

枸橼酸钾缓释片在人体内的药动学研究

林冠宇, 胡海棠*, 谭志刚, 张俊东

丽珠集团医学临床研究中心, 广东 珠海 519020

摘要: 目的 以枸橼酸钾颗粒剂为对照, 评价枸橼酸钾缓释片在人体内的药动学特征。方法 采用 LC-MS 方法, 测定单次剂量 (32 名) 和多剂量 (20 名, 双交叉试验) 口服枸橼酸钾缓释片和颗粒剂后尿样中枸橼酸根浓度, 以内源性药物的基线校正, 尿药累积排泄量 ($A_{e\ 0-24\ h}$) 和最大尿药排泄速率 (R_{max}) 为主要指标计算其药动学参数, 经剂量校正进行方差分析和对数转化生物等效性原理分析后评价缓释片的缓释特征。结果 单次给药后, 受试药的低、中、高 (1.08、2.16、4.32 g) 剂量组的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 与对照药 (2.9 g) 的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 相比较差异无统计学意义; 受试药的低、中、高剂量组的 R_{max} 与对照药的 R_{max} 相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 多次给药后结果显示中剂量组的受试药和对照药的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 差异无统计学意义, 而低剂量组的受试药和对照药的 R_{max} 差异显著 ($P < 0.001$)。结论 枸橼酸钾缓释片与枸橼酸钾颗粒剂相比具有明显的缓释药动学特征。

关键词: 枸橼酸钾缓释片; 尿药累积排泄量; 最大尿药排泄速率; 药动学

中图分类号: R969.1; R975

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)05-0692-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.009

In vivo pharmacokinetics of Potassium Citrate Sustained-release Tablets in healthy volunteers

LIN Guan-yu, HU Hai-tang, TAN Zhi-gang, ZHANG Jun-dong

Clinical Research Center, Livzon Pharmaceutical Group Co., Ltd., Zhuhai 519020, China

Abstract Objective To study the *in vivo* pharmacokinetic characteristics of Potassium Citrate Sustained-release Tablets (PCSTs) in healthy volunteers, comparing with ordinary granules. **Methods** The concentration of folic acid group in urine was determined by LC-MS after a single dose (32 cases) or multiple doses (20 cases, the double cross test) oral PCSTs and granules, baseline was checked by endogenous drugs, pharmacokinetic parameters were calculated by urine drug cumulative excretion ($A_{e\ 0-24\ h}$) and maximum urine drug excretion rate (R_{max}) as key indicators. The sustained release characteristics of PCSTs were evaluated after variance analysis and logarithmic transformation principle of bioequivalence analysis by dose-adjusted. **Results** The pharmacokinetic parameters of PCSTs and granules from the single-dose study were as follows: $A_{e\ 0-24\ h}$ of test drug (low-dose, 1.08 g), (mid-dose, 2.16 g), (high-dose, 4.32 g), and had no significant difference compared with 2.9 g of reference drugs. R_{max} of test drug (low-dose, 1.08 g), (mid-dose, 2.16 g), (high-dose, 4.32 g) h, and had the significant differences compared with reference drugs ($P < 0.05$). The pharmacokinetic parameters of PCSTs and granules from the multi-dose study were as follows: $A_{e\ 0-24\ h}$ of test drug (mid-dose, 2.16 g) and had no significant differences compared with reference drugs. R_{max} of test drug and reference drug had significant differences ($P < 0.001$). **Results** Compared with granules, PCSTs show the significant sustained-release characteristics.

Key words: Potassium Citrate Sustained-release Tablets; urine drug cumulative excretion; maximum urine drug excretion rate; pharmacokinetics

枸橼酸钾是一种强力、无钠的碱化剂, 通过碱化尿液, 减少尿酸结晶的形成, 并通过提高尿枸橼

酸盐的排泄抑制草酸钙结晶的形成。枸橼酸是内源性物质, 吸收后排泄快, 约 4 h 尿药浓度即恢复到

收稿日期: 2013-08-26

基金项目: 广东省技术创新项目 (2007915114)

作者简介: 林冠宇 (1984—), 男, 硕士, 研究方向为临床药理。Tel: (0756)8135306 E-mail: linguanyu2012@gmail.com

*通信作者 胡海棠 (1964—), 男, 教授级高级工程师。Tel: (0756)8135888 E-mail: huhaitang@livzon.com.cn

基线水平^[1], 常规的枸橼酸钾制剂难以确保尿液在1 d中持续碱化。丽珠集团研制的枸橼酸钾缓释片获国家食品药品监督管理总局批准, 进行临床研究。本研究应用 LC-MS 方法测定尿样中枸橼酸根的浓度, 非传统方式计算其药动学参数, 阐明药动学特性, 并对其缓释特征进行评价。

1 材料

1.1 仪器

TSQ 型 LC-MS/MS 联用仪 (美国 Finnigan 公司), Genex Beta 取样器 (5~50 μ L), Finnpiptette 移液器 (20~200 μ L, Thermo Electron 公司), Xcalibur1.1 色谱工作站; XW—80A 型旋涡混合器 (上海医大仪器厂); 1612—1 型高速离心机 (上海医疗器械有限公司手术机械厂)。

1.2 药品与试剂

枸橼酸钾缓释片 (1.08 g/片, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号 041001); 枸橼酸钾颗粒 (商品名: 可维加, 1.45 g/袋, 山东绿叶制药股份有限公司, 批号 20040904); 枸橼酸钾对照品 (质量分数 99.8%, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号 040801); 顺丁烯二酸 (色谱级, 质量分数 99%, Sigma 公司, 批号 5212269); 甲醇 (色谱纯, Merck 公司)。

1.3 受试者

健康志愿受试者, 体质量指数为 19~25, 年龄 18~40 岁。经伦理委员会审批同意, 并签署知情同意书。试验前 2 周及试验期间未服用其他任何药物, 最近 3 个月未献血者及试验采血者。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 色谱条件 Phenomenex 苯基色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-水-甲酸 (8:92:1); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.1.2 质谱条件 离子源为 ESI 源; 喷雾电压 4.0 kV; 碰撞能: 20 V; 毛细管温度: 300 $^{\circ}$ C; 雾化气压: 241 kPa; 源内碰撞电压: 10 V; 检测方式: 负离子检测; 扫描方式: 选择性离子监测 (SIM); 扫描时间: 0.5 s; 定量的离子: 枸橼酸根 m/z 190.8、内标顺丁烯二酸 m/z 114.6。

2.2 试验设计^[1]

服药前受试者必须接受严格的饮食, 包括低钾 (50~60 mmol/d, 正常饮食为 50~150 mmol/d), 低钠 (160~180 mmol/d), 热卡摄取量 (10.46~10.65 kJ/d) 及高液体摄取量 (3 000~5 000 mL/d, 正常

为 1 300~2 500 mL/d)。试验期间严格限制运动量, 以免出汗过多而使 K^{+} 丢失。

单次给药采用中剂量平行对照试验设计。32 名受试者, 男女各半, 按体质量排序, 相邻体质量随机入组, 设试验组低 (口服 1 片, 1.08 g)、中 (口服 2 片, 2.16 g)、高 (口服 4 片, 4.32 g) 剂量组, 对照组 1 个剂量 (口服 2 袋, 2.90 g) 组, 每组 8 人; 前 3 d 为食物平衡期, 按上述饮食要求进行, 但液体则按下列时间饮用: 早晨 7:00 第 1 次 500 mL, 然后每 1 h 饮 200 mL, 直至 12 h。第 4~5 天为基线期, 每位受试者收集尿液并测定尿中枸橼酸, 并继续控制饮食条件, 收集尿液时间如下: 第 4 天早上 7:00 排空尿液后, 收集 0~1、1~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~16、16~24 h 尿液, 并测定尿中枸橼酸。第 5 天除早上 7:00 排空尿液外, 其余与第 4 天相同, 并于第 6 天为给药期, 继续给予标准食物及液体。早上 7:00 给予受试枸橼酸钾缓释片 (其中中剂量组内的对照组给予对照药枸橼酸钾), 用 500 mL 水送服, 然后按 0~1、1~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~16、16~24 h 收集尿液, 并测定尿中枸橼酸, 计算药动学参数。

多次给药采用双周期随机交叉试验设计。受试者 20 人, 男女各半, 随机分为两组, 每组 10 人。分 2 个周期完成。第 1 个周期为试验组 2.16 g/次, 2 次/d; 对照组 1.45 g/次, 3 次/d。前 6 d 研究同单次给药设计; 连续给药后, 次日收集每天 16~24 h 尿液, 连续 3~5 d, 达到稳态后, 于最后一天早上 7:00 服药后收集 0~1、1~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~16、16~24 h 尿液, 并测定尿中枸橼酸。清洗 1 周后, 进行第 2 个周期的试验。

2.3 样品的处理

精密量取尿样 0.2 mL, 置于 1.5 mL eppendorf 管中, 精密加入 0.500 mg/mL 顺丁烯二酸内标溶液 20 μ L, 涡旋 30 s。精密加入甲醇 0.8 mL, 涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 20 μ L 进样。

2.4 数据处理及统计分析

所有统计分析和药动学计算由 DAS 3.0 软件完成。基线校正的尿药量数据计算各受试者的药动学参数, 包括 24 h 总尿量 ($A_{e\ 0-24\ h}$)、最大排泄速率 (R_{max})、达到最大排泄速率的时间 (t_{max})。计算各参数的均数和标准差。进行药动学特征分析, 试验制剂的数据和参比制剂进行药动学参数的方差分析。

校正方法: 服药后各个时间段的尿药量减去服

药前 2 d 相应时间段尿药量的均值, 如果为负值则用 0 代替。

3 结果

3.1 方法学确证

3.1.1 专属性试验 分别精密取 6 份健康人尿样 0.2 mL, 按“样品的处理”项下方法操作; 将一定

质量浓度枸橼酸根对照品溶液加入空白尿样, 同法操作; 将一定质量浓度内标顺丁烯二酸溶液加入空白尿样, 同法操作; 取受试者给药后收集的尿样品, 同法操作。取各溶液进样测定, 结果枸橼酸 t_R 为 2.93 min、顺丁烯二酸 t_R 为 4.06 min, 枸橼酸与顺丁烯二酸的峰形良好, 无杂峰干扰。见图 1。

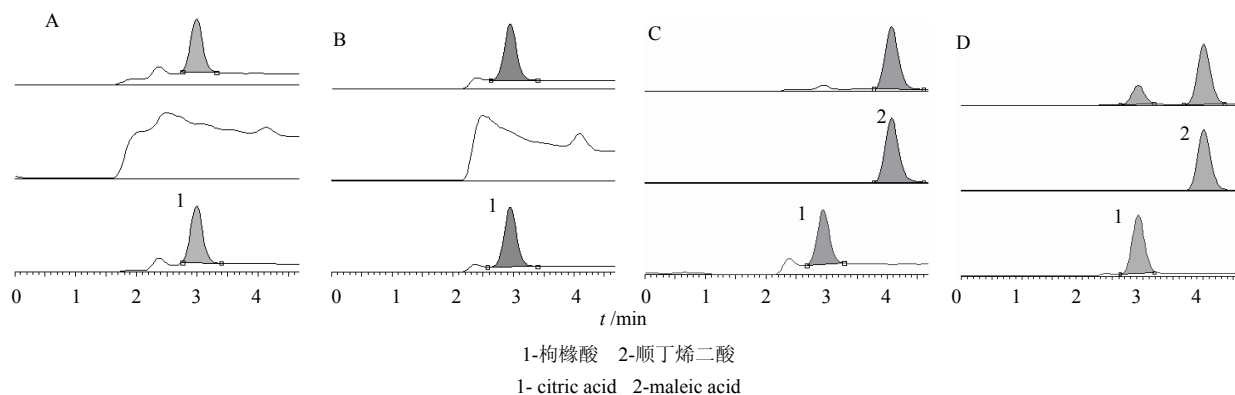


图 1 空白尿样 (A)、枸橼酸钾对照品和内标顺丁烯二酸 (B)、内标顺丁烯二酸 (C) 和受试者口服枸橼酸钾缓释片 1 h 后的尿样 (D) 的 LC-MS 图谱

Fig. 1 LC-MS chromatograms of blank urine (A), potassium citrate reference substance + internal standard maleic acid (B), internal standard maleic acid (C), and urine sample in volunteers after oral administration of PCSTs (D)

3.1.2 线性关系考察 精密称量枸橼酸钾 800 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 80 mg/mL 溶液, 4 °C 冰箱冷藏, 作为储备液。取不同体积储备液分别稀释至 8.0、5.0、2.5、1.0、0.8、0.5、0.25、0.1 mg/mL。取健康人尿样 9 份各 0.2 mL 于 eppendorf 管中, 精密吸取不同质量浓度的对照品溶液 20 μ L, 使各管尿中的枸橼酸根质量浓度增加值为 0、10、25、50、80、100、250、500、800 μ g/mL。按“样品的处理”项下方法自“精密加入 0.500 mg/mL 顺丁烯二酸内标溶液 20 μ L”起同法操作进行分析, 建立标准曲线。以待测物质量浓度的增加值为横坐标, 待测物峰面积与内标物峰面积的比值与空白中枸橼酸根峰面积与内标物峰面积的比值的差值为纵坐标, 用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0041X-0.0081$ ($r=0.999$), 线性范围为 10~800 μ g/mL。

3.1.3 提取回收率试验 取健康人尿样, 配制枸橼酸根浓度增加值为 25、250、800 μ g/mL 3 个质量浓度的尿样品各 5 份以及空白尿样 2 份, 于每份样品中各精密加入甲醇 0.8 mL, 涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 于 0.60 mL 上清液中精密加入 500 μ g/mL 顺丁烯二酸内标溶液 20 μ L, 混匀, 取 20 μ L

进样, 测定得到枸橼酸根峰面积与内标峰面积的比值 (样品 $f_1=A_i/A_s'$, 空白 $f_0=A_i/A_s$); 另取 25、250、800 μ g/mL 对照品溶液 0.6 mL 各 2 份, 精密加入 0.5 mg/mL 内标溶液 20 μ L, 混匀, 同法进样分析, 得到枸橼酸根峰面积与内标峰面积的比值 ($f_2=A_i''/A_s''$)。计算提取回收率 [回收率 = $(f_1-f_0)/f_2 \times 100\%$]。结果回收率分别为 93.06%、100.41%、105.1%。

3.1.4 精密度试验 同“3.1.3”项下方法配制低、中、高 3 个质量浓度的尿样品, 按“样品的处理”项下自“精密加入 0.50 mg/mL 顺丁烯二酸内标溶液 20 μ L”起同法操作, 在不同时间内连续制备并测定 3 个分析批, 每批样品 3 个质量浓度水平, 每个质量浓度 5 份样品, 计算批内和批间的 RSD 值均小于 10%。见表 1。

表 1 批内精密度和批间精密度试验结果

Table 1 Results of intra-assay and inter-assay precision

质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	批内精密度/%	批间精密度/%
25	6.35	7.13
250	6.40	6.71
800	5.06	6.13

3.2 单次给药人体药动学结果

32 名健康受试者分别口服低、中、高剂量的枸橼酸钾缓释片以及颗粒的平均累积尿枸橼酸根排量（基线校正）- 时间曲线、平均尿枸橼酸根排量（基线校正）- 时间中点曲线见图 2。基线校正的尿枸橼酸药动学参数见表 2。结果显示，与枸橼酸钾颗

粒相比，枸橼酸钾缓释片低中剂量的 $R_{\max}$ 明显降低。对剂量校正后 $A_{e\ 0-24\ h}$ 和 $R_{\max}$ 经对数转换进行方差分析，结果显示枸橼酸钾缓释片和颗粒的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 差异无统计学意义， $R_{\max}$ 差异显著并有统计意义 ($P<0.05$)，提示枸橼酸钾缓释片具有明显的缓释特征。

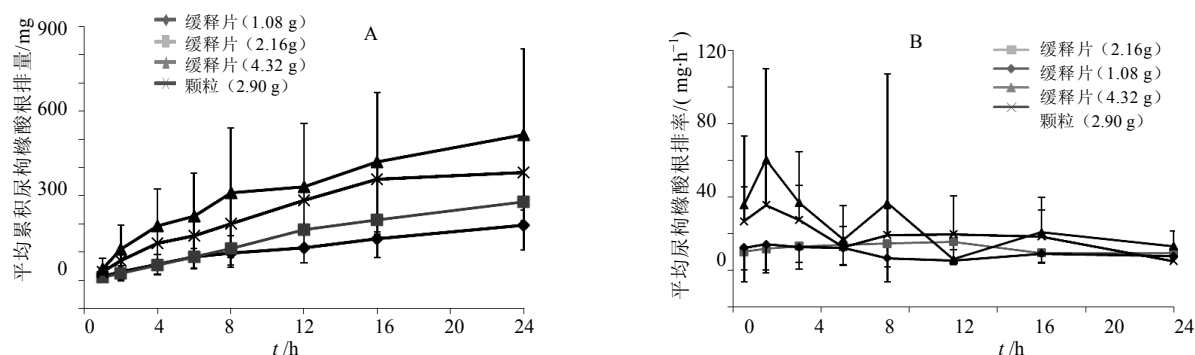


图 2 单次口服给药枸橼酸钾缓释片和颗粒的平均累积尿枸橼酸根排量（基线校正）- 时间曲线（A）和平均尿枸橼酸根排量（基线校正）- 时间中点曲线（B）

Fig. 2 Mean cumulative urinary excretion (baseline adjusted) - time curve (A) and mean rate of urinary excretion (baseline adjusted) - midpoint curve (B) of PCSTs and granules after a single oral administration

表 2 单次口服枸橼酸钾缓释片和颗粒剂后基线校正的尿枸橼酸药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters after a single oral administration of PCSTs and granule

样品	剂量/g	n	$A_{e\ 0-24\ h}/\text{mg}$	$R_{\max}/(\text{mg}\cdot\text{h}^{-1})$	$t_{\max}/\text{h}$
缓释片	1.08	8	196.88 ± 89.11	11.69 ± 6.88	3.25 ± 1.69
	2.16	8	279.74 ± 67.50	14.32 ± 7.77	5.94 ± 3.28
	4.32	7	516.38 ± 304.50	81.64 ± 67.66	2.57 ± 2.15
颗粒	2.90	8	383.88 ± 133.70	54.22 ± 13.99	3.69 ± 4.67

3.3 多次给药人体药动学结果

20 名健康受试者交叉多次口服枸橼酸钾缓释片和颗粒的最后一次给药后平均累积尿枸橼酸根排量（基线校正）- 时间曲线见图 3。基线校正的尿中枸橼酸药动学参数见表 3。口服 2.16 g 枸橼酸钾缓释片比 1.45 g 枸橼酸钾颗粒的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 略有增加，而 $R_{\max}$ 明显降低。对剂量校正后 $A_{e\ 0-24\ h}$ 和 $R_{\max}$ 经对数转换进行方差分析，结果显示枸橼酸钾缓释片和颗粒间的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 差异无统计学意义， $R_{\max}$ 差异显著并有统计意义 ($P<0.001$)，提示枸橼酸钾缓释片具有明显的缓释特征。

3 讨论

本研究采用电喷雾离子化 ESI 的 HPLC-MS 方法，该法专属性强，灵敏度高，回收率高，稳定性

好。许玲等^[2]对内源性药物尿药生物等效性的试验设计和分析方法进行研究，多数内源性药物服用后，受体内自稳机制的影响，血药浓度并不和实际吸收量成正比。如氯化钾泡腾片给药后的血钾浓度变化，不能反映钾离子的吸收情况^[3]，而是稳定在一个相对窄小的范围内，所以对于主要经过肾脏排泄的内源性药物（如枸橼酸钾等）尿中排泄量比血药浓度更准确地反映药物吸收。参考 FDA 对枸橼酸钾产品研究指南^[4-5]，对于内源性药物的主要药动学参数包括 $A_{e\ 0-24\ h}$ 和 $R_{\max}$ 。因此在本研究中以尿药的 $A_{e\ 0-24\ h}$ 和 $R_{\max}$ 为主要研究指标评价枸橼酸钾缓释片的缓释特征。在单次给药试验中，口服枸橼酸钾缓释片的剂量和 24 h 尿枸橼酸总排量呈正比关系，在 1.08~4.32 g 吸收呈线性关系，而在多次给药试验中未发

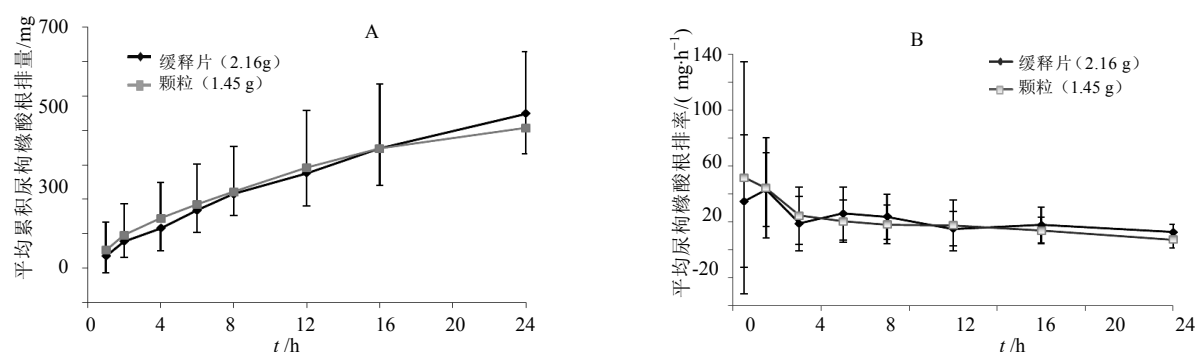


图3 多次口服给药枸橼酸钾缓释片和颗粒的平均累积尿枸橼酸根排量(基线校正)-时间曲线(A)和平均尿枸橼酸根排量(基线校正)-时间中点曲线(B)

Fig. 3 Mean cumulative urinary excretion (baseline adjusted) - time curve (A) and mean rate of urinary excretion (baseline adjusted) - midpoint curve (B) of PCSTs and granules after multi-dose oral administration

表3 多次口服枸橼酸钾缓释片和颗粒剂后基线校正的尿枸橼酸药动学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters after multi-dose oral administration of PCSTs and granule

样品	剂量/g	$A_{e\ 0-24\ h}/mg$	$R_{max}/(mg\cdot h^{-1})$	t_{max}/h
缓释片	2.16	449.62 ± 116.56	31.85 ± 17.54	2.68 ± 3.21
颗粒	1.45	407.53 ± 221.44	74.58 ± 79.72	2.68 ± 3.02

现枸橼酸钾的蓄积现象。

在单次和多次给药枸橼酸钾缓释片和颗粒剂 $A_{e\ 0-24\ h}$ 的差异均无统计学意义, R_{max} 均小于参比药物且有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明吸收量相当, 峰值降低, 枸橼酸钾缓释片呈现出明显缓释特征。

本研究由安徽省肿瘤医院 I 期临床研究室和合源医药科技有限公司实施, 上海中医药大学临床研究中心统计, 在此深表感谢!

参考文献

- [1] Park C Y, Skuria C, Brinkley L, *et al.* Augmentation of renal citrate excretion by oral potassium citrate administration: time course, dose frequency schedule, and dose-response relationship [J]. *J Clin Pharmacol*, 1984, 24: 19-26.
- [2] 许 玲, 赵 佳, 李禄金, 等. 内源性药物尿药生物等效性的试验设计和分析方法 [J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 10(27): 793-796.
- [3] 马越鸣, 裘福荣, 冒国光, 等. 氯化钾泡腾片人体相对生物利用度研究 [J]. 药学报, 2001, 36(9): 699-702.
- [4] FDA. Potassium chloride modified-release tablets and capsules: in vivo bioequivalence and in vitro dissolution testing [EB/OL]. (2005-10). www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory-Information/Guidances/ucm072890.pdf.
- [5] FDA. Draft Guidance on Potassium Citrate [EB/OL]. (2010-8). www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory-Information/Guidances/UCM224224.pdf.