

非诺贝特双层渗透泵片在 Beagle 犬体内的药动学研究

郭庆明^{1,2}, 张 晖^{1,2}, 苏晓峰^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: **目的** 研究非诺贝特双层渗透泵片在犬体内的药动学特征, 并评价受试制剂和参比制剂的生物等效性。**方法** 采用 LC-MS 测定比格犬体内的血药浓度, 采用 DAS 2.1.1 软件计算药动学参数。**结果** 受试制剂和参比制剂血浆中非诺贝特酸的 $C_{\max}$ 分别为 $(1\ 100.0 \pm 771.2)$ 、 (924.3 ± 564.0) ng/mL, $t_{\max}$ 分别为 (6.7 ± 8.5) 、 (2.5 ± 0.5) h, AUC_{0-t} 分别为 $(17\ 841.1 \pm 12\ 220.7)$ 、 $(17\ 615.5 \pm 12\ 870.2)$ ng·h/mL; $t_{1/2}$ 分别为 (17.7 ± 8.2) 、 (16.4 ± 3.3) h, MRT_{0-t} 分别为 (24.7 ± 4.0) 、 (24.5 ± 5.2) h, 受试制剂中非诺贝特酸的相对生物利用度为 $(104.7 \pm 12.4)\%$ 。**结论** 受试制剂非诺贝特渗透泵片和参比制剂非诺贝特缓释胶囊具有生物等效性。

关键词: 非诺贝特渗透泵片; 非诺贝特缓释胶囊; 生物利用度; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)06-0594-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.06.003

Pharmacokinetics of Fenofibrate Double-layer Osmotic Pump Tablets in Beagle dogs *in vivo*

GUO Qing-ming^{1,2}, ZHANG Hui^{1,2}, SU Xiao-feng^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To study the pharmacokinetics of Fenofibrate Double-layer Osmotic Pump Tablets and evaluate the bioequivalence between tested preparation and reference preparation in Beagle's dogs. **Methods** The concentration of fenofibric acid in plasma was determined by LC-MS. Also, the pharmacokinetic parameters of Fenofibrate Double-layer Osmotic Pump Tablets *in vivo* were calculated by pharmacokinetic software DAS 2.1.1. **Results** The main pharmacokinetic parameters of the tested preparation and reference preparation were as follows. The $C_{\max}$ were $(1\ 100.0 \pm 771.2)$ and (924.3 ± 564.0) ng/L, $t_{\max}$ were (6.7 ± 8.5) and (2.5 ± 0.5) h, AUC_{0-t} were $(17\ 841.1 \pm 12\ 220.7)$ and $(17\ 615.5 \pm 12\ 870.2)$ ng·h/mL, $t_{1/2}$ were (17.7 ± 8.2) and (16.4 ± 3.3) h, MRT_{0-t} were (24.7 ± 4.0) and (24.5 ± 5.2) h, the relative bioavailability of fenofibric acid in the tested preparation was $(104.7 \pm 12.4)\%$. **Conclusion** The test preparation and reference preparations are bioequivalent.

Key words: Fenofibrate Double-layer Osmotic Pump Tablets; Fenofibrate Sustained Release Capsules; bioavailability; pharmacokinetics

非诺贝特为氯贝丁酯类血脂调节剂, 属于一种前体药物, 口服后在体内经组织和血浆酯酶水解为活性产物非诺贝特酸^[1-2], 增加脂蛋白脂酶活性, 促进三酰甘油代谢, 降低总胆固醇、三酰甘油与低密度脂蛋白的浓度, 增加高密度脂蛋白含量^[3-4], 对原发性和继发性高脂血症具有良好的效果, 已广泛应

用于临床^[5]。此外, 非诺贝特还具有抗炎、降低纤维蛋白原水平以及预防性的神经保护作用^[6]。非诺贝特最初由 Fournier 公司研制成功, 于 1975 年在法国上市, 至今已在 70 多个国家上市^[1,7]。本实验研究了非诺贝特双层渗透泵片与非诺贝特缓释胶囊的生物等效性, 为评估和控制制剂质量及临床合理用

收稿日期: 2013-12-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB724001)

作者简介: 郭庆明(1970—), 男, 工程师, 主要从事新药的研究与开发。Tel: (0518)81152369 E-mail: guoqingmngmg7380@soho.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 从事中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzhz-nj@163.net

药提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联质谱仪, 配备大气压化学电离源, Xcalibur 2.0 数据采集软件, LCQuan 2.5.6 定量处理软件 (美国 Thermo 公司), BT25S 天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司], LD5—2A 离心机 (北京医用离心机厂), HY—2 型调速多用振荡器 (深圳天南海北实业有限公司), CAY—1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂), TurboVap 蒸发仪 (美国 Zymark 公司)。

1.2 药品与试剂

受试制剂非诺贝特双层渗透泵片, 含非诺贝特 0.25 g/片, 批号 20090803, 江苏康缘药业股份有限公司提供。参比制剂非诺贝特缓释胶囊, 含非诺贝特 0.25 g/粒, 批号 100108, 上海爱的发制药有限公司提供。非诺贝特酸对照品 (批号 130352-200405)、酮洛芬对照品 (批号 130351-200303) 均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 甲酸 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 盐酸 (分析纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂), 醋酸乙酯 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂), 重蒸水 (自制)。

1.3 实验动物

健康 Beagle 犬, 体质量 8~12 kg, 购自沈阳康平实验动物研究所, 许可证号为 2009-0005。

2 方法与结果

2.1 给药方案与样品采集

将 6 只 Beagle 犬随机分成 2 组, 每组 3 只。给药前禁食 10 h 以上, 试验日晨空腹 ig 受试制剂 1 片或参比制剂 1 粒。于给药前 (0 h) 和给药后 0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、15、24、36、48、72 h 自犬前肢静脉取血约 1.0 mL, 并立即移入经肝素处理的离心试管中, 3 000~3 500 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 于 -20℃ 冰箱中保存待测。

2.2 血浆样品处理

取血浆 0.1 mL, 置 10 mL 具塞离心试管中, 分别加入甲醇-水 (50:50) 50 μ L、500 ng/mL 内标酮洛芬溶液 50 μ L 和 0.12 mol/L 盐酸溶液 50 μ L, 混匀; 加入醋酸乙酯 2.0 mL, 涡流混合 1 min, 240 次/min 往复振荡 10 min, 3 500 r/min 离心 5 min, 分取上层有机相于另一个试管中, 于 40℃ 空气流下吹干, 残留物加入 100 μ L 流动相溶解, 涡流混合,

取 20 μ L 进行 LC/MS/MS 分析。

2.3 色谱条件与质谱条件

2.3.1 色谱条件 分析柱为 Inertsil ODS-3 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μ m); 预柱为迪马公司 EasyGuard C₁₈ 保护柱 (8 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-1%甲酸 (90:10); 体积流量为 0.25 mL/min; 柱温为 20℃; 进样量为 20 μ L。

2.3.2 质谱条件 离子源为大气压化学电离源 (APCI 源), 源喷射电压为 4.0 kV, 汽化室温度为 400℃, 加热毛细管温度为 270℃; 鞘气 (N₂) 压力为 30 L/min, 辅助气 (N₂) 压力为 5 L/min, 碰撞气 (Ar) 压力为 23.8 Pa; 碰撞诱导解离 (CID) 电压均为 25 eV; 正离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测 (SRM); 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 319 $\rightarrow$ 139 (非诺贝特酸) 和 m/z 255 $\rightarrow$ 105 (酮洛芬); 扫描时间为 0.3 s。

2.4 非诺贝特酸对照品溶液的配制

精密称取非诺贝特酸对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 1 mg/mL 非诺贝特酸储备液 I; 取 1.0 mL 储备液 I, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (50:50) 稀释并加至刻度, 即得 100 μ g/mL 储备液 II。以甲醇-水 (50:50) 稀释储备液 II, 配制非诺贝特酸对照品系列溶液。

2.5 内标酮洛芬溶液的配制

精密称取酮洛芬对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 1 mg/mL 储备液 I; 取 5.0 mL 储备液 I, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (50:50) 稀释并加至刻度, 即得 500 μ g/mL 的储备液 II; 取 0.1 mL 储备液 II, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (50:50) 稀释并加至刻度, 即得 500 ng/mL 内标溶液。

2.6 专属性试验

取 Beagle 犬的空白血浆 0.1 mL, 除不加内标溶液外, 其余按 2.2 项下血浆样品处理方法操作; 取 Beagle 犬的空白血浆 0.1 mL, 加入 40.0 ng/mL 非诺贝特酸对照品溶液 50 μ L 和 500 ng/mL 内标溶液 50 μ L, 按 2.2 项下血浆样品处理方法操作; 另取 Beagle 犬 ig 非诺贝特受试制剂 0.25 g 后 2 h 的血浆样品, 按 2.2 项下血浆样品处理方法操作。以上样品均进样 20 μ L, 得色谱图。结果表明: 非诺贝特酸和内标酮洛芬的保留时间分别为 2.69、2.20 min, 空白血浆中的内源性物质不干扰测定。

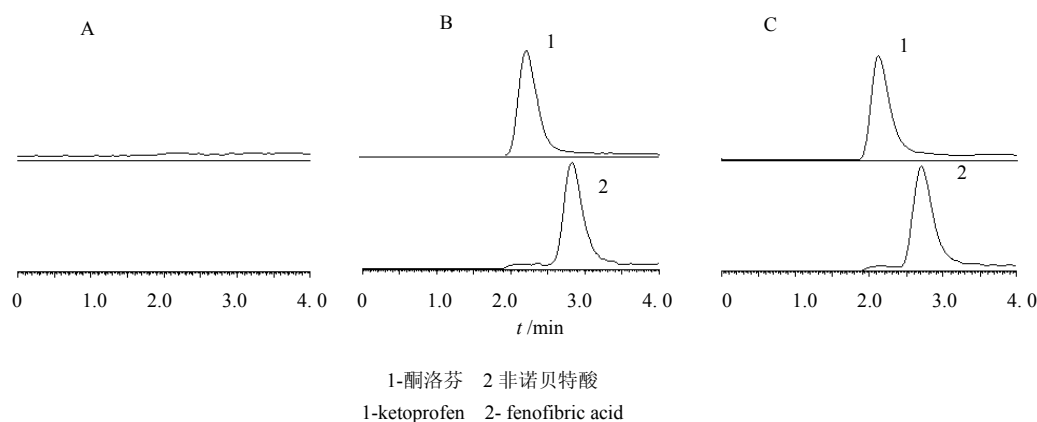


图 1 血浆 (A), 血浆+对照品+内标物 (B) 和血浆样品 (C) 中非诺贝特酸及内标酮洛芬的 SRM 色谱图

Fig. 1 SRM chromatogram of plasma (A), plasma + fenofibric acid + ketoprofen (internal standard), and sample (C)

2.7 标准曲线的绘制

取空白血浆 0.1 mL, 加入非诺贝特酸对照品系列溶液 50 μ L, 配制成相当于非诺贝特酸血浆浓度为 10、20、50、200、500、2 000、5 000 ng/mL 样品, 按 2.2 项下血浆样品处理方法操作, 每一个浓度进行双样本分析, 进样 20 μ L, 记录色谱图; 以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得回归方程 $Y=5.727 \times 10^{-3} X-9.582 \times 10^{-3}$ ($r^2=$

0.995 6), 结果表明非诺贝特酸在 10~5 000 ng/mL 线性关系良好。

2.8 精密度试验

取空白血浆 0.1 mL, 按 2.7 标准曲线的绘制项下的方法配制低、中、高 3 个质量浓度 (非诺贝特酸血浆质量浓度分别为 20、500、4 000 ng/mL) 的样品, 每一个质量浓度各 6 份, 按照 2.2 血浆样品处理项下方法处理, 进样分析, 连续测定 3 d, 计算日内及日间精密度, 结果见表 1。

表 1 精密度试验结果

Table 1 Results of precisions test

质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内精密度		日间精密度	
	测定质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	测定质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%
20.0	21.2 $\pm$ 1.0	4.7	20.8 $\pm$ 1.6	7.8
500.0	507.0 $\pm$ 43.6	8.6	500.1 $\pm$ 42.1	8.4
4 000.0	4 052.7 $\pm$ 341.4	8.4	4 059.4 $\pm$ 314.0	7.7

2.9 提取回收率试验

取空白血浆 0.1 mL, 按 2.7 标准曲线的绘制项下的方法配制低、中、高 3 个质量浓度 (非诺贝特酸血浆浓度分别为 20、500、4 000 ng/mL) 的样品, 每一个浓度进行 6 个样本分析。同时另取空白血浆 0.1 mL, 除不加内标溶液外, 按照 2.2 血浆样品处理项下方法操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的对照品溶液 50 μ L 和内标溶液 50 μ L, 涡流混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干。残留物以流动相溶解, 进样分析, 获得相应峰面积 (3 次测定的平均值)。以每一个浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率, 见表 2。结果表明, 所建立的测定 Beagle 犬血

浆中非诺贝特酸的分析方法符合《中国药典》要求, 可用于非临床药动力学试验。

表 2 提取回收率试验结果

Table 2 Results of extraction recovery

质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
20.0	92.5 $\pm$ 10.5	10.5
500.0	83.6 $\pm$ 6.6	7.9
4 000.0	85.4 $\pm$ 7.3	8.6

2.10 血浆样品稳定性试验

分别考察了血浆样品经液-液萃取处理后室温

放置 24 h、血浆样品室温放置 4 h、血浆样品经历 3 次冷冻 - 解冻循环及血浆样品于 -20 ℃ 冷冻放置 60 d 的稳定性, 结果见表 3。可见血浆样品经上述条件处理和放置后比较稳定。

表 3 血浆样品稳定性试验结果

Table 3 Stability results of fenofibric acid in plasma

放置条件	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	测定质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
液 - 液萃取	20.0	20.3±2.3	11.2
后室温放置	4 000.0	3810.6±168.9	4.4
室温放置	20.0	21.2±1.6	7.3
	4 000.0	3 813.9±205.8	5.4
冷冻 - 解冻 循环	20.0	21.1±1.6	7.4
	4 000.0	3 644.9±124.2	3.4
冷冻放置	20.0	22.3±0.8	3.8
	4 000.0	3 830.5±448.7	11.7

2.11 药动学参数

采用 DAS 2.1.1 数据处理软件, 计算 Beagle 犬 ig 受试制剂和参比制剂后的药动学参数, 结果见表 4。平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。

表 4 受试制剂和参比制剂中非诺贝特酸药动学参数 (n=6)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of fenofibric acid after ig test preparation and reference preparation

参数	单位	受试制剂	参比制剂
$t_{1/2}$	h	17.7	16.4
MRT_{0-t}	h	24.7	24.5
$MRT_{0-\infty}$	h	30.7	29.1
t_{max}	h	6.7	2.5
C_{max}	ng·mL ⁻¹	1 100.0	924.3
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	17 725.0	17 086.9
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	18 649.8	18 789.4
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$		0.924	0.932

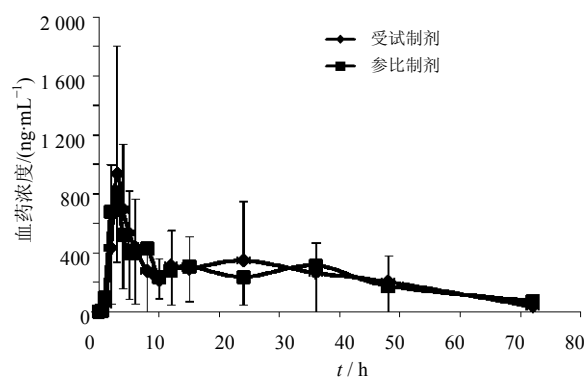


图 2 分别 ig 非诺贝特受试制剂和参比制剂后非诺贝特酸的 平均药时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of fenofibric acid after ig administration of test preparation and reference preparation

2.12 相对生物利用度的测定

以统计矩方法统计结果中的 AUC_{0-t} , 计算相对生物利用度 (F)。结果受试制剂中非诺贝特酸的 平均相对生物利用度为 (104.7±12.4) %。

$$F = AUC_{0-t}(\text{test}) / AUC_{0-t}(\text{reference})$$

2.13 统计学分析 (生物等效性评价)

采用 DAS 2.1.1 软件, 对药动学参数进行统计学分析。

2.13.1 方差分析 受试制剂与参比制剂的 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 方差分析结果见表 5。结果显示, 上述参数数据在制剂间和周期间的差异无统计意义, 在个体间的差距有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 5 主要药动学参数方差分析结果

Table 5 ANOVA results of main pharmacokinetic parameters

参数	F 值		
	制剂间	周期间	个体间
AUC_{0-t}	0.636	0.598	251.428**
$AUC_{0-\infty}$	0.442	0.118	100.153**
C_{max}	1.056	0.282	107.910**

$$F_{0.05}(1,4)=21.20 \quad F_{0.05}(5,4)=15.52 \quad **P < 0.01$$

2.13.2 双向单侧 t 检验及 [1-2 α] 置信区间分析 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 双向单侧 t 检验结果及 [1-2 α] 置信区间分析见表 6。结果显示受试制剂中, 非诺贝特酸的 AUC_{0-t} 的 90% 置信区间为参比制剂的 93.5%~115.9%, $AUC_{0-\infty}$ 的 90% 置信区间为参比制剂的 89.3%~124.2%, C_{max} 的 90% 置信区间为参比制剂的 91.2%~129.9%。

表 6 药动学参数双单侧检验和 $[1-2\alpha]$ 置信区间检验结果

Table 6 The t-test and confidence interval results of main pharmacokinetic parameters

参数	t_1	t_2	90%置信区间
AUC_{0-t}	5.222	3.626	93.5~115.9
$AUC_{0-\infty}$	3.546	2.215	89.3~124.2
C_{max}	5.329	3.286	91.2~129.9

 $t(0.05/4)=2.13$

3 讨论

采用 LC-MS-MS 法测定了 Beagle 犬血浆中非诺贝特酸, 并进行了方法确证。血浆样品经液-液萃取后, 采用 APCI 源, 以 SRM 扫描方式进行定量分析, 血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定。本方法具有快速、准确、灵敏度高等特点, 适合非诺贝特双层渗透泵片在 Beagle 犬体内的生物利用度和生物等效性研究。

采用交叉给药的方式进行了受试制剂和参比制剂在 Beagle 犬体内的药动学研究, 经统计学分析后, 受试制剂和参比制剂各药动学参数差异无显著性, 因此可认为非诺贝特双层渗透泵片与缓释胶囊

具有生物等效性。

参考文献

- [1] 李卫中, 张峻菁, 卢君强. 非诺贝特缓释胶囊体外释放度及释药机制的研究 [J]. 今日药学, 2010, 20(4): 34-36.
- [2] 孙光美, 杨星钢, 聂淑芳, 等. 非诺贝特双层渗透泵制剂的处方优化 [J]. 中国药剂学杂志: 网络版, 2009, 7(4): 212-217.
- [3] 李晓祥, 赵亚男, 周理想. 非诺贝特缓释片人体药代动力学及生物等效性研究 [J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 732-734.
- [4] 赵永红, 黄毅慧, 黄仲义. 非诺贝特胶囊(微粒化)人体生物利用度研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(14): 1082-1083.
- [5] 左素兰, 吕娜, 丁桂真. 非诺贝特缓释胶囊治疗原发性高脂血症的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(8): 489.
- [6] 沈敏, 李中东. 非诺贝特非调脂作用的研究与应用 [J]. 中国临床药学杂志, 2010, 19(4): 253-256.
- [7] 何勇, 夏涛. HPLC 法测定非诺贝特胶囊的含量 [J]. 安徽医药, 2004, 9(2): 118-119.