RRPG92010386（37.P）

計畫編號：DOH92-TD-1130

行政院衛生署九十二年度科技研究發展計畫

開發 Gliclazide 體外體內相關性之關鍵性溶離試驗

研 究 報 告

執行機構：臺北醫學大學

計畫主持人：許 明 照

研究人員：

執行期間： 92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目　　錄

目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5
材料與方法	9
結果與討論	16
結論與建議	21
參考文獻	22
圖、表	24

中文摘要

在本研究中藉由體外溶離試驗與體內血漿濃度之藥動學參數建立 gliclazide 之體外體內相關性。在本實驗中以羥丙烷基甲基纖維素 (Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC) 與乳糖作為調控藥物釋溶之賦形劑。採用直接打錠法壓製直徑 9 mm 的錠片，每顆錠片總重 240mg，內含 80mg gliclazide。首先建構不同 sodium lauryl sulfate 添加量對 gliclazide 於不同酸鹼值溶解度之影響曲線關係，依此共篩選出三種不同酸鹼值溶離溶液 (酸鹼值分別為 1.2，4.5(+1%SLS)，及 6.8)，建立三種不同釋放速率處方之溶離曲線，以作為建構體外體內相關性的體外溶離參數值。將這三種不同溶離速率處方在 18 名健康受試者以三相交叉設計進行生體可用率試驗，分別得到三個處方的體內藥物血漿濃度曲線，並計算包括 Cmax、Tmax、與 AUC(0-t) 等相關藥物動力學參數，以及利用 Wagner-Nelson 與 point-area deconvolution 分別計算體內吸收分率與吸收速率（input function），分別用於作為建構 C 等級（level C）和 A 等級（level A）之體外體內相關性。結果顯示，結果顯示建構 C 等級的體內體外相關性可以選擇 Cmax 與在酸鹼值為 6.8 之溶離液的溶離百分率，或是選擇 Tmax 與在酸鹼值為 4.5 之溶離液的溶離百分率。而酸鹼值為 6.8 的溶離液是建構 A 等級相關性的體外溶離條件之較佳選擇。由此所建立的相關性對於日後 Gliclazide 的處方修飾或是製程改變，將可提供體外溶離與體內血中濃度變化的參考依據，官方也可作為判定是否需要進行生體相等性試驗之依據準則。

關鍵詞: 體外體內相關性，Gliclazide，體外溶離試驗，體內吸收

英文摘要

The purpose of this research project was to establish in vitro /in vivo correlation (IVIVC) of Gliclazide. Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and lactose was used to formulate tablets with three different release rates. Direct compression method was employed to prepare those tablets (9 mm in diameter and 240 mg in weight) containing 80mg gliclazid. In the first, the influence of various adding amount of sodium lauryl sulfate on the pH-solubility profiles of gliclazide was examined to select three dissolution media (pH=1.2, 4.5 (1% SLS), and 6.8) for characterization of the release rate for those three tablet formulations. It provides in vitro dissolution profiles for construction of in vitro-in vivo correlation. The three formulations were then ingested with 18 volunteers in a three-way cross over design to obtain plasma concentration profiles, from which the pharmacokinetic parameters (Cmax, Tmax, and AUC(0-t)) were deduced as in vivo parameters for constructing in vitro-ion vivo correlation of level C. Wagner-Nelson method and point-area deconvolutiom method were utilized to calculate fraction absorbed and input rate, respectively, to construct level A correlation. Results demonstrate that a level C correlation was established for Cmax with % dissolution in pH=6.8 dissolution medium, whereas for Tmax with those in pH=4.5 (1% SLS) dissolution medium. The best choice for constructing level A correlation was to conduct dissolution measurement in pH=6.8 dissolution medium. These constructed IVIV correlations could be used as a surrogate for formulation changes or process modifications of gliclazide. Preferably, authority also can do decision-making regarding whether bioequivalence study is needed based on these scientific data.

Keywords：IVIVC, Gliclazide, in vitro dissolution, in vivo input rate

前言

體外體內相關性（in vitro/in vivo correlation，IVIVC），是指建立體外溶離（in vitro dissolution）與體內吸收（in vivo input）的關係[1]。體外溶離試驗常用來當做藥物製劑的品質管制或是建立臨床表現的依據，而藉由體外溶離試驗來代替體內的生體相等性（bioequivalence）試驗，是近來新興的研究方向。不過能夠建立體外體內相關性的藥物其釋放模式必須是控釋劑型，而不是立即釋放的模式，因為建立相關性的要件之一，就是藥物的溶離速率必須是藥物吸收速率的限制步驟，如此才能藉由關鍵性的溶離試驗來建立體外體內的相關性，也就是在 Biopharmaceutic Classification System（BCS）的分類中，屬於第二類的藥物，即低溶解度高滲透性的藥物，較可成功的建立體外體內相關性[2]。如果能建立出可供利用的體外體內相關性，將可以利用較簡單的體外溶離試驗來預測藥物在體內的變化，進一步代替生體相等性的試驗，如此一來將能夠減少管理單位的負擔，並且降低人體試驗的次數，同時也可節省成本，將資源做更妥善的應用，因此已經有多種藥物成功地建立其體外體內相關性[3,4,5]，而 FDA 在 1997 年也制定了相關法則來幫助建立口服藥物的體外體內相關性[6]。

FDA 將體外體內相關性分成四種不同的等級：

A 等級（level A）：是將藥物在體外的溶離和體內的吸收建立成一種點對點，或稱做是一對一的關係，通常這樣的關係是線性的，若呈現非線性的關係也可接受。而建立的方法，是將血中濃度曲線經由適當的運算使其成為體內吸收曲線，而與體外溶離曲線做比對，建立其相關性。運算的方法包括有 Wagner-Nelson procedure[7]，Loo-Riegelman method 或是 deconvolution[8] 等，如果體內釋放速率比胃腸道吸收的速率低，適用

Wagner-Nelson procedure，若是體內釋放速率比胃腸道吸收的速率稍微低一些或是相等，則適用 deconvolution。從控制管理的角度來看，A 等級是能夠提供最完善資訊的等級，因為它建立的是完整的血中濃度曲線和溶離曲線的關係，是每一個體內的表現點對體外溶離點的關係，所以若是藥物的體外體內相關性是建立在 A 等級，那麼之後將可以利用體外的溶離曲線來預測體內的血中濃度變化，而不需要再多做任何的人體試驗。因此，日後若是需要做一些處方的改變，或是稍微修正原本的劑型，更改賦型劑，替換原料藥的來源，改變藥物的強度等，將不必再做人體實驗，只需要建立其體外溶離試驗的結果，再經過體外體內相關性的比對運算，就可以得到這些經過修正的藥物其在體內吸收的變化情形，而可加以判斷其是否為生體相等性，這對於節省資源有很大的幫助。

B 等級（level B）：是利用統計的原理來進行分析，是將體外的平均溶離時間比上藥物在體內的平均停留時間，或是藥物在體內的平均溶離時間。雖然從實驗所得的所有體外和體內的數據都可以建立這樣的關係，可是這卻不是一種點對點的關係，無法真實的表現出體內血中濃度的變化，因為有許多的藥物在體內的平均停留時間可能都相同，但其在體內的吸收曲線卻是不相同的，所以依據 B 等級的關係無法幫助我們判斷處方的修改對於體內吸收的變化情形，因此 B 等級的體外體內相關性有其使用上的限制性，而較少被使用。

C 等級（level C）：是建立單點的溶離數據（例如：溶離 50%所需的時間，或是在 4 小時內溶離的百分比），與單點的藥物動力學參數間（例如：AUC 或 Cmax）的關係，雖然 C 等級所建立的關係無法描述完整的血中濃度曲線，不過其所提供的資訊對於處方的早期發展，或是對於產品的品質控制

卻有重要的幫助。

多重 C 等級（Multiple level C）：是建立一或多點的藥物動力學參數，與數個時間點的溶離數據之間的關係，從控制管理的角度來看，和 A 等級一樣都能夠提供較完整的資訊。如果藥物能夠建立多重 C 等級的關係，其也很可能可以建立 A 等級的體外體內相關性。

一般來說要建立體外體內的相關性，必須要有溶離試驗和人體試驗的數據。在溶離試驗方面，除非藥物本身的溶離速率不會受到溶離環境的影響，否則必須要有兩個以上具有不同溶離速率的處方，且要選擇合適的溶離實驗條件，對於每一個處方所採用的實驗條件都要相同。而在人體試驗方面，除非有特別的規定，一般都採用交叉（crossover）試驗。以建立 A 等級體外體內相關性為例，利用 deconvolution 的技巧可以由血中濃度曲線得到體內的吸收曲線，再將體外的溶離曲線與其做相關性，如此就可建立 A 等級的體外體內相關性。如果無法順利的做出相關性，則可能要修正溶離方面的條件，或是利用時間的參數（time scaling factor）來做修正[9]。當建立出體外體內的相關性之後，必須對其的預測力（predictability）來做檢測，包括內部（internal）檢測和外部（external）檢測[10, 11]。在內部檢測方面，是將用來建立相關性的數據，與預測出的數據做比較。而外部檢測則是使用一些外加的數據來做檢測，但除非所建立的藥物其治療區間（therapeutic index）狹小，或是建立相關性時僅使用兩組處方，又或者內部檢測不符合規定，否則不需做外部檢測。

在本研究中，我們選用 gliclazide 來當做建立體外體內相關性的模型藥，其化學式為 1-(3-azabicyclo(3.3.0)oct-3-yl)-p-tolylsulphonylurea，是屬於第二代

的 sulfonylurea，為口服的降血糖藥，用來治療非胰島素依賴型（non-insulin-dependent diabetes mellitus，NIDDM）的糖尿病，它能夠改善胰島素的分泌與逆轉胰島素的抗性（resistance），以達到理想的血糖控制[12]。其有良好的耐受性（tolerability），而且不容易引起低血糖的發生，同時可以緩和病人的視網膜病變，所以常用來當做長期控制非胰島素依賴型的糖尿病用藥[13]。常用劑量一天為 40-80mg，最多可增加到 320mg，若使用劑量超過 160mg，則分為早晚兩次隨餐服用。gliclazide 在腸胃道能夠很快被吸收，並且經由肝臟代謝，而經過代謝的藥物和少部分的原型藥主要經由尿液排泄。口服單一劑量 40-120mg 之後其最高血中濃度（Cmax）為 2.2 到 8 ug/ml，達到最高血中濃度的時間（Tmax）為 2-8 小時，在 48 小時之後會達到穩定的血中濃度，與食物共服會增加 Cmax，但會延長 Tmax，因其蛋白結合率為 85-95%，所以分布體積（V_d）很低，約 13-24L。血中半衰期為 8.1-20.5 小時[14]。 Gliclazide 的商品很多，包括有 diabrezide，diamicron，diaprel，diabezid 等，雖然都為 gliclazide 的製劑，不過其在生體可用率與溶離試驗的表現卻很不相同[15]，因為 gliclazide 本身的溶解度很低，在 37 ℃下，100ml 的蒸餾水僅能溶解 3.9mg[16]，所以發展出的製劑會因為其賦形劑或製程的不同而影響本身溶離的速率，進一步會影響其在腸胃道的吸收，而造成不同的生體可用率與不同的臨床降血糖效果。所以在本研究中我們依據溶離實驗的結果來選擇不同的處方，並藉由體外的溶離試驗與體內的血中濃度變化，來建立 gliclazide 其體外體內的相關性，以利之後管控其產品品質。

材料與方法

在本研究中將先藉由硫酸月桂鈉了解 gliclazide 溶解度，並利用羥丙烷基甲基纖維素 Hydroxypropyl methylcellulose（HPMC）和乳糖 Lactose 設計出三組不同溶離速率的處方，而後建立其溶離曲線。藉由人體試驗得到血中濃度曲線與藥物動力學參數。再分別將體外溶離試驗和體內人體試驗所得到的資訊，做 A 等級和 C 等級的體外體內相關性，最後再對建立出的相關性作內部的預測力檢測，以確定所建立的相關性合於規定的標準。

（一）溶解度試驗

gliclazide 的檢量線標準品溶液之配製

取 10 mg gliclazide 以溶媒 water：Ethanol=1：1 定量至 100 ml，使濃度稀釋為 100 μg/ml 的儲備溶液（Stock solution）。取各比例的 gliclazide 儲備溶液，再以溶媒 water：Ethanol=1：1 定量至 10 ml，使配製成下列六種檢量線標準品溶液，濃度分別為：2、4、10、20、24、28 μg/ml。檢量線標準品溶液以紫外光分光光度計分析，波長設定為 227 nm。

媒液（medium）的配製

取 1 g Sodium Lauryl Sulfate（SLS）於 20 ml 容量瓶，以不同 pH 值（1.2、2.6、4.0、4.5、5.6、6.8、7.2）之緩衝液（Buffer）稀釋至體積，使其含 5 % SLS 之儲備溶液，並以此儲備溶液也作為本次溶解度試驗其中一種媒液。取各比例的 5 % SLS 儲備溶液於 10ml 容量瓶，再以不同 pH 值（1.2、2.6、4.0、4.5、5.6、6.8、7.2）之緩衝液（Buffer）稀釋至體積，使其內含 0.2 %、0.5 %、1 %、2 % SLS 的媒液。

溶解度試驗方法

取過量之 gliclazide 粉末於內含上述媒液的微量離心管（Eppendorf）中（n=3），將其振搖均勻後放入 37 ℃水浴鍋，共計 24 小時。實驗期間，每隔 2 小時振搖一次，且當藥物完全溶解後再加入藥物，直至藥物不再溶解。24 小時後以紫外光分光光度計分析樣品，波長設定為 227 nm。分析系統適宜性以及同日間與異日間的準確度與精確度都經過確效的檢定。

（二）高效液相層析 (HPLC) 分析方法之開發與確效

內部標準品（internal standard）溶液之配製

取 10 mg glibenclamide 以溶媒 Methanol 定量至 10ml，再由此 10ml 取出 1ml 並以溶媒 Methanol 定量至 20ml，使濃度稀釋為 50 μg/ml 的儲備溶液，以供 gliclazide 的血漿標準品配製之用。

gliclazide 的檢量線標準品溶液之配製

取 10 mg gliclazide 以溶媒 Methanol 定量至 10ml，使濃度稀釋為 1 mg/ml 的儲備溶液。取各比例的 gliclazide 儲備溶液，再以溶媒 Methanol 定量至 10ml，使配製成下列八種檢量線標準品溶液，濃度分別為： 0.5、1、2、5、10、20、50、100 μg/ml 及三種 quality control（QC）標準品溶液濃度：1.5、40、80 μg/ml。

gliclazide 的血漿標準品之配製

取上述檢量線標準品溶液 0.1 ml 與 50 μg/ml 內部標準品之儲備溶液 0.1 ml 加入 1 ml 血漿，而定最後之 gliclazide 的血漿標準品檢量線濃度為 0.05、

0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μg/ml 及三種 quality control（QC）標準品溶液濃度：0.15、4、8 μg/ml。

分析條件

在 gliclazide 體內血中濃度分析方法之開發方面，利用高效液相層析法進行分析，血漿中之 gliclazide 萃取方法簡述如下：取 1ml 含 gliclazide 的血漿加入 0.1 ml 內部標準品溶液（glibenclamide，50 μg/ml），混合均勻後再加入 5 ml Dichloromethane（DCM）有機溶媒，振搖混合 5 分鐘以進行萃取。然後離心 3000 rpm 10 分鐘，取下層之有機溶媒層至另一試管，之後吹氮氣，並以水浴鍋加熱（55℃）加速有機溶媒層之揮發。溶媒完全揮發後加入 250 μl 移動相（mobile phase）回溶，並加入 2 ml Hexane 去除雜波峰之干擾。振搖混合 2 分鐘後離心，以 3000 rpm 離心 5 分鐘使兩層分的更清楚。之後取下層之移動相（mobile phase）至 Spin-X centrifuge tube filter，然後離心 6000 rpm 5 分鐘，吸取澄清液約 100 μl 注入 HPLC 系統以進行分析。利用 SYNERGI Polar-RP 80A，4 μm 的分析管柱，mobile phase 為 phosphate buffer (0.08% ammonium acetate 與 0.15% triethylamine，pH =3)：acetonitrile = 55：45 (v/v)，流速 1 ml/min，紫外光設定為 227 nm。分析系統適宜性以及同日間與異日間的準確度與精確度都經過確效的檢定。

（三）處方設計

本次實驗將篩選三種不同釋放速率之處方，處方設計以羥丙烷基甲基纖維素作為控釋（controlled release）賦形劑，並以乳糖作為稀釋劑。每顆錠片總重 240mg，內含 80mg gliclazide 與 160mg 賦形劑。使用直接打錠的方式，壓製出直徑 0.9cm 的錠片。預計篩選出三種不同釋放速率之處方。

（四）體外溶離試驗

將不同組成的處方，利用溶離實驗來進行溶離速率的篩選，欲篩選出快，中，慢三種不同的溶離速率，且這三種不同的溶離速率以 10%的差距遞減。測試方法將依據中華藥典第四版溶離度試驗法裝置二，轉速 50rpm，溶離液為 900ml，溫度 37 ℃溶離媒液，溶離媒液分別為：pH 1.2、pH 4.5 + 1% SLS、 pH 6.8 的緩衝液，取樣時間如下：0、15、30、60、90、120、180、240、360、480、600、720、960、1440（minutes）。每一組溶離試驗都進行六重複的試驗，且組內的變異係數（coefficient of variation）不得超過 10 %，最後可得到三組不同溶離速率處方的溶離曲線。

（五）體內人體試驗

經由體外溶離試驗所篩選出的三組不同溶離速率的處方將進行人體試驗，以得到體內的血中濃度變化。實驗計畫書將先經人體試驗委員會之核可，實驗內容是將對 18 位健康的受試者隨機分成 3 組，每組 6 人，進行交叉試驗，每位受試者將總共各服用 80×3 mg 的 gliclazide。每次不同處方的服藥間隔一個星期。受試者須年滿 20 歲的我國健康成年男性，並需經過健康檢查，包括血液及尿液的生化檢查，無任何肝、腎或其他疾病，且於試驗前兩週內無服用任何藥物。在受試前需空腹 10 小時以上，服用藥物用 200ml 的水（基於可能造成低血糖的考量，可改用 20%的葡萄糖溶液服用藥物），在第 4 小時的抽血點之後，服用一低脂的午餐，在第 12 小時的抽血點之後，服用晚餐，每次抽取靜脈血液 10ml，在服用藥物前（predose）與服用藥物後 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10，12 和 24 小時抽血，另外，為建立 A 等級的相關性，必須有靜脈快速注射（intravenous bolus）或口服溶液劑之後的血中濃度，所以其值將參考文獻或也經由人體試驗而得。抽取

的血液檢品經 3000rpm 離心 10 分鐘，收集上層的血清並冰凍在-20 ℃直到進行含量分析。血清中的 Gliclazide 含量測定將採用上述開發的高效液相層析儀（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）進行分析。藥動學相關的參數將利用適當的分析軟體，進行個人血中濃度與時間之變化曲線進行解析計算，計算的參數包括 Cmax，Tmax，AUC(0-t)，MRT 等。

（六）建立體外體內相關性

1. 建立 C 等級的體外體內相關模式：多重 C 等級的關係模式建立將把三組不同處方的 Gliclazide，其平均 Cmax 和 AUC 比上體外不同時間點的溶離百分比，選擇的時間點將分別為整體溶離時間的前、中、後三個時間點，而所選擇的時間點將使溶離百分比與平均Cmax和AUC建立出直線的相關性。

2. 建立 A 等級的體外體內相關模式：其建立方式是將體外溶離曲線和體內吸收曲線做相關性，體外溶離百分比對時間的曲線可直接由溶離實驗所得，而體內吸收曲線必須將血中濃度對時間的曲線藉由 deconvolution 計算的方式所得。對於線性系統（linear system）而言，體內的血中濃度 c(t)與體內的吸收 f(t)，可藉由 convolution 的關係式來建立之間的關係，

$$c(t) = c_\delta(t) * f(t) = \int c_\delta(u) f(t-u) du \qquad (1)$$

$c_\delta(t)$ 是立即釋放的口服劑型在血中的濃度，"*"是 convolution 的運算，$c(t)$ 是服用藥物後的血中濃度，$f(t)$ 是藥物在體內的吸收或是體內溶離的狀況，所以體內的吸收曲線可由人體試驗所得的血中濃度曲線經由上式

deconvolution 得到[19]。因此最後 A 等級的體外體內相關模式就可由體外溶離曲線與體內吸收曲線而得。若是體外和體內的時間座標無法相互配合，例如：體外溶離發生的時間是在實驗開始的前 2 個小時內，而體內的吸收是發生在服藥後 10-20 小時之間，這時候就需要做時間參數 I（time scaling factor）的修正[17]，

I = 體內吸收 50%所需要的時間/體外溶離 50%所需要的時間　　(2)

經過時間參數修正的 A 等級體外體內相關模式，是由在 t 時間的體內吸收百分比與 t 時間的體外溶離百分比/I，再作圖建立其相關性。

（七）評估體外體內相關性的內部預測力[17]

1. 評估建立的 C 等級之體外體內相關模式：由上述方法所建立的直線關係中，可以得到由相關模式中所預測的平均 Cmax 和 AUC，將其值和實際所得到之平均 Cmax 和 AUC 相互比較，即可得到預測誤差百分比（percent prediction error，%PE），

$$\%PE = \frac{(\text{實際 值} - \text{預測 值})}{\text{實際 值}} \times 100 \qquad (3)$$

2. 評估建立的 A 等級之體外體內相關模式：

可藉由下式來做內部預測力評估，

$$c(t) = \int_0 c_{\&v}(t-u).r_{pred-vivo}(u).du \qquad (4)$$

$c_{\&v}$ 是靜脈快速注射（intravenous bolus）或口服溶液劑之後的血中濃度，可由之前的的文獻或經人體試驗而得，$r_{pred-vivo}$ 是預測的體內吸收速率，可由下式而得，

$$r_{pred-vivo} = \frac{\%體內吸收(t_2) - \%體內吸收(t_1)}{(t_2 - t_1)} \qquad (5)$$

$c(t)$ 是在 t 時間所預測的血中濃度，u 是 dummy convolution variable。從第(4)式可以得到由建立的 A 等級之體外體內相關模式所預測的血中濃度，並且可以計算得到預測的平均 Cmax 和 AUC，和評估 C 等級的方法相同，將實際值和預估值代入第(3)式，即可得到預測誤差百分比（%PE）。

在 FDA 的規範中，當評估內部預測力時，預估 Cmax 和 AUC 時的平均的預測誤差百分比不可超過 10%，另外對於每一種個別的處方其預測誤差百分比不可超過 15%，當符合規定時，才算成功的建立體外體內相關性。

結果與討論

（一）溶解度試驗

Table 1 和 Fig 1 是同日間，Table 2 和 Fig 2 是異日間之確效評估，利用六重複五個 quality control 濃度計算其精確度及準確度皆在可接受範圍內。經由 Fig 3 之不同 pH 值對溶解度作圖可知，gliclazide 在 pH 1.2 與 7.2 時溶解度最好，而以 pH 4.5 時的溶解度最差。且隨著添加 SLS 的比例增加，gliclazide 的溶解度也逐漸增加，當加入 5% SLS 當作助溶劑時，gliclazide 的溶解度更是大幅提升。此種溶解度的變化可能是因 gliclazide 有 azabicyclo group 與 sulfonyl group，因 azabicyclo group 具有 Nitrogen，其可能具有弱鹼性質，在強酸環境（pH=1.2）下時，可形成鹽酸鹽，因此使得 gliclazide 的溶解度大幅提升；而 sulfonyl group 則具有弱酸性質，因此在鹼性環境（pH=7.2）時，也使得 gliclazide 的溶解度大幅提升。

（二）高效液相層析（HPLC）分析方法之開發與確效

Table 3 和 Fig 4 是同日間異日間之確效評估，利用六重複五個 quality control 濃度計算其精確度及準確度皆在可接受範圍內。經由 Fig 5 之層析圖譜可知，利用 SYNERGI 4μ Polar-RP 80A 層析管柱可有效分離 gliclazide 及其內部標準品（glibenclamide）。其滯留時間分別為 8.7 分鐘與 14.4 分鐘，進一步可應用此分析條件於之後人體試驗之血漿檢品之分析。如 Fig 6 所示，各成份之圖峰皆無血漿基體之干擾且完全分離。在定量方面，最低可測得 0.05 μg/ml 之血漿濃度，顯示其對 gliclazide 具有相當好之靈敏度，

（三）處方設計

處方設計以羥丙烷基甲基纖維素（HPMC）作為控釋賦形劑，並以乳糖作

為稀釋劑。每顆錠片總重 240mg，內含 80mg gliclazide 與 160mg 賦形劑。使用直接打錠的方式，壓製出直徑 0.9cm 的錠片，與之後之溶離試驗相配合，可篩選出三種不同釋放速率之處方（F1、F2、F3）如下所示，其溶離之結果如第四部分體外溶離試驗所示：

	Gliclazide (mg)	HPMC 50cps (mg)	HPMC 4000cps (mg)	Lactose (mg)
F1	80	60		100
F2	80	30	30	100
F3	80		60	100

（四）體外溶離試驗

經由不同 pH 值之溶離媒液之測定，如 Fig 7-9 所示，此三種不同比例的處方，分別在 pH=1.2 與 6.8 時，可明顯看出各處方之溶離速率之間有 10 % 的差距，在 pH=4.5 時，雖也可看出有 10 %的差距，但處方之間的差距較小。且由 Fig 7-9 可看出，F1 溶離速率最快，F2 溶離速率居中，而以 F3 的溶離速率最慢。此結果與處方組成的比例不同相符合。因本次使用不同黏度的 HPMC 當作控釋賦形劑，以 HPMC 50 cps 的黏度較低，HPMC 4000 cps 的黏度較高，所以當只用 HPMC 50 cps 當作控釋賦形劑（F1）時，因錠片結合較不緊密，因此錠片的吸水性較佳，當錠片放入溶離媒液中可看到錠片迅速地產生崩散作用而溶離；隨著 HPMC 4000 cps 的加入，因其黏度較高，使得錠片結合較緊密，因此水分進入較慢，所以 F2 的崩散作用較差且溶離較慢；而當完全使用 HPMC 4000 cps 當作控釋賦形劑（F3），則崩散作用更差且溶離更慢。因此藉由處方組成比例之改變與溶離試驗，可製得三種不同溶離速率之處方，以進行之後之人體試驗，以及體內體外

相關性之應用。

將溶離百分率達到 20、50、及 80% 所需要的時間分別由三個處方 (F1、F2、F3) 於三種不同酸鹼值溶離溶液（pH= 1.2, 4.5+1%SLS, 及 6.8）中的溶離曲線內插得到，此將作為建構 C 等級 體內體外相關性之用。而三個不同處方於此三種溶離溶液的整條溶離曲線，因溶離取樣時間與採血時間是一致，所以將直接與體內的吸收分率進行 A 等級 體內體外相關性分析之用。

（五）體內人體試驗

將三組不同處方於 18 位受試者服用後之血中濃度樣品，利用之前所開發出並經確效之 HPLC 方法進行分析，其結果如圖 10 所顯示。由此血漿濃度圖可看出，隨著服用處方的溶離速率減緩，Cmax 隨之下降，Tmax 隨之增長，而 AUC (0-t) 有隨之減低之趨勢。此 18 位受試者服用三個處方後相關的藥動學參數包括 Cmax，Tmax 及 AUC (0-t) 分別計算得到，並取其平均值作為建立 C 等級體內體外相關性之用。並利用 Wagner-Nelson 方法分別計算三個處方服用後於受試者體內的累積吸收分率（Fraction absorbed），此將作為建構 A 等級的體內體外相關性之用。

（六）建立體外體內相關性

圖 11 建構 C 等級的體內體外相關性趨勢圖，分別將藥動學參數的 Tmax、Cmax、及 AUC(0-t) 對在三種不同酸鹼值溶離液的溶離百分率為 20、50、及 80% 之溶離時間作圖比較。其相關性分析結果顯示，Cmax 與 Tmax 對三種溶離百分率的相關性較為良好，而 AUC(0-t) 是三者中的相

關性較為不佳的。進而比較可以了解到，與 Cmax 有較佳的相關性的體外條件是在酸鹼值為 1.2 及 6.8 的溶離液中溶離，不管是任何溶離百分率的溶離時間都與 Cmax 有最佳的相關性。但對 Tmax 而言，則以在酸鹼值為 1.2 及 4.5 的溶離液溶離，不管是任何溶離百分率的溶離時間都與 Tmax 有較佳的相關性。即使於酸鹼值為 1.2 的溶離百分率與 Cmax 及 Tmax 都有極佳的相關性，但其相關係數變異太小差別不大，可能導致分辨能力不足。另一方面，AUC(0-t) 與溶離率之相關性不佳可能是吸收不完全所導致的不同程度偏差，尤其在溶離率緩慢的處方應會有更明顯的差異性。所以綜合而言，建構 C 等級的體內體外相關性可以選擇 Cmax 與在酸鹼值為 6.8 之溶離液的溶離百分率，或是選擇 Tmax 與在酸鹼值為 4.5 之溶離液的溶離百分率。

圖 12 建構 A 等級的體內體外相關性趨勢圖，因為溶離取樣點與採血點的時間相同，所以直接是將三種不同溶離率處方的血漿濃度利用 Wagner-Nelson 法所計算的累積吸收分率（fraction absorbed）分別與在三種不同酸鹼值溶媒中溶離的百分比曲線進行關聯性比較，其分析結果顯示，在酸鹼值為 1.2 的溶離液中，F1 及 F2 的溶離率與吸收分率的相關線相近但明顯不同於 F3 的相關性，而在酸鹼值為 4.5 的溶離液中，此三個處方的溶離率與吸收分率的相關線更是相近重疊，唯有在酸鹼值為 6.8 的溶離液中，三個處方的相關線可以明顯分辨其差異性。雖然於酸鹼值為 6.8 的溶離具有關聯其體內吸收程度的可能性，但三條曲線皆呈現 S 型，不像直線關係的可以直接計算預估值，所以只能依據此些數據初步判定，酸鹼值為 6.8 的溶離液是建構 A 等級相關性的體外溶離條件之較佳選擇。

利用 point-area deconvolution 方法進行建構體內體外相關性分析，詳細的 Excel Macro 如圖 13 所示，其中的靜脈注射的血漿濃度是以文獻資料為基礎所計算得到，程式的準確性也經過已知數據的驗證無誤，驗證結果的誤差值皆在 2%以內，證明此 point-area deconvolution 的 Excel Macro 程式可用於評估 A 等級的體內體外相關性。但當應用此程式於本試驗的數據時，發現此部份的分析工作所得的結果不是很好，或許是靜脈注射血漿濃度是文獻資料而非個人自己的數據所導致，其真正原因尚在評估中，如有更改善的結果將在後續補送。

（七）評估體外體內相關性的內部預測力

C 等級體外體內相關性的內部預測力依據實驗部份的定義計算，其結果列於表 4 中。此結果顯示，內部預測能力仍如上所討論的，Cmax 與 Tmax 對三種溶離百分率的相關性較為良好，所以誤差度較小，具有較佳的內部預測能力。而 AUC(0-t) 是三者中的相關性較為不佳的，所以誤差度偏高，內部預測能力相對的降低。A 等級的體外體內相關性建構方面，由於 Wagner-Nelson 方法所計算得到的累積吸收分率只與在酸鹼值為 6.8 溶離液中的溶離百分率具有較佳的分辨能力，但三條曲線皆呈現 S 型，不像直線關係的可以直接計算預估值，所以內部預測能力無法準確的相互比較。，至於 point-area deconvolution 的 A 等級體外體內相關性建構，其內部預測能力就待解決分析結果不良的原因後，再一併計算評估。

結論與建議

體外體內相關性（in vitro/in vivo correlation，IVIVC），是指建立體外溶離（in vitro dissolution）與體內吸收（in vivo input）的關係。體外溶離試驗常用來當做藥物製劑的品質管制或是建立臨床表現的依據，而藉由體外溶離試驗來代替體內的生體相等性（bioequivalence）試驗，可以縮短藥廠研發產品上市的時間，降低官方單位管理的負擔。在本研究中先藉由瞭解硫酸月桂鈉於不同酸鹼值溶液中對 gliclazide 溶解度的影響，選擇三種不同酸鹼值溶離液作為體外溶離條件，其中酸鹼值為 4.5 的溶離液需要添加 1%的 SLS，使其對藥物的溶解度類似於其他兩種酸鹼值溶液。再利用羥丙烷基甲基纖維素（HPMC）和乳糖設計出三組不同溶離速率的處方，而後建立其在此三種不同酸鹼值之溶離液的溶離曲線。藉由人體試驗得到三個處方的血漿濃度曲線與藥物動力學參數，進而與溶離數據建立其體外體內相關性。結果顯示建構 C 等級的體內體外相關性可以選擇 Cmax 與在酸鹼值為 6.8 之溶離液的溶離百分率，或是選擇 Tmax 與在酸鹼值為 4.5 之溶離液的溶離百分率。而酸鹼值為 6.8 的溶離液是建構 A 等級相關性的體外溶離條件之較佳選擇。此資訊可提供國內廠商應用於劑型設計，以提昇臨床治療的有效性。

參考文獻

1. V.R. Uppoor, Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/ in vivo (bioavailability) correlation, *J. Control. Release.* 72 (2001) 127-132.
2. R. Lobenberg and G.L. Amidon, Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.* 50 (2000) 3-12.
3. O.A. Lake, M. Olling and D.M. Barends, In vitro/ in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tables with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.* 48 (1999) 13-19.
4. P. Veng-Pedersen, J.V.S. Gobburu, M.C. Meyer and A.B. Straughc, Carbamazepine level-A in vivo-in vitro correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach, *Biopharm. Drug Dispos.* 21 (2000) 1-6.
5. G. Balan, P. Timmins, D. Greene and P.H. Marathe, In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy volunteers, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1176-1185.
6. FDA, Guidance for industry: Extended Release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/ in vivo correlations, 1997.
7. K. Yu, M. Gebert, S. A. Altaf, D. Wong and D.R. Friend, Optimization of sustained-release diltiazem formulations in man by use of an in vitro/ in vivo correlation, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998) 845-850.
8. M. Pitsiu, G. Sathyan, S. Gupta and D. Verotta, A semiparametric deconvolution model to establish in vivo-in vitro correlation applied to OROS oxybutynin, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 702-712.
9. FDA, Guidance for industry: SUPAC-MR: Modified release solid oral dosage forms: Scale-up and post-approval changes: chemistry, manufacturing and control, in vitro dissolution testing, and in vivo bioequivalence documentation, 1997.
10. N.D. Eddington, P. Marroum, R. Uppor, A. Hussain and L. Augsburger, Development and internal validation of an in vitro-in vivo correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation, *Pharm. Res.* 15 (1998) 466-473.
11. H. Mahayni, G.S. Rekhi, R.S. Uppoor, P. Marroum, A.s. Hussain, L.L. Augsburger and N.D. Eddington, Evaluation of "external" predictability of an in vitro-in vivo

correlation for an extended-release formulation containing metoprolol tartrate, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 1354-1361.

12. Y. Akanuma, K. Kosaka, Y. Kanazawa, M. Kasuga, M. Fukuda and S. Aoki, Diabetic retinopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients: the role of gliclazide, *Am. J. Med.* 90 (1991) 74S-76S.
13. J.A. Colwell, Pathophysiology of vascular disease in diabetes: effects of gliclazide, *Am. J. Med.* 90 (1991) 50S-54S.
14. K.J. Palmer and R.N. Broden, Gliclazide: an update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Drug* 46 (1996) 92-125.
15. F.K. Glowka, T.W. Hermann and M. Zable, Bioavailability of gliclazide from some formulation tablets, *Int. J. Pharm.* 172 (1999) 71-77.
16. S.S. Hong, S.H. Lee, Y.J. Lee, S.J. Chung, M.H. Lee and C.K. Shim, Accelerated oral absorption of gliclazide in human subjects from a soft gelatin capsule containing a PEG 400 suspension of gliclazide, *J. Control. Release.* 51 (1998) 185-192.
17. G. Balan, P. Timmins, D.S. Greene and P.H. Marathe, In vitro in vivo correlation models for glibenclamide after administration of metformin/ glibenclamide tablets to healthy human volunteers, *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 831-838.

圖、表

Table 1. 溶解度試驗之紫外光分析方法之同日間準確度與精確度 (n=6)

Spiked concentration (μg/ml)	Calculated concentration (μg/ml)	SD[a]	CV[b] (%)	RSE[c] (%)
2	2.106	0.087	4.135	5.321
4	4.012	0.143	3.569	0.293
10	9.822	0.298	3.034	-1.784
20	19.974	0.522	2.614	-0.129
24	24.012	0.402	1.674	0.049
28	28.026	0.513	1.831	0.092

Table 2. 溶解度試驗之紫外光分析方法之異日間準確度與精確度(n=6)

Spiked concentration (μg/ml)	Calculated concentration (μg/ml)	SD[a]	CV[b] (%)	RSE[c] (%)
2	2.099	0.085	4.073	4.941
4	3.993	0.046	1.164	-0.176
10	9.915	0.070	0.711	-0.855
20	19.856	0.090	0.454	-0.722
24	24.107	0.113	0.469	0.444
28	28.048	0.186	0.664	0.171

Table 3. gliclazide 高效液相層析法之同日間與異日間之準確度與精確度 (n=6)

Intra-day (同日間) Nominal Conc. (μg/mL)	**0.05**	**0.15**	**4**	**8**	**10**
Mean	0.0439	0.1595	3.8956	7.9374	10.0751
SD[a]	0.0034	0.0091	0.0330	0.0871	0.0660
CV[b] **(%)**	7.64	5.72	0.85	1.10	0.66
Relative Err (%)	-12.19	6.31	-2.61	-0.78	0.75
Inter-day (異日間) Nominal Conc. (μg/mL)	**0.05**	**0.15**	**4**	**8**	**10**
Mean	0.0562	0.1368	3.8709	8.0317	10.0357
SD	0.0009	0.0074	0.1063	0.2486	0.7950
CV (%)	1.53	5.41	2.75	3.05	7.92
Relative Err (%)	12.50	-8.79	-3.23	1.97	0.36

Table 4. （A）Cmax、（B）Tmax、（C）AUC (0-t) 在三種不同 PH 值（1.2、4.5、6.8）之不同溶離百分率（20 %、50 %、80 %）之下的預測誤差百分比（percent prediction error，%PE）

(A) Cmax

	PH=1.2			PH=4.5			PH=6.8		
	20%	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**
F1	-3.6	-4.5	-4.5	-6.4	-6.0	-6.4	-4.3	-4.2	-2.4
F2	6.2	9.4	32.4	23.4	25.4	22.2	8.4	7.7	3.7
F3	-4.0	-5.7	-30.1	-20.5	-22.2	-19.3	-6.1	-6.1	-1.8

(B) Tmax

	PH=1.2			PH=4.5			PH=6.8		
	20%	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**
F1	-23.7	-19.8	3.4	-2.0	-1.0	-4.5	-20.8	-21.7	-27.2
F2	24.1	19.9	-5.7	3.4	1.4	4.5	21.1	21.7	28.0
F3	-4.5	-4.8	4.3	-1.4	-0.7	-2.3	-4.6	-4.6	-3.6

(C) AUC(0-t)

	PH=1.2			PH=4.5			PH=6.8		
	20%	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**	**20%**	**50%**	**80%**
F1	-7.4	-7.8	-4.6	-7.3	-6.9	-7.5	-7.7	-7.8	-6.8
F2	12.4	14.6	28.1	23.8	24.8	23.1	14.0	13.5	10.3
F3	-5.9	-7.9	-24.0	-17.6	-18.8	-16.7	-7.3	-6.9	-4.1

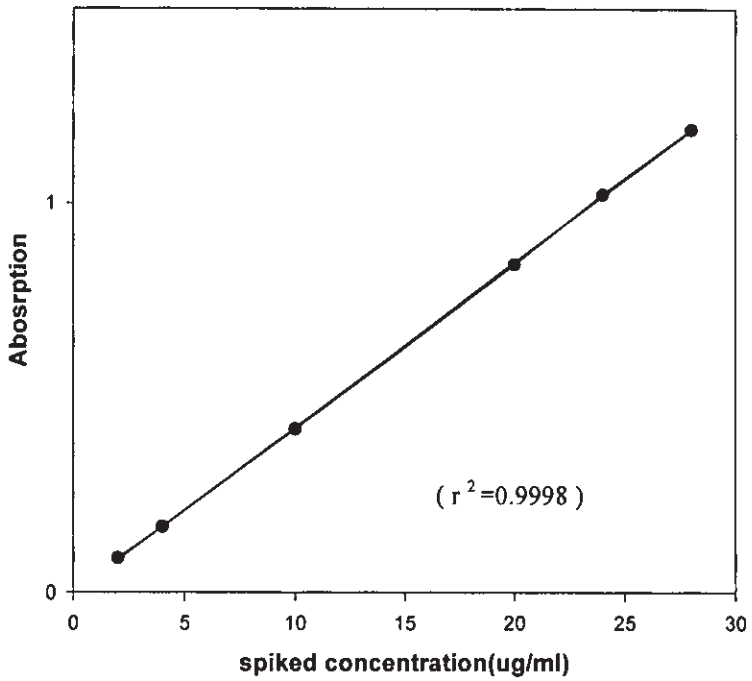


Fig 1. gliclazide 溶解度試驗之同日間準確度精確度之檢量線 (n=6)

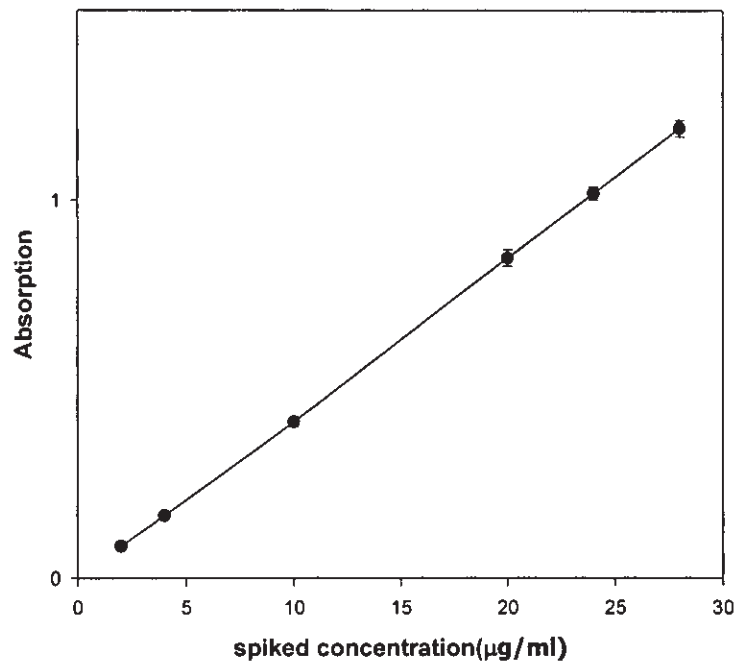


Fig 2. gliclazide 溶解度試驗之異日間準確度精確度之檢量線(n=6)

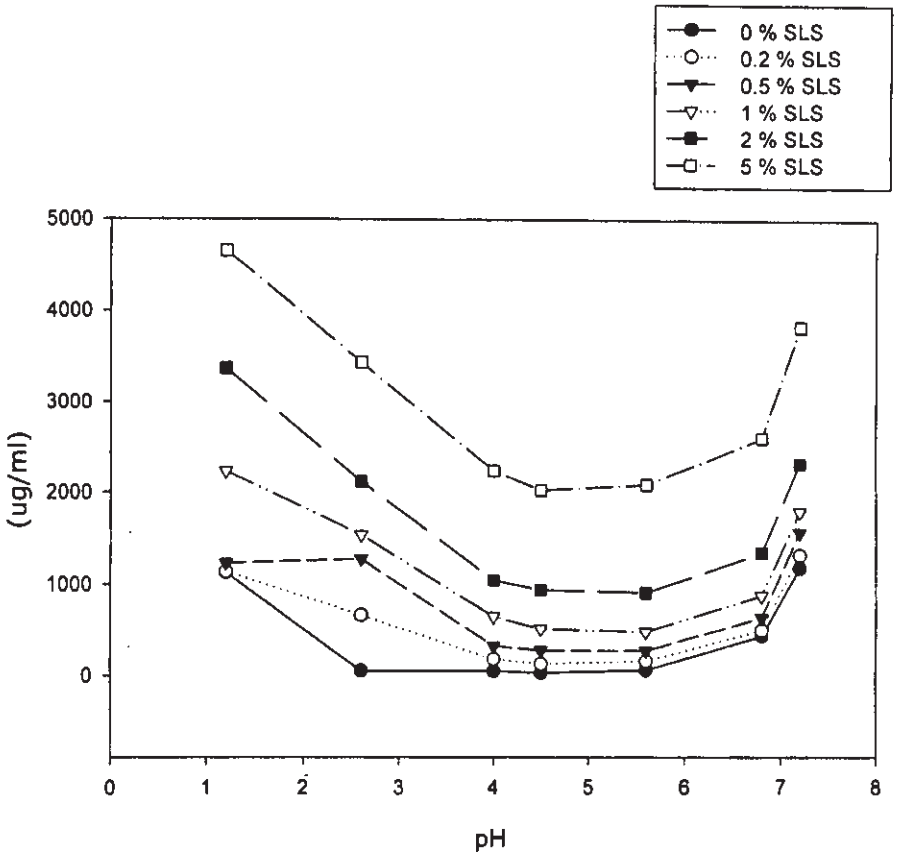
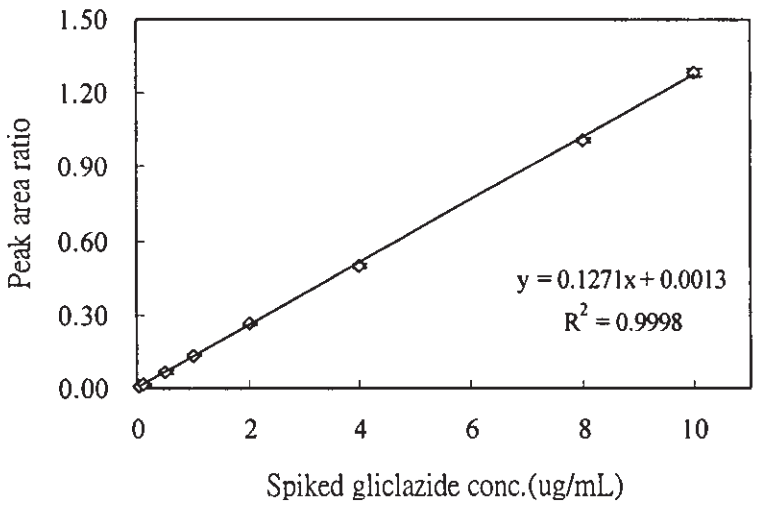


Fig 3. gliclazide 在不同 pH 值(1.2, 2.6, 4.0, 4.5, 5.6, 6.8, 7.2)與不同濃度 SLS （0-5%）之溶解度試驗 (n=3)

(A) Inter-day



(B) Intra-day

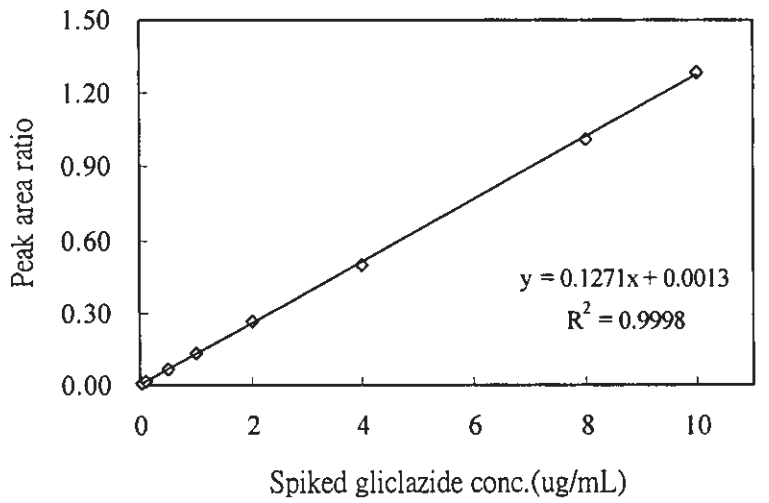


Fig 4. gliclazide 高效液相層析法之同日間異日間之檢量線 (n=6)

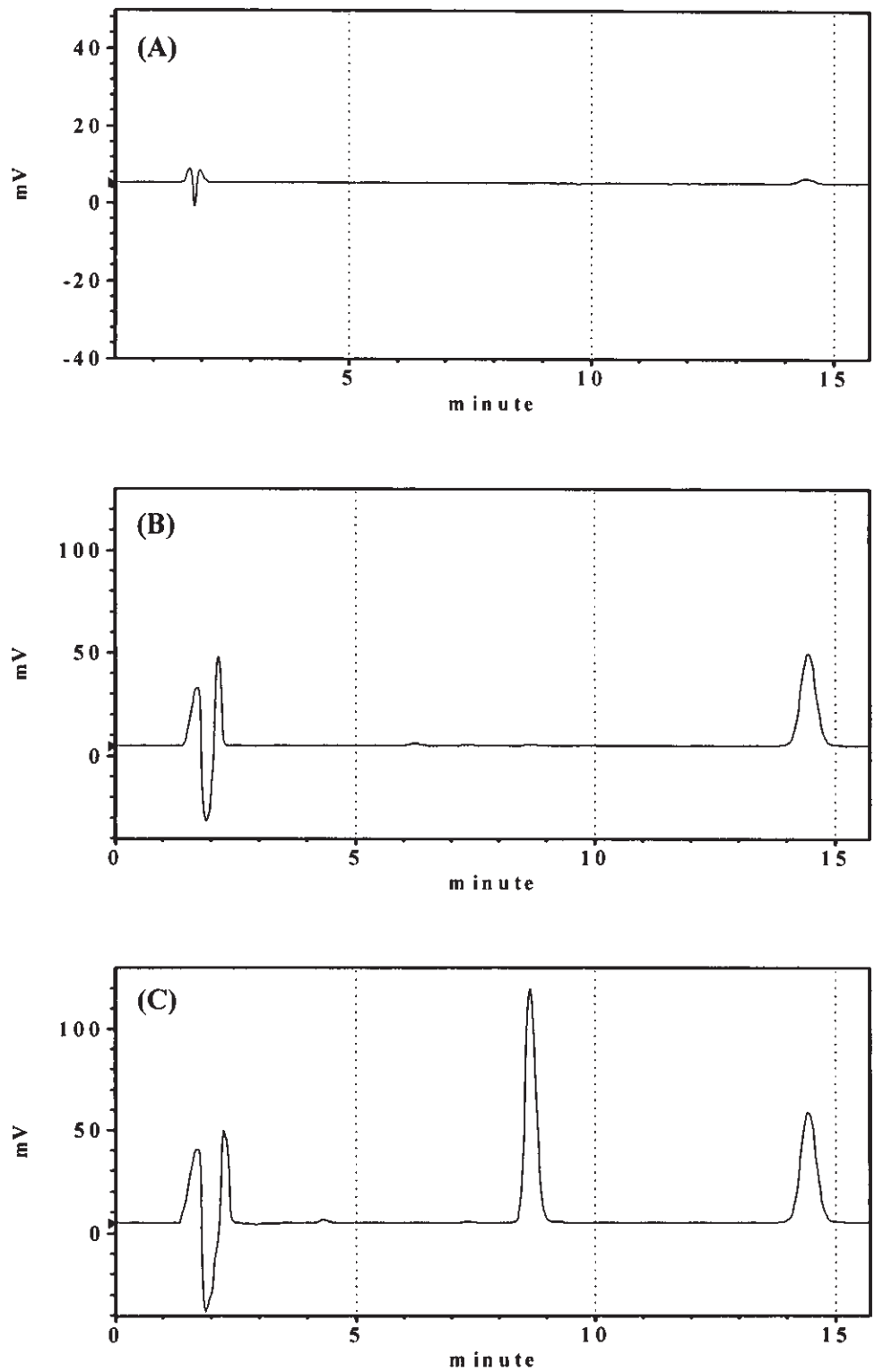


Fig 5. (A) blank solution，(B) 內部標準品 glibenclamide，(C) 已知濃度之 gliclazide 與 glibenclamide (IS) 之層析圖譜圖

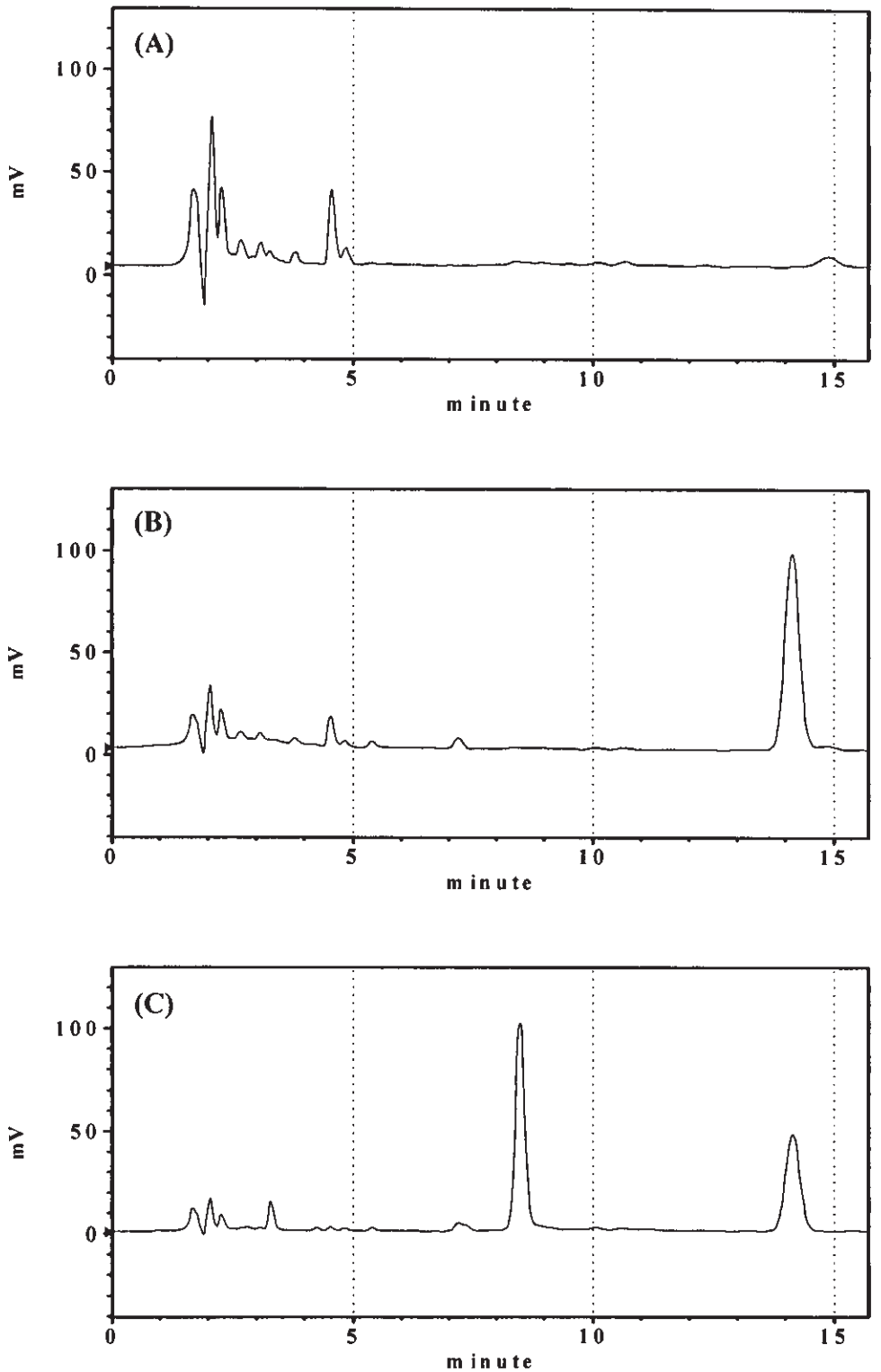


Fig 6. (A) blank plasma，(B) 內部標準品 glibenclamide，(C) 已知濃度之 gliclazide 與 glibenclamide (IS) 之層析圖譜圖

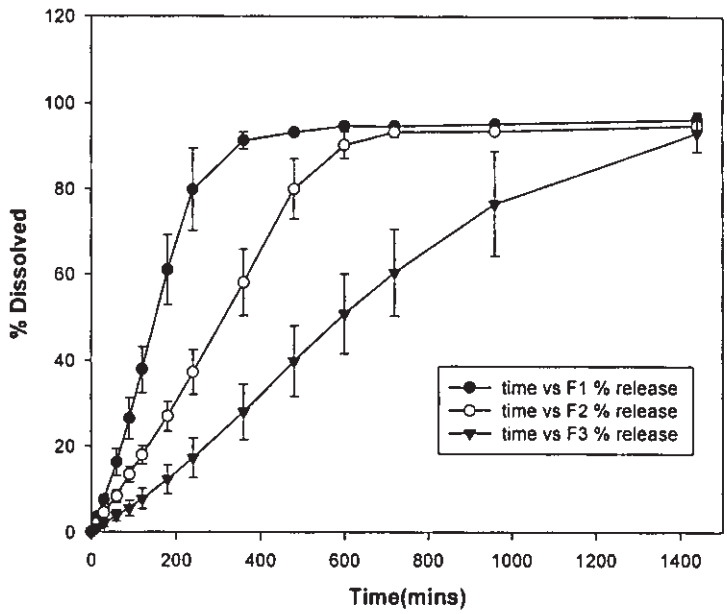


Fig 7. gliclazide 三種不同錠片處方在 pH = 1.2 之溶離曲線圖 (n=6)

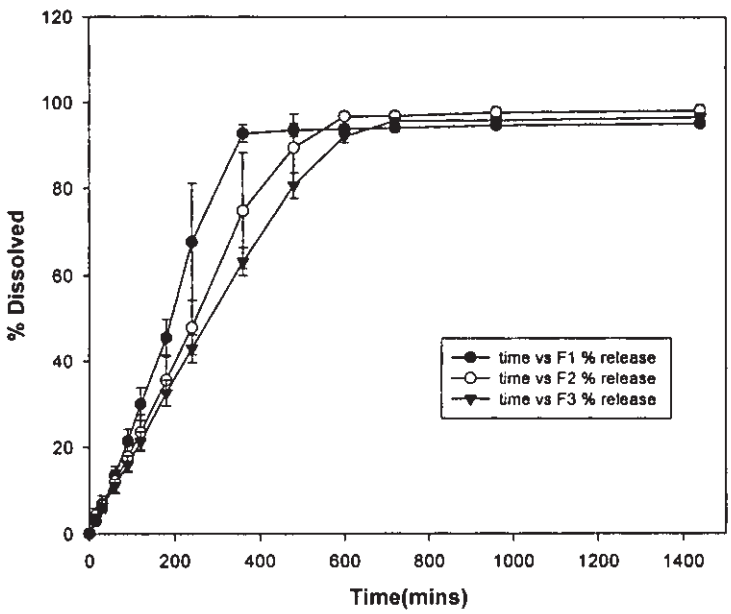


Fig 8. gliclazide 三種不同錠片處方在 pH = 4.5+1% SLS 之溶離曲線圖 (n=6)

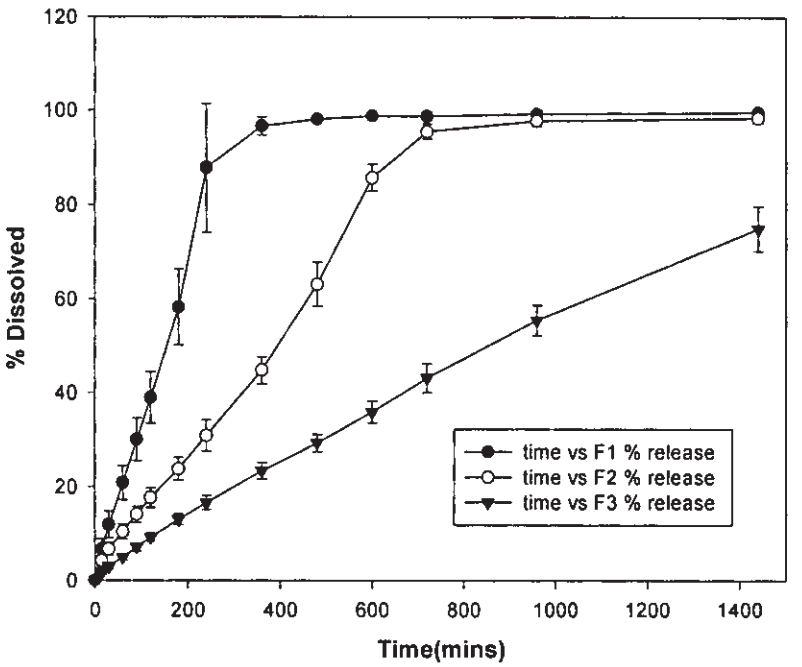


Fig 9. gliclazide 三種不同錠片處方在 pH = 6.8 之溶離曲線圖 (n=6)

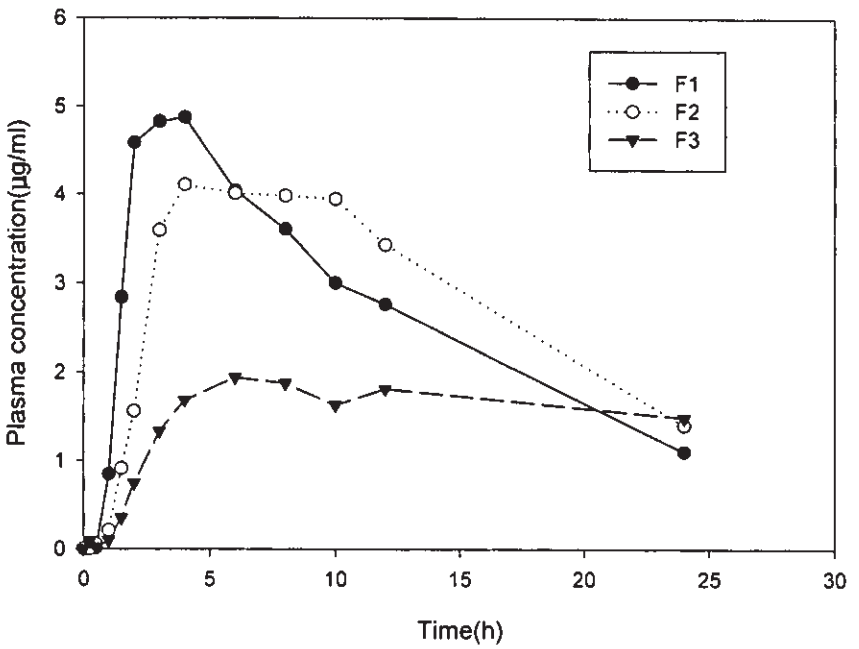


Fig. 10 三種不同溶離速率處方之平均血漿濃度圖

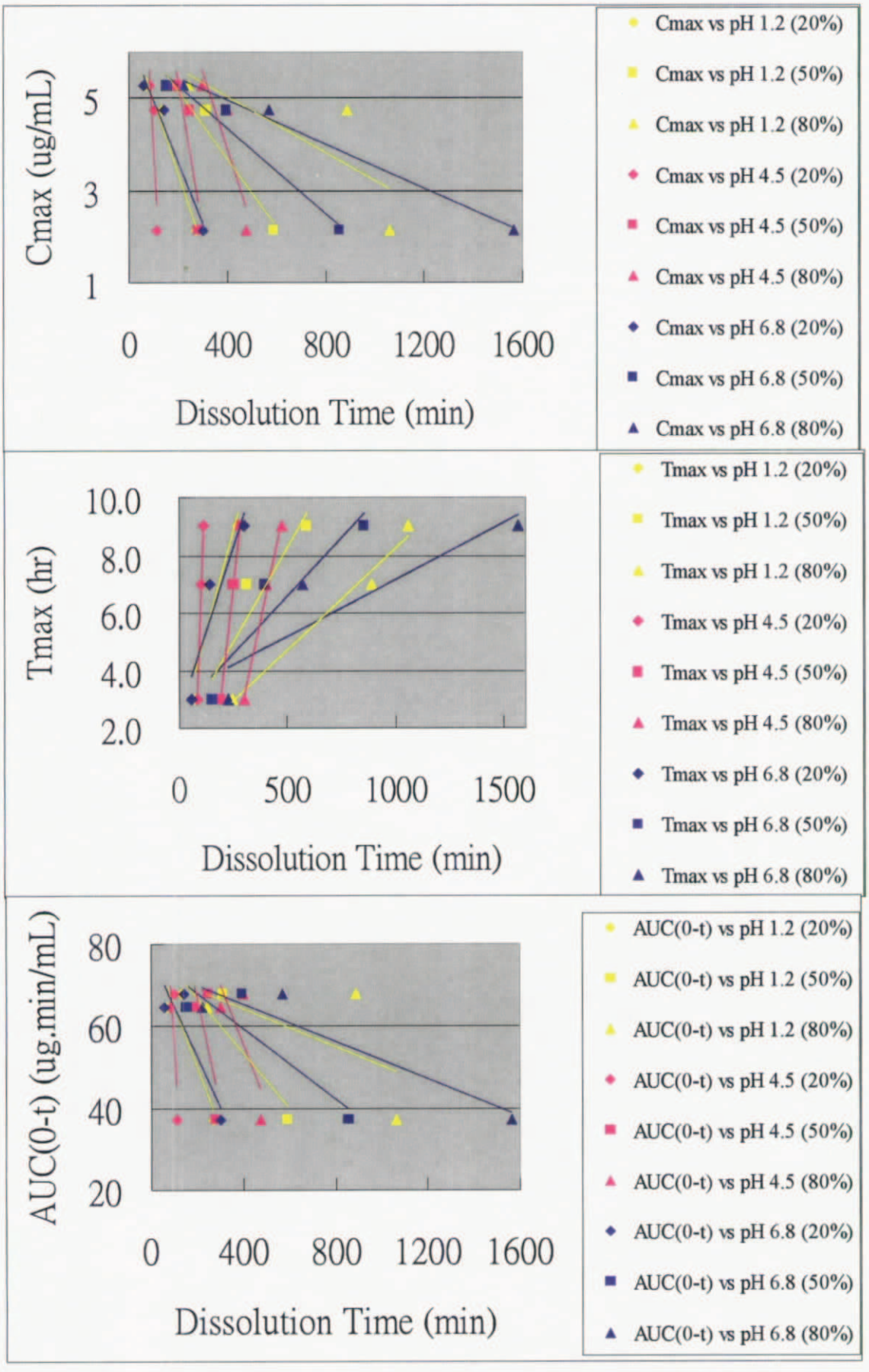


Fig. 11 建構 C 等級體內體外相關性

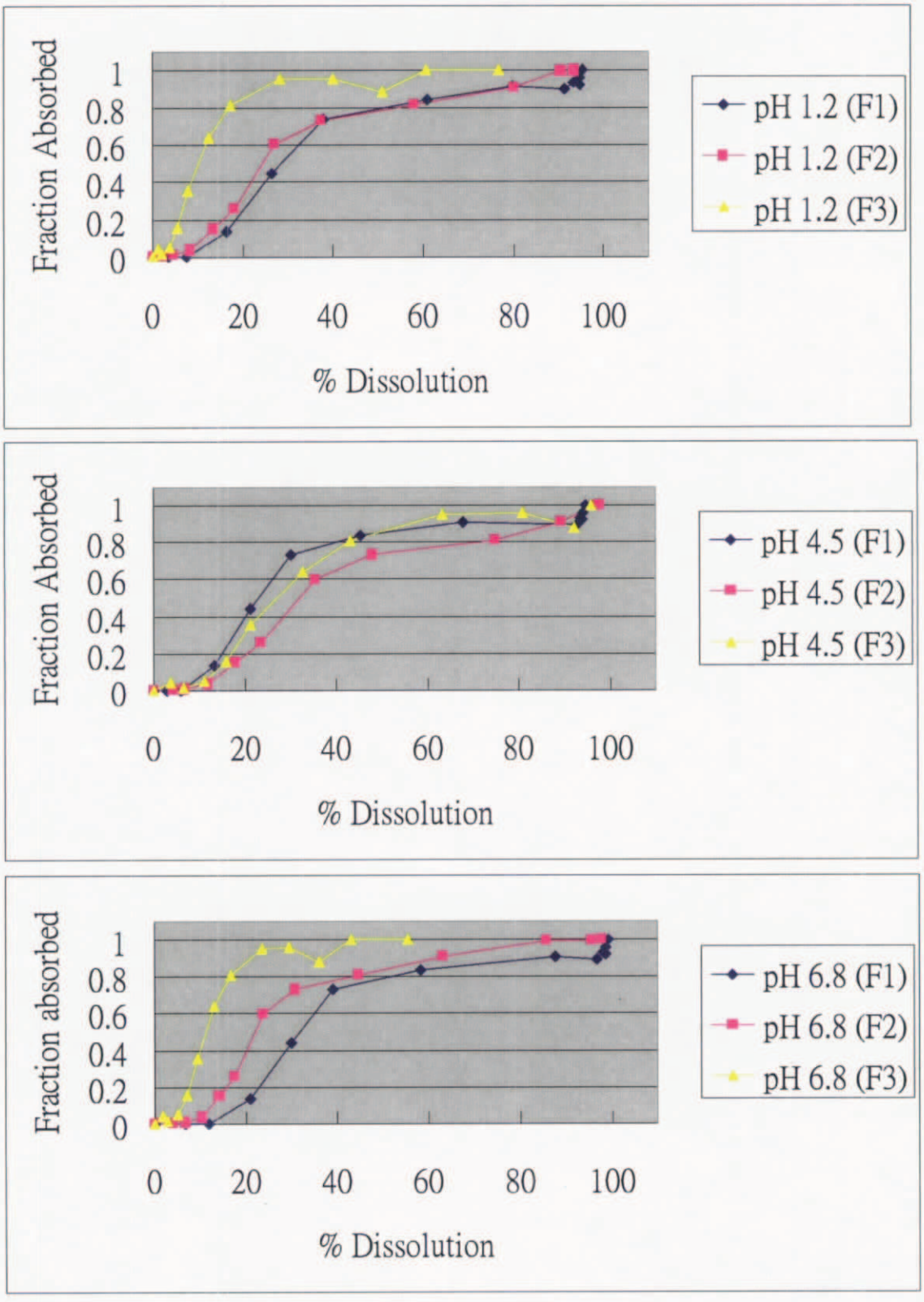


Fig. 12 建構 A 等級體內體外相關性

```
Dim Time(20) As Integer
Dim Character(20), Response(20), Transfer(20) As Variant
Dim x As String
Sub pointarea()

    X=InputBox (輸入數據之工作表)

    Sheets(x). Select
    Numcount=0
    For Each cell In Columns("A"). Cells
      If IsNumeric(cell) Then
        If IsEmpty(cell) Then Exit For
        Numcount= numcount+1
        Time(numcount)=cell. Value
        Character(numcount)=cell.Offset(0,1).Value
        Response(numcount)= cell.Offset(0,2).Value
      End If
    Next cell
    Transfer(1)=Response(1)/Character(1)
    Range("D2"). Value=Transfer(1)
    For I=2 To numcunt
      Transfer(I)=Response(I)
      For J=1 To I-1
        Transfer(I)= Transfer(I)- Transfer(J)* Character(I-J+1)
      Next J
      Transfer(I)= Transfer(I)/Character(1)
      Range("D"&I+1). Value= Transfer(I)
    Next I
End Sub
```

Fig. 13 巨集（Excel Macro）for Point-Area Deconvolution