

甲磺酸多沙唑嗪缓释片 Beagle 犬体内药动学和生物等效性研究

于艳英, 何 勇, 吴宗好*

合肥华方医药科技有限公司, 安徽 合肥 230088

摘要: 目的 研究甲磺酸多沙唑嗪(Dox)缓释片在 Beagle 犬体内的药动学, 评价其生物等效性。方法 8 条健康 Beagle 犬, 采用双周期、双交叉、单剂量分别 ig Dox 缓释片受试制剂或参比制剂 4 mg; 建立血浆中 Dox 液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法, 进行方法精密性、准确性、回收率、基质效应、稳定性方法学验证; 测定给药前 (0 h) 及给药后 2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、24、36、48、72 h 血浆中 Dox 经时血药浓度, 运用 DAS3.2.8 计算其药动学参数, 并评价其生物等效性。结果 LC-MS/MS 方法学经验证符合检测要求。主要药动学参数如下: 受试制剂与参比制剂的 C_{max} 分别为 (29.998 ± 3.725) 、 (31.207 ± 5.586) ng/mL, T_{max} 分别为 (11.5 ± 2.33) 、 (11.25 ± 1.035) h, AUC_{0-t} 分别为 (528.549 ± 84.526) 、 (539.852 ± 94.232) ng·h/mL; 受试制剂 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 的 90% 置信区间分别为参比制剂相应参数的 84.6%~113.9%、88.6%~107.5% 和 90.2%~104%, 均在 80%~125% 范围内。结论 Dox 缓释片受试制剂与参比制剂生物等效。

关键词: 甲磺酸多沙唑嗪缓释片; LC-MS/MS; 药动学; 生物等效性

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2019) 04-0630-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.005

Pharmacokinetics and bioequivalence of doxazosin mesylate extended-release tablets in healthy Beagle dogs

YU Yanying, HE Yong, WU Zonghao

Hefei Huafang Pharmaceutical Science & Technology Co., Ltd., Hefei 230088, China

Abstract: Objective To develop a validated LC-MS/MS method for determining doxazosin mesylate (Dox) in Beagle dogs, and investigate the pharmacokinetic profiles and bioequivalence of Dox extended-release tablets. **Methods** Eight healthy Beagle dogs were ig given Dox sustained-release tablets or reference tablets of 4 mg in two-cycle, double-crossover and single-dose respectively. A method for the determination of Dox in plasma by LC-MS/MS was established. The method was validated for precision, accuracy, recovery, matrix effect and stability. The blood concentration of Dox in plasma was determined before (0 h) and 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 36, 48, 72 h after administration. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.2.8 and its bioequivalence was evaluated. **Results** LC-MS/MS methodologies were verified to meet the detection requirements. The main pharmacokinetic parameters of Dox test and reference preparations after a single dose were as follows: C_{max} , (29.998 ± 3.725) and (31.207 ± 5.586) ng/mL; T_{max} , (11.5 ± 2.33) and (11.25 ± 1.035) h; AUC_{0-t} , (528.549 ± 84.526) and (539.852 ± 94.232) ng·h/mL; respectively. The 90% confidence intervals of AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} were respectively 84.6% ~ 113.9%, 88.6% ~ 107.5% and 90.2% ~ 104%, which were all within the range of 80% ~ 125%. **Conclusion** Statistical analysis shows that Dox extended-release tablets was bioequivalent to reference tablets.

Key words: doxazosin mesylate extended-release tablets; LC-MS/MS; pharmacokinetics; bioequivalence

甲磺酸多沙唑嗪(doxazosin mesyllate, Dox)缓释片是新一代 α 肾上腺素受体阻滞剂,主要用于原

发性轻、中度高血压和良性前列腺增生患者的治疗^[1],已被列为抗高血压的一线药物。Dox主要在

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09201003-006)

第一作者: 于艳英,女,助理研究员,硕士,研究方向为药物代谢动力学。E-mail: ying0216521@163.com

*通信作者 吴宗好 E-mail: 1064938983@qq.com

胃肠道吸收,吸收迅速、完全;其在体内零级释放,不受胃肠道pH值影响,血药浓度更加平稳;在人体内服药后8~9 h血药浓度达峰值。Dox血浆蛋白结合率为98%~99%,消除半衰期约为9~12 h,口服2~8 mg后绝对生物利用度为62%~69%,长期服用无蓄积现象,主要由肝脏代谢,原形药物经粪便排出不到5%,肾脏排泄9%^[2-4]。在临床使用时,缓释片减少了给药次数,提高了患者的依从性,同时也减少了不良反应。目前国内还没有该双层渗透泵制剂,亟需开发国产自主该高端制剂产品^[1]。

本实验根据SFDA有关技术性要求^[5-6],对两种甲磺酸多沙唑嗪缓释片制剂进行Beagle犬体内药动学和相对生物利用度研究,并评价其生物等效性,为该制剂的药动学研究和进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

受试制剂:Dox缓释片,规格4 mg/片,批号1206001,合肥华方医药科技有限公司提供;参比制剂:Dox缓释片(商品名:可多华[®]),规格4 mg/片,批号B110238,辉瑞制药有限公司生产。

Dox对照品,批号100566-200401,质量分数100%,中国食品药品检定研究院;哌唑嗪,批号121001,质量分数99.3%,天津中瑞药业有限公司;甲醇、乙腈,色谱级,merck。乙酸铵、甲酸,色谱级,阿拉丁。

1.2 主要仪器

Agilent 1290-2超高压液相色谱仪,安捷伦;AB4000三重四级杆串联质谱仪(ESI⁺源),ABSciex;Analyst1.6.3数据采集系统;GL-16G型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Werke Typ VX 2E混匀器(德国IKA);AG135型电子分析天平(METTLER TOLEDO)。

1.3 实验动物

健康Beagle犬8只,体质量10.1~12.3 kg,由南京安立默科技有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2010-0002。

2 方法

2.1 血浆样品中Dox的浓度测定

色谱条件:色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇-4 mmol/L醋酸铵(含0.15%甲酸)=45:55;体积流量为0.2 mL/min;柱温40 °C;进样体积5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子检测,

雾化器为344.74 kpa,辅助加热器为344.74 kpa,气帘气为172.37 kpa,碰撞气为48.26 kpa,源温度为550 °C,喷雾电压为5 500 V,多反应监测(MRM)扫描分析。监测离子对 m/z 452.2→ m/z 344.3(Dox), m/z 384.2→ m/z 247.2(哌唑嗪);去簇电压分别为141 V和125 V;碰撞能量分别为43 V和38 V。二级全扫描质谱图见图1。

2.2 分组给药及采血

健康Beagle犬8只,随机分成2组,雌雄各半,进行单剂量双周期双交叉ig受试制剂Dox缓释片和参比制剂Dox缓释片,两组均给予Dox缓释片1片。依据药品说明书,在满足检测要求的情况下,设定给药剂量为4 mg。给药前禁食12 h,试验期间自由饮水,给药后4 h进食;清洗期为1周。

于给药前(0 h)及给药后2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、24、36、48、72 h采集静脉血至肝素化试管中;于4 °C,12 000 r/min离心10 min,分离血浆,-80 °C冷冻保存待测。

2.3 Beagle犬血浆样品的预处理

精密量取200 μL血浆,精密加入内标哌唑嗪对照品溶液(200 ng/mL)5 μL,涡旋混匀30 s,加入400 μL乙腈,立即涡旋1.5 min,3 000 r/min离心10 min。提取上清液,40 °C N₂吹干,残渣用200 μL流动相复溶,于12 000 r/min高速离心机离心10 min,取上清5 μL进样分析。

2.4 Dox对照品溶液配制

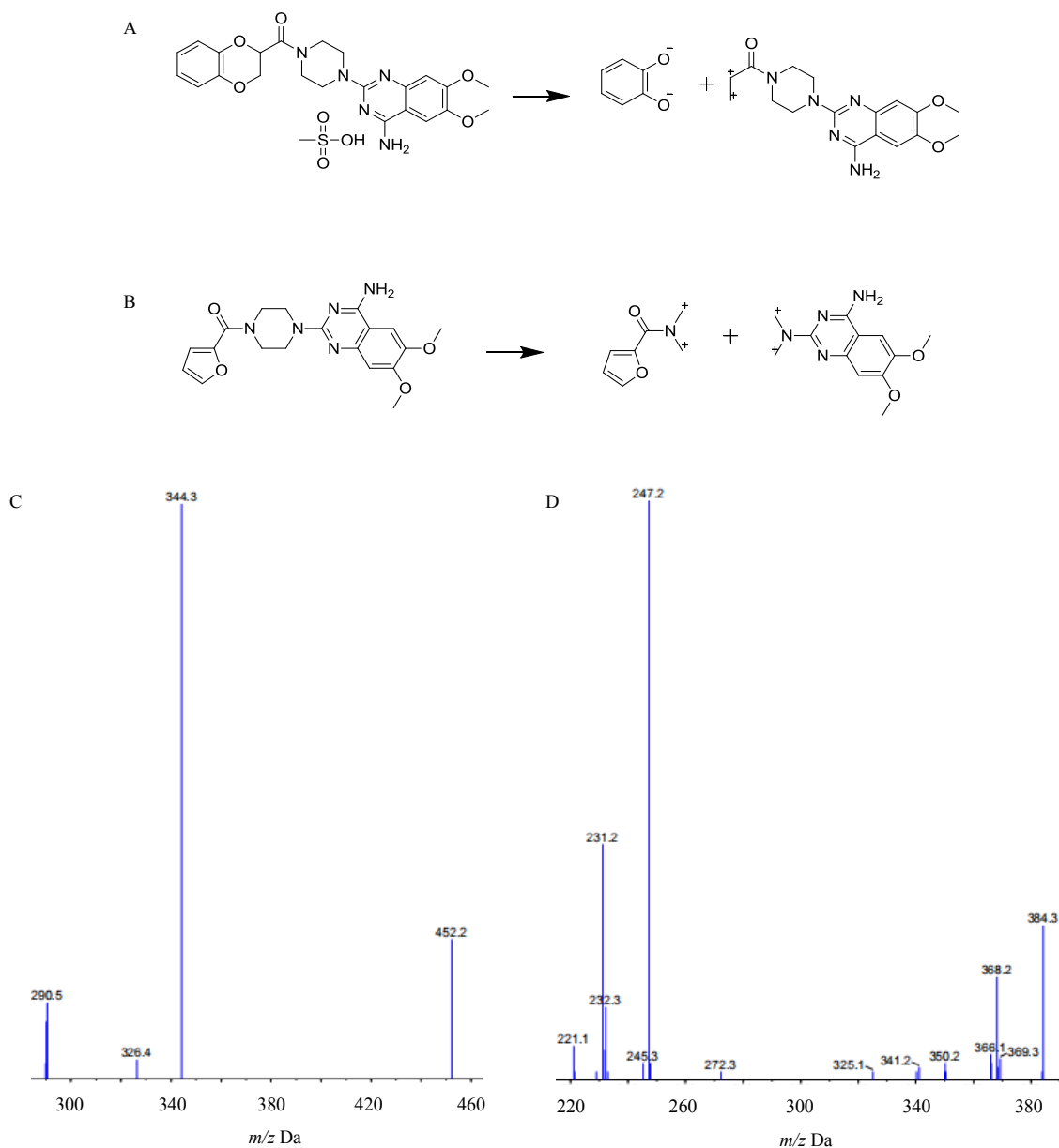
精密称取Dox 10.0 mg,至100 mL容量瓶中,甲醇定容,摇匀即得100 μg/mL的Dox对照品储备液。分别精密量取适量储备液,用纯甲醇稀释,得Dox标曲工作液10、20、40、100、200、400、800 ng/mL,质控工作液4、10、100、600 ng/mL。

2.5 方法专属性试验

取空白血浆、含Dox对照品(10 ng/mL)和内标(5 ng/mL)的空白血浆及Beagle犬ig Dox缓释片8 h血浆样品,按“2.3”项下方法处理,进样分析,在本试验条件下,血浆中Dox能得到较好的分离:Dox和内标哌唑嗪保留时间分别为4.47、1.37 min。血浆中内源性物质和代谢产物不干扰Dox和哌唑嗪的测定;专属性图谱见图2。

2.6 标准曲线和线性范围

精密量取不同质量浓度Dox标准曲线浓度点的工作液各10 μL,置2 mL EP管中,40 °C下N₂吹干后,精密加入200 μL空白血浆,依次配制成相当于Dox血浆质量浓度分别为0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、



A-Dox 结构裂解式; B-哌唑嗪结构裂解式; C-Dox 二级质谱图; D-哌唑嗪二级质谱图

A-Dox structure pyrolysis; B-prazosin structure pyrolysis; C-Dox secondary mass spectrum; D-prazosin secondary mass spectrum

图1 Dox 和内标哌唑嗪的二级全扫描质谱图

Fig. 1 MS2 full scan mass spectra of Dox and internal standard-prazosin

10.0、20.0、40.0 ng/mL 的样品,按“2.3”项下方法操作,并按“2.1”项色谱条件进行测定,建立 Dox 标准曲线。分别以 Dox 质量浓度为横坐标, Dox 色谱峰面积与内标色谱峰面积的比值为纵坐标,进行线性回归运算,线性方程为 $Y=0.195\ 14X+0.037\ 31$ ($r=0.995\ 57$)。结果表明, Dox 在 0.2~40.0 ng/mL 范围内线性关系良好。

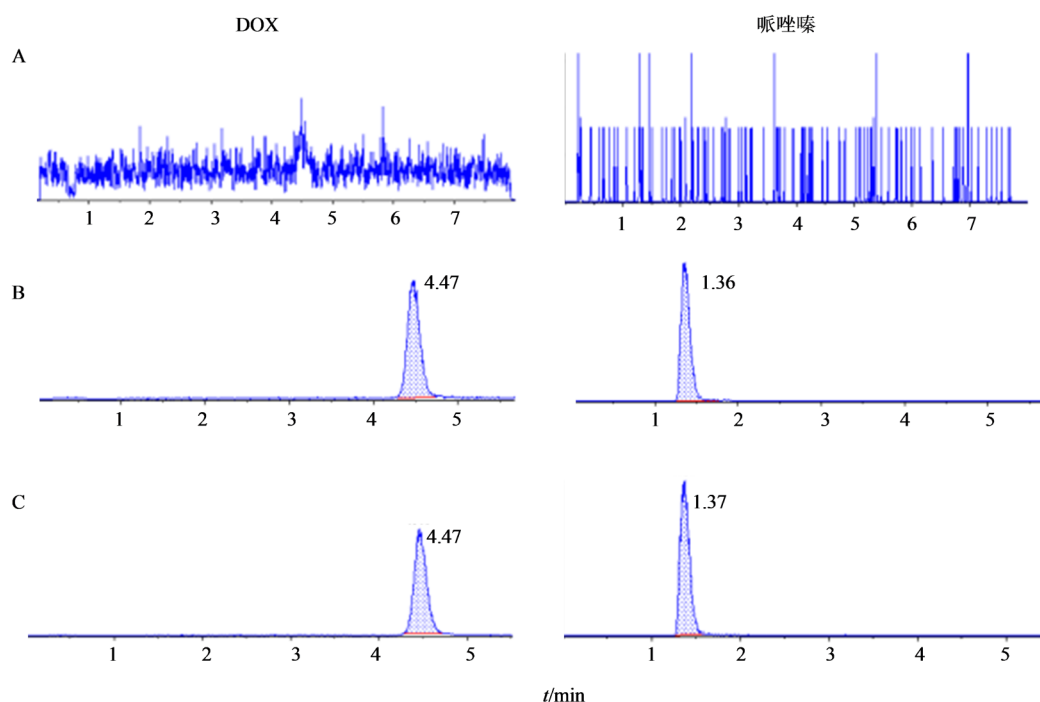
2.7 方法精密度与准确度

精密量取 200 μ L 空白血浆,加入 10 μ L Dox 对照品溶液,配制成最低质控 (LLOQ QC)、低质控 (LOQ QC)、中质控 (MOQ QC)、高质控 (LOQ

QC)4 个质量浓度 (0.2、0.5、5.0、30.0 ng/mL) 的样品,按“2.3”项下方法操作,每一浓度进行 5 样本分析,连续测定 3 个批次,根据当批的标准曲线,计算精密度的测得浓度。根据精密度样品结果计算本法的精密度和准确度,结果表明, LLOQ QC 日内、日间精密度相对标准差 (RSD%) < 20%, 准确度均在 80%~125% 范围内; 其他 3 个浓度日内、日间精密度 RSD% < 15%, 准确度均在 85%~115% 范围内。

2.8 提取回收率和基质效应试验

分别配制低、中、高质量浓度 (0.5、5.0、30.0 ng/mL) 的 Dox 对照品溶液 (含内标) A; 取空白血浆,



A-空白血浆;B-空白血浆中添加Dox(10 ng/mL)和内标(5 ng/mL);C-Beagle犬ig Dox缓释片8 h血浆样品
A-blank plasma;B-plasma spiked with Dox (10 ng/mL) and internal standard (5 ng/mL);C-plasma obtained from Beagle at 8 h after ig administration of Dox mesylate extended-release tablets

图2 血浆中Dox和内标哌唑嗪的典型色谱图

Fig. 2 Typical MRM chromatograms of doxazosin and prazosin in plasma

按“2.3”项下方法操作,吹干后加入Dox对照品和内标溶液,分别制备相应质量浓度血样B;取空白血浆,分别加入适量Dox对照品和内标溶液,按“2.3”项下方法操作,分别制备相应质量浓度血样C。依次进样,记录色谱图,计算提取回收率和基质效应,提取回收率=峰面积_C/峰面积_B,基质效应=峰面积_B/峰面积_A。计算所得Dox和内标的提取回收率分别为77.10~84.94%和78.59%;基质效应分别为95.7%~106.2%和93.7%~102.8%,均没有基质干扰样品检测。

2.9 稳定性试验

分别配制低、中、高(0.5、5.0、30.0 ng/mL)质量浓度的血浆样品,测定在室温放置10 h、反复冻融3次、处理后放置10 h、短期冻存7 d、长期冷冻40 d的稳定性,准确度均在(100±15)%以内,说明稳定性良好。

2.10 数据处理

采用DAS 3.2.8药动学软件,选择统计矩方法进行药动学参数计算,采用梯形法计算AUC_{0-t}和AUC_{0-∞};C_{max}、t_{max}值采用实测值。

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(配对Wilcoxon检验)进行统计分析。

3 结果

3.1 血药浓度-时间曲线

8条Beagle犬ig受试制剂Dox缓释片和参比制剂Dox缓释片后的血药浓度-时间图,见图3。

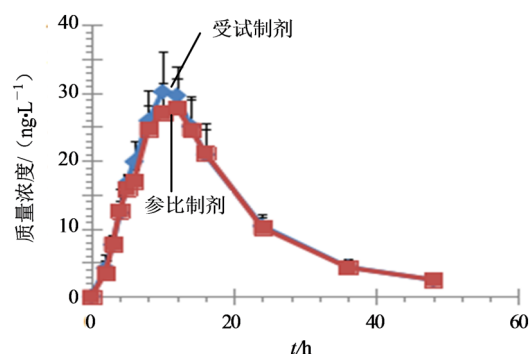


图3 平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2 主要药动学参数

8条健康Beagle犬单剂量ig 4 mg Dox缓释片受试制剂和参比制剂后的主要药动学参数,结果见表1。

表1 2种Dox缓释片在Beagle犬体内的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of Dox in Beagle dogs ($\bar{x} \pm s, n=8$)

药动学参数	单位	受试制剂	参比制剂
t_{max}	h	11.5±2.33	11.25±1.035
C_{max}	ng·mL ⁻¹	29.998±3.725	31.207±5.586
$T_{1/2}$	h	9.245±1.903	8.715±1.432
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	528.549±84.526	539.852±94.232
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	567.031±74.598	582.13±84.384

3.3 生物等效性评价

受试制剂和参比制剂 $\ln(AUC_{0-t})$ 、 $\ln(AUC_{0-\infty})$ 和 $\ln(C_{max})$ 经方差分析无显著性差异,采用双向单侧 t 检验和 $[1-2\alpha]$ 置信区间法进行生物等效性评价,结果表明:受试制剂 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 的90%置信区间分别为参比制剂相应参数的84.6%~113.9%、88.6%~107.5%和90.2%~104%,均在80%~125%范围内;表明两制剂在吸收程度和达峰浓度上等效。 t_{max} 经非参数检验两种制剂间无显著性差异,表明两制剂达峰时间上等效,因此可以判定两制剂生物等效。

4 讨论

Dox缓释片为小剂量药物,血药浓度较低,采用HPLC法准确测定其血药浓度比较困难。本研究建立了血浆中Dox药物浓度检测的LC-MS/MS方法^[7-10],并按照2015年版《中国药典》生物样品定量分析方法验证的指导原则进行了全面系统的评价^[11];方法专属性强、重现性好、灵敏度高、操作简便,适合临床药物的药动学和生物利用度试验。针对样品处理方法的选择:选用液液萃取的方法,经NaOH碱化后,用二氯甲烷:正己烷(30:70)进行处理,提取回收率很低;采用甲醇沉淀蛋白法,上清不澄清;所以最终选择用乙腈沉淀蛋白法。关于色谱条件的选择:经基质效应、色谱分离等综合因素的考察,最终选定了以甲醇:4 mmol/L醋酸铵(含

0.15%甲酸)=45:55为流动相,分析物及内标保留时间短,节省了样品分析时间。

通过8条健康Beagle犬单剂量双交叉ig给药^[12],对受试制剂Dox缓释片进行了生物等效性评价。统计分析结果表明,Dox缓释片受试制剂和参比制剂的主要药动学参数 C_{max} 、 T_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 经方差分析,无显著性差异,两制剂具有生物等效性,为临床药物质量研究提供重要参考。

参考文献

- [1] 赵颖. 甲磺酸多沙唑嗪控释制剂的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [2] 刘可, 钟大放, 袁涛, 等. 多沙唑嗪人体药动学和肝微粒体中代谢的立体选择性研究[A]. 第九届全国药物和化学异物代谢学术会议. 第九届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集[C]. 2012.
- [3] 王雪姣. 甲磺酸多沙唑嗪微孔渗透泵片的研制[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.
- [4] 薛娜. 甲磺酸左旋多沙唑嗪的质量控制及药代动力学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [5] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005.
- [6] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [7] 张毕奎, 朱运贵, 谢平, 等. HPLC-MS测定人血浆中多沙唑嗪及其在健康人体药动学研究中的应用[J]. 药物分析杂质, 2007, 27(9): 1357-1360.
- [8] 王侠. LC-MS法检测甲磺酸多沙唑嗪控释片在中国男性健康志愿者中的相对生物利用度[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 2: 152.
- [9] 谢平, 张比奎, 朱运贵, 等. 甲磺酸多沙唑嗪片的人体药动学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(8): 940-942.
- [10] 吕伟伟, 孙成春, 孙军, 等. 甲磺酸多沙唑嗪片在健康人体内的生物等效性研究[J]. 中国药房, 2009, 20(32): 2514-2516.
- [11] 国家药典委员会. 生物样品定量分析方法验证指导原则(中华人民共和国药典二部2015年版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [12] 师健鑫, 卢骏, 冯岩, 等. 甲磺酸多沙唑嗪单层渗透泵控释片的研制及Beagle犬体内的药动学[J]. 中国医药工业杂质, 2011, 42(5): 347-350.