

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.05.016

阿莫西林胶囊溶出度测定方法研究*

沈川¹,程义¹,曾令高^{2,3},姜学美^{2,3},沈丹丹^{2,3,△}

(1. 重庆市綦江区人民医院,重庆 401420; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院,重庆 401121; 3. 国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室,重庆 401121)

摘要:目的 考察紫外-可见分光光度(UV-Vis)法与高效液相色谱(HPLC)法测定阿莫西林胶囊溶出度的差异。方法 UV-Vis法测定波长为272 nm;HPLC法色谱柱为Inertsil ODS C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用2 mol/L氢氧化钾溶液调节pH至5.0)-乙腈(97.5:2.5, V/V),检测波长为254 nm,进样量为20 μL,流速为1.0 mL/min。分别以水、pH 1.2的盐酸氯化钠溶液、pH 4.0的醋酸盐缓冲液、pH 6.8的磷酸盐缓冲液为溶出介质,采用篮法(转速为100 r/min)测定原研产品(参比制剂)的体外溶出量。结果 测定参比制剂在以上4种溶出介质中120 min时的溶出度,UV-Vis法分别为109.53%,115.64%,110.02%,114.72%,HPLC法分别为102.54%,77.11%,101.09%,102.24%。结论 HPLC法简单、准确,可用于阿莫西林胶囊溶出度的定量测定,且消除了空胶囊壳的干扰,更能真实地反映产品在溶出介质中的溶出度,可用于阿莫西林胶囊的一致性评价。

关键词:阿莫西林胶囊;紫外-可见分光光度法;高效液相色谱法;溶出度;溶出曲线

中图分类号:R917;R978.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)05-0059-04

Dissolution Determination of Amoxicillin Capsules

SHEN Chuan¹, CHENG Yi¹, ZENG Linggao^{2,3}, JIANG Xuemei^{2,3}, SHEN Dandan^{2,3}

(1. Chongqing Qijiang District People's Hospital, Chongqing, China 401420; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121;

3. Chongqing Research Center for Drug Process and Quality Control Engineering, National Medical Products Administration, Chongqing, China 401121)

Abstract: **Objective** To investigate the difference in the dissolution of Amoxicillin Capsules determined by ultraviolet visible spectrophotometry(UV-Vis) and high-performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** The UV-Vis method was adopted with detection wavelength of 272 nm. The HPLC method was adopted with Inertsil ODS C₁₈ column(150 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L monobasic potassium phosphate solution(adjusted pH to 5.0 with 2 mol/L potassium hydroxide solution)-acetonitrile(97.5:2.5, V/V), the detection wavelength was 254 nm, the injection volume was 20 μL, and the flow rate was 1.0 mL/min. The dissolution of the original products(reference preparation) *in vitro* were determined by basket apparatus(the stirring speed was 100 r/min) with water, pH 1.2 hydrochloric acid sodium chloride solution, pH 4.0 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer as dissolution medium. **Results** The dissolution of the reference preparation in the above four dissolution medium within 120 min was 109.53%, 115.64%, 110.02%, 114.72% by UV-Vis method and 102.54%, 77.11%, 101.09%, 102.24% by HPLC method. **Conclusion** The HPLC method is simple and accurate, which can be used for the quantitative determination of the dissolution of Amoxicillin Capsules and eliminate the interference caused by empty capsule shell. It can reflect the dissolution of the product in the dissolution medium more accurately and can be used for the consistency evaluation of Amoxicillin Capsules.

Key words: Amoxicillin Capsules; UV-Vis; HPLC; dissolution; dissolution profile

阿莫西林胶囊可治疗多种细菌感染引起的疾病,包括喉炎、肺炎、皮肤感染、泌尿道感染等^[1],目前国内共有267个批准文号,涉及125,250,500 mg 3个规格。国外上市的主要发达国家有英国、美国及澳大利亚,英国比切姆公司生产的Amoxil® Capsules 250 mg是全球最早上市的阿莫西林胶囊,已在美国停售,目前仍在英国销售。2015年版《中国药典(二部)》(ChP 2015)^[2]、《美国药典(42版)》(USP 42)^[3]、《英国药典(2020版)》(BP 2020)^[4]及《日本药典(17版)》(JP 17)^[5]均收载有阿莫西林胶囊的质量标准,BP 2020未规定溶出度检查项,

其余各国溶出度测定方法均有差异,JP 17采用高效液相色谱(HPLC)法测定溶出度,ChP 2015(自身对照法)与USP 42(对照品对照法)均采用紫外-可见分光光度(UV-Vis)法。根据2017年原国家食品药品监督管理总局发布的《总局关于发布仿制药参比制剂目录(第三批)的通告》(2017年第65号),阿莫西林胶囊(规格为每粒按C₁₆H₁₉N₃O₅S计0.25 g)的原研参比制剂为Beecham Group plc的Amoxil®。本品所用明胶胶囊壳中含有多种色素着色剂,均未在中国、美国及日本上市,且各国上市的仿制品胶囊配色方案均各不相同。本研究中

*基金项目:国家科技重大专项-重大新药创制课题资助项目[2017ZX09101001]。

第一作者:沈川,男,大学本科,主治医师,研究方向为临床医学,(电子信箱)1311028093@qq.com。

△通信作者:沈丹丹,女,硕士研究生,工程师,研究方向为药物制剂与药物分析,(电子信箱)499258077@qq.com。

分别采用 UV-Vis 法及 HPLC 法测定原研产品在水、pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 4 种溶出介质中的溶出曲线,拟建立一种更加准确的阿莫西林溶出度测定方法,更加真实地反映阿莫西林胶囊的体外溶出度,为药物一致性评价过程中处方工艺优化提供借鉴。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪,包括 Waters 2489 型紫外检测器、Waters 色谱工作站(美国 Waters 公司);AT Xtend 型溶出度仪(瑞士 Sotax 公司);XP205 型电子天平(梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一);UV-2401 型紫外-可见分光光度计(日本岛津制作所)。

1.2 试药

阿莫西林对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 130409-201011,含量为 86.9%);阿莫西林胶囊(商品名 Amoxil[®],批号为 136,规格为每粒 0.25 g);磷酸二氢钾、氢氧化钾、醋酸钠三水合物、氯化钠、无水磷酸氢二钠、盐酸、醋酸均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

取样品,按 2015 年版《中国药典(四部)》溶出度与释放度测定法(通则 0931 第一法)^[6],分别以水、pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 900 mL 为溶出介质,转速为 100 r/min,依法测定,分别于 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 时取 10.0 mL,及时补充相同温度、相同体积的溶出介质,作为贮备溶液。

2.2 溶出度定量测定

2.2.1 UV-Vis 法

取 2.1 项下溶液适量,用 0.45 μm 混合纤维素酯滤膜滤过,弃去 3 mL 初滤液,精密量取续滤液适量,用溶出介质定量稀释成每 1 mL 中含阿莫西林(按 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ 计)130 μg 的溶液,作为供试品溶液。另取阿莫西林对照品适量,精密称定,用溶出介质溶解并定量稀释成每 1 mL 中含阿莫西林(按 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ 计)130 μg 的溶液,作为对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0401 UV-Vis 法,于 272 nm 波长处测定吸光度,计算各取样时间点溶出度,并绘制溶出曲线。结果见表 1 和图 1。可见,参比制剂在 4 种溶出介质中的溶出度均达 110%。原研胶囊壳成分包括明胶(囊材)、赤藓红(色素)、二氧化钛(遮光剂)、靛蓝(色素)、氧化铁黄(色素)和紫胶(色素),其色素可能干扰紫外测定,导致测定结果偏高。

表 1 UV-Vis 法测定阿莫西林胶囊参比制剂在不同溶出介质中各取样时间点的溶出度(%)

Tab. 1 Determination of dissolution of Amoxicillin Capsules reference preparation in different dissolution medium at different sampling time points by UV-Vis method(%)

溶出介质	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
水	34.82	50.74	59.61	76.88	94.44	102.61	108.82	109.53
pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液	91.61	107.18	107.43	110.09	111.76	113.14	114.16	115.64
pH 4.0 的醋酸盐缓冲液	33.31	52.14	62.32	82.43	98.85	103.00	108.27	110.02
pH 6.8 的磷酸盐缓冲液	54.45	78.03	87.64	103.61	109.82	111.80	113.22	114.72

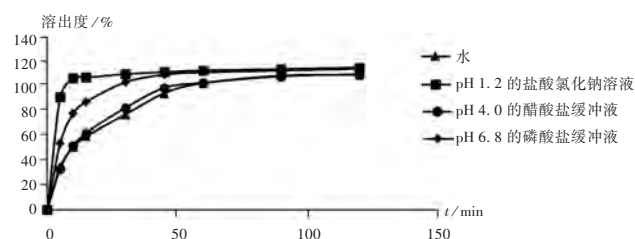


图 1 阿莫西林胶囊参比制剂在不同溶出介质中的溶出曲线 (UV-Vis 法)

Fig. 1 The dissolution profiles of Amoxicillin Capsules reference preparation in different dissolution medium (UV-Vis method)

2.2.2 HPLC 法

溶液制备:以水、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为溶出介质,取 2.1 项下溶液适量,用 0.45 μm 混合纤维素酯滤膜滤过,弃去 3 mL 初滤液,取续滤液,作为供试品溶液;以 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液为溶出介质,取续滤液 5.0 mL,置 25 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液(pH 6.8 磷酸盐缓冲液与水按 1:1 混合)稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。以水、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为溶出介质,取阿莫西林对照品适量,精密称定,用 3 种溶出介质溶解,并定量稀释成每 1 mL 含阿莫西林(按 $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ 计)278 μg 的溶液,作为对照品溶液;以 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液为溶出介质,精密量取溶液 5.0 mL,置 25 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,即得对照品溶液。

色谱条件:色谱柱为 Inertsil ODS C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 至 5.0)-乙腈(97.5:2.5, V/V);检测波长为 254 nm;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL 。

溶出度测定:取供试品溶液与对照品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算各取样时间点的溶出度,并绘制溶出曲线。结果见表 2 和图 2。结果阿莫西林胶囊在水、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中溶出度均达 100.00%,在 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液中溶出 10 min 后达到最大溶出度,随着时间的推移,溶出度呈下降趋势,这主要是由于阿莫西林在 pH 1.2

的盐酸氯化钠溶液中不稳定。且供试品溶液中均未检出阿莫西林,表明空胶囊壳中未能检出残留的阿莫西林,空胶囊壳中残留的阿莫西林不干扰参比制剂胶囊壳溶出度的测定结果。

表2 HPLC法测定阿莫西林胶囊参比制剂在不同溶出介质中各取样时间点的溶出度(%)

Tab.2 Determination of dissolution of Amoxicillin Capsules reference preparation in different dissolution medium at different sampling time points by HPLC method(%)

溶出介质	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
水	28.22	43.93	53.53	72.70	84.38	93.40	100.94	102.54
pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液	95.48	99.34	96.78	93.11	90.21	89.11	80.27	77.11
pH 4.0 的醋酸盐缓冲液	30.01	47.22	57.42	74.94	84.42	90.84	99.06	101.09
pH 6.8 的磷酸盐缓冲液	48.00	72.71	84.94	98.76	101.40	102.41	102.53	102.24

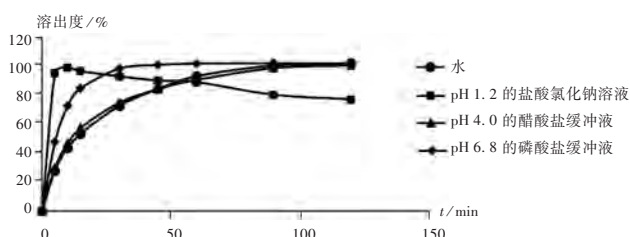


图2 阿莫西林胶囊参比制剂在不同溶出介质中的溶出曲线(HPLC法)

Fig.2 The dissolution profiles of Amoxicillin Capsules reference preparation in different dissolution medium (HPLC method)

2.3 胶囊壳溶出干扰试验

取原研参比制剂,倾出内容物,将胶囊壳用压缩空气吹干。取空胶囊壳,以水 900 mL 为溶出介质,按 2.1 项下方法配制供试品溶液。取溶液适量,分别按 2.2.1 及 2.2.2 项下方法操作,计算胶囊壳干扰值。结果见表 3。可见,原研制剂的空胶囊对紫外测定方法有干扰,不能采用 UV-Vis 法测定累积溶出量,故选择 HPLC 法测定。

表3 UV-Vis法测定参比制剂胶囊壳平均累积溶出干扰率(%)

Tab.3 Determination of interference rate of average cumulative dissolution of capsule shell of reference preparation by UV-Vis method(%)

时间	胶囊壳累积溶出干扰率	时间	胶囊壳累积溶出干扰率
5 min	0.04	45 min	3.83
10 min	2.42	60 min	4.04
15 min	2.88	90 min	4.53
30 min	3.61	120 min	4.72

2.4 自制样品与参比制剂溶出曲线比较

取样品,按 2.1 项下方法操作,取溶液适量,按 2.2.2 项下方法操作,精密量取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算各取样时间点的溶出度,并绘制溶出曲线。结果见表 4 和图 3。

计算差异因子(f_1)与相似因子(f_2)。结合图 2 参比制剂溶出曲线,在 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液中均能在 15 min 内溶出 85% 以上,随着时间的推移,溶出度均呈下降趋势。在这种情况下,药物吸收的限速步骤是胃排空。在禁食状态下,胃排空 50% 所需的平均时间为 15~20 min。因此,如果药物在温和溶出试验条件下,15 min 内在 0.1 mol/L 的盐酸溶液中溶出 85%,类似于溶液,通常应无任何生物利用度问题。按照普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则^[7],受试制剂与参比制剂的溶出曲线 f_1 值和 f_2 值的比较和计算应满足以下 2 个条件:1)受试制剂与参比制剂应在完全相同的条件下测定溶出曲线,且 2 条曲线的取样点应相同;2)药物溶出度超过 85% 的取样点不超过 1 个。故本研究选取了在水、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中 5, 10, 15, 30, 45, 60 min 的取样点计算 f_1 值和 f_2 值,自制样品与参比制剂溶出度数据的 f_2 值分别为 67.04, 72.59, 63.50, 均大于 50, f_1 值分别为 7.74, 5.63, 6.58, 均小于 10,符合美国食品药品监督管理局(FDA)《口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》及日本厚生劳动省医药品食品监督管理局《仿制药生物等效性试验指导原则》对于溶出曲线相似性的判定标准,提示自制样品与参比制剂具有相似的溶出行为。

表4 HPLC法测定自制样品在不同溶出介质中各取样时间点的溶出度(%)

Tab.4 Determination of dissolution of self-made products in different dissolution medium at different sampling time points by HPLC method(%)

溶出介质	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
水	23.44	38.53	49.00	68.40	81.33	91.14	99.21	101.36
pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液	90.90	96.77	95.81	92.42	88.85	87.33	83.54	79.04
pH 4.0 的醋酸盐缓冲液	26.90	43.24	55.48	70.56	81.33	88.55	100.40	100.74
pH 6.8 的磷酸盐缓冲液	42.42	68.63	77.64	95.73	100.10	100.91	101.21	101.00

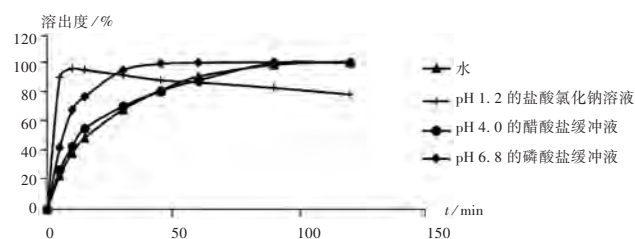


图3 自制样品在不同溶出介质中的溶出曲线(HPLC法)

Fig.3 The dissolution profiles of self-made products in different dissolution medium (HPLC method)

3 讨论

3.1 UV-Vis法与HPLC法的溶出曲线差异比较

本研究中采用 USP 40 UV-Vis 对照品对照法及 ChP 2015 二部阿莫西林胶囊含量测定 HPLC 法分别测定阿莫西林胶囊在 4 种溶出介质中的溶出度并绘制溶

出曲线。结果发现,采用 UV-Vis 法测定的累积溶出量均达到 110%,测定结果偏高,但采用 HPLC 法测定阿莫西林胶囊在水、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中的溶出度均在 100% 左右,与 UV-Vis 对照品法测定结果比较,HPLC 法测定结果更准确。比较 UV-Vis 法与 HPLC 法测定溶出曲线的差异,可能主要由以下原因引起:1)胶囊壳干扰 UV-Vis 测定。Amoxil® 所用明胶胶囊壳中含有多种色素着色剂(赤藓红、靛蓝、氧化铁黄和紫胶),在紫外光测定条件下存在干扰。而本品未在中国、美国及日本上市,且各国上市的仿制品胶囊的配色方案又各不相同,不同色素在 272 nm 波长处的吸收值也各不相同,故对于 UV-Vis 法的测定存在不同程度的干扰或毫无干扰。2)杂质干扰 UV-Vis 法测定。根据 USP 42 收载的阿莫西林原料杂质谱,阿莫西林共有 11 个已知杂质,各杂质在 272 nm 波长处可能有一定吸收,从而影响测定结果的准确性。3)每次溶出曲线测定的误差及胶囊装量差异。

本研究中,胶囊壳溶出干扰试验结果,Amoxil® 胶囊壳在 0,5,10,15,30,45,60,90,120 min 时的干扰值均接近 5%,随着时间的推移,胶囊干扰率呈增加趋势,表明胶囊壳也是一个溶出过程。虽然《中国药典(四部)》^[6]建议空胶囊的干扰低于 2% 时可忽略,干扰较大时可采用空白胶囊校正法测定。但在测定溶出曲线时,不同时间点的胶囊干扰值是不同的,因此无法统一扣除胶囊的干扰,而且各企业产品的胶囊着色剂也不同,因此无法建立统一的校正方案。

3.2 HPLC 法定量测定

本研究中采用了阿莫西林胶囊溶出度 HPLC 法定量测定方法,对 4 种溶出介质均进行了方法学验证。由于阿莫西林在酸性条件下不稳定,因此对以 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液作为介质的供试品溶液进行了处理。试验时立即取续滤液 5.0 mL,置 25 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,测得此溶液 pH 在 6.0~7.0,溶液稳定性试验结果表明,此溶液在 10 h 内稳定。HPLC 法测得阿莫西林胶囊在 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液中溶

出曲线与日本橙皮书中收载的阿莫西林颗粒在 pH 1.2 的盐酸氯化钠溶液中溶出曲线趋势基本一致^[8-9],表明阿莫西林胶囊对酸不稳定,在试验过程中不断降解。而 UV-Vis 对照品法测定的溶出曲线开始呈上升趋势,达到平衡后趋于稳定,在 120 min 时溶出度为 115.64%,进一步表明采用 HPLC 法测定可消除降解杂质的干扰,测定结果更真实、准确。

3.3 研究价值

UV-Vis 法及 HPLC 法测定阿莫西林胶囊在 4 种溶出介质中的溶出度并绘制的溶出曲线结果差异较大,UV-Vis 法定量测定中,胶囊及杂质均可干扰阿莫西林胶囊的溶出度,表明本研究中建立的 HPLC 法更加准确、真实,更能准确地反映原研产品在 4 种溶出介质中的溶出度,可用于阿莫西林胶囊溶出曲线的比较,对一致性评价中的溶出度测定具有重要指导意义。

参考文献

- [1] 于海晴. 阿莫西林胶囊的不良反应病例回顾性分析[J]. 中国处方药,2020,18(1):60-61.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:568.
- [3] The United States Pharmacopoeial Convention. USP 42-NF37[M]. Rockville:The United States Pharmacopoeial Convention,2019:295.
- [4] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2020 (Volume III)[M]. London:The Stationery Office,2020:150-151.
- [5] The Japanese Pharmacopoeia Commission. Japanese Pharmacopoeia (17th edition)[M]. Tokyo:The Ministry of Health, Labour and Welfare,2016:425-426.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:121.
- [7] 国家药品监督管理局. 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则和化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则的通告[EB/OL]. (2015-02-05)[2019-10-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/images/MjAxNjQtdozusXNqLjmlLi9vP4x.LmRvY3g=.docx>.
- [8] アステラス製薬株式会社. サワシリン® 医薬品インタビューフォーム[EB/OL]. [2020-03-21]. http://www.jp-orangebook.gr.jp/cgi-bin/search_h/search_e.cgi?action=diss_view&effect=613&find=Amoxicillin%20Hydrate&seq=4023.
- [9] 協和発酵キリン株式会社. パセトシン® 医薬品インタビューフォーム[EB/OL]. [2020-03-21]. http://www.jp-orangebook.gr.jp/cgi-bin/search_h/search_e.cgi?action=diss_view&effect=613&find=Amoxicillin%20Hydrate&seq=4026.

(收稿日期:2020-01-09;修回日期:2020-06-26)

本栏目由

重庆药友制药有限责任公司

协办

出 10 min 后达到最大溶出度,随着时间的推移,溶出度呈下降趋势,在 120 min 时仅为 77.11%,溶