

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.17.001

· 基础研究 ·

乙酰唑胺缓释胶囊的制备与体外释放评价*

杨茜¹ 张新蕊² 李蒙² 刘婷² 郑爱萍^{2Δ}

(1 国家药典委员会 北京 100061; 2 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所 北京 100850)

摘要目的:采用挤出滚圆工艺制备乙酰唑胺缓释微丸,并进行体外释放评价。**方法:**采用离子交换色谱法测定参比制剂中功能性辅料十二烷基硫酸钠的处方含量。参照参比制剂处方组成,以水不溶性的微晶纤维素作为缓释微丸的骨架材料,羟丙基纤维素水溶液作为粘合剂,通过挤出和滚圆过程使得微丸成为致密的类球体,从而缓慢的释放药物。以软材粘性和释放曲线作为主要考察指标,采用挤出滚圆工艺制备乙酰唑胺缓释微丸,微丸干燥后灌装硬胶囊。分别测定自制制剂和参比制剂在 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 4.5 乙酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和纯水介质中的释放曲线,采用相似因子(f_2)法比较释放曲线的相似性。**结果:**自制制剂与参比制剂的辅料种类和用量基本一致,微丸的制备工艺较为简便,在不同介质中均能缓慢释放药物,且自制制剂和参比制剂在不同介质中的释放曲线趋势相似,释放曲线的相似因子(f_2)数值均大于 50。**结论:**自制制剂的体外释放行为与参比制剂相比具有一致性。

关键词:乙酰唑胺;缓释;挤出滚圆;体外释放

中图分类号:R944.9;R965 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)17-3201-04

Preparation and in vitro Release of
Acetazolamide Extended-release Capsules*YANG Xi¹, ZHANG Xin-rui², LI Meng², LIU Ting², ZHENG Ai-ping^{2Δ}

(1 Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing, 100061, China; 2 Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing, 100850, China)

ABSTRACT Objective: To prepare acetazolamide extended-release pellets by extrusion-spheronization process and assess its release behavior in vitro. **Methods:** Ion exchange chromatography was applied to determine the content of sodium lauryl sulfate as the functional excipient in the formulation of the reference listed drug. According to the formulation analysis of the reference listed drug, the water-insoluble microcrystalline cellulose was used as the matrix material of extended-release pellets, and the hydroxy propyl cellulose aqueous solution was used as the adhesive excipient. Through extrusion-spheronization process, the pellets became dense spheroids, so as to slowly release the drug. When viscosity of damp mass and release curves of capsules were considered as the main indexes, acetazolamide extended-release pellets were prepared by extrusion-spheronization process, dried and filled into capsules. The release curves of the self-made preparation and the reference drug in pH1.2 hydrochloric acid solution, pH 4.5 acetate buffer, pH 6.8 phosphate buffer and water were determined respectively. And the similarity factor (f_2) method was used to compare the similarity of the release curves between two formulations. **Results:** The types and amounts of excipients of the self-made preparation and the reference listed drug are basically the same. The preparation process of the pellets is relatively simple. And drugs can be released slowly from the self-made preparation in four different media. The release curve trends of the self-made preparation and the reference listed drug in four different media were basically similar, and the similarity factor (f_2) values of the release curve between two formulations were all above 50. **Conclusion:** The release behavior in vitro of the self-made preparation was consistent with that of the reference listed drug.

Key words: Acetazolamide; Extended-release; Extrusion-spheronization; Release in vitro

Chinese Library Classification (CLC): R944.9; R965 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)17-3201-04

前言

乙酰唑胺是第一代碳酸酐酶抑制剂,能够抑制肾小管上皮

细胞内碳酸酐酶活性,产生利尿作用;还可以抑制睫状体的碳酸酐酶,抑制房水生成,降低眼内压;减少脑脊液的生成;增加动脉血的血氧饱和度,缓解高原反应症状^[1-3]。美国上市的乙酰

* 基金项目:国家重大新药创制项目(2013ZX09402103)

作者简介:杨茜,女,博士,助理研究员,研究方向:制剂技术与质量控制,E-mail: zzyx1119@126.com

Δ 通讯作者:郑爱萍,女,博士,研究员,研究方向:纳米技术药物和仿生智能递药系统

(收稿日期:2024-03-27 接受日期:2024-04-23)

唑胺制剂包括乙酰唑胺片、乙酰唑胺缓释胶囊剂和注射用乙酰唑胺,是FDA批准该适应症的唯一药物。目前国内上市的乙酰唑胺制剂仅有普通片剂,规格为0.25 g,批准适应症为治疗各型青光眼以及内眼手术前降低眼压^[4,5]。而近年来,随着乙酰唑胺片剂在临床上使用增加以及超说明书用药(急性高原病),其不良反应如急性肾病、低血钾症、剥脱性皮炎等报道也逐渐增多^[6,7]。因此,有必要对乙酰唑胺缓释制剂进行研究和仿制开发。

本文以国家药监局发布的仿制药参比制剂目录(第二十六批)中的乙酰唑胺缓释胶囊(美国橙皮书收录)作为参比制剂,采用挤出滚圆工艺制备了缓释微丸并灌装硬胶囊,以相似因子 f_2 作为体外释放曲线评价指标,考察自制制剂和参比制剂在4种介质中体外释放度的一致性,以期为乙酰唑胺缓释胶囊的制剂开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

BT-25S 电子天平(德国 Sartorius);Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo);882 型离子色谱仪(瑞士万通);U-3010 紫外分光光度计(日本日立);FE48 型 pH 计(德国 Sartorius);RC806D 溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);CSB-SHAC 恒温水浴振荡器(常州金坛良友仪器有限公司);HLSH 1-3 湿法混合制粒机(中航工业北京航空制造工程研究所);E-250 型单螺杆挤出机(重庆英格制药机械有限公司);S-250 型抛丸机(重庆英格制药机械有限公司);MINI Glatt 实验型流化床(德国 Glatt GmbH);HE53 型水分测定仪(瑞士梅特勒托利多);JSM7900F 型扫描电子显微镜(日立仪器有限公司)。乙酰唑胺缓释胶囊(美国 Heritage Pharmaceuticals Inc.,规格 500 mg,批号 18031315);乙酰唑胺对照品(美国 USP 提供,纯度:99.7%,K1J032);乙酰唑胺原料药(双鹤药业,H4018190603);微晶纤维素(日本 Asahi Kasei,1854),十二烷基硫酸钠(德国 BASF,180509),羟丙基纤维素(日本曹达,NGL0231),滑石粉(龙胜华美,201811115),硝酸(Sigma-Aldrich,170227),2,6-吡啶二甲酸(Sigma-Aldrich,180325)。

1.2 方法

1.2.1 参比制剂解析 本研究以 Heritage Pharmaceuticals Inc.生产的乙酰唑胺缓释胶囊作为参比制剂,规格为 500 mg。FDA 橙皮书收录该药品的说明书,其处方组成为:乙酰唑胺、微晶纤维素、羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠和滑石粉。其中,乙酰唑胺为活性成分,微晶纤维素为骨架材料,羟丙基纤维素为粘合剂,十二烷基硫酸钠为润湿剂和增溶剂,滑石粉为润滑剂和助流抗粘剂。随机选取参比制剂胶囊 5 粒,称量胶囊内容物的重量,均值为 635 ± 2 mg。即每粒胶囊中含有乙酰唑胺 500 mg,其它辅料 135 mg。

在该参比制剂的处方组成中,十二烷基硫酸钠是润湿剂和增溶剂,为功能性辅料,可能影响药物在体内的吸收。因此,采用离子交换色谱法,通过测定样品溶液中阳离子 Na^+ 的浓度(药物分子和其它辅料均不含 Na^+),得到参比制剂中十二烷基硫酸钠的含量。以硝酸-吡啶二甲酸水溶液作为离子交换色谱的流动相。将 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $25 \mu\text{g/mL}$ 十二烷基硫酸钠溶液分别进样,得到工作曲线。样品

溶液的制备:称取参比制剂内容物的研细粉末 500 mg 于 50 mL 容量瓶中,加入流动相摇匀,定容至刻度,离心并滤过,取续滤液进样。平行测定 3 粒胶囊,并考察加样回收率。

1.2.2 扫描电镜观察参比制剂微丸形态 将参比制剂胶囊中的微丸取出,部分微丸用小刀从中间剖开,采用扫描电镜观察微丸的表面形态和横截面样貌。

1.2.3 pH-溶解度曲线 取过量原料药,置 8 支具塞试管中,分别加入 pH 1.0、pH 2.0、pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 和 pH 8.0 溶出介质适量,置 37°C 水浴振荡 12 h,使之形成过饱和溶液,离心并滤过,取续滤液经适当稀释后在波长 265 nm 处测定吸光度,计算溶解度,绘制 pH-溶解度曲线。

1.2.4 微丸的制备 以软材粘性和释放曲线作为处方及工艺筛选的主要考察指标^[8-10]。小试处方工艺每批按照 500 粒胶囊投料。最终筛选得到的处方组成和制备工艺如下:将乙酰唑胺(过 40 目筛)250 g、微晶纤维素 PH101 33 g(抛丸时还需要外加少量)、羟丙基纤维素 SL 7.0 g、十二烷基硫酸钠 1.2 g 和滑石粉 7.6 g,高速混合 5 min,再加入粘合剂(羟丙基纤维素 SL 水溶液,浓度为 12%)适量,高速剪切混合制得软材。软材经筛板(孔径 0.6 mm)挤出,所得条状物料置抛丸机的转盘内,在挤出速度 $30 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、滚圆速度 $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、滚圆时间 30 s 条件下进行操作,滚圆成微丸^[11-16]。流化床 60°C 干燥至微丸含水量为 2%~3%,过 20 目筛。采用高效液相色谱,以外标法测定自制微丸中乙酰唑胺的含量,根据测定结果灌装硬胶囊。

1.2.5 释放曲线 照溶出度与释放度测定法(中国药典 2020 年版四部通则 0931)第二法测定自制制剂和参比制剂的释放度。分别以 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和纯水作为释放介质,介质体积为 900 mL,浆的转速为 $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,介质温度为 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$,分别在 1、2、5、7、9、12、14 h 取样 3 mL(同时补加同温等量的释放介质)^[17-21]。经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液。采用紫外可见分光光度法,在 265 nm 波长处测定吸光度(续滤液可经适当稀释),计算自制制剂和参比制剂在不同取样时间点的累积释放度。

1.2.6 相似因子 f_2 采用相似因子(f_2)法对参比制剂和自制制剂在不同介质中释放曲线的相似性进行评价。将自制制剂的平均释放量与参比制剂的平均释放量进行平行比较,平均释放量为 12 粒胶囊释放量的均值。本研究选用 3 个取样时间点(1 h、5 h、14 h)进行相似因子 f_2 的计算。根据国家药品监督管理局药品审评中心发布的《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》中对相似性分析的结果判定,当两条溶出曲线相似因子(f_2)数值不小于 50 时,可认为溶出曲线相似^[22]。

$$\text{计算公式: } f_2 = 50 \cdot \lg \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{0.5} \cdot 100 \right\}$$

R_i 为 t 时参比制剂的平均释放量;

T_i 为 t 时自制制剂的平均释放量;

n 为释放曲线取样时间点的个数。

2 结果

2.1 参比制剂中十二烷基硫酸钠的含量

将样品溶液中十二烷基硫酸钠对应的色谱峰面积代入工作曲线,以外标法计算十二烷基硫酸钠的含量,结果为 0.36%

(w/w),在后续自制微丸的小试处方工艺摸索中固定该比例。

2.2 扫描电镜观察参比制剂微丸形态

扫描电镜照片显示,参比制剂胶囊中微丸的大小比较均一,平均粒径约为 700 μm ,形态为类球形。微丸表面不平整光

滑,未观察到成膜材料,且横截面边缘未见有包衣层,以上信息提示参比制剂所含微丸并非膜控型缓释微丸,推断其为骨架型缓释微丸,见图 1。

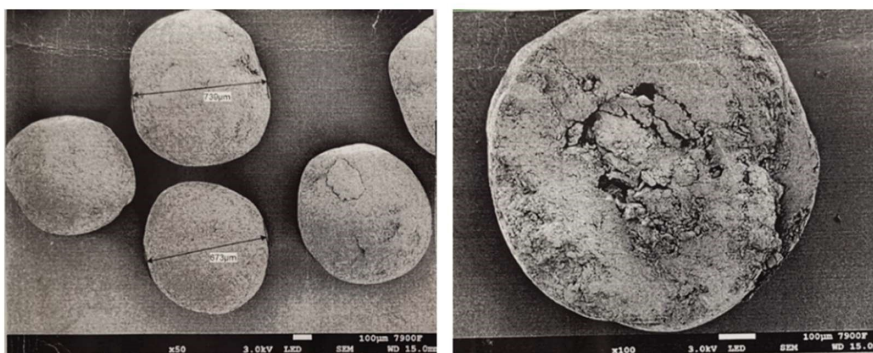


图 1 扫描电镜观察参比制剂中微丸的表面和横截面形态

Fig.1 Surface and cross section morphology of pellets of the reference listed drug observed by scanning electron microscopy

2.3 pH- 溶解度曲线

经测定乙酰唑胺的 pH- 溶解度曲线,结果显示,根据 2020 年版《中国药典》四部凡例中对溶解度的规定,在 pH 1.0 至 pH 8.0 溶出介质中,乙酰唑胺的溶解度在极微溶解至微溶之间,不具有明显的 pH 依赖性,见图 2。

2.4 释放曲线评价

自制制剂和参比制剂在 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 4.5 乙酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和纯水的释放介质中,其释放曲线趋势均基本相同,药物均缓慢释放,见图 3。

2.5 相似性评价

采用相似因子(f_2)法对参比制剂和自制制剂在不同介质中释放曲线的相似性进行评价。在本项研究中,参比制剂和自制制剂在 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 4.5 乙酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和纯水的释放介质中, f_2 均大于 50,见表 1,即四条释放曲线的相似性分析结果均为相似。

3 讨论

将药物制备为缓释微丸能够增加药物在人体内的作用时间,减少用药次数,减小血药浓度波动,降低药物副作用。根据处方、组成结构及释药机制不同,目前缓释微丸主要分为骨架

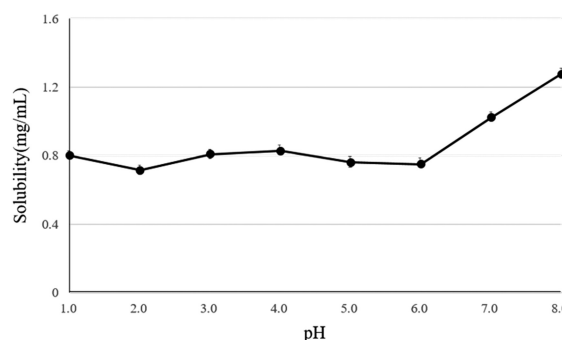


图 2 乙酰唑胺 pH- 溶解度曲线(n=3)

Fig.2 pH-solubility curve of acetazolamide (n=3)

型微丸和膜控型微丸^[23]。本研究采用挤出滚圆法,通过处方工艺优化,仿制开发了乙酰唑胺缓释胶囊,内容是骨架型微丸。微丸的制备过程分为五步:(1)原辅料的混合;(2)软材的制备;(3)软材的挤出;(4)微丸的滚圆;(5)微丸的干燥。我们制备的缓释微丸以水不溶性的微晶纤维素作为骨架材料,在粘合剂的作用下,通过挤出和滚圆过程使得微丸成为致密的类球体,从而缓慢的释放药物。该方法操作比较简单,经过处方工艺优化得到的自制微丸圆整度较高,粒径均匀,收率高。在挤出和滚圆

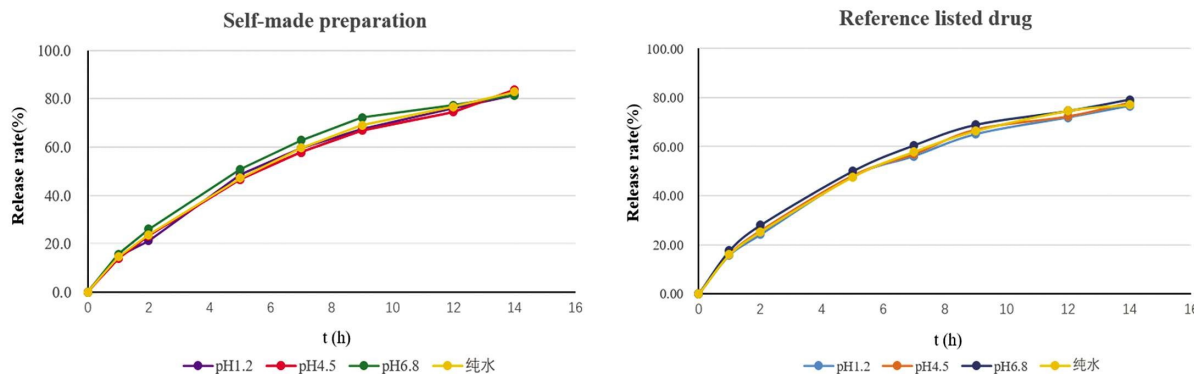


图 3 自制制剂和参比制剂在四种不同介质中的释放曲线

Fig.3 Release curves of the self-made preparation and reference listed drug in four different media

表 1 采用相似因子(f_2)法比较自制制剂和参比制剂在不同介质中释放曲线的相似性Table 1 The similarity factor (f_2) used to compare the similarity of release curves between the self-made preparation and the reference listed drug in different media

Media	pH1.2 hydrochloric acid solution	pH 4.5 acetate buffer	pH 6.8 phosphate buffer	Water
Similarity factor	75	71	84	72
Similarity analysis	similar	similar	similar	similar

工艺中,水分含量,微丸滚圆速度和停留时间是影响微丸性能的主要因素。在此基础上,以软材粘性和释放曲线作为主要考察指标,对自制微丸进行了处方工艺优化。参比制剂处方组成中按质量比计算,药物占 79%,辅料占 21%,因此辅料用量的调整空间较小。由于处方组成中十二烷基硫酸钠为功能性辅料,其用量可能引起缓释微丸体外溶出和体内吸收的显著差异,因此采用离子色谱法测定了参比制剂中其处方用量。粘合剂羟丙基纤维素的配制浓度和加入体积对软材粘性有着显著影响,直接影响挤出和滚圆的制备过程。此外,滑石粉并非在总混时加入作为润滑剂,而是在制软材时内加,起到助流抗粘和润滑的作用。

在释放曲线评价中,我们通过模拟人体胃肠道生理环境,发现得到的自制制剂在模拟胃液(0.1 mol/L HCl 溶液)、模拟十二指肠液(pH4.5 磷酸缓冲液)、模拟小肠液中(pH6.8 磷酸缓冲液)中^[9],药物均能缓慢释放,在人体胃肠道正常排空时间 6 小时内未见药物突释。得到的自制制剂与参比制剂相比,在四种不同的释放介质中的释放曲线的相似因子(f_2)数值均大于 50,显示自制制剂与参比制剂的体外释放行为具有一致性^[24,25]。乙酰唑胺缓释胶囊尚未进口国内,目前国内也没有仿制药上市。该药品用于预防和治疗急性高原病的市场需求广阔,本文为该药品的研制和开发提供了借鉴和参考。

参考文献(References)

- [1] 马慧萍,贾正平. 乙酰唑胺预防急性高原病的研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2010, 26(3): 262-264.
- [2] 施冰,薛大卫. 长春西汀、乙酰唑胺、红景天三种药物防治急性高原病的效果比较研究[J]. 现代医学与健康研究, 2022, 6 (17): 68-71.
- [3] 曹成珠,张欢,张伟,等. 乙酰唑胺对急性低氧应激雄性大鼠肺通气功能及动脉血气的影响[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2022, 43 (2): 83-90.
- [4] 李谷辛,张振中,冯凡,等. 乙酰唑胺缓释胶囊体内外一致性评价研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2547-2552.
- [5] 梅芊,李茜,刘英. 柱前衍生化 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 法测定乙酰唑胺及其胶囊剂中脘的含量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1467-1472.
- [6] 陈茂玲,梁光江,马淑媚. 乙酰唑胺的不良反应文献分析[J]. 中国实用医药, 2010, 5(27): 162-164.
- [7] 曹成珠,吴穹. 乙酰唑胺防治急性高原病的疗效与安全性的研究进展[J]. 高原医学杂志, 2021, 31(4): 59-63.
- [8] 李欣,刘琳娜. 挤出-滚圆法制备枸橼酸莫沙必利骨架缓释微丸[J]. 解放军药学学报, 2010, 26(1): 4-6.
- [9] 张永强,刘新友,杨鹏,等. 甘草次酸结肠靶向微丸的研制 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17, (3): 425-428.
- [10] 郑林,邓盛齐,陶静,等. 帕利哌酮缓释微丸的处方优化[J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(2): 224-229.
- [11] Tian Wenxiu, Lin Xiao, Hong Yanlong, et al. Influence of Extrudate-Based Textural Properties on Pellet Molding Quality [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(10): 1505-1509.
- [12] 蔡翠芳,毕殿洲,毛世瑞. 挤出滚圆法制备氢溴酸右美沙芬骨架缓释微丸[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 313-316.
- [13] 曹淑忠,陈美丽,李美. 挤出滚圆法制备盐酸索他洛尔骨架缓释微丸[J]. 药学研究, 2013, 32(3): 162-164.
- [14] 张雪,洪燕龙,徐德生. 挤出滚圆法制备微丸中软材特征物理性质的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(4): 387-391.
- [15] 狄媛,李盛华,姜庆伟,等. 挤出-滚圆法制备微丸的影响因素研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(19): 1512-1514.
- [16] 李悦,邢建国,杨秀,等. 挤出滚圆法制备香青兰黄酮骨架型微丸 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 1-4.
- [17] 苗国力,郭洪涛,崔芹芹,等. 盐酸文拉法辛缓释胶囊的制备及释放度研究[J]. 山东化工, 2023, 52, 48-53.
- [18] 刘新颖,许向阳,高梓真,等. 盐酸羟考酮缓释片体外释药特性研究[J]. 中国药业, 2023, 32(16): 52-56.
- [19] 王海莹,杨星钢,潘卫三,等. 多潘立酮片体外溶出的一致性评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(3): 238-242.
- [20] 汪忠军,赵月,邓黎,等. 琥珀酸去甲文拉法辛膜控与骨架结合型缓释微丸的制备及释放特性研究 [J]. 华西药学杂志, 2018, 33(2): 26-30.
- [21] 余裕炳,涂家生. 硝苯地平骨架型和膜控型缓释微丸的制备及比较[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 235-238.
- [22] 国家药品监督管理局药品审评中心. 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则[EB/OL]. 2016.
- [23] 盘叶花,奉建芳,刘雪梅,等. 缓释微丸的研究进展[J]. 广西医学, 2021, 43(10): 1245-1248.
- [24] 赵娜,石靖. 口服固体仿制药体外一致性评价中的非常规研究及常见问题解析[J]. 药学学报, 2021, 56(06): 1739-1744.
- [25] 倪冬胜,孙井龙,桂双英,等. 米拉贝隆缓释片自研品与参比制剂体外释放一致性评价研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1058-1068.