

【生物药剂学专栏】

佐匹克隆的物理化学性质和生物药剂学分类系统属性研究

尹 婕, 白雅婷, 南 楠, 陈 华*

中国食品药品检定研究院 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629

摘要:目的 研究佐匹克隆的生物药剂学分类系统(BCS), 并对原研和3家仿制企业原料的关键理化性质进行对比评价, 为佐匹克隆片剂的一致性评价提供依据。方法 检测pH 6.8和pH 7.4的磷酸盐缓冲液中佐匹克隆的固有溶出速率; 分别采用差示扫描量热法(DSC)和X射线粉末衍射法对佐匹克隆的晶型进行考察; 采用高效液相色谱(HPLC)法测定佐匹克隆不同pH介质中的平衡溶解度及表观油水分配系数; 分别采用平行人工膜渗透性模型(PAMPA)和Caco-2细胞模型, 考察佐匹克隆的有效渗透性。对佐匹克隆的BCS进行初步判定, 并考察原研与仿制企业原料的差异。结果 原研与仿制企业的佐匹克隆晶型为同一晶型, 为对映异构体形成的无水非中心对称的正交晶型化合物; 佐匹克隆在酸性介质中溶解度最高, 为高溶解度药物; 表观油水分配系数结果表明, 佐匹克隆在胃内几乎无吸收, 在不同肠段存在不同程度的吸收; PAMPA和Caco-2细胞模型均判定佐匹克隆为高渗透性药物, P-gp转运体参与佐匹克隆的肠道转运过程。原研与仿制企业原料的固有溶出速率、晶型、溶解度、表观油水分配系数和有效渗透性基本一致。结论 佐匹克隆为BCS I类药物; 原研与仿制企业原料的关键理化性质基本一致; 为佐匹克隆片的体外溶出行为评价和体内外相关性研究提供数据支撑。

关键词: 佐匹克隆; 理化性质; 生物药剂学分类系统; 仿制药一致性评价; 溶解性; 渗透性; 平行人工膜渗透性模型; Caco-2细胞模型

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)06-1171-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.06.006

Research on attribute of physicochemical properties and biopharmaceutics classification system of zopiclone

YIN Jie, BAI Yating, NAN Nan, CHEN Hua

National Institutes for Food and Drug Control, National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China

Abstract: Objective To determine the biopharmaceutics classification system (BCS) of zopiclone and compare the key physicochemical characteristics of the original and generic drug materials. **Methods** The intrinsic dissolution rates of zopiclone in pH 6.8 and pH 7.4 phosphate buffer were measured; The crystal form of zopiclone was investigated by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray powder diffraction (XRD); The equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of zopiclone in different pH media were determined by high performance liquid chromatography (HPLC); Parallel artificial membrane permeability model (PAMPA) and Caco-2 cell model were used to investigate the effective permeability of zopiclone. The BCS of zopiclone was preliminarily determined, and the differences of raw materials between original research and imitation enterprises were investigated. **Results** The crystal form of zopiclone from original research and imitation enterprises was the same crystal form, which was an anhydrous noncentrosymmetric orthorhombic compound formed by enantiomer; Zopiclone had the highest solubility in acid medium, which was a high solubility drug. The results of apparent oil-water partition coefficient showed that zopiclone had almost no absorption in the stomach, and there were different degrees of absorption in different intestinal segments. Both Pampa and Caco-2 cell models showed that zopiclone was a highly permeable drug. P-gp transporter was involved in the intestinal transport

收稿日期: 2020-12-17

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09101001)

第一作者: 尹 婕,女,副研究员,研究方向为药物质量控制与检测分析。Tel:(010)53851627 E-mail:yinjie@nifdc.org.cn

*通信作者: 陈 华,男,主任药师,研究方向为药物质量控制与检测分析。Tel:(010)53851622 E-mail:chenhua@nifdc.org.cn

process of zopiclone. There was no significant difference in the intrinsic dissolution rate, crystal form, solubility, apparent oil-water partition coefficient and effective permeability between the original and generic drug materials, although there were obvious differences in the synthesis process. **Conclusion** Zopiclone is classified into class I in the BCS. By comparing the key parameters of the original and generic drug materials, the data support can be provided for the *in vitro* dissolution behavior evaluation and *in vitro* and *in vivo* correlation research of zopiclone tablets.

Key words: zopiclone; physicochemical properties; biopharmaceutics classification system; generic drug consistency evaluation; solubility; permeability; parallel artificial membrane permeability model (PAMPA); Caco-2 cell model

生物药剂学分类系统(biopharmaceutics classification system, BCS)是基于药物在水中的溶解度和肠壁渗透能力对药物进行科学分类的体系^[1],是预测药物体内相关性的重要依据,在新药研发、仿制药注册申请、生产工艺放大和变更以及上市后药品评价等方面都有重要应用。目前越来越多的监管机构在药品研发和申报过程中都接受了BCS的概念,其中美国食品药品监督管理局(FDA)、世界卫生组织(WHO)和欧洲药品管理局(EMA)发布的基于BCS分类的指导原则最具权威性^[2-4]。我国在仿制药一致性评价工作中发布的《人体生物等效性试验豁免指导原则》也是基于药物的BCS分类起草,要求在申请豁免或简化生物等效性(bioequivalence, BE)时提供药物的BCS信息。

佐匹克隆(zopiclone)是1987年上市的第一个非苯二氮草类镇静催眠药,具有镇静、抗焦虑、抗惊厥和肌肉松弛作用,是环吡咯酮类第三代镇静催眠药物的代表,属于国家基本药物目录品种,于1989年在国内上市。目前国产佐匹克隆已经占据国内市场的主要份额。在WHO、美国国立儿童健康与人类发育研究所(NICHHD)和FDA已公布的部分药物BCS分类结果中均未收载佐匹克隆^[5-6]。在基于药物体内处置的生物药剂学分类系统(biopharmaceutics drug disposition classification system, BDDCS)中,佐匹克隆以及右佐匹克隆被归为第1类,即高溶解性、强代谢的药物^[7]。这两种生物药剂学分类系统由于判定方法的不同,可能会导致不同的分类结果。不同监管机构对两者的认知也尚未完全统一^[8]。因此有必要对佐匹克隆的溶解性和肠壁渗透性进行研究,明确其BCS分类,为其仿制药一致性评价工作提供依据。

本研究分别采用用于评价药物肠壁渗透性的两种常用的体外模型——平行人工膜渗透性仿生模型(parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA)和人结肠癌细胞(Caco-2)单细胞层体外培养模型,考察佐匹克隆的有效渗透性,并结合溶解度、固有溶出速率、晶型和表观油水分配系

数(apparent oil-water distribution coefficient, P_{app})这些理化参数的结果,对佐匹克隆的BCS分类进行初步判定。通过比较原研与仿制企业佐匹克隆原料的固有溶出速率、晶型、溶解度的差异,为进一步开展仿制药体外溶出行为评价和体内相关性研究提供数据支持。

1 材料

1.1 主要仪器

XS205DU电子分析天平(Mettler Toledo公司); S220-B酸度计(Mettler Toledo公司); SB25-12D超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); J25高速冷冻离心机(Beckman Coulter公司); HZQ-F160-全温振荡培养箱(常州申光仪器有限公司); 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司, Agilent 1260); FODT-101G光纤固有溶出度实时测定仪(上海富科思分析仪器有限公司); DSC 214 Polyma差示扫描量热仪(德国NETZSCH公司); SmartLab 9KW X射线衍射仪(日本理学公司); μ Flux™型药物渗透性测定仪(美国Pion Inc.公司); 3144 CO₂培养箱(Thermo公司); Plus384酶标仪(Spectra公司); 倒置相差显微镜(日本Nikon公司); 1389 A2生物安全柜(Thermo公司); Z2颗粒计数分析仪(Beckman Coulter公司)。

1.2 药物及主要试剂

佐匹克隆对照品(批号100870-201502,质量分数99.9%,中国食品药品检定研究院); 佐匹克隆原研企业原料(Sanofi-Aventis, 批号Z51000WS01); 佐匹克隆国内企业A原料(齐鲁制药有限公司, 批号511028HD); 国内企业B原料(吉林金恒制药股份有限公司, 批号20170303); 国内企业C原料(广东华润顺峰药业有限公司, 批号20170102); 维拉帕米(质量分数98%, Sigma-Aldrich公司); 盐酸普萘洛尔对照品(批号100783-201202,质量分数100%,中国食品药品检定研究院); 酒石酸美托洛尔对照品(批号100084-201403,质量分数99.9%,中国食品药品检定研究院); 阿替洛尔对照品(批号100117-201606,质量分数99.9%,中国食品药品检定研

究院)。

接收池漏槽条件缓冲液(acceptor sink conditioned buffer, ASB)、胃肠道模拟脂质体(批号520426)购自 Pion Inc. 公司; DMEM 培养基(Macgene 公司); 胎牛血清、Pen-Strep 双抗液、0.25% Trypsin-EDTA、HBSS 均购自 Gibco 公司; transwell 12 孔板(3401, Corning 公司); 十二烷基硫酸钠、正辛醇均为色谱纯, 购自 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为分析纯。本研究所用不同 pH 值缓冲溶液均参照《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》中的附录配制。

1.3 细胞

人结肠癌 Caco-2 细胞株, 购自 ATCC, 试验用细胞代数在 25~50 代。

2 方法和结果

2.1 固有溶出速率测定

取不同厂家的佐匹克隆原料约 100 mg 装入压片模孔中(直径 4 mm), 150 kg 压力下加压保持 2 min, 重复 3 次。取出压片, 确认表面完整光洁后安装在钢轴上, 浸入不同的实验介质(pH 1.0 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液)中, 介质体积为 700 mL, 温度为 37 °C, 搅拌速度为 300 r/min, 采集 24 h, 在 303 nm 波长处(参比波长为 550 nm)采用光纤探头分别测定药物浓度, 绘制原料的溶出曲线。平行试验 3 次。

企业 C 的佐匹克隆原料在不同 pH 值的缓冲介质中固有溶出行为不同。在 pH 1.0 和 pH 4.0 的介质中, 佐匹克隆压片迅速崩解并散落在溶出杯中, 整个溶出行为速率过快, 在短时间内全部溶解并出现平台期, 因此这 2 种介质不适于进行佐匹克隆固有溶出速率的测定。在 pH 6.8 和 pH 7.4 的介质中, 佐匹克隆在 24 h 内以恒定的速率溶出, 都可作为佐匹克隆固有溶出速率的测定条件。

佐匹克隆在 pH 6.8 和 pH 7.4 的介质中的固有溶出速率测定结果如图 1 所示。可见同一生产企业的佐匹克隆原料在 pH 6.8 和 pH 7.4 介质中的固有溶出速率基本一致, 且同一介质条件下不同厂家生产的佐匹克隆原料的固有溶出速率也基本一致, 均无显著性差异。

2.2 晶型考察

分别采用差示扫描量热法(DSC)和 X 射线粉末衍射法对不同企业佐匹克隆原料的晶型进行考察。精密称取不同企业的佐匹克隆原料 3~5 mg, 分别置于铝质坩埚中, 各坩埚加盖后在盖子上扎 1 个小

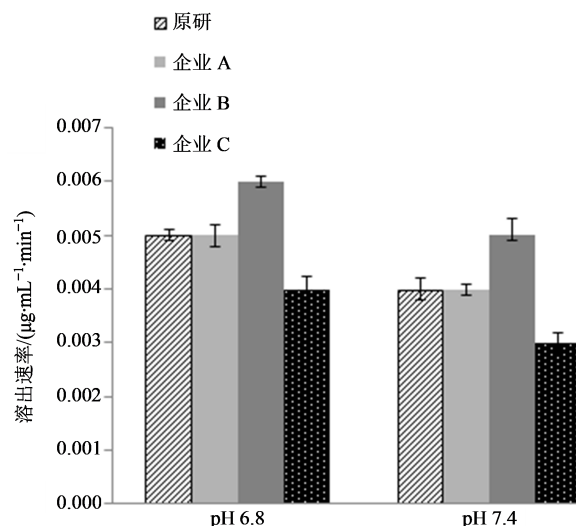


图1 佐匹克隆在 pH 6.8 和 pH 7.4 的介质中的固有溶出速率 ($n=3$)

Fig. 1 Intrinsic dissolution rate of zopiclone in media with different pH value ($n=3$)

孔, 压盖密封后分别放入差示扫描量热仪中以 10 °C/min 的速率在 20 mL/min 的氮气流下加热。

将不同企业的佐匹克隆原料分别研磨后过 100 目筛, 各取 50 mg 样品置载样玻璃片凹槽中, 用玻璃片正压法制片备用。X 射线粉末衍射实验条件为: 阳极靶 Cu, 配 Ni 滤光片, 射线管电压 45 kV, 电流 200 mA, 入射狭缝 0.5°, 接收狭缝 20 mm, 2θ 扫描范围 5°~40°, 扫描间隔 2°, 发散狭缝 1°, 防散射狭缝 1°^[9]。

佐匹克隆含有 1 个手性中心及 4 个扭转角, 制剂中使用的原料为消旋体。文献报道佐匹克隆原料存在 3 种晶型, 分别为由对映异构体形成的无水非中心对称的正交晶型化合物、外消旋体形成单斜二水化合物以及两种晶型的混合体^[10]。不同生产企业的合成原料及合成工艺均存在差异, 通过考察不同企业原料的晶型可对原料进行一致性评价。

图 2 为不同企业原料的 DSC 扫描结果, 不同企业原料的热分析图几乎无明显差异, 均在 177~178 °C 存在吸热峰, 无水峰或者去溶剂化峰, 也不存在转晶现象。由此初步判断原研与仿制企业的佐匹克隆晶型为同一晶型, 为对映异构体形成的无水非中心对称的正交晶型化合物。

按照《中国药典》2020 年版四部通则 0451 对不同厂家的佐匹克隆原料进行 X 射线粉末衍射定性分析, 获取特征性衍射数据, 结果见图 3。尽管在峰强和峰面积上有略微的区别, 但原研与 3 家仿制企业的佐匹克隆晶型均为同一晶型, 在关键的 2θ

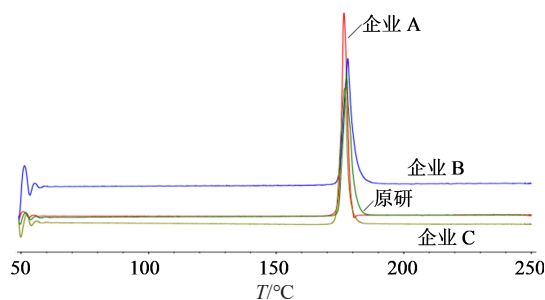


图2 不同企业原料药DSC扫描结果

Fig. 2 DSC results of zopiclone from different manufacturers

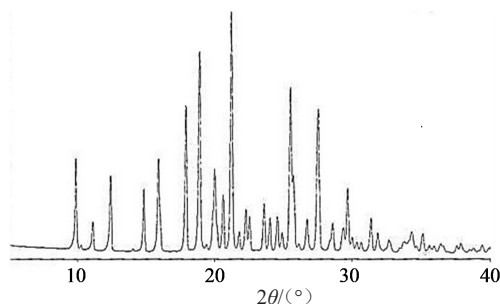


图3 佐匹克隆原料X射线粉末衍射结果

Fig. 3 X-ray powder diffraction result of zopiclone

值(5.0°、10.0°、14.9°、16.0°、17.9°、21.3°、25.6°、27.6°、29.7°)处均存在明显的衍射峰。对比结果可以确定4个企业生产的佐匹克隆原料的晶型应均为无水非中心对称的正交晶型化合物。

2.3 平衡溶解度测定

参照《中国药典》2020年版二部佐匹克隆原料有关物质检查的HPLC色谱方法,采用HPLC法测定平衡溶解度。HPLC色谱条件:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂[Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)或效能相当的色谱柱];以乙腈-磷酸盐溶液(取十二烷基硫酸钠8.1 g与磷酸二氢钠1.6 g,加水1 000 mL使溶解,用磷酸调pH值至3.5)(37.5:62.5)为流动相;检测波长为303 nm;进样体积为20 μL。

取过量佐匹克隆原料置于离心管,分别加入不同pH值的缓冲溶液(pH值分别为1.2、2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、6.0、6.8、7.0、7.4)2 mL,超声30 min使溶液成为饱和状态,放入(37.0±0.5)°C的恒温振荡器中,100 r/min振摇48 h。取上述饱和溶液以3 000 r/min离心15 min。取上清液,滤过,用流动相稀释后进样20 μL,平行测定3次,记录峰面积并计算佐匹克隆在不同pH缓冲液中的平衡溶解度^[11]。

佐匹克隆的pH-溶解度曲线见图4,可见佐匹克隆的溶解度呈现明显的pH值相关性。在pH值1.2的酸性介质中其溶解度最大(约为33.58 mg/mL),随着

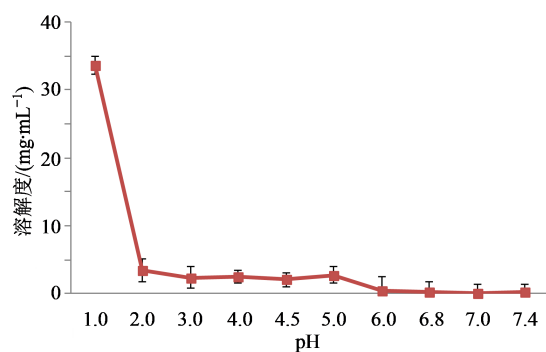


图4 不同pH缓冲介质中佐匹克隆的平衡溶解度(37 °C)

Fig. 4 Equilibrium solubility of zopiclone in media with different pH value(37 °C)

介质pH值的升高,其溶解度明显减小。在pH 6.8、pH 7.4和水(pH 7.0)中的溶解度分别为0.19、0.14、0.13 mg/mL。经单因素方差分析,原研与3家仿制企业佐匹克隆原料的溶解度均无显著性差异。佐匹克隆片临床服用的最大剂量为7.5 mg/d,因此在pH值1.0~6.8的范围内,佐匹克隆能够完全溶解在小于50 mL的水溶性缓冲介质中,属于高溶解性药物。

2.4 P_{app}测定

2.4.1 水相饱和正辛醇溶液及正辛醇饱和水相溶液的制备 分别量取油相(正辛醇)和水相(pH为1.0、4.5、6.8、7.4的介质以及纯化水)各100 mL置于250 mL锥形瓶中,超声30 min后,置于25 °C恒温振荡器中以150 r/min的转速振摇,48 h后取出,静置过夜,分液漏斗分液。上层为不同pH水相饱和的正辛醇,下层为正辛醇饱和的不同pH值水相^[12]。

2.4.2 油水比例的确定 精密称取佐匹克隆约15 mg置于50 mL容量瓶中,加入水相饱和的正辛醇,超声30 min,放冷,用水饱和的正辛醇稀释至刻度摇匀,作为佐匹克隆水相饱和的正辛醇溶液。取上述佐匹克隆水相饱和的正辛醇溶液一定量,按照1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9的油水比例加入正辛醇饱和的水相溶液,混匀超声30 min,置于(37.0±0.5)°C恒温振荡培养箱中,24 h后取出离心,以3 000 r/min离心15 min。离心结束后上层液体用注射器直接吸出并滤过,再用吸入一定体积空气的注射器插入下层液体,排出空气后吸入一定体积的下层液体,拔出针头后迅速拆下针头并滤过。滤过后的上下层溶液分别用流动相和正辛醇稀释成1 mL中含佐匹克隆40 μg的溶液,取20 μL注入液相色谱仪,按“2.3”项下色谱条件测定,记录

峰面积。按外标法计算佐匹克隆在不同比例介质中的浓度,平行实验3次,按公式(1)计算佐匹克隆在不同油水比例下的 P_{appow} ,并求得 $\lg P_{\text{appow}}$ 。

$$P_{\text{appow}} = \frac{C_o}{C_w} \quad (\text{公式1})$$

C_o 为油水分配平衡时药物在水饱和的正辛醇中的浓度, C_w 为油水分配平衡时药物在正辛醇饱和的水中的浓度

当油相体积一定时,随着水相体积的增加,佐匹克隆在油相和水相的分配没有明显的差异, $\lg P_{\text{appow}}$ 值都在0.83~0.90。可见佐匹克隆在水相与正辛醇相之间的分配不受油水比例的影响,故以1:1的油水比例进行不同pH缓冲溶液中的 P_{appow} 的测定。

2.4.3 P_{appow} 的测定 精密称取佐匹克隆15 mg置于50 mL容量瓶中,加入水相饱和的正辛醇,超声30 min,放冷,用水饱和的正辛醇稀释至刻度摇匀,作为佐匹克隆水相饱和的正辛醇溶液。精密量取该溶液10 mL,加入正辛醇饱和的对应pH值的水相溶液10 mL,混匀超声30 min,置于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温振荡培养箱中,24 h后取出离心,以3 000 r/min离心15 min。按照“2.4.2”项下自“离心结束后……”起同法操作,按公式(1)计算佐匹克隆在不同pH值缓冲介质中的 P_{appow} ,并计算 $\lg P_{\text{appow}}$ 。

佐匹克隆在不同介质中的油水分配系数如表1所示,在pH 1.0~4.5的介质中,佐匹克隆的 $\lg P_{\text{appow}}$ 为负值,表明在低pH条件下,佐匹克隆在水相的浓度大于油相中的浓度,说明佐匹克隆进入胃内以溶解过程为主;当介质的pH值处于6.8~7.4时,佐匹克隆的 $\lg P_{\text{appow}}$ 呈正值,其在油相的浓度大于在水相的浓度,佐匹克隆在肠道内以吸收过程为主。

表1 不同pH缓冲溶液中佐匹克隆的 P_{appow}
Table 1 P_{appow} of zopiclone in media with different pH value

pH	P_{appow}	$\lg P_{\text{appow}}$
1.0	0.013	-1.87
4.5	0.305	-0.52
6.8	7.785	0.89
7.0	7.444	0.87
7.4	12.499	1.10

$\lg P_{\text{appow}}$ 对于药物在胃肠道吸收的速度和程度有很大影响。文献报道,药物最佳 $\lg P_{\text{appow}}$ 在-1.0~2.0,此范围内的化合物脂溶性和水溶性适中,具有较好的生物膜渗透性而发挥疗效^[13]。人体胃肠道不同部位的酸碱性不同,胃部pH 1.0~3.0、十二指

肠pH 4.0~6.0、空肠pH 6.0~7.0、回肠pH 7.0,结肠pH 8.0。在正辛醇-水不同介质中(pH 1.0~7.4),佐匹克隆 $\lg P_{\text{appow}}$ 随pH值升高而增大。使用Gastroplus软件对佐匹克隆在人体内的吸收情况进行预测(见图5),结果表明,佐匹克隆在胃内几乎无吸收,在不同肠段存在不同程度的吸收能力,预测的药物体内吸收情况与其油水分配系数的结果基本相符。

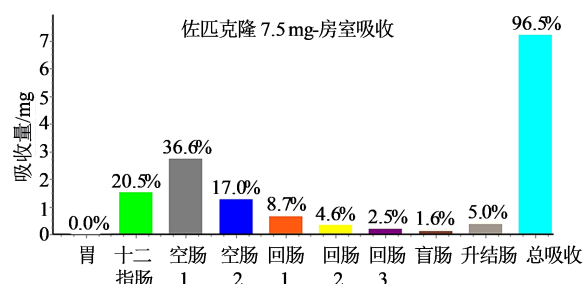


图5 Gastroplus对于佐匹克隆在胃肠道不同部位吸收情况的预测结果

Fig. 5 Simulation result of zopiclone in gastrointestinal tract using Gastroplus software

2.5 PAMPA 研究

PAMPA作为一种仿生系统,可以快速测定被动转运机制吸收药物的渗透性^[14-16],其测定结果与人体小肠灌注法测定的渗透性结果呈正相关,相关系数为0.83^[17]。采用平行人工膜实验测定佐匹克隆在被动转运中的有效渗透性,测定装置见图6。该装置分为供体室和受体室(均为20 mL),中间由仿生膜隔开。由于人体空腹肠液pH值为6.5,血液pH值为7.4,佐匹克隆的 pK_a 为 (6.70 ± 0.10) ,因此为了使渗透性的测定条件接近人体胃肠道环境,同时兼顾溶出曲线的测定,参照日本橙皮书和《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》,分别选择pH 6.8和pH 7.4的磷酸盐缓冲液作为实验介质。供体室代表胃肠道,分别加入pH 6.8和pH 7.4的磷酸盐缓冲液;受体室代表血液,加入pH 7.4的ASB缓冲液;中间的仿生膜代表胃肠道细胞膜,表面涂以胃肠道模拟脂质体(GIT lipid)。

首先在人造膜表面滴加20 μL 的胃肠道模拟脂质体,然后在供体室中分别加入20 mL的磷酸盐缓冲液(pH 6.8和pH 7.4),在受体室中加入20 mL的ASB缓冲液。精密称定佐匹克隆原料适量,用二甲基亚砜(DMSO)溶解并稀释制成每1 mL含佐匹克隆15 mg的贮备液。分别精密量取上述贮备液180 μL (pH 6.8介质)、150 μL (pH 7.4介质)置供体室中,并保证佐匹克隆在受体室的ASB缓冲液中满

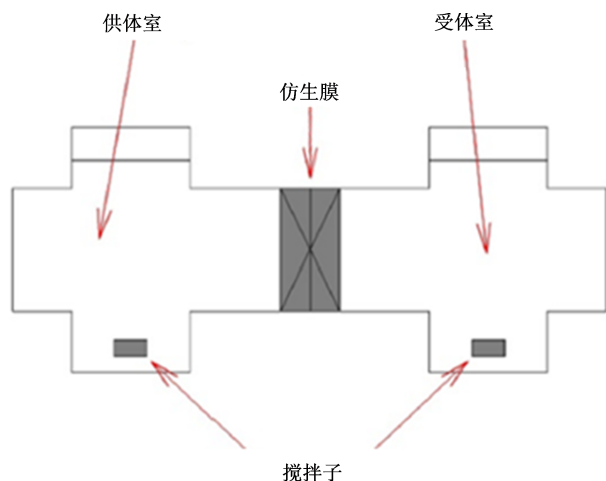


图6 μFLUX™药物渗透性测定仪示意图

Fig. 6 Sketch of μFLUX™ permeability apparatus

足漏槽条件。温度为37℃,搅拌速度为200 r/min,采集时间240 min,采样间隔60 s。将两侧光线探头分别置于液面下方,在300~310 nm波长范围内测定药物浓度,按公式(2)计算药物的渗透性^[18]。同时以酒石酸美托洛尔为参比样品对模型系统进行验证。

$$P_e = \frac{J}{C_i} = \left(\frac{d_c}{d_t} \right) \times V / (A \times C_i \times 60) \quad (\text{公式2})$$

P_e 为有效渗透性(cm/s); J 为渗透速率(Flux),即药物在单位时间通过单位膜面积的量($\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$); C_i 为供体室中药物的初始浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); $\frac{d_c}{d_t}$ 为单位时间内受体室中药物浓度的变化速率($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$); V 为受体室中缓冲液体积(mL); A 为人工膜面积:1.54 cm²。

以酒石酸美托洛尔为参比样品对模型系统进行验证。酒石酸美托洛尔在pH 6.8介质中的 P_e 为 1.20×10^{-4} cm/s,与实验报道数据在人体近端空肠中单相测定的 P_e 1.34×10^{-4} cm/s基本一致。由此证明本研究中采用体外模型来模拟人体小肠环境测得的药物渗透性结果,接近人体小肠灌流实验测得的结果,体外建模成功,且测定结果准确,可应用于药物的渗透性研究。同法测得酒石酸美托洛尔在pH 7.4介质中的 P_e 值为 5.96×10^{-4} cm/s。

佐匹克隆原料在pH 6.8和pH 7.4的缓冲液中的渗透性测定结果见图7。随着检测时间的增加,药物逐渐通过模拟的胃肠道细胞膜,由供体室转移到受体室中。根据公式(2)计算出佐匹克隆原料在pH 6.8和pH 7.4的缓冲液中被转运的 P_e 分别为 5.68×10^{-4} 、 6.58×10^{-4} cm/s。经单因素方差分析,原研与3家仿制企业的佐匹克隆原料的 P_e 值均无显著性差异,均高于酒石酸美托洛尔在相同条件下的测定结果,初步判定其为高渗透性药物。

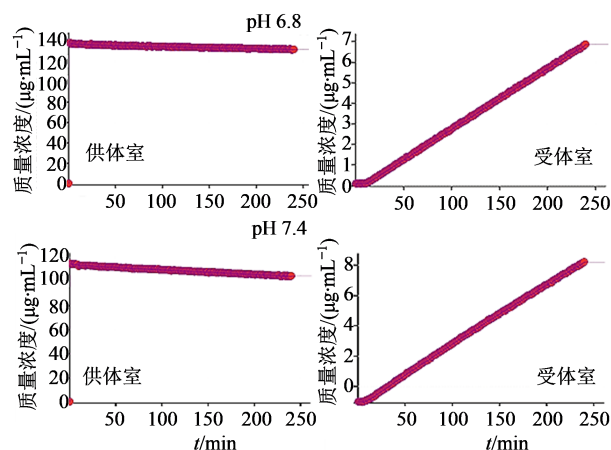


图7 佐匹克隆在供体室和受体室中的浓度(pH 6.8和pH 7.4)

Fig. 7 Concentration of zopiclone in donor and receptor (pH 6.8 or 7.4)

2.6 佐匹克隆在Caco-2细胞中的转运行为考察

Caco-2细胞可自发进行上皮样分化并形成紧密连接,分化出绒毛面肠腔侧(apical, AP)和基底面肠壁侧(basolateral, BL),其形态学、标志酶的功能表达、渗透特征等与小肠柱状上皮细胞非常相似^[19]。它可用于研究药物的摄取、转运和外排特性,与人体口服吸收程度具有非常高的相关性,并且是一种用于药物吸收研究的快速筛选工具,是研究药物肠道吸收的常用模型^[20]。

2.6.1 Caco-2单层细胞膜的培养 取20~35代的Caco-2细胞进行研究^[21-22]。取对数生长期的Caco-2细胞悬液,以 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞浓度接种在预热过的transwell板中,每个小室上层加入0.5 mL的细胞悬液,下层加入1.5 mL的完全培养基,在培养箱中培养21 d^[23]。第1周隔天换液1次,后2周每天换液。每3天测1次跨膜上皮电阻(TEER)值。当细胞TEER值在400~600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$,表明已构建紧密完整的单层细胞膜。

2.6.2 Caco-2细胞膜双向转运实验 取培养21 d的Caco-2单层膜,分别在AP和BL侧加入0.5、1.5 mL的HBSS缓冲液润洗2次。第3次润洗加入HBSS缓冲液后,置37℃培养箱中温孵20 min后开始实验。加药前弃去原有HBSS缓冲液,将待测溶液(6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 佐匹克隆DMSO溶液)加入到供应池(AP侧0.5 mL或BL侧1.5 mL),并在相应的接收池(BL侧1.5 mL或AP侧0.5 mL)加入HBSS缓冲液。对照组两侧加入对应体积的HBSS缓冲液,每组各设置4个复孔。加样后的12孔板置于37℃的恒温摇床以50 r/min的转速振摇,分别于30、60、90 min于接收池侧取样200 μL ,取样后及时补充200 μL 预热的HBSS

缓冲液^[24]。样品用甲醇稀释后,计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient, P_{app})。

同时考察 Caco-2 细胞膜上的 P-gp 转运体是否对佐匹克隆的转运有影响。在 AP 侧加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米溶液 0.5 mL, BL 侧加入 1.5 mL 的 HBSS 缓冲液。在培养箱中孵育 20 min, 取出弃去溶液, 按上述双向转运过程进行操作。测量药物的转运量, 考察药物的渗透性及 P-gp 转运体是否参与佐匹克隆的转运过程。

2.6.3 样品分析与数据处理 色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (1.8 μm , 100 mm $\times$ 2.1 mm), 流动相: A 相为 0.1% 甲酸溶液、B 相为甲醇, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 样品盘温度 10 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL 。按表 2 进行梯度洗脱。

表 2 液质联用梯度洗脱条件

Table 2 Linear gradient elution of HPLC-MS

t/min	A%	B%
0.0	100	0
3.0	0	100
5.0	0	100
5.1	100	0
7.0	100	0

质谱条件: 电喷雾离子源, 正/负离子检测方式; 多级反应监测扫描 (MRM); 毛细管电压 1.0 kV; 锥孔电压 95 V; 去溶剂温度为 500 $^{\circ}\text{C}$; 去溶剂体积流量 1 000 L/h; 雾化器电压 620 kPa; 碰撞器体积流量 0.19 mL/min; 锥孔气体流量 150 L/h, 扫描时间 350 s。

按照公式 (3) 计算经 Caco-2 细胞单层的 P_{app} :

$$P_{app} = \frac{d_Q/d_t}{A \times C_0} \quad (\text{公式 3})$$

P_{app} 为表观渗透系数 (cm/s); d_Q/d_t 为单位时间内的药物累积转运量 (mmol/s); A 为聚碳酸酯膜的表面积: 1.13 cm^2 ; C_0 为供应池中药物的初始浓度 (mmol/L)。 P_{app} 值越大, 药物的渗透性越强。

同时通过测定药物不同转运方向的 P_{app} 判断药物的转运方式。按公式 (4) 计算外排率 (Efflux Ratio, ER):

$$\text{ER} = \frac{P_{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})}{P'_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})} \quad (\text{公式 4})$$

$P_{app}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 和 $P'_{app}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 分别为待测药物从 BL 侧转运到 AP 侧、AP 侧到 BL 侧的 P_{app} 。ER 值可反映待测药物在转运过程中是否存在外排现象, 若 $\text{ER} = 1$, 则提示药物以被动扩散为主, 若 $\text{ER} > 1.5$, 则提示药物可能存在主动转运

方式。

2.6.4 Caco-2 细胞模型的验证 分别测定具有不同渗透性的工具药物 (高渗透性——盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔, 中渗透性——阿替洛尔, 零渗透性——苯酚红) 的 P_{app} 来验证所构建 Caco-2 细胞模型的可靠性 (结果见表 3), 方法同“2.6.2”项。苯酚红的 P_{app} 为 $0.29 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 几乎不存在转运现象, 表明单层细胞膜完整并紧密连接。文献报道盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔、阿替洛尔的 P_{app} 分别为 26.6×10^{-6} ^[25]、 23.3×10^{-6} ^[13]、 2.62×10^{-6} ^[26] cm/s , 与实验测定的 P_{app} 相近, 且阿替洛尔的渗透性远低于盐酸普萘洛尔, 说明 Caco-2 单层细胞建模成功。

表 3 不同渗透性工具药物在 Caco-2 细胞单层 AP-BL 转运的 P_{app} ($n=3$)

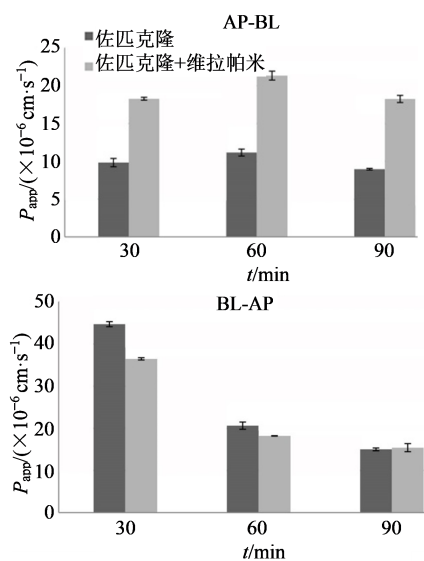
Table 3 P_{app} values of tool drugs with different permeability in Caco-2 monolayer cell model ($n=3$)

工具药物	渗透性	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})(\text{AP-BL})$		
		30 min	60 min	90 min
盐酸普萘洛尔	高($f_a \geq 85\%$)	33.16 $\pm$ 0.22	29.62 $\pm$ 0.59	24.54 $\pm$ 0.96
酒石酸美托洛尔	高($f_a \geq 85\%$)	33.84 $\pm$ 0.02	28.70 $\pm$ 0.12	25.98 $\pm$ 0.04
阿替洛尔	中(f_a 为 50%~84%)	2.31 $\pm$ 0.22	2.04 $\pm$ 0.25	1.67 $\pm$ 0.17
酚红	零	0.43 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.03

2.6.5 佐匹克隆在 Caco-2 细胞膜上的双向转运行为 如图 8 所示, AP 至 BL 侧佐匹克隆的 P_{app} 值大于 $8.96 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, BL 至 AP 侧的 P_{app} 值大于 $15.03 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 。30、60、90 min 的 ER 分别为 4.55、1.84、1.72, 均大于 1.5, 提示佐匹克隆的渗透过程存在主动外排现象, 因此进一步考察了 P-gp 外排转运体是否参与佐匹克隆的转运过程。

当以 100 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米对 Caco-2 细胞的 P-gp 主动转运体进行抑制时, 佐匹克隆从 AP 至 BL 侧转运的 P_{app} 呈增长趋势; 而从 BL 至 AP 侧转运时, 其 P_{app} 呈现下降趋势; 并且使用 P-gp 抑制剂后, 佐匹克隆给药 60 min 时细胞转运的 ER 由 1.84 减小为 0.85, 证明 P-gp 转运体参与佐匹克隆的肠道转运过程。

佐匹克隆的 P_{app} 明显低于美托洛尔, 并且 Caco-2 细胞上的 P-gp 转运体参与佐匹克隆的肠道转运过程。佐匹克隆作为 P-gp 外排转运体的底物, 由 P-gp 转运体从细胞内侧转运到细胞外侧, 从而影响了其转运速率及生物利用度。虽然佐匹克隆的渗透性

图8 佐匹克隆主动转运渗透性结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Permeability results of zopiclone with active transport in Caco-2 monolayer cell model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

低于高渗药物美托洛尔,但其渗透性高于中渗药物阿替洛尔。与FDA规定的高渗药物中渗透性最低的米诺地尔(P_{app} 为 $5.56 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)相比^[27-28],佐匹克隆的渗透性更大,因此将佐匹克隆仍归为高渗性药物。

3 讨论

BCS分类根据药物的溶解性和肠道渗透性特点将药物分为4类。当涉及到口服固体常释制剂中活性药物成分(active pharmaceutical ingredient, API)在体内的吸收速度和程度时,BCS系统主要考虑以下3个关键因素,即药物溶解性、肠道渗透性和制剂溶出度。本研究对佐匹克隆原料的重要理化性质(固有溶出速率、晶型、平衡溶解度、油水分配系数及渗透性)进行了系统深入地考察;并对原研与仿制企业原料的特定理化参数进行了对比;基于溶解性和渗透性结果对佐匹克隆的BCS属性进行了初步判断。

3.1 佐匹克隆的溶解性

药物的固有溶出速率用于描述药物固体表面到液相的质量传递速率特性,受药物结晶性的影响。相比溶出度,它与药物在体内的溶出速率存在一定的相关性,可用于评价原料批间、不同来源、不同晶型的一致性,也是判断药物BCS分类的重要依据之一^[29]。本研究发现佐匹克隆在pH 6.8和pH 7.4介质中的固有溶出速率基本一致,且同一介质条件下原研和仿制企业原料的固有溶出速率也无显著性差异。同时原研与国内3家仿制企业的原料晶型

均为无水非中心对称的正交晶型化合物。晶型的一致性也表现为不同企业原料固有溶出速率的一致性。由此可知原研与国产片剂体外溶出行为的差异与原料无关,而与制剂的处方和工艺相关。

口服药物在胃肠道体液的溶解度对其后续通过脂质双分子层进入血循环的吸收过程影响重大,了解药物的水溶性和脂溶性可以预判其BCS分类。BCS对高溶解性的定义为:单次给药的最高剂量对应的API在体积为250 mL(或更少)、pH值在1.0~6.8范围内的水溶性介质中完全溶解。研究中分别采用动态法^[30]和摇瓶法^[31]测定了佐匹克隆在不同介质下的平衡溶解度和 P_{appow} 。根据佐匹克隆在pH值1.0~6.8范围内的最小溶解度和片剂临床单次给药的最大剂量计算,佐匹克隆属于高溶解性药物。 P_{appow} 的结果表明佐匹克隆在胃内几乎无吸收,在不同肠段存在不同程度的吸收特性。

3.2 佐匹克隆的渗透性

覆盖在肠壁上的单层上皮细胞是限制药物溶液吸收至体内的一道屏障。除肠黏膜的结构以及肠道内酶对药物代谢的影响外,药物自身的渗透性成为影响药效的关键参数。BCS对于高渗透性的定义为:在没有证据表明药物在胃肠道不稳定的情况下,制剂口服后吸收程度 $\geq 85\%$ 即认为该药具有高渗透性。用于评价药物肠壁渗透性的常用方法有体外法、体内法及动物体内吸收研究法。尽管人体小肠灌流法是最直接的测量渗透性的方法,但由于人体试验操作复杂、成本高,因此到目前为止仅有Lennernas等^[32]于2007年发表的29种药物的人体小肠渗透性数据可作为准确的判断依据。近年来多种体外研究模型用于模拟药物通过肠壁的渗透情况,如PAMPA法、组织(尤斯灌流室)法、原位(肠单向灌流)法和细胞(Caco-2、MDCK等)法。在药物研发早期,经常联合使用PAMPA和Caco-2细胞模型对大量化合物的渗透性能进行研究。前者考察的是跨越脂质屏障的跨细胞被动转运的渗透性,不需要考虑细胞膜孔隙或药物转运体的作用;后者不仅能考察跨细胞被动转运的渗透性,也能考察转运体介导的转运(外排和吸收)及细胞旁转运情况。两种模型结合可以科学、合理地预测药物的人体吸收情况^[33]。

FDA推荐了可以作为肠道原位灌流实验标准物的20种工具药物,其中高渗透性的标准物为美托洛尔和酮洛芬^[2]。渗透性的高低可通过与同一方法测得的美托洛尔的数值进行比较,高于美托洛尔的

为高渗透性药物,反之则为低渗透性药物。本研究采用PAMPA模型测得原研与仿制企业佐匹克隆原料的被动转运 P_{app} 无显著性差异,均高于美托洛尔在相同条件下的测定结果,初步判定其为高渗透性药物;Caco-2单层细胞膜双向转运的结果证明细胞上的P-gp转运体参与佐匹克隆的肠道转运过程。佐匹克隆的 P_{app} 介于高渗药物美托洛尔和中渗药物阿替洛尔之间,同时又高于高渗药物中渗透性最低的米诺地尔,因此仍将其判定为高渗透性药物。

基于以上的溶解性和渗透性结果,初步判断佐匹克隆为高溶解性、高渗透性药物,即为BCS I类药物。从定义可知BCS系统是以吸收程度来定义渗透性,认为吸收程度与渗透性具有很好的相关性,但当体外渗透性与体内吸收出现不一致的情况时,则倾向于使用吸收数据来进行分类判断。换言之,BCS分类并不着重区分药物在体内的不同吸收途径,如细胞旁路通道、被动跨膜转运、载体协助跨膜转运等,而更侧重于吸收结果,即吸收程度。因此根据渗透性预测的吸收程度并不完全等同于生物利用度,要研究佐匹克隆的体内渗透与吸收情况,还需进一步通过人体或动物实验来验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Amidon G L, Lennernas H, Shah V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.
- [2] FDA. Guidance for industry: "Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry" [EB/OL]. (2017-12-01) [2021-08-17]. <http://www.fda.gov/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
- [3] WHO. Technical report series No. 937; annex 7: multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability; annex 8: proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate-release, solid oral dosage forms [S]. 2006.
- [4] EMA. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev1, Appendix III [S]. 2010.
- [5] WHO. Proposal to Waive *in vivo* bioequivalence requirements for the WHO model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms [J]. WHO Tech Rep Ser, 2006, 937: 391-437.
- [6] Intra-Agency Agreement Between the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) and the U. S. Food and Drug Administration (FDA) Oral Formulations Platform-Report 1 [R]. 2011. https://bpca.nichd.nih.gov/collaborativeefforts/initiatives/Documents/Formulations_Platform_Report1.pdf
- [7] Benet L Z, Broccatelli F, Oprea T I. BDDCS applied to over 900 drugs [J]. *AAPS J*, 2011, 13(4): 519-547.
- [8] 王琳, 张喆, 胡琴, 等. 两种生物药剂学分类系统比较及应用探讨 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(20): 1789-1793.
Wang L, Zhang Z, Hu Q, et al. Comparison of two biopharmaceutics classification systems and discussion of their applications [J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53(20): 1789-1793.
- [9] Terblanche R J, Liebenberg W, de Villiers M M, et al. Characterization of zopiclone crystal forms found among generic raw materials [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(5): 531-537.
- [10] Shankland N, David W I, Shankland K, et al. Structural transformations in zopiclone [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2001, 7(21): 2204-2205.
- [11] 王素珍, 李荣荣, 岳雪, 等. 不同溶出介质中辛伐他汀的平衡溶解度和表观油水分配系数测定 [J]. *中国药业*, 2016, 25(12): 35-38.
Wang S Z, Li R R, Yue X. Determination of equilibrium solubility of simvastatin in various buffers and its apparent oil/water partition coefficient [J]. *Chin Pharm*, 2016, 25(12): 35-38.
- [12] 周云, 符旭东, 毕诗涛. 盐酸奈必洛尔平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. *中国药师*, 2017, 20(4): 754-756.
Zhou Y, Fu X D, Bi S T. Determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of nebivolol hydrochloride [J]. *China Pharm*, 2017, 20(4): 754-756.
- [13] 孙进. 现代药物制剂技术丛书·口服药物吸收与转运 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 345.
Sun J. *Oral Drug Absorption and Transport/Modern Pharmaceutical Technology Series* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 345.
- [14] Kansy M, Avdeef A, Fischer H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2004, 1(4): 349-355.
- [15] Borbás E, Balogh A, Bocz K, et al. *In vitro* dissolution-permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-

- based formulation of aripiprazole using μ Flux™ [J]. *Int J Pharm*, 2015, 491(1/2): 180-189.
- [16] 赵海云, 刘广桢, 王松, 等. 基于来氟米特的溶解度、渗透性分析初步预测制剂的生物等效性 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(13): 1117-1122.
- Zhao H Y, Liu G Z, Wang S, et al. Preliminary prediction of bioequivalence of leflunomide tablets based on analysis of solubility and permeability [J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53(13): 1117-1122.
- [17] Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. PAMPA-critical factors for better predictions of absorption [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(11): 2893-2909.
- [18] Watanabe E, Kinoshita N, Takahashi M, et al. Prediction of absorbability of poorly water-soluble drugs based on permeability obtained through modified in vitro chamber method [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20(6): 428-434.
- [19] 高坤, 孙进, 何仲贵. Caco-2细胞模型在口服药物吸收研究中的应用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22(6): 469-474.
- Gao K, Sun J, He Z G. Application of Caco-2 cell model in the study of oral drug absorption [J]. *J Shengyang Pharm Univ*, 2005, 22(6): 469-474.
- [20] 蒋学华, 贾运涛, 袁媛, 等. Caco-2细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用 [J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(5): 325-327.
- Jiang X H, Jia Y T, Yuan Y, et al. Application of Caco-2 cell model in the study of oral drug absorption process [J]. *Chin Pharm J*, 2002, 37(5): 325-327.
- [21] Yamaguchi H, Yano I, Hashimoto Y, et al. Secretory mechanisms of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line caco-2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 295(1): 360-366.
- [22] Zhang X F, Song J H, Shi X P, et al. Absorption and metabolism characteristics of rutin in Caco-2 cells [J]. *Scientific World J*, 2013, 2013: 382-350.
- [23] Incecayir T, Tsume Y, Amidon G L. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(3): 958-966.
- [24] Hubatsch I, Ragnarsson E G, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2111-2119.
- [25] 龙潇鸿, 邱峰, 徐霞, 等. 药物体外转运模型及普萘洛尔异构体转运动力学研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(9): 1038-1041.
- Long X H, Qiu F, Xu X, et al. Enantioselective transport of R/S-propranolol in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2008, 33(9): 1038-1041.
- [26] Teksin Z S, Seo P R, Polli J E. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers [J]. *AAPS J*, 2010, 12(2): 238-241.
- [27] 赵悦清, 周仕海, 柳文洁, 等. 口服固体制剂溶出方法的建立和验证的技术讨论 [J]. *药学学报*, 2018, 53(2): 202-209.
- Zhao Y Q, Zhou S H, Liu W J, et al. Discussion of development and validation of dissolution methods for solid oral dosage forms [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2018, 53(2): 202-209.
- [28] 萧惠来. FDA《根据BCS豁免速释固体口服制剂体内生物利用度和生物等效性研究的指导原则》介绍 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 753-760.
- Xiao H L. Introduction of FDA guidance for industry waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system [J]. *Drug Eval Res*, 2018, 41(5): 753-760.
- [29] Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73(1): 102-106.
- [30] 袁飞, 何琳丁, 沐淦. 静态法与动态法测定药物水中溶解度的探讨 [J]. *广东药学院学报*, 2010, 26(5): 462-465.
- Yuan F, He L, Ding M G, et al. Study on the determination of the drug's solubility in water by stationary method compared with dynamic method [J]. *J Guangdong Pharm Coll*, 2010, 26(5): 462-465.
- [31] 刘莹, 孙德兴, 叶欢, 等. 正辛醇-水分配系数的测定和估算方法 [J]. *化学工程与装备*, 2016, 9: 277-279.
- Liu Y, Sun D X, Ye H, et al. Determination and estimation of n-octanol-water partition coefficient [J]. *Chem Eng Equ*, 2016, 9: 277-279.
- [32] Lennernas H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination [J]. *Xenobiotica*, 2007, 37(10/11): 1015-1051.
- [33] 宁保明, 杨永健. 生物药剂学在药物研发中的应用 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012: 889.
- Ning B M, Yang Y J. *Biopharmaceutics Applications in Drug Development* [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2012: 889.

【责任编辑 兰新新】