

中图分类号: R965; R977.1+5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)09-0046-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.09.010



平行人工膜渗透分析法预测恩格列净片生物等效性*

夏颖¹, 王晶萍², 李耕¹, 严菲^{1△}

(1. 江苏省药品监督检验研究院, 江苏 南京 210019; 2. 浙江省东阳市中医院, 浙江 金华 322100)

摘要:目的 建立预测恩格列净片生物等效性的平行人工膜渗透分析(PAMPA)法,为仿制制剂的体外一致性评价提供参考。方法 采用 MacroFLUX™ 光纤药物溶出度与渗透速率测定系统模拟空腹和饱腹状态下恩格列净片的体内释放-吸收过程,以原研药为参比制剂,采用 PAMPA 法测定仿制制剂和参比制剂的渗透速率和 240 min 时累计渗透量,并计算渗透速率和 240 min 时累计渗透量的 90% 置信区间(90%CI)。结果 4 家国产仿制制剂和参比制剂在空腹和饱腹条件下的渗透速率和累计渗透量的 90%CI 均在 80%~120% 范围内。结论 初步预测了不同来源恩格列净片国产仿制制剂和参比制剂的体内溶出-吸收行为一致,为一致性评价监管提供了有力的技术支持。**关键词:**平行人工膜渗透分析法;恩格列净片;渗透速率;累计渗透量;生物等效性;一致性评价

Prediction of Bioequivalence for Empagliflozin Tablets by PAMPA

XIA Ying¹, WANG Jingping², LI Geng¹, YAN Fei^{1△}

(1. Jiangsu Institute of Drug Control, Nanjing, Jiangsu 210019, China; 2. Dongyang Traditional Chinese Medicine Hospital, Jinhua, Zhejiang 322100, China)

Abstract: Objective To establish a parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) for predicting the bioequivalence of Empagliflozin Tablets, and to provide a reference for *in vitro* consistency assessment of generic drugs. **Methods** The MacroFLUX™ fiber-optic drug dissolution and penetration rate measurement system was used to simulate the *in vivo* release-absorption processes of Empagliflozin Tablets in the fasted and satiated states. With the innovator drug as the reference preparation, the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min for both generic drug and reference preparation were determined by the PAMPA, and the 90% confidence intervals (90%CI) of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min were calculated. **Results** The 90%CI of penetration rates and cumulative penetration volume at 240 min of four domestic generic drugs and the reference preparation in the fasted and satiated states ranged from 80% to 125%. **Conclusion** The preliminary prediction demonstrates that the *in vitro* dissolution-absorption profiles of domestic generic Empagliflozin Tablets from different manufacturers are consistent with that of the reference preparation, and provides robust technical support for the regulatory of consistency assessment.

Key words: PAMPA; Empagliflozin Tablets; penetration rate; cumulative penetration volume; bioequivalence; consistency assessment

恩格列净片(商品名欧唐静)于2014年5月首次在欧洲上市,2014年8月在美国上市,2017年在我国上市,用于治疗2型糖尿病^[1]。国内批准的恩格列净剂型为片剂,规格有每片10 mg和25 mg,目前已批准的国内仿制制剂均视同通过一致性评价。仿制制剂要实现与参比制剂在临床使用的相互替代,二者不仅需药学等效,更需生物等效。生物等效性试验是评价仿制制剂与参比制剂一致性的“金标准”。但生物等效性试验存在周期长、费用高等缺点,且涉及伦理道德问题^[2-3],无法作为常规仿制制剂上市后的监管手段。恩格列净片为口服固体制剂,其溶解性和胃肠道渗透性决定其在体内的吸收程度^[4-5]。平行人工膜渗透性分析(PAMPA)法是一种测定药物渗透性的方法,采用涂卵磷脂溶液的聚碳酸酯膜或聚偏氟乙烯模拟小肠上皮细胞,适用于被动转运机制

吸收药物(多数药物),测定结果与人体小肠灌流法相近^[6]。该法操作简便,重复性好,效率高^[7],已广泛用于药物处方筛选与仿制药一致性评价^[8]。本研究中模拟了空腹和饱腹条件下恩格列净片的体内释放-吸收过程,以原研药作为参比制剂,比较仿制制剂与参比制剂的溶出和吸收行为,通过测定4家企业生产的恩格列净片仿制制剂及参比制剂的渗透速率和累计渗透量,建立适宜的体内外相关性模型,对国产恩格列净片与参比制剂的体内一致性进行评价。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

MacroFLUX™ 光纤药物溶出度与渗透速率测定系统(美国 Pion Inc 公司); XPR-60 型电子天平(精度为 0.000 01 g), Seven Excellence 型 pH 计,均购自瑞士

*基金项目:江苏省药品监督管理局科研计划项目[202415]。

第一作者:夏颖,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为化学药品质量标准,(电子信箱)953400276@qq.com。

△通信作者:严菲,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品质量标准,(电子信箱)37931658@qq.com。

Mettler Toledo公司;KH-700TDB型高频数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为700 W,频率为80 kHz)。

1.2 试药

恩格列净对照品(批号为0007,含量为99.9%),恩格列净片原研药(德国Boehringer Ingelheim公司,批号为101450,规格为每片10 mg;批号为705853,规格为每片25 mg);恩格列净片仿制药[批号分别为154211102(A企业)、211109102(B企业)、2201701(C企业)、D211206K72(D企业),规格为每片10 mg;批号分别为107220101(A企业)、210412202(B企业),规格为每片25 mg];药物溶出模拟液固体粉末(英国Biorelevant公司,批号为FFF-0421-B);ASB缓冲液(批号为521021,规格为250 mL),胃肠道模拟脂质体(批号为520928),均购自美国Pion Inc公司;二甲基亚砜(DMSO)为色谱纯,盐酸和氯化钠均为优级纯,无水磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯化钾、氢氧化钠、冰醋酸均为分析纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

空腹肠模拟液(pH 6.5):取氢氧化钠0.42 g,无水磷酸二氢钾3.44 g和氯化钠6.19 g,置同一1 L容量瓶中,加水900 mL,超声使溶解,测定pH约为6.5,用水稀释至1 L,即得肠缓冲液A。再取22.4 g药物溶出模拟液固体粉末,用肠缓冲液A 0.5 L超声使溶解,再加0.5 L肠缓冲液A,混匀,超声处理30 min后静置30 min,即得。

磷酸盐缓冲液(pH 10.2~10.6):取氯化钾20.0 g和无水磷酸氢二钠42.6 g,置同一1 L容量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液40 mL,用水定容,混匀,测定pH应为10.2~10.6。

混合液:将空腹肠模拟液和磷酸盐缓冲液以1:1(V/V)比例混合,临用现制。

空腹胃模拟液(pH 1.4~1.6):取1 mol/L盐酸溶液210 mL和氯化钠31.5 g,同置一容器中,加水稀释至7 L,混匀,测定pH应为1.4~1.6。

饱腹肠模拟液(pH 5.0):取氢氧化钠12.12 g和氯化钠35.62 g,加2.7 L水使溶解,再加冰醋酸25.95 g,混匀,测定pH应为 5.0 ± 0.2 ,加水稀释至3 L,即得肠缓冲液B。再取11.2 g胆酸盐粉末,加0.5 L肠缓冲液B,混匀,继续加肠缓冲液B至1 L,超声混匀,放置30 min,即得。

对照品溶液:取恩格列净对照品适量,精密称定,用DMSO溶解并定容,制成每1 mL含恩格列净10 mg的溶液,即得。

2.2 受体室标准曲线建立

取ASB缓冲液50 mL,置100 mL烧杯中,放入转子,

设定转速为400 r/min,将通道2,4,6的光纤探头置液面下,光纤探头光程为10 mm,精密量取对照品溶液5 μ L,依次加入ASB缓冲液中,采集数据。在200~700 nm波长范围内扫描,选择272~280 nm波长进行测定,进行二阶导数法校正后,以对照品溶液质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、曲线下面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果回归方程分别为 $Y_{\text{通道}2} = 488.88 X_{\text{通道}2} - 0.004$, $Y_{\text{通道}4} = 486.41 X_{\text{通道}4} - 0.003$, $Y_{\text{通道}6} = 488.62 X_{\text{通道}6} - 0.005$,相关系数(r)均不小于0.999 8。结果表明,受体室中恩格列净质量浓度在1.001 9~5.007 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与曲线下面积线性关系良好。

2.3 生物等效性预测

2.3.1 试验方法

采用MacroFLUX™光纤药物溶出度与渗透速率测定系统(见图1)模拟空腹和饱腹条件下恩格列净片的体内释放-吸收过程。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0931 溶出度与释放度测定法中第二法(浆法),以空腹胃模拟液(pH 1.4~1.6)400 mL为溶出介质,设定转速为50 r/min,依法操作(以饱腹肠模拟液为溶出介质时,试验初始直接加500 mL饱腹肠模拟液,30 min后无需再加入混合液),精密量取ASB缓冲液12 mL,置受体室中,设定转速为450 r/min,两隔室间以人工膜隔离(使用前用胃肠道模拟脂质体溶液50 μ L浸润,面积为3.88 cm^2),试验运行30 min后,取混合液100 mL,置溶出杯中,采样间隔1 min,总采集时间为240 min,采用光纤探头(10 mm)测定受体室中的药物浓度(200~700 nm波长范围),计算波长为272~280 nm,按公式(1)计算恩格列净片的渗透速率,按公式(2)计算累计渗透量,按公式(3)和公式(4)计算渗透速率与累计渗透量的90%置信区间(90%CI)上限、下限,以预测生物等效性。

$$J(FLUX) = (dc/dt) \times (V/A) \quad (1)$$

式中, $J(FLUX)$ 为渗透速率,即待测物在单位时间通过单位膜面积的量[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]; dc/dt 为单位时间内受体室中待测物质量浓度的变化速率[$\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$]; A 为3.88 cm^2 ,即人工膜面积(cm^2); V 为12 mL,即受体室中ASB缓冲液体积(mL)。

$$T = CV \quad (2)$$

式中, T 为累计渗透量,即药物在测定时间进入受体室的量(μg); C 为试验终点受体室中药物的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); V 为受体室中ASB缓冲液体积(mL)。

$$90\%CI \text{ 上限} = A + (CS/\sqrt{n}) \quad (3)$$

$$90\%CI \text{ 下限} = A - (CS/\sqrt{n}) \quad (4)$$

式中, A 为测量值的平均值; n 为样本重复次数;

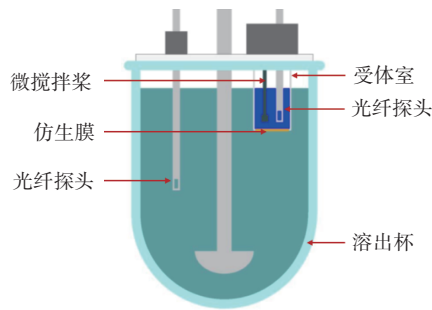


图1 MacroFLUX™ 光纤药物溶出度与渗透速率测定系统
Fig.1 MacroFLUX™ fiber - optic drug dissolution and permeation rate measurement system

C 为换算系数(与重复次数相关, $n = 3$ 时 $C = 2.92$); S 为测量值的标准偏差。

2.3.2 空腹条件下生物等效性预测

空腹条件下参比制剂与仿制制剂的渗透速率和240 min时的累计渗透量见表1和表2。4家生产企业仿制制剂与参比制剂的药物渗透速率和累计渗透量的90%CI均在80%~120%范围内。表明空腹条件下,所选取的4家生产企业的仿制制剂与参比制剂的体外溶出-渗透行为均一致。详见表3。

表1 10 mg规格恩格列净片空腹条件下的渗透速率与240 min时累计渗透量测定结果($n = 3$)

Tab.1 Results of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets (10 mg) in the fasted state ($n = 3$)

试验序号	生产企业	批号	渗透速率			累计渗透量		
			检测结果[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	均值[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	RSD (%)	检测结果[μg]	均值[μg]	RSD (%)
1	参比	101450	0.08536			65.5077		
			0.08041	0.08196	3.60	66.3434	65.9193	0.63
			0.08010			65.9069		
	A企业	154211102	0.08691			65.5905		
			0.07856	0.08206	5.28	62.2868	64.3661	2.81
			0.08072			65.2209		
	B企业	211109102	0.08041			66.5914		
			0.07701	0.07845	2.24	59.9354	63.2608	5.26
			0.07794			63.2556		
2	参比	101450	0.07608			65.5719		
			0.07979	0.07866	2.84	63.2726	64.9171	2.21
			0.08010			65.9069		
	C企业	2201701	0.07794			67.4577		
			0.08072	0.07856	2.46	63.3854	64.1057	4.77
			0.07701			61.4741		
	D企业	D211206K72	0.07825			63.4567		
			0.07361	0.07815	5.74	58.0059	63.2392	8.11
			0.08258			68.2549		

表2 25 mg规格恩格列净片空腹条件下的渗透速率与240 min时累计渗透量测定结果($n = 3$)

Tab.2 Results of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets (25 mg) in the fasted state ($n = 3$)

生产企业	批号	渗透速率			累计渗透量		
		检测结果[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	均值[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	RSD (%)	检测结果[μg]	均值[μg]	RSD (%)
参比	705853	0.1246			98.2071		
		0.1243	0.1283	5.24	96.2683	99.8685	4.66
		0.1361			105.1300		
A企业	107220101	0.1265			101.1703		
		0.1200	0.1264	5.02	97.2942	100.3469	2.73
		0.1327			102.5761		
B企业	210412202	0.1265			103.8784		
		0.1262	0.1270	0.94	102.8627	103.4808	0.52
		0.1284			103.7014		

表3 不同企业恩格列净片空腹条件下渗透速率与累计渗透量的90%置信区间(90%CI)

Tab.3 The 90%CI of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets from different manufacturers in the fasted state (%)

生产企业	规格	批号	90%CI	
			渗透速率	累计渗透量
A企业	10 mg	154211102	(91.2, 109.0)	(91.1, 109.1)
	25 mg	107220101	(91.2, 106.8)	(95.9, 105.1)
B企业	10 mg	211109102	(92.1, 99.3)	(88.0, 105.1)
	25 mg	210412202	(97.4, 100.5)	(102.7, 104.5)
C企业	10 mg	2201701	(95.7, 104.0)	(90.8, 106.7)
D企业	10 mg	D211206K72	(92.8, 112.7)	(88.6, 116.7)

2.3.3 饱腹条件下生物等效性预测

参比制剂与仿制制剂的渗透速率和240 min时的累计渗透量见表4和表5。4家生产企业仿制制剂与参比制剂的药物渗透速率与累计渗透量的90%CI均在80%~120%范围内。表明饱腹条件下,所选取的4家生产企业的仿制制剂与参比制剂的体外溶出-渗透行为均一致。详见表6。

3 讨论

3.1 恩格列净生物药剂学分类(BCS)研究

单次给药的最高剂量对应的原料药(恩格列净片为25 mg)在体积为250 mL(或更少)的水溶性介质(pH 1.0~6.8)中完全溶解,则认为该药物为高溶解性。若恩格列净溶解质量浓度满足0.1 mg/mL,则认为恩格列净为高溶解性。恩格列净原料药在pH 1.2盐酸溶液、pH 4.5醋酸盐缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液和水中的饱和溶解度分别为0.35, 0.35, 0.33, 0.36 mg/mL,属高溶解性药物。通常认为渗透性高于美托洛尔的

表4 10 mg规格恩格列净片饱腹条件下的渗透速率与240 min时累计渗透量测定结果(n=3)

Tab. 4 Results of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets (10 mg) in the satiated state (n = 3)

试验序号	生产企业	批号	渗透速率			累计渗透量			
			检测结果[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	均值[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	RSD (%)	检测结果(μg)	均值(μg)	RSD (%)	
1	参比	101450	0.06371			60.3055			
			0.06866	0.06557	4.11	64.9049	62.4597	3.70	
			0.06433			62.1686			
	A企业	154211102	0.06680			63.3904			
			0.06711	0.06660	0.96	61.6615	63.2370	2.38	
			0.06588			64.6592			
	D企业	D211206K72	0.06340			58.8283			
			0.06897	0.06588	4.30	65.0219	62.9084	5.62	
			0.06526			64.8749			
	2	参比	101450	0.05103			49.5150		
				0.05258	0.05175	1.51	52.5310	51.9861	4.33
				0.05165			53.9123		
B企业		211109102	0.05227			50.2342			
			0.05536	0.05412	3.02	55.5504	52.3643	5.37	
			0.05474			51.3082			
C企业		2201701	0.05134			49.7831			
			0.05103	0.05309	6.23	50.1017	52.0633	7.06	
			0.05691			56.3050			

表5 25 mg规格恩格列净片饱腹条件下的渗透速率与240 min时累计渗透量测定结果(n=3)

Tab. 5 Results of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets (25 mg) in the satiated state (n = 3)

生产企业	批号	渗透速率			累计渗透量		
		检测结果[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	均值[$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$]	RSD (%)	检测结果(μg)	均值(μg)	RSD (%)
参比	705853	0.06959			63.9610		
		0.06124	0.06505	6.49	55.9359	60.3267	6.74
		0.06433			61.0832		
A企业	107220101	0.07175			67.2260		
		0.06526	0.06794	4.99	58.2868	62.7568	7.12
		0.06680			62.7575		
B企业	210412202	0.06742			62.8020		
		0.06309	0.06453	3.88	58.2419	61.0068	3.98
		0.06309			61.9765		

为高渗透性药物,美托洛尔空腹肠的有效渗透性为 $1.34 \times 10^{-4} \text{ cm} / \text{ s}^{[9-10]}$ 。选择pH 5.0、pH 6.8、pH 7.4的缓冲液分别模拟人体饱腹、空腹和血液中的环境,测定恩格列净原料药的渗透性为 $(25.8 \sim 31.9) \times 10^{-6} \text{ cm} / \text{ s}$,低于美托洛尔的渗透性,故恩格列净为低渗透性药物,为

表6 不同企业恩格列净片饱腹条件下渗透速率与累计渗透量的90%CI(%)

Tab. 6 The 90%CI of the penetration rate and cumulative penetration volume at 240 min of Empagliflozin Tablets from different manufacturers in the satiated state (%)

生产企业	规格	批号	90%CI	
			渗透速率	累计渗透量
A企业	10 mg	154211102	(99.9, 103.2)	(97.2, 105.3)
	25 mg	107220101	(95.7, 113.2)	(91.2, 116.1)
B企业	10 mg	211109102	(99.3, 109.9)	(91.6, 109.8)
	25 mg	210412202	(92.7, 105.7)	(94.0, 107.6)
C企业	10 mg	2201701	(91.8, 113.4)	(88.2, 112.1)
D企业	10 mg	D211206K72	(93.2, 107.8)	(91.2, 110.2)

BCS III类药物。

3.2 试验准确性

目前,MacroFLUX™光纤药物溶出度与渗透速率测定系统常用于BCS II类药物等高渗透性药物。对于低渗透性药物,若从供体室渗透入受体室的浓度太低(低于受体室的检测限),则无法实现准确测定。本研究中为提高检测灵敏度,供体室(溶出杯)选择500 mL介质体积,而非1000 mL介质体积,通过提高供体室的浓度,增加渗透驱动力,从而提高受体室的药物浓度,实现准确测定。为避免ASB缓冲液及胃肠道模拟脂质体试剂批内批间差异影响结果,每次比对试验中均选用同1瓶ASB缓冲液及同1支胃肠道模拟脂质体开展试验,每次试验均同时测定仿制制剂和参比制剂,排除试验过程中的偏差,保证结果的准确性。

3.3 模型科学性与可行性分析

PAMPA模型适用于被动转运药物,95%药物的转运机制为被动转运。恩格列净的解离常数(pKa)为12.57,在pH 1.0~7.4范围内呈分子态,推测其转运机制为被动转运。依据参比制剂的药品说明书,恩格列净是乳腺癌耐药蛋白(BCRP)和P-糖蛋白(P-gp)底物,但在治疗剂量下恩格列净不会抑制这些外排转运体,不存在外排效应。采用体外溶出度-渗透速率测试结果的模型比较仿制制剂与参比制剂的释放和吸收过程较科学、合理。

3.4 方法评价

采用PAMPA法建立的体内外相关性模型,能将恩格列净体外释放情况与其体内响应应答关联起来,具有一定的体外溶出与体内吸收相关性,较传统的溶出曲线法更能揭示药物受工艺、处方及体内生理因素的影响。比较仿制制剂与参比制剂的释放和吸收过程,能准确、快速地评价仿制制剂与参比制剂的体内一致性,可用于评价国产恩格列净片的质量,为一致性评价监管提供了有力的技术支撑。