非布司他片有区分力溶出度检测法的建立及溶出曲线相似性评价

刘鑫洋[1,2#]，秦杰琛[1#]，董艳萍[3]，普俊学[4]，张贵民[1*]
（1. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400；2. 昆明医科大学药学院，云南昆明 650500；
3. 昆药集团股份有限公司，云南昆明 650500；4. 昆明积大药业股份有限公司，云南昆明 650100）

摘要：参考非布司他（**1**）片剂（参比制剂）的进口注册标准及美国药典溶出度方法数据库，建立了 **1** 片有区分力的溶出度测定法，并用其评价自制 **1** 片与参比制剂溶出曲线的相似性。考察了不同 pH 介质、含不同浓度十二烷基硫酸钠（SDS）水性溶液条件下 **1** 片的溶出曲线。结果显示，参比制剂在 0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的盐酸（pH 1.2）及含 0.5% SDS 的乙酸盐缓冲液（pH 4.5）中的溶出曲线具有区分力；计算得相似因子（f_2）均大于 50，表明自制 **1** 片与参比制剂在上述介质中的溶出行为基本一致。本研究可为 **1** 片的一致性评价提供依据。

关键词：非布司他；片剂；溶出曲线；相似性；一致性评价
中图分类号：R927.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)01-0119-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.01.014

Establishment of a Discriminatory Dissolution Method for Febuxostat Tablets and Evaluation of the Similarity of Dissolution Curves

LIU Xinyang[1,2#], QIN Jiechen[1#], DONG Yanping[3], PU Junxue[4], ZHANG Guimin[1*]
(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. School of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500; 3. KPC Pharmaceuticals, Inc., Kunming 650500; 4. Kunming JIDA Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650100*)

ABSTRACT: According to the import registration standard for febuxostat (**1**) tablets (reference preparation) and the USP dissolution methods database, a discriminatory dissolution method for **1** tablets was established to assess the similarity between the dissolution profiles of the self-made tablets and reference preparation. The dissolution profiles of **1** tablets in various pH media and the aqueous solutions with different concentrations of sodium dodecyl sulfate (SDS) were investigated. The results showed that the dissolution curves of the reference preparation in 0.3% SDS aqueous solution, pH 1.2 hydrochloride containing 0.7% SDS and pH 4.5 acetate buffer containing 0.5% SDS were distinguishable. The calculated similarity factor (f_2) values were all above 50, suggesting that the dissolution profiles of the self-made tablets and reference preparation in the above dissolution media were basically similar. This study could provide a basis for the consistency evaluation of **1** tablets.

Key Words: febuxostat; tablet; dissolution curve; similarity; consistency evaluation

非布司他（febuxostat，**1**）化学名为 2-[(3- 氰基 -4- 异丁氧基）苯基]-4- 甲基 -5- 噻唑羧酸，是由日本武田公司开发的一种新型口服抗高尿酸血症的药物，通过抑制黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase，XO）的活性来发挥作用[1]，具有不良反应少、耐受性好、禁忌证少等优势，在痛风治疗领域发挥了越来越重要的作用[2]。**1** 作为 40 年来首个获准治疗

#对文章贡献等同
收稿日期：2021-02-07
作者简介：刘鑫洋(1996—)，男，硕士，从事药物制剂开发及质量研究工作。
E-mail：1070680168@qq.com
秦杰琛(1995—)，男，硕士，从事化学药物及蛋白质药物的质量研究。
E-mail：1293694765@qq.com
通信作者：张贵民(1969—)，男，研究员，从事新药的研究与开发。
E-mail：Lunanzhangguimin@163.com

伴有高尿酸血症痛风患者的新药，先后在不同的国家及地区上市销售[3]，并于2013年2月在国内被批准上市。根据美国FDA网站资料所述，**1**归属于生物药剂学分类系统（BCS）Ⅱ类，具有pH依赖性。

本研究参考国家颁布的相关指导原则[4—6]，通过HPLC法研究**1**在不同pH介质中的溶出行为，建立了**1**片具有区分力的溶出度检测法，以期为后续仿制药一致性评价提供参考。

1　仪器与试药

Arc型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；PTU30型全自动溶出仪（德国PharmaTest公司）；XSE205型分析天平（瑞士Mettler Toledo公司）；THZ-82型恒温振荡器（常州国华电器有限公司）。

1原料药（含量98.60%，批号03900270）、**1**片（规格40 mg，批号20200818、20200913、20201015）和相关辅料均购于昆药集团股份有限公司；**1**对照品（中国食品药品检定研究院，含量99.86%，批号101278-201301）；原研**1**片［参比制剂，安斯泰来制药（中国）有限公司，规格40 mg，批号8132、8150］。乙腈为色谱纯；十二烷基硫酸钠（SDS，含量92.5%）；无水乙酸钠（含量≥99%）；磷酸二氢钾（含量≥99.5%）；磷酸氢二钾（含量≥99.4%）；氢氧化钠（含量≥95.5%）；一水合枸橼酸（含量≥99%）；冰乙酸（含量≥99%）；无水磷酸氢二钠（含量≥98%）；盐酸（含量≥80%）；磷酸（含量≥90%）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Inerstil ODS-SP C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈∶水∶冰乙酸（600∶400∶2）；检测波长 317 nm；流速 1.5 ml/min；柱温 40 ℃；进样量 10 μl。

2.2　溶液配制

溶剂：乙腈∶水（60∶40）。

pH 1.2 盐酸：取氯化钠2.0 g，加适量水使溶解，加入盐酸7 ml，再加水定容至1 000 ml，混匀即得。

pH 2.0 盐酸：取盐酸1.17 ml，用水定容至1 000 ml，摇匀即得。

pH 6.0 介质溶液：取无水磷酸氢二钠17.91 g，加水溶解并定容至1 000 ml，即得0.05 mol/L磷酸氢二钠溶液；另取一水合枸橼酸5.25 g，加水溶解并定容至1 000 ml，即得0.025 mol/L枸橼酸溶液。然后用枸橼酸溶液调节磷酸氢二钠溶液的pH值，制备pH 6.0的介质溶液。

pH 4.5 乙酸盐缓冲液：取乙酸钠2.99 g，加入2 mol/L乙酸溶液14 ml，用水溶解并定容至1 000 ml，摇匀即得。

pH 6.8 磷酸盐缓冲液：取磷酸二氢钾1.7 g和无水磷酸氢二钠1.775 g，加水适量使溶解，定容至1 000 ml，即得。

pH 7.4 磷酸盐缓冲液：取磷酸二氢钾1.36 g，加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液79 ml，用水稀释至200 ml，即得。

对照品溶液：精密称取**1**对照品约5 mg，置50 ml量瓶中，加入溶剂溶解并定容，作为对照品贮备液。精密移取对照品贮备液2 ml置20 ml量瓶中，加入溶剂定容，制成每1 ml中约含**1** 10 μg的对照品溶液。

2.3　1 溶解度的测定

取过量的**1**原料药，置50 ml量瓶中，分别加入“**2.2**”项下pH 1.2盐酸、pH 2.0盐酸、pH 4.5乙酸盐缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液、pH 7.4磷酸盐缓冲液定容，于37 ℃恒温振荡水浴中放置24 h，过滤，取续滤液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，采用外标法计算**1**的溶解度。结果显示，**1**在上述介质中的溶解度分别为0.07、0.04、7.62、3 327.00、3 759.57 μg/ml。

2.4　有区分力的溶出度检测方法的建立

2.4.1　溶出介质的选择

参照《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》[5,7]、**1**片进口注册标准及美国药典（USP 40）溶出数据库中的内容，选择“**2.2**”项下的pH 1.2盐酸、pH 4.5乙酸盐缓冲液、pH 6.0介质溶液、pH 6.8磷酸盐缓冲液和水5种介质进行筛选。

2.4.2　参比制剂溶出曲线的测定

取**1**参比制剂（批号8132、8150），于不同溶出介质中进行溶出度试验。分别于5、10、15、30、45、60 min时取溶出液10 ml，并即时补液10 ml，

过滤（弃去初滤液 5 ml），取续滤液作为供试品溶液。另取 **1** 对照品适量，加入 pH 6.8 磷酸盐缓冲液适量，超声 10 min 使 **1** 溶解，稀释制成每 1 ml 中约含 **1** 10 μg 的对照品溶液。取上述 2 种溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积分别计算各时间点的溶出率（以 **1** 计），绘制溶出曲线。

结果见图 1，**1** 参比制剂（批号 8132、8150）在 pH 6.0、pH 6.8 介质中，15 min 溶出率大于 85%，溶出曲线不具区分力；在水溶液中最终溶出小于 60%；在 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中最终溶出约 20%；在 pH 1.2 盐酸中几乎没有溶出。因此拟通过在水、pH 4.5 乙酸盐缓冲液、pH 1.2 盐酸 3 种介质中加入 SDS 并考察其加入量，进而确定合适的 SDS 浓度使 **1** 的溶出曲线具备一定的区分力，用于评价原研及自制片剂的溶出特性。

2.4.3 不同溶出介质中 SDS 添加浓度的考察

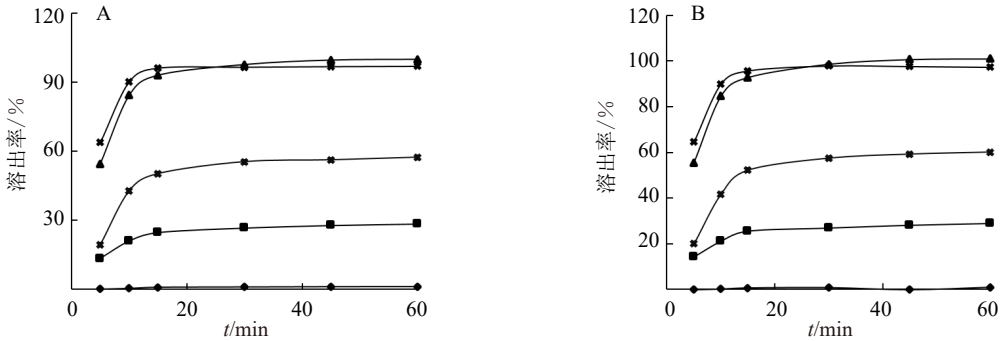
分别考察水、pH 1.2 盐酸、pH 4.5 乙酸盐缓冲液中 SDS 添加浓度对 **1** 参比制剂（批号 8132）溶出行为的影响（其中，水中 SDS 添加浓度为 0.1%～0.4%、pH 4.5 乙酸盐缓冲溶液中 SDS 添加浓度为 0.3%～0.6%、pH 1.2 盐酸中 SDS 添加浓度为 0.4%～0.7%）。

结果见图 2，**1** 参比制剂（批号 8132）在不含和含 0.1% SDS 的水溶液中溶出较慢；在 0.4% SDS 水溶液中溶出较快；在 0.2%和 0.3% SDS 水溶液中 30 min 溶出率能达到 80%，但 0.3% SDS 条件相比于 0.2% SDS 条件更具有区分力，且无拐点和突释，因此选择 0.3% SDS 水溶液作为溶出介质。在含 0.4%～0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸中 **1** 均能溶出，无拐点和突释；而在不含 SDS 的 pH 1.2 盐酸中基本不溶出。在含 0.7% SDS 条件下，30 min 溶出率能达到 80%，故认为该条件最具区分力，且不会过度区分，适合用来评价原研片和自制片的一致性。在含 0.3%、0.4% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲溶液中 **1** 溶出较慢；在不含 SDS 的 pH 4.5 介质中溶出最慢；在含 0.5%、0.6% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲溶液中 30 min 溶出率能达到 80%，且无拐点和突释，溶出曲线具有区分力。参照《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》中的要求[5,7]，优先选择低 SDS 浓度，因此 pH 4.5 乙酸盐缓冲溶液中 SDS 添加量选择 0.5%。

取 **1** 参比制剂（批号 8150），按上述方法重复测定其在 0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中的溶出行为，溶出曲线见图 3。结果显示 **1** 参比制剂（批号 8150）在 0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中均能溶出，无拐点和突释，且 30 min 溶出率均能达到 80%，适合用来评价原研片和自制片剂的一致性。

2.5 溶出曲线相似性评价

采用相似因子（f_2）法比较原研片和自制片剂溶

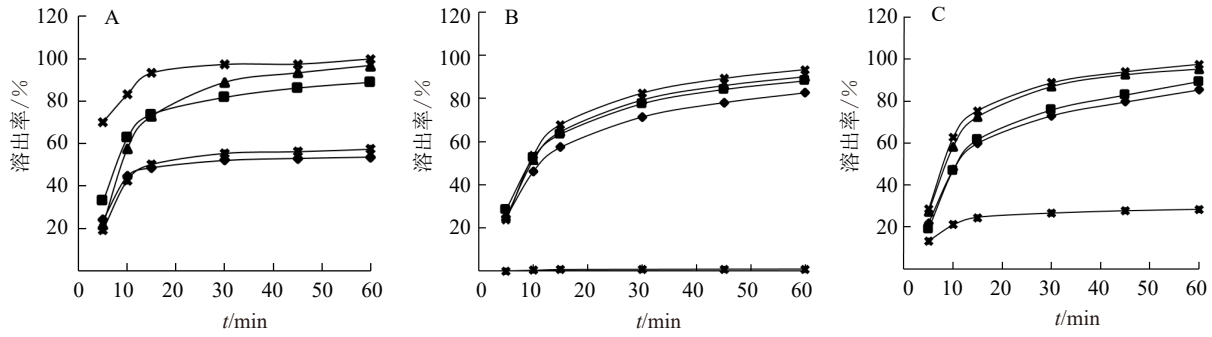


A：批号 8132，B：批号 8150

◆－pH 1.2 盐酸；■－pH 4.5 乙酸盐缓冲液；▲－pH 6.0 介质溶液；×－pH 6.8 磷酸盐缓冲液；✖－水

图 1 参比制剂在不同介质中的溶出曲线（n=6）

Fig.1 Dissolution Curves of Reference Preparation in Different Dissolution Media (n=6)



A：水溶液（◆－0.1% SDS；■－0.2% SDS；▲－0.3% SDS；×－0.4% SDS；∗－ 无 SDS），
B：pH 1.2 盐酸（◆－0.4% SDS；■－0.5% SDS；▲－0.6% SDS；×－0.7% SDS；∗－ 无 SDS），
C：pH 4.5 乙酸盐缓冲液（◆－0.3% SDS；■－0.4% SDS；▲－0.5% SDS；×－0.6% SDS；∗－ 无 SDS）

图 2　参比制剂（批号 8132）在含不同浓度 SDS 介质中的溶出曲线（*n*=6）

Fig.2　Dissolution Curves of Reference Preparation (Batch No.8132) in Media Contaning Different Concentratioons of SDS (*n*=6)

出曲线的相似性：若 $50 \leqslant f_2 \leqslant 100$，可认为 2 条溶出曲线相似，即二者的溶出量平均差异 <10%。除上述 3 种介质以外，参考 **1** 进口注册标准（JX201300），增加 pH 6.0 溶出介质，比较 **1** 自制片剂与原研片在上述 4 种溶出介质中溶出曲线的 f_2 值。结果见表 1，原研片和自制 **1** 片剂在 4 种溶出介质（pH 6.0 磷酸盐缓冲液、0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液）中的溶出曲线间的 f_2 值均大于 50，具有与原研药相似的溶出特性。

表 1　自制 1 片剂在不同溶出介质中的 f_2 值

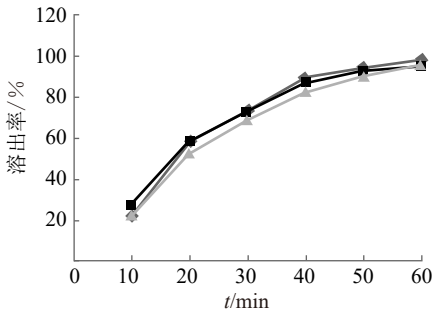
Tab.1　f_2 Values of the Self-made Tablets in Different Dissolution Media

溶出介质	f_2		
	批号20200818	批号20200913	批号20201015
pH 6.0磷酸盐缓冲液	65.66	69.29	68.57
0.3% SDS水溶液	70.82	68.18	69.34
含0.7% SDS的pH 1.2盐酸	69.77	68.72	68.43
含0.5% SDS的pH 4.5乙酸盐缓冲液	65.97	66.96	66.54

2.6　方法学验证

2.6.1　滤膜吸附试验

本试验经筛选确定 4 种溶出介质（pH 6.0 磷酸盐缓冲液、0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液），使



◆－0.3% SDS水溶液；■－pH 4.5，含0.5% SDS；
▲－pH 1.2，含0.7% SDS

图 3　参比制剂（批号 8150）在不同溶出介质中的溶出曲线（*n*=6）

Fig.3　Dissolution Curves of Reference Preparation (Batch No.8150) in Different Media (*n*=6)

用 0.45 μm 水相滤膜，采用原料药与原料药加辅料的方式代替溶出液以考察滤膜对 **1** 的吸附作用。由于滤膜对不同浓度药物的吸附作用可能不同，因此使用 20%及 100%浓度水平的样品进行考察。

分别称取 **1** 原料药 1.76、8.80 mg，置 200 ml 量瓶中，加入乙腈 10 ml，超声溶解，分别用 4 种溶出介质定容，取上清液即得浓度水平分别为 20%及 100%的 **1** 原料药供试品溶液；分别向上清液中加入辅料 220 mg，即得浓度水平分别为 20%及 100%的 **1** 原料药 + 辅料供试品溶液。分别取上述溶液，经 0.45 μm 滤膜过滤，分别弃去初滤液 1、

3、5、7 ml 后，取续滤液 10 μl，及“**2.2**”项下的对照品溶液 10 μl，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以峰面积计算回收率及吸附率。结果显示，在 4 种溶出介质中，**1** 原料药供试品溶液及 **1** 原料药 + 辅料供试品溶液在使用 0.45 μm 滤膜过滤后，回收率均为 98%～ 102%，且吸附率在 ±2%内，可见 0.45 μm 滤膜对 **1** 无吸附作用。

2.6.2 线性试验

精密称取 **1** 对照品 4 份，每份约 44 mg，分别置 100 ml 量瓶中，分别加入“**2.6.1**”项下经筛选确定的 4 种溶出介质，溶解并稀释制成 **1** 质量浓度（*c*）约为 4.4、8.8、26.4、44.4、52.8、66.0 μg/ml 的线性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定并记录色谱图，以峰面积（*A*）为纵坐标、*c* 为横坐标进行线性回归。结果显示，**1** 在 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中的线性方程分别为 A=29.617c+4.529、A=29.763c+10.021、A=29.936c+6.624、A=29.771c+9.027，R^2 分别为 1.000 0、0.999 8、0.999 9、0.999 9，说明 **1** 在 4.4 ～ 66.0 μg/ml 内线性关系良好。

2.6.3 检测限与定量限

取“**2.2**”项下对照品溶液，逐级稀释，分别取 10 μl 按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以信噪比为 10 和 3 计算定量限和检测限。结果显示，**1** 的定量限为 0.207 μg，检测限为 0.104 μg。

2.6.4 准确度试验

称取 **1** 对照品 4 份，每份约 55 mg，置 25 ml 量瓶中，分别加入“**2.6.1**”项下经筛选确定的 4 种溶出介质，溶解并定容作为准确度贮备液。分别称取相当于处方量 50%、100%、150%的空白辅料各 12 份，置 100 ml 量瓶中，加入上述 4 种准确度贮备液 1、2、3 ml，分别用相应的介质定容，摇匀过滤，作为准确度供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，按外标法照上述测定条件测定峰面积，计算回收率。结果显示，**1** 在 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中的平均回收率（n=12）分别为 100.35%、100.11%、100.09%、100.08%，RSD 分别为 0.93%、0.86%、1.46%、0.98%，均小于 2.0%，说明该方法准确度好。

2.6.5 重复性试验

按“**2.6.4**”项下辅料添加浓度为 100%的准确度贮备液制备方法平行配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算回收率，结果显示，**1** 在 pH 6.0 磷酸盐缓冲液、0.3% SDS 水溶液、含 0.7% SDS 的 pH 1.2 盐酸及含 0.5% SDS 的 pH 4.5 乙酸盐缓冲液中的平均回收率（n=6）分别为 100.17 %、100.24 %、100.16 %、99.88 %，RSD 分别为 0.99 %、1.03 %、0.78 %、0.90 %，均小于 2%，表明方法重复性良好。

2.6.6 稳定性试验

取“**2.6.1**”项下浓度水平为 100%的 **1** 原料药供试品溶液，室温放置，分别于 0、2、4、6、8、12、24、48、72 h 时按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算峰面积与 0 h 峰面积的比值（回收率）。结果见表 2，可见各样品在 72 h 内稳定性良好。

表 2 稳定性试验结果

Tab.2 Results of the Stability Test

时间/h	回收率/%			
	含0.7% SDS的pH 1.2盐酸	含0.5% SDS的pH 4.5乙酸盐缓冲液	pH 6.0磷酸盐缓冲液	0.3% SDS水溶液
0	100.00	100.00	100.00	100.00
2	100.14	100.01	99.83	100.01
4	100.08	99.99	99.95	99.83
6	100.17	100.08	99.96	99.93
8	100.25	99.99	99.90	100.03
12	100.22	99.66	99.72	100.06
24	99.64	99.88	99.60	99.47
48	99.44	99.31	99.04	99.25
72	99.55	99.55	99.26	99.32

2.6.7 耐用性试验

分别考察流动相比例 ±3 %、流速 ±5 %、柱温 ±5%、波长 ±5 nm、色谱柱及设备等变化的影响。精密量取“**2.2**”项下对照品溶液及“**2.6.1**”项下浓

度水平为100%的**1**原料药供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果表明，在各个微调条件下，主成分峰面积的RSD（n=8）均小于2.0%，说明方法耐用性良好。

3　小结

1在酸度较大的条件下溶解度较低，随着酸度的降低溶解度逐渐增大，通过溶解度试验结果可知，**1**属于难溶性药物且有pH依赖性。考虑到在pH值较小时，pH值的微小变化可能会引起较大的误差，因此重点考察指导原则推荐的溶出条件，通过考察SDS的浓度[7—8]，最终筛选得到了具有区分力的4种溶出介质。试验结果表明，在不同条件下自制片剂和原研片剂溶出曲线的f_2均大于50。此外，本试验对**1**片的溶出度检测方法进行了验证，各项验证结果均符合规定，表明该方法良好。溶出曲线相似性评价结果表明，自制片剂与原研片剂在各溶出介质中的溶出行为基本相似，使用多批次的自制样品也能有效避免因样品间差异导致的生物不等效的风险，为仿制药一致性评价提供了试验依据。

参考文献：

[1] WHITE W B, SAAG K G, BECKER M A, *et al*. Cardiovascular safety of febuxostat or allopurinol in patients with gout [J]. *N Engl J Med*, 2018, **378**(13): 1200-1210.

[2] LTD B P G. Cardiovascular safety of febuxostat and allopurinol [J]. *Drug Ther Bulletin*, 2018, **56**(6): 63-65.

[3] 申　筠, 薄　艳. 非布司他治疗痛风及高尿酸血症临床研究及应用进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, **31**(10): 1107-1108.

[4] 国家食品药品监督管理总局. 人体生物等效性试验豁免指导原则[EB/OL]. [2021-01-02]. http://www. sfda. gov. cn/WS01/CL0087/153483. html.

[5] 国家食品药品监督管理总局. 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则[EB/OL]. [2021-01-02]. http://www. sfda. gov. cn/WS01/CL0087/147583. html.

[6] FDA. Drug databases: dissolution methods [EB/OL]. [2021-01-02]. http://www. accessdata. fda. gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults. cfm.

[7] 谢沐风. 具有区分力的溶出曲线[J]. 中国医药工业杂志, 2014, **45**(7): 687-689.

[8] 王亚敏. 浅谈溶出度检查方法的分辨力[J]. 药物分析杂志, 2012, **32**(11): 2094-2096.