

【药动学评价】

盐酸文拉法辛缓释片 Beagle 犬体内药动学及生物等效性研究

何 勇, 于艳英, 张亮亮, 方宗华, 吴宗好*

合肥华方医药科技有限公司, 安徽 合肥 230088

摘要: 目的 研究盐酸文拉法辛缓释片在 Beagle 犬体内的药动学和生物等效性。方法 8 条健康 Beagle 犬随机分成 2 组, 采用双周期、双交叉、单剂量分别 ig 盐酸文拉法辛缓释片受试制剂或参比制剂 75 mg, 清洗期为 1 周; 建立血浆中盐酸文拉法辛液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法, 进行方法精密度、准确度、提取回收率、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 血浆中盐酸文拉法辛血药浓度, 运用 DAS 2.1.1 软件计算其药动学参数, 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, 受试制剂和参比制剂主要药动学参数分别如下: $T_{1/2}$ 分别为 (7.16 ± 2.34) 和 (6.95 ± 1.57) h、 C_{max} 分别为 (522.89 ± 201.12) 和 (515.22 ± 159.29) ng/mL、 T_{max} 分别为 (10.38 ± 1.69) 和 (10.50 ± 2.07) h、 AUC_{0-4} 分别为 $(8\ 398.64 \pm 3332.86)$ 和 $(8\ 050.71 \pm 2103.15)$ ng·h/mL、 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(8\ 701.60 \pm 3303.29)$ 和 $(8\ 450.01 \pm 2273.45)$ ng·h/mL; 以参比制剂为参考, 受试制剂 $AUC_{0-\infty}$ 相对生物利用度为 $(101.0 \pm 13.1)\%$ 。结论 盐酸文拉法辛缓释片受试制剂与参比制剂在 Beagle 犬体内具有生物等效性。

关键词: 盐酸文拉法辛缓释片; 药动学; 生物等效性; 液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS)

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 07-1314-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.010

Pharmacokinetics and bioequivalence of Venlafaxine hydrochloride sustained release tablets in Beagle dogs

HE Yong, YU Yanying, ZHANG Liangliang, FANG Zonghua, WU Zonghao

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

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetic profiles and bioequivalence of Venlafaxine hydrochloride sustained release tablets. **Methods** Eight healthy Beagle dogs were ig given Venlafaxine hydrochloride sustained-release tablets or reference tablets of 75 mg in two-cycle, double-crossover and single-dose respectively. A method for the determination of Venlafaxine hydrochloride in plasma by LC-MS/MS was established. The method was validated for precision, accuracy, recovery, matrix effect and stability. The blood concentration of Venlafaxine hydrochloride 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 2.1.1 and its bioequivalence was evaluated. **Results** LC-MS/MS methodologies were verified to meet the detection requirements. The main pharmacokinetic parameters of Venlafaxine test and reference preparations were as follows: $T_{1/2}$, (7.16 ± 2.34) and (6.95 ± 1.57) h; C_{max} , (522.89 ± 201.12) and (515.22 ± 159.29) ng/mL; T_{max} , (10.38 ± 1.69) and (10.50 ± 2.07) h; AUC_{0-4} , $(8\ 398.64 \pm 3\ 332.86)$ and $(8\ 050.71 \pm 2\ 103.15)$ ng·h/mL; $AUC_{0-\infty}$, $(8\ 701.60 \pm 3\ 303.29)$ and $(8\ 450.01 \pm 2\ 273.45)$ ng·h/mL, respectively. The relative bioavailability of Venlafaxine was $(101.0 \pm 13.1)\%$. **Conclusion** Venlafaxine hydrochloride sustained-release tablets have bioequivalence with reference tablets in Beagle dogs.

Key words: Venlafaxine hydrochloride sustained release tablets; pharmacokinetics; bioequivalence; LC-MS/MS

文拉法辛为苯乙胺类衍生物,是具有独特化学结构和神经药理活性的新型抗抑郁药,临床多用于治疗各型抑郁症、广泛性焦虑症以及社交焦虑症,

具有起效快、疗效可靠、不良反应较小、耐受性好等特点,已成为治疗抑郁症的一线药物^[1-3]。文拉法辛口服后主要从胃肠道吸收,且吸收迅速,在肝脏有

收稿日期: 2018-09-12

基金项目: 国家重大专项新药创制(2017ZX09201003-006)

第一作者: 何 勇,男,副研究员,主要从事药学研究。E-mail: h13956000400@163.com

*通信作者: 吴宗好,研究员,主要从事药学研究。E-mail: hfsci@163.com

明显的首关效应,单剂量口服可被吸收90%,口服生物利用度为40%~45%^[4-8]。合肥华方医药科技有限公司研制了盐酸文拉法辛缓释片,该渗透泵控释制剂实现了零级释放,释药速度不受胃肠道pH影响,避免体内、体外突释,血药浓度更加平稳。目前美国OSMOTICA原研的盐酸文拉法辛渗透泵控释片未在国内销售,仅有一家“博乐欣”,难以满足市场需求,亟需研发同类产品丰富市场。

本实验按照国家《关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见》要求和指导原则^[9],建立液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法测定比格犬血浆浓度,考察药动学参数,评价受试制剂相对生物利用度,以期为后续该药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

受试制剂:盐酸文拉法辛缓释片,规格75 mg/片,批号1206001,合肥华方医药科技有限公司;参比制剂:盐酸文拉法辛缓释片(商品名VENLAFAXINE),规格75 mg/片,批号3153689,VERTICAL PHARMACEUTICALS, LLC;盐酸文拉法辛对照品,批号100566-200404,质量分数100%,中国食品药品检定研究院;盐酸维拉帕米原料,批号121003,质量分数99.3%,天津中瑞药业有限公司。

甲醇、乙腈(德国默克公司,色谱纯),其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

Agilent 1290-2超高压液相色谱仪、AB4000三重四级杆串联质谱仪、GL-16G型高速冷冻离心

机(上海安亭科学仪器厂);SZ-1型快速混匀器(常州国宇仪器制造有限公司);AG135型电子分析天平。

1.3 实验动物

Beagle犬8条,体质量10 kg,雄性,来源于仪征安立卵生物科技有限公司,许可证号为SCXK(苏)2016-0005。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

精确称取10.00 mg的盐酸文拉法辛对照品置于100 mL棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成100 µg/mL的盐酸文拉法辛储备液,再用甲醇依次稀释成质量浓度分别为0.04、0.10、0.20、0.40、1.00、2.00、4.00、10.00、20.00 µg/mL的对照品溶液作为工作液。

2.2 检测条件

色谱条件:色谱柱为C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 µm,日本岛津);流动相为甲醇-4 mmol/L醋酸铵(含0.15%甲酸)(65:35);体积流量为0.5 mL/min;柱温40 °C;进样体积5 µL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI⁺),MRM模式,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。盐酸文拉法辛和内标的定量离子对分别为 m/z 278.2→ m/z 58.1和 m/z 455.3→ m/z 165.2;去簇电压分别为71 V和115 V;碰撞能量分别为42 V和40 V。二级全扫描质谱图见图1。

2.3 样品预处理

精密量取200 µL血浆于2 mL EP管中,精密加

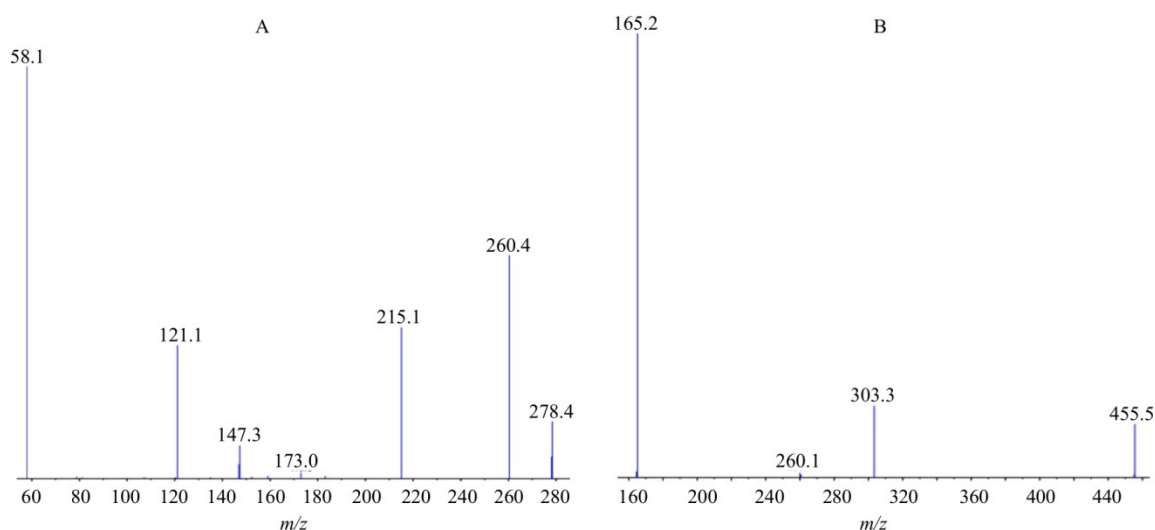


图1 盐酸文拉法辛(A)和内标盐酸维拉帕米(B)的二级全扫描质谱图

Fig. 1 MS2 full scan mass spectra of Venlafaxine hydrochloride (A) and internal standard-Verapamil hydrochloride (B)

入内标盐酸维拉帕米对照溶液(4 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL , 涡旋混匀 30 s, 加入 1.0 mL 石油醚-乙醚(60:40)萃取液, 涡旋 2 min, 于 12 000 r/min 离心 10 min。转移上清液于另一 10 mL 玻璃管中。40 $^{\circ}\text{C}$ N_2 吹干, 残渣用 200 μL 流动相复溶, 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液 5 μL 进样分析。

2.4 样品采集

健康 Beagle 犬 8 只, 随机分成 2 组, 每组 4 只, 进行单剂量双周期双交叉 ig 受试制剂和参比制剂: 禁食过夜 12 h 后, 次日清晨两组每条犬分别 ig 盐酸文拉法辛缓释片受试制剂或参比制剂, 给药剂量为 1 片(75 mg/片), 给药后 ig 50 mL 温水。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 75 mg。清洗期为 1 周, 1 周后交叉给药。

于给药前(0 h)及给药后 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24、30、48 h 采集静脉血, 每条犬总计采集 14 个点(每点采血 4 mL)。每个血样都放置于预先标记好的含 EDTA 试管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 分离出的血浆样品置于已标记好的 EP 管中, 在冰箱中 -80°C 冷冻保存。

2.5 方法专属性试验

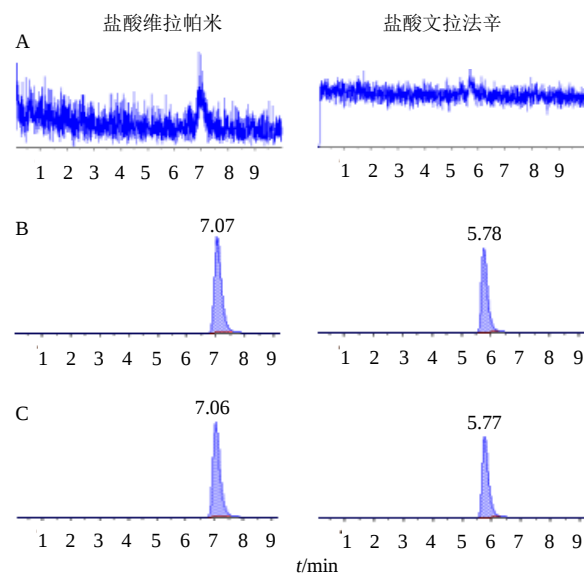
空白血浆、空白血浆添加盐酸文拉法辛(4 $\mu\text{g/mL}$) 和内标盐酸维拉帕米(4 $\mu\text{g/mL}$) 以及犬 ig 盐酸文拉法辛缓释片后 4 h 血浆加入内标维拉帕米(4 $\mu\text{g/mL}$), 按“2.3”项下方法处理后进样分析得到色谱图见图 2。盐酸文拉法辛和内标物保留时间为 5.77 和 7.07 min。结果表明, 空白血浆中代谢物质和内源性物质均不干扰盐酸文拉法辛和内标物测定。

2.6 标准曲线和线性范围

精密量取 200 μL 空白血浆, 加入盐酸文拉法辛标准曲线浓度点的工作液各 10 μL , 依次配制成相当于盐酸文拉法辛血浆质量浓度分别为 2、5、10、20、50、100、200、500、1 000 ng/mL 的样品, 按“2.3”项下依法操作, 并以“2.2”项色谱条件进行测定, 建立盐酸文拉法辛标准曲线。经线性回归运算, $Y=0.0973X+0.0118$ ($r=0.9972$), 结果表明, 盐酸文拉法辛在 2~1 000 ng/mL 线性关系良好。

2.7 精密度和准确度

精密量取 200 μL 空白血浆, 加入 10 μL 盐酸文拉法辛对照品溶液, 配制成低、中、高 3 个质量浓度(5、200 和 800 ng/mL)的样品, 按“2.3”项下操作, 每一浓度平行 5 个样品, 连续测定 3 批, 根据当批标准曲线, 计算其测得浓度。结果表明, 日内、日间精密密度相对标准差(RSD%) < 15%, 准确度均在



A-空白血浆; B-空白血浆中添加盐酸文拉法辛(4 $\mu\text{g/mL}$) 和内标(4 $\mu\text{g/mL}$); C-Beagle 犬 ig 盐酸文拉法辛缓释片后 4 h 血浆加入内标维拉帕米(4 $\mu\text{g/mL}$)

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with Venlafaxine hydrochloride and internal standard; C-plasma obtained from Beagle dogs 4 h after ig administration of Venlafaxine hydrochloride sustained release tablets and spiked with internal standard

图 2 血浆中文拉法辛和内标维拉帕米的典型色谱图
Fig. 2 Typical MRM chromatograms of Venlafaxine and internal standard-Verapamil hydrochloride

85%~115%。

2.8 基质效应和提取回收率

分别配制低、中、高质量浓度(5、200、800 ng/mL)的盐酸文拉法辛对照品溶液(含内标)A; 相应浓度的血浆样品(含内标)B, 按“2.3”项下方法处理; 取空白血浆处理后, 再加入相应浓度盐酸文拉法辛和内标溶液, 得样品 C。依次进样, 记录色谱图。计算盐酸文拉法辛和内标的平均提取回收率分别为 83.89%~88.82% 和 83.54%; 基质效应分别为 97.5%~110.2% 和 93.8%~108.3%, 均没有基质干扰样品检测。

提取回收率=峰面积 B/峰面积 C; 基质效应=峰面积 C/峰面积 A

2.9 稳定性考察

经验证, 样品在室温放置 10 h、样品处理后放置 8 h、反复冻融 3 次、 -80°C 短期冻存 7 d 以及长期冷冻 40 d 条件下; 低、中、高 3 个质量浓度(5、200 和 800 ng/mL)的血浆样品处理后进行测定, 计算其准确度均在 85%~115%, 表明样品在这些条件下稳定性良好。

2.10 血药浓度测定

8 条 Beagle 犬 ig 受试制剂和参比制剂后的血药浓度-时间曲线见图 3。

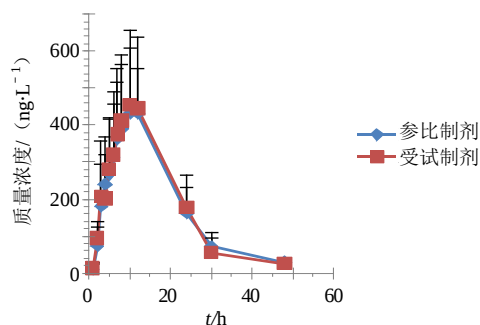


图3 8条Beagle犬ig受试制剂和参比制剂后平均血药浓度-时间曲线图($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of Venlafaxine in eight Beagle dogs after ig administration of Venlafaxine sustained-release tablets ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.11 主要药代动力学参数

8条Beagle犬ig 75 mg 盐酸文拉法辛缓释片后的主要药代动力学参数见表1。

表1 2种盐酸文拉法辛缓释片在Beagle犬体内的主要药代动力学参数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of Venlafaxine in eight Beagle dogs after ig administration of Venlafaxine sustained-release tablets ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

药动学参数	单位	受试制剂	参比制剂
$t_{\max}$	h	10.38±1.69	10.50±2.07
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	522.89±201.12	515.22±159.29
$t_{1/2}$	h	7.16±2.34	6.95±1.57
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	8 398.64±3 332.86	8 050.71±2 103.15
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	8 701.60±3 303.29	8 450.01±2 273.45

2.12 生物等效性分析

受试制剂盐酸文拉法辛缓释片 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90.4%~112.7%、91.2%~110.2% 和 89.4%~110.4%，均在80%~125%范围内，表明两制剂具有相同的释放和吸收效果。受试制剂和参比制剂的 $t_{\max}$ 经非参数检验(配对Wilcoxon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。总之，在Beagle犬体内两种制剂间具有生物等效性。

3 讨论

样品预处理方法的选择：考察了文献中所报道

的血浆样品处理方法，选用10%高氯酸沉淀蛋白法，提取回收率很低；试用乙醚作为萃取剂，回收率有所提高，但杂质较多，干扰监测；最终选用石油醚-乙醚(60:40)的混合溶液做为萃取剂，峰形好，内源性物质干扰少，提取回收率也能达到要求。

本实验建立了准确可靠的血浆中盐酸文拉法辛药物浓度检测的LC-MS/MS方法。通过8条健康Beagle犬单剂量双交叉ig给药，以盐酸文拉法辛缓释片(VENLAFAXINE®)为参比制剂，对受试制剂进行了生物等效性评价；其相对生物利用度(F)为(101.0±13.1)%，F为受试制剂与参比制剂 $AUC_{0-\infty}$ 的比值。经统计分析，两种制剂生物等效，为临床药物质量研究提供重要参考。

参考文献

- [1] Wright C W, Aikman M S, Werts E, et al. Bioequivalence of single and multiple doses of venlafaxine extended-release tablets and capsules in the fasted and fed states: four open-label, randomized crossover trials in healthy volunteers [J]. Clin Ther, 2009, 31(11): 2722-2734.
- [2] 王永军, 任 珊, 王俊峰, 等. 盐酸文拉法辛缓释片的制备及其家犬体内药代动力学初步研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(21): 1991-1994, 2000.
- [3] 余 勤, 梁茂植, 向 瑾, 等. 盐酸文拉法辛缓释片人体药代动力学和生物等效性研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(20): 1716-1720.
- [4] 姜云平, 于波涛, 张 勤, 等. 盐酸文拉法辛胶囊的人体生物等效性 [J]. 西南国防医药, 2009, 19(11): 1081-1083.
- [5] 张志华, 何周康, 周彦彬, 等. 高效液相色谱-荧光法测定人血浆中文拉法辛及相对生物利用度 [J]. 中南药学, 2008, 6(4): 406-408.
- [6] 余 勤, 邹 静, 梁茂植, 等. RP-HPLC法同时测定Beagle犬血浆中曲马多、文拉法辛和罗通定浓度 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(4): 532-536.
- [7] 陆 川, 贾晶莹, 张梦琪, 等. 液相色谱串联质谱法测定人血浆中文拉法辛及其代谢物的浓度 [J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 8(30): 634-638.
- [8] 陈银霞, 杜江波, 张逸凡, 等. 中国男性健康志愿者口服去甲文拉法辛缓释片对映体选择性药代动力学研究 [J]. 药理学学报, 2015, 50(4): 486-491.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.