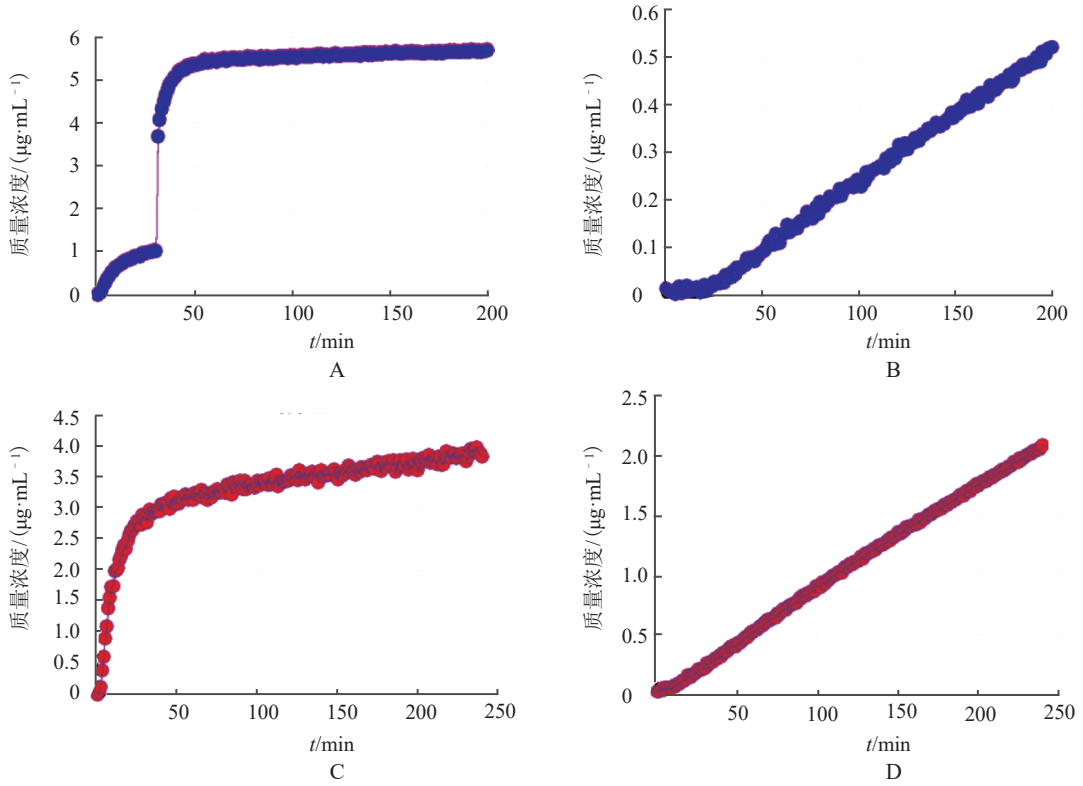
式中：T/μg，为总渗透量（permeation amount），即药物在测定时间内通过仿生膜的总量；c/（μg·mL^{-1}）为最终时间点接收液中的药物浓度；V/mL，为缓冲液的体积。

2.5 溶出度与渗透速率测定结果

参比制剂与 3 家受试制剂在空腹和饱腹条件下，溶出度与渗透速率整体趋势一致（图 2）。**1** 片在 pH 1.6 的空腹胃液中溶出缓慢，受体室中的 **1** 维持在低浓度水平。30 min 后溶媒转换为 pH 6.5 的空腹肠液，**1** 片溶出迅速且完全，渗透速率明显增大。**1** 片在 pH 5.0 的饱腹胃肠液中，**1** 片的溶出经初始的快速增长后趋于平缓，最终的溶出率只达到 70%，溶出不完全，但此时受体室中的渗透速率是空腹状态时的 3 ～ 5 倍。

2.6 参比制剂与受试制剂的渗透速率与总渗透量比较

截取受体室空腹条件下 75 ～ 140 min 与饱腹条件下 100 ～ 150 min 中测得的 **1** 浓度值，以时间对药物质量浓度进行线性回归，将该时间段药物浓度变化速率（即线性方程斜率）分别代入式①计算渗透速率，以 180 min 时测得的受体室接收液浓度代



A—空腹条件下的溶出曲线；B—空腹条件下的渗透曲线；C—饱腹条件下的溶出曲线；D—饱腹条件下的渗透曲线。

图 2　1 片溶出度与渗透速率的典型曲线

Fig.2　Typical Curves of Dissolution and Permeation Rates of **1** Tablets

入式②计算总渗透量。由计算结果（表 1、2）可见，受试制剂 A 与参比制剂结果最为接近，受试制剂 B 的渗透速率和总渗透量均低于参比制剂，受试制剂 C 在空腹条件下的关键参数均高于参比制剂，在饱腹条件下均低于参比制剂。**1** 片受试制剂与参比制剂的渗透曲线如图 3 所示。

表 1　空腹条件下渗透速率与总渗透量的测定结果

Tab.1　Determination Results of the Permeation Rate and Total Amount under the Fasting Condition

样品	渗透速率 /(μg·min⁻¹·cm⁻²)			总渗透量 /μg		
	第 1 片	第 2 片	第 3 片	第 1 片	第 2 片	第 3 片
参比制剂	0.008 4	0.008 9	0.007 9	4.810 1	5.437 4	5.173 2
受试制剂 A	0.008 8	0.008 8	0.008 0	5.222 6	5.455 7	4.882 8
受试制剂 B	0.006 8	0.007 9	0.007 2	4.807 0	5.099 3	5.216 2
受试制剂 C	0.009 6	0.009 9	0.009 1	6.113 6	6.262 2	5.808 0

表 2　饱腹条件下渗透速率与总渗透量测定结果

Tab.2　Determination Results of the Permeation Rate and Total Amount under the Fed Condition

样品	渗透速率 /(μg·min⁻¹·cm⁻²)			总渗透量 /μg		
	第 1 片	第 2 片	第 3 片	第 1 片	第 2 片	第 3 片
参比制剂	0.027 1	0.027 7	0.028 1	24.573 3	25.245 0	25.290 1
受试制剂 A	0.027 6	0.028 9	0.028 7	25.133 1	25.968 2	26.079 9
受试制剂 B	0.023 9	0.025 3	0.024 7	21.538 6	22.631 0	22.526 7
受试制剂 C	0.025 5	0.025 0	0.025 7	22.484 6	22.449 7	22.548 3

2.7 参比制剂与受试制剂生物等效性预测

预测制剂的生物等效性，可通过药动学参数中 c_{max} 与 AUC 几何均值比值的 90% 置信区间进行比较。在 PAMPA 试验中，计算 IVIVC 的关键参数（渗透速率与总渗透量）的 90% 置信区间（confidence interval，CI）进行等效性评估。

3 批受试制剂与参比制剂的生物等效性评估结果如表 3 所示。受试制剂 A 生物等效的 90% 置信区间均为 80.00%～125.00%，初步预测受试制剂 A 与参比制剂在体外空腹和饱腹模拟试验中具有生物等效性。受试制剂 A 为已通过一致性评价产品，由此可验证此评价系统的准确性。受试制剂 B 与受试制剂 C 在空腹条件下的预测结果均超出了 80.00%～125.00%，提示其存在生物不等效的风险。

3 讨论

3.1 受试制剂的选取

在进行 PAMPA 试验前，选择含 0.15% SDS 的盐酸（pH 1.0）、含 0.15% SDS 的乙酸盐缓冲液（pH 4.5）、PBS（pH 6.8）和 PBS（pH 7.4）4 种溶出介质，考察国内 20 余家企业生产的 **1** 片与参比制剂的溶出行为，最终选取 3 家企业产品进一步开展了 PAMPA 试验。在溶出曲线与参比制剂相似的产品中选取受试制剂 A 与 B，其中受试制剂 A 为已通过一致性评价产品，以验证该方法的准确性，在溶出曲线不相似的产品中选择受试制剂 C。

1 片在 pH 7.4 的溶出介质中均为快速溶出，在其他 3 种溶出介质中，受试制剂 A、B 与参比制剂溶出曲线的相似因子均大于 50，受试制剂 C 与参比制剂的相似因子小于 50。而经 PAMPA 试验预测，受试制剂 B 生物不等效，由此可见只进行溶出度考察是不够的，需要建立可模拟体内环境的体内外相关模型，将溶出度方法与体内吸收相结合才能对仿制药的研发具有指导意义[10]。

3.2 **1** 片溶出与渗透行为分析

1 是一种亲脂性弱酸，pK_a 值为 5.9。当溶媒的 pH 值大于药物的 pK_a 值时，药物解离度高，溶解度大，药物在溶液中大部分以离子形式存在；当溶媒的 pH 值小于药物的 pK_a 值时，药物解离受到抑制，溶解

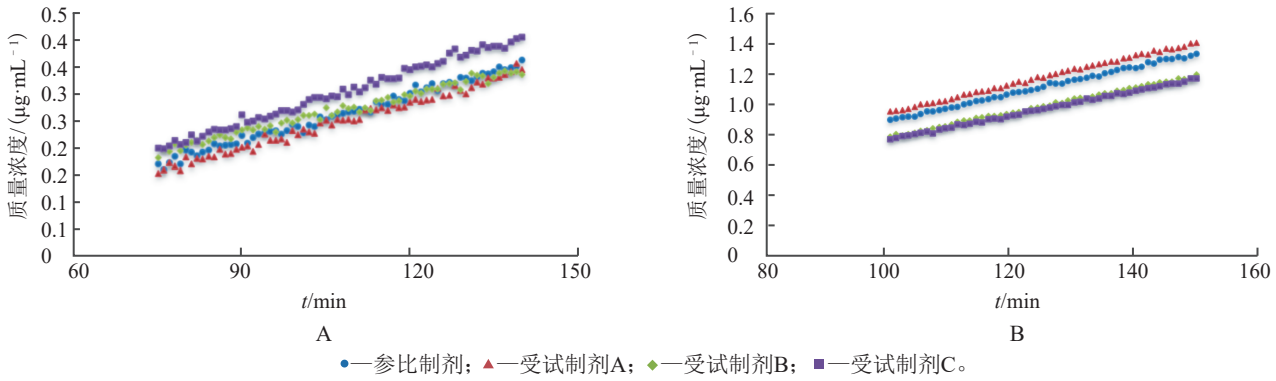


图 3 空腹状态（A）和饱腹状态（B）下 **1** 片的渗透曲线

Fig.3 Permeability Curves of **1** Tablets under Fasting Condition (A) and Fed Condition (B)

表 3 参比制剂与受试制剂的 **90%** 置信区间

Tab.3 90% Confidence Interval of the Test and Reference Preparations

样品	空腹模拟试验		饱腹模拟试验	
	渗透速率 /%	总渗透量 /%	渗透速率 /%	总渗透量 /%
受试制剂 A	92.75～110.68	91.46～110.36	98.34～107.26	99.28～106.24
受试制剂 B	76.17～98.10	91.15～104.98	84.89～93.46	84.74～92.86
受试制剂 C	105.63～121.33	110.32～125.51	89.81～94.22	89.51～90.18

度小，药物在溶液中主要以分子形式存在，而分子形式易于药物的跨膜转运。因此，本试验结果显示，**1** 片在饱腹条件下溶出不完全，而渗透速率是空腹条件时的 3 ～ 5 倍。

1 片说明书中的用法指出，本品需餐前 30 min 服用，与本试验所得结果相符。**1** 片在空腹状态下易于溶出，饱腹状态下利于吸收。

3.3 受试制剂与参比制剂生物等效性分析

当受试制剂与参比制剂关键参数的 90％置信区间为 80.00％～ 125.00％，可初步预测受试制剂的生物等效性。受试制剂 B 的 90％置信区间整体偏低，在空腹与饱腹条件下的溶出行为与参比制剂基本一致，但渗透速率和总渗透量均低于参比制剂。提示可能是受试制剂在辅料的选择与用量方面与参比制剂存在差异，影响了主药对仿生膜的渗透，导致药物的生物利用度不同。受试制剂 C 在空腹条件下的溶出速率快于参比制剂，在饱腹条件下的溶出速率慢于参比制剂，溶出行为本身不一致，导致 90％置信区间在空腹介质中整体偏高，在饱腹介质中整体偏低。该结果提示受试制剂 C 生物不等效的风险较高，需要优化处方。

本研究模拟了空腹和饱腹条件下药物在体内的溶出 - 渗透过程，建立了药物 IVIVC 研究的技术路线，为仿制药处方筛选及预 BE 研究积累了理论和数据基础，可降低仿制制剂与参比制剂人体生物等效性试验失败的风险，对仿制药的生物等效性风险评价具有指导作用。

参考文献：

[1] 杨秀云，辛桂杰，王 峰，等．格列吡嗪胶囊的相对生物利用度和生物等效性［J］．吉林医学，2006, **27**(11)：1343-1344．

[2] National Institute of Child Health and Human Development, FDA．Intra-agency agreement between the NICHD and the FDA: oral formulations platform—report 1［EB/OL］．［2023-10-10］．http://zy．yaozh．com/orangebook/NICHD_BCS．pdf．

[3] 关皓月，张广超，牛剑钊，等．平行人工膜体外渗透技术在药物一致性评价中的应用［J］．中国药事，2020, **34**(8)：891-896．

[4] 刘雪婧，李文龙，关皓月，等．仿制药体外渗透性研究的应用进展［J］．中国新药杂志，2022, **31**(11)：1066-1071．

[5] AVDEEF A, BENDELS S, DI L, *et al*．PAMPA-critical factors for better predictions of absorption［J］．*J Pharm Sci*, 2007, **96**(11)：2893-2909．

[6] AVDEEF A, ARTURSSON P, NEUHOFF S, *et al*．Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pK_a(flux) method［J］．*Eur J Pharm Sci*, 2005, **24**(4)：333-349．

[7] 张 伟，张 慧，熊 婧，等．基于 BCS 分类测定药物的平衡溶解度、油水分配系数及渗透性［J］．中国医药工业杂志，2023, **54**(1)：111-117．

[8] 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］．中国药学杂志，2019, **54**(18)：1511-1514．

[9] 张丹丹，王 松，李玉杰，等．基于平行人工膜渗透性分析法初步预测盐酸吡格列酮制剂生物等效性［J］．食品与药品，2022, **24**(3)：227-233．

[10] ENIKO B．The effect of formulation additives on *in vitro* dissolution-absorption profile and *in vivo* bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations［J］．*Eur J Pharm Sci*, 2018, **114**(3)：310-317．