

• 研究论文 •

硝苯地平缓释片临床前药动学及生物利用度研究

王新刚^{1,2}, 李全胜², 蔡悠悠¹, 邹全飞³, 司端运^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津大学, 天津 300193

摘要: **目的** 研究硝苯地平缓释片在 Beagle 犬体内的药动学和生物利用度。**方法** 采用双周期随机交叉试验设计, 分别给予 8 只 Beagle 犬受试制剂(硝苯地平缓释片)或参比制剂(硝苯地平控释片) 30 mg, 采用 LC-MS/MS 法测定给药后不同时间的血药浓度。选用 DAS 2.0 软件计算药动学参数, 并对药代参数进行配对 *t* 检验统计分析。**结果** 血浆中硝苯地平线性范围为 0.05~30 ng/mL, 最低定量限为 0.05 ng/mL, 分析方法灵敏、准确、特异性高。受试制剂和参比制剂的峰浓度、达峰时间和药-时曲线下面积分别为 (4.46±2.11)、(5.21±2.68) ng/mL, (11.0±3.85)、(7.38±2.97) h, (49.5±25.9)、(49.6±25.2) ng·h/mL。以药-时曲线下面积计算受试制剂的相对生物利用度为 (104±43.5)%。**结论** 建立的分析方法操作简单、准确、重复性好, 可用于犬体内硝苯地平药动学和相对生物利用度的研究; 受试制剂具有一定的延迟释放特征。

关键词: 硝苯地平缓释片; 药动学; 生物利用度; LC-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)03-0161-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.001

Preclinical study on pharmacokinetics and bioavailability of Nifedipine Sustained-release Tablets

WANG Xin-gang¹, LI Quan-sheng², CAI You-you¹, ZOU Quan-fei³, SI Duan-yun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin University, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To study the pharmacokinetics (PK) and bioavailability of Nifedipine Sustained-release Tablets (NSRT) in Beagle's dogs. **Methods** Using dicycle randomized crossover study, test tablets (NSRT) or reference tablets (Nifedipine Controlled-release Tablets, NCRT) with the dose of 30 mg were given to eight Beagle's dogs. The plasma concentration of nifedipine collected at different time points was determined by LC-MS/MS method. The main PK parameters were obtained by DAS 2.0 program. **Results** With the linear range of 0.05—30 ng/mL and the lower limit quantification of 0.05 ng/mL, the LC-MS/MS method had high sensitivity, accuracy, and specificity. The main PK parameters of NSRT and NCRT were as follows: the C_{max} were (4.46 ± 2.11) and (5.21 ± 2.68) ng/mL, the t_{max} were (11.0 ± 3.85) and (7.38 ± 2.97) h, and the AUC_{0-t} were (49.5 ± 25.9) and (49.6 ± 25.2) ng·h/mL. Compared to NCRT, the bioavailability of NSRT was (104 ± 43.5)%. **Conclusion** The method is simple and accurate for the determination of the drug plasma concentration with good repeatability, and is successfully applied to the bioavailability evaluation of NSRT in Beagle's dogs. The NSRT has the feature of sustained release.

Key words: Nifedipine Sustained-release Tablets; pharmacokinetics; bioavailability; LC-MS/MS

硝苯地平 (nifedipine) 为二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 可选择性抑制钙离子进入心肌细胞和平滑肌细胞的跨膜转运, 并抑制钙离子从细胞内库释放。

硝苯地平能同时舒张正常供血区和缺血区的冠状动脉, 并可抑制心肌收缩; 还能舒张外周阻力血管, 减轻心脏后负荷, 是目前治疗高血压的一线药物^[1-3]。

收稿日期: 2013-04-25

作者简介: 王新刚, 男, 硕士研究生。研究方向为药物代谢动力学。Tel: 13702168105 E-mail: wxg515@yahoo.cn

*通信作者 司端运, 男, 博士, 研究员。研究方向为药物代谢动力学。Tel: (022)84845243 E-mail: sidy@tjpr.com

但硝苯地平半衰期短(2~3 h),在服药 30~45 min 即达到血药峰值,易引起较大的血压波动^[4]。而且由于硝苯地平可反射性增加心率作用,血药浓度高时,心率就加快,易导致猝死。因此,开发硝苯地平缓控释制剂具有必要性。

本研究根据 SFDA 有关的技术要求^[5-6],以北京伊斯康科技有限公司研制的延迟起释型硝苯地平缓释口服制剂为研究对象,选用比格犬单次双交叉给药方案,阐明制剂释药特征及生物利用度,为药物的进一步开发提供研究资料。

1 材料

1.1 动物

健康 Beagle 犬 8 只,体质量 10.3~12.5 kg,雌雄各半。由北京玛斯生物技术有限公司提供,生产许可证号 SCXK(京)2011-0003。由天津市新药安全评价研究中心实验动物室饲养,实验动物使用许可证号 SYXK(津)2011-0005。实验动物饲养采用明暗各 12 h 的照明控制,温度(22±1)℃,湿度(60±5)%。

1.2 药品

受试制剂:硝苯地平延迟起释型缓释片(Nifedipine Sustained-release Tablets, NSRT),批号 110701,北京伊斯康科技有限公司生产并提供。参比制剂:硝苯地平控释片(拜新同, Nifedipine Controlled-release Tablets, NCRT),批号 BJ05820, Bayer Schering Pharma AG 公司生产。

硝苯地平对照品和尼群地平对照品(批号分别为 100338-201103 和 100585-201104,质量分数分别为 99.9%和 99.0%)均由中国食品药品检定研究院提供。

1.3 试剂

甲醇(色谱纯, Fisher 公司出品);无水甲酸(色谱纯)天津市光复精细化工研究所出品;乙腈(色谱纯, Fisher 公司出品);甲酸铵(分析纯,天津市光复精细化工研究所出品);纯水(采用科诺 BM—40 型纯水制备系统自制)。

1.4 仪器

液相色谱为日本岛津 30A 超高效液相系统,输液泵 LC—30 AD,自动进样器 SIL—30 AC;质谱仪为美国 AB 公司 TRIPLE QUAD 5500 型,配有电喷雾离子化源(ESI),Analysis1.5 分析数据处理系统。XS105 型和 AB54—S 型分析天平,均为瑞士 Mettler Toledo 公司产品。B600 型低速自动平衡离心机,白洋离心机厂产品;3K15 型高速冷冻离心机,

德国 Sigma 公司产品;17R 型高速冷冻离心机, Thermo Scientific 产品。XW—80A 型漩涡混合器,上海沪西分析仪器厂有限公司产品;KH—851 型,上海环宇仪器厂产品。

2 方法

2.1 待测物的贮备液与标准系列溶液

精密称取 10.0 mg 质量分数为 99.9%的待测物硝苯地平置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容,混合均匀得 1 000 μg/mL 的硝苯地平溶液储备液。以甲醇稀释待测物贮备液,配制浓度依次为 1、2、6、20、60、200、600 ng/mL 的系列标准溶液。

2.2 血浆样品中硝苯地平的定量分析

色谱条件:色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(50 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-20 mmol/L 甲酸铵(含 0.5%甲酸和 10%甲醇)(60:40),体积流量为 0.5 mL/min,柱温 45℃,进样量 5 μL。

质谱条件:ESI 离子化源,正离子检测,源温度为 550℃,喷雾电压为 5 000 V,扫描方式选择多反应监测(MRM),硝苯地平选择 m/z 347.1→ m/z 315.1 离子对进行监测,碰撞电压为 10 V;内标尼群地平为 m/z 361.2→ m/z 315.1,碰撞电压为 18 V。扫描时间为 4.0 min。二级全扫描质谱图见图 1。

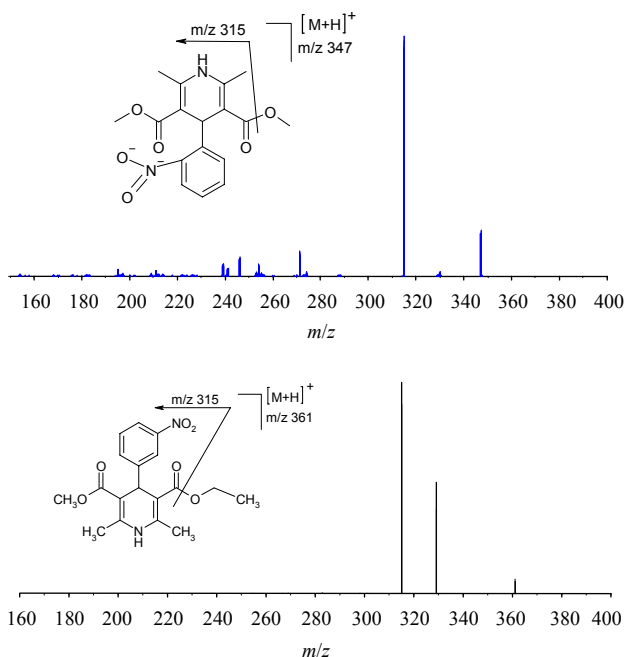


图1 硝苯地平(A)和内标尼群地平(B)的二级全扫描质谱图

Fig. 1 MS² full scan mass spectra of nifedipine (A) and interior standard—nitrendipine (B)

2.3 Beagle 犬血浆样品的处理

所有操作均在暗室中避光进行。精密吸取 Beagle 犬血浆 200 μL ，加入 10 μL 硝苯地平标准液，加入 800 μL 内标(2 ng/mL 尼群地平，用乙腈-甲醇=7:3 的溶液配制)，涡旋混匀后，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 100 μL ，进样 5 μL 进行 LC/MS/MS 分析。

2.4 给药方法及血样采集

健康 Beagle 犬 8 只，随机分为 2 组，每组 4 只，雌雄各半，进行单剂量、双周期、双交叉口服给药试验。给药前禁食 16 h，试验期间自由饮水，给药后 4 h 进食。第一周期与第二周期试验中间经过一周清洗期。

血样采集：在给药前(0 h)及口服给药后 1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、18、24、30、48 h，分别自犬前肢静脉取血至肝素化试管中，于 10 min 内离心，分离血浆，于 -80°C 冷冻保存，并在 70 d 内完成样品分析。

2.5 数据处理

采用中国药理学学会数学药理专业委员会编辑的

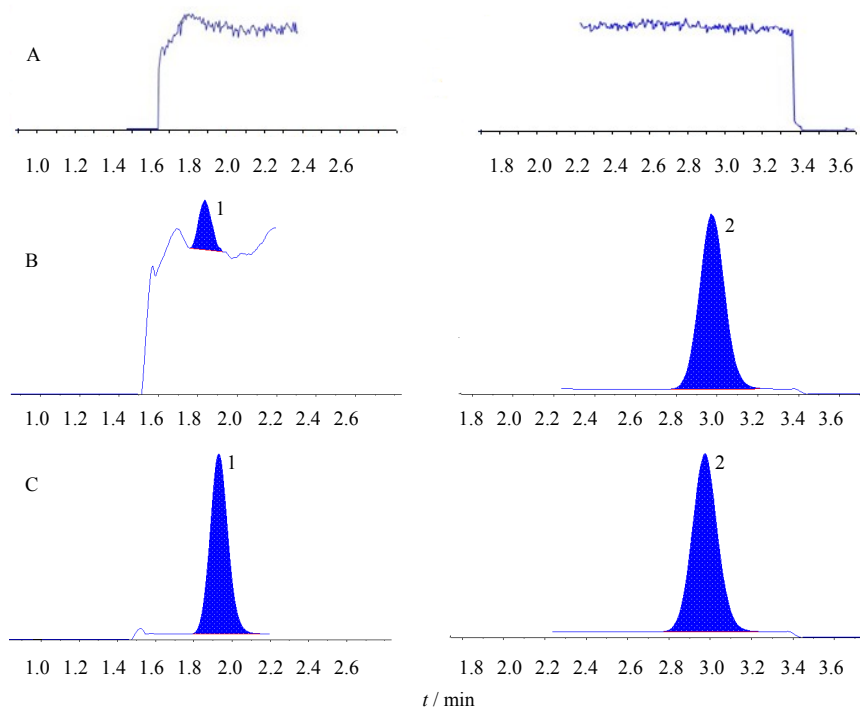
DAS 2.0 软件，选择统计矩方法进行药动力学参数计算。采用梯形法计算 AUC_{0-t} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ ； $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 值采用实测值； V_d 、 $t_{1/2}$ 、MRT、CL 以统计矩计算结果为准。

受试制剂与参比制剂的 AUC_{0-t} 、 $C_{\max}$ 数据进行方差分析和配对 t 检验，并经自然对数转换后进行双向单侧 t 检验； $T_{\max}$ 数据用非参数法进行统计分析。

3 结果

3.1 Beagle 犬血浆中硝苯地平定量分析方法的确证

Beagle 犬血浆中硝苯地平定量分析方法的确证结果显示，在选定的色谱质谱条件下，血浆中的内源性物质不干扰目标物测定，典型色谱图见图 2；该方法的线性范围为 0.05~30 ng/mL，代表性的校正曲线回归方程： $Y=0.280X+0.002\ 20$ ($r=0.998$)；定量下限(LLOQ)为 0.05 ng/mL，该浓度下信噪比(S/N)>50，准确度(RE)为 7.20%，批内精密度为 4.76%；在低、中、高 3 个质量浓度(0.1、1.0、24.0 ng/mL)水平上待测物硝苯地平的绝对回收率分别为 $(82.0\pm3.42)\%$ 、 $(94.6\pm6.08)\%$ 和 $(93.3\pm4.64)\%$ ，内标尼群地平的回收率为 $(93.1\pm1.18)\%$ ；



1-硝苯地平，2-尼群地平(内标)；A-空白血浆，B-空白血浆加入 0.05 ng/mL 硝苯地平(LLOQ)或 2 ng/mL 尼群地平，C-Beagle 犬口服 30 mg 硝苯地平 8 h 的血浆样品

1- nifedipine, 2- nitrendipine (IS); A-blank plasma; B-blank plasma + nifedipine (LLOQ, 0.05 ng/mL) or nitrendipine (IS, 2ng/mL); C-dog plasma sample at 8 h after ig administration of nifedipine 30 mg/kg to Beagle's dogs

图 2 LC/MS/MS 测定犬血浆中硝苯地平的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of nifedipine in dog plasma by LC/MS/MS method

每一浓度水平 QC 样品的准确度 (RE) 在 $-2.50\% \sim 0.830\%$, 批内精密性 (RSD) 在 $2.06\% \sim 6.21\%$, 批间精密性 (RSD) 在 $1.80\% \sim 15.7\%$, 符合有关生物样品中分析方法确证的要求; 样品稳定性实验表明, 处理后的硝苯地平血浆样品室温放置 24 h、进样器中放置 48 h、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反复冻融 3 次和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下长期冻存 77 d 的稳定性的准确度均在 $\pm 15\%$ 以内, 稳定性良好; 在试验选择的样品处理、色谱与质谱条件下, 待测物在低、中、高 3 个质量浓度 (0.1 、 1.0 、 24.0 ng/mL) 水平上的基质效应分别为 $(92.0 \pm 5.50)\%$ 、 $(102 \pm 3.19)\%$ 和 $(102 \pm 1.03)\%$, 内标的基质效应为 $(106 \pm 2.10)\%$, 平行测定的 RSD 小于 6.0% , 基本没有基质效应, 不会对样品的分析产生影响。

3.2 血药浓度测定

Beagle 犬口服给药后, 受试制剂与参比制剂的平均血药浓度-时间曲线见图 3。从图可看出, 给药后 2 h 开始, 达到同一有效血药浓度的时间, 试验品比参比品延后 2~4 h。两药达 $T_{\max}$ 后均较为平缓的下降, 均显示出明显的时滞特征, 表明试验品具有一定的延迟释放特征。

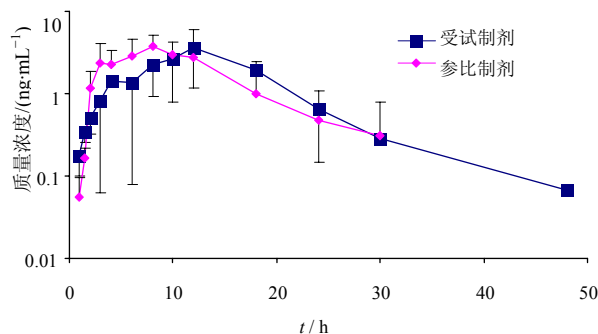


图3 Beagle 犬单次双交叉口服受试制剂或参比制剂后血浆中硝苯地平的平均血药浓度-时间曲线 (LogC-t) 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves of nifedipine after ig administration of NSRT and NCRT to Beagle dogs ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 药动学参数计算结果

采用统计矩法进行药动学参数计算, 主要药动学参数结果见表 1。

3.4 缓释特征与生物利用度分析

犬单次双交叉口服相同剂量的受试制剂或参比制剂后, 受试制剂的相对生物利用度为 $(104 \pm 43.5)\%$ 。多因素方差分析及配对 t 检验表明两者的

表1 Beagle 犬单次双交叉口服受试制剂或参比制剂后平均药动学参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 PK parameters of nifedipine after ig administration of NSRT and NCRT to Beagle's dogs ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	单位	受试制剂	参比制剂
AUC_{0-t}	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	49.5 ± 25.9	49.6 ± 25.2
$AUC_{0-\infty}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	50.5 ± 26.0	50.3 ± 25.2
MRT_{0-t}	h	13.7 ± 3.31	11.2 ± 3.74
$MRT_{0-\infty}$	h	14.5 ± 3.75	11.9 ± 4.12
$t_{1/2}$	h	5.88 ± 2.06	6.75 ± 5.52
$T_{\max}$	h	11.0 ± 3.85	$7.38 \pm 2.97^*$
CL	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	810 ± 512	786 ± 543
V_d	L	$6\,901 \pm 5\,242$	$7\,289 \pm 7\,581$
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.46 ± 2.11	5.21 ± 2.68
K_a	h^{-1}	2.42 ± 3.08	39.0 ± 108

与受试制剂比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs test formulation

AUC_{0-t} 差异没有显著性, 说明两种制剂在 Beagle 犬体内吸收程度基本一致。受试制剂与参比制剂中硝苯地平的 $T_{\max}$ 的分别为 7.38 h 和 11.0 h, 配对 t 检验表明受试制剂具有一定的时滞特征。这符合缓释剂型药物释放速度慢于普通片剂、达峰时间延后的特点, 说明硝苯地平缓释片具有缓释的特征。

4 讨论

测定方法的选择: 硝苯地平缓释片的口服剂量较低, 一般为 30 mg/次, 在体内所能达到的浓度较低, 因此需要选择比较灵敏的检测方法。文献报道硝苯地平的测定方法主要有 HPLC 法^[7]、GC 法^[8]和 LC-MS/MS 法^[9-11]。本研究采用 LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中硝苯地平的浓度, 药物与内标得到较好的分离, 不受血浆中内源性物质的干扰。该法具有专属性强、灵敏度高、重复性好等特点, 可满足硝苯地平的体内药动学及相对生物利用度研究, 符合化学药物非临床前药动学研究指导原则中生物样品分析方法的基本要求^[5]。

检验两种制剂是否等效, 通常采用双向单侧 t 检验及置信区间法。此两种检验方法对试验例数都有一定要求, 尤其对于存在较大个体差异的研究。由于本试验中动物间存在的个体差异较大, 动物实验的例数较少, 导致双向单侧 t 检验及置信区间法检验不适于评价两种制剂是否等效, 因此采用方差分析及配对 t 检验来统计分析两种制剂药动学参数的差异性, 更客观地评价两种制剂释药特征与生物暴露情况。

参考文献

- [1] 薛洪源, 胡玉钦, 杨荣慧, 等. 单剂量口服硝苯地平缓释片的药动学及生物等效性 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(8): 970-973.
- [2] Wu J, Wang B J, Wei C M, *et al.* Pharmacokinetics of nifedipine sustained-release tablets in healthy Chinese volunteers [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2007, (16): 192-196.
- [3] 薛洪源, 侯艳宁, 杨荣慧, 等. 多剂量口服硝苯地平缓释片的药动学及生物等效性研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(8): 915-920.
- [4] Ye L L, Jiang G Q, Chen J, *et al.* Preparation and *in vitro* release of oral osmotic pump system with single room and layer nifedipine as the model drug [J]. *Fine Chem*, 2002, 19(11): 628-647.
- [5] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [6] 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [7] 于芝颖, 李玉珍, 解建勋, 等. 高效液相色谱法测定硝苯地平缓释片的血药浓度和相对生物利用度 [J]. 首都医药, 2000, 7(2): 24.
- [8] Dai Z S, Long L H, Gu S F, *et al.* Relative bioavailability of nifedipine sustained-release tablets in health volunteers [J]. *Acta Univ Med Tongji*, 2001, 30(6): 527-529.
- [9] Xue H Y, Hu Y Q, Yang R H, *et al.* Pharmacokinetics properties and bioequivalability of nifedipine sustained-release tablets after a single dose administration in healthy volunteers [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2006, 26(8): 970-973.
- [10] Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical alnalysis. Viewpoint and discussion [J]. *J Chromatograph*, 1997, 689(1): 175-180.
- [11] Wang X D, Li J L, Lu Y, *et al.* Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a clinical herb-drug interaction study [J]. *J Chromatograph B*, 2007, 852(1/2): 1-11.