

苯磺酸氨氯地平片人体生物等效性研究

马 涛¹, 张志涛¹, 王清清¹, 董海军², 蒋志文¹

[摘要] 目的:评价苯磺酸氨氯地平片的人体生物等效性。方法:20名男性健康志愿者随机交叉口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂各10mg,采用液相-串联质谱法(LC-MS/MS)测定血药浓度。以DAS2.0软件计算其药动学参数,考察其生物等效性。结果:苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂的 T_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-144} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别为(5.60±3.09)h和(6.30±2.85)h、(8.19±2.2)μg/L和(8.22±1.99)μg/L、(366±100)μg·L⁻¹·h⁻¹和(385.8±80)μg·L⁻¹·h⁻¹、(397±115)μg·L⁻¹·h⁻¹和(421±83)μg·L⁻¹·h⁻¹。以 AUC_{0-144} 计算,苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂比较的人体相对生物利用度为(96.1±26.6)%。结论:试验制剂苯磺酸氨氯地平片和参比制剂苯磺酸氨氯地平片具有生物等效性。

[关键词] 药理学,临床;苯磺酸氨氯地平;液相-串联质谱法;生物等效性

[中国图书资料分类法分类号] R 969 **[文献标识码]** A

Bioequivalent of amlodipine besylate tablets in healthy volunteers

MA Tao¹, ZHANG Zhi-tao¹, WANG Qing-qing¹, DONG Hai-jun², JIANG Zhi-wen¹

(1. Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Hefei Heyuan Parma Sci & Tec Co Ltd, Hefei Anhui 230088, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the bioequivalence of amlodipine besylate tablets in healthy volunteers. **Methods:** A single oral dose of 10 mg test or reference formulations were given to 20 male healthy volunteers in a randomized crossover design. The serum concentration of amlodipine was determined by LC-MS/MS method. Pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated with DAS 2.0 program to evaluate the bioequivalence of the two formulations. **Results:** Pharmacokinetic parameters of amlodipine besylate test formulation were obtained as follows: T_{max} was (5.60±3.09) h, C_{max} was (8.19±2.2) μg/L, AUC_{0-144} was (366±100) μg·L⁻¹·h⁻¹, $AUC_{0-\infty}$ was (397±115) μg·L⁻¹·h⁻¹. For reference formulation: T_{max} was (6.30±2.85) h, C_{max} was (8.22±1.99) μg/L, AUC_{0-144} was (385.8±80) μg·L⁻¹·h⁻¹, $AUC_{0-\infty}$ was (421±83) μg·L⁻¹·h⁻¹. Calculated with AUC_{0-144} , the bioavailability of two formulation was (96.1±26.6)%. **Conclusions:** The amlodipine besylate tablets test formulation and reference formulation were bioequivalent.

[Key words] pharmacology, clinical; amlodipine besylate; LC-MS/MS; bioequivalent

氨氯地平(amlodipine)是第三代二氢吡啶类钙离子拮抗剂,能阻滞心肌和血管平滑肌细胞钙离子内流,具有舒张血管平滑肌,扩张外周小动脉,降低外周阻力及扩张冠状动脉的作用,主要用于治疗高血压和心绞痛,且该药具有服药剂量低、不良反应轻微、药效维持时间长等特点,目前已成为临床一线用药。本试验采用液相-串联质谱法(LC-MS/MS)测定人血清中的苯磺酸氨氯地平浓度,监测苯磺酸氨氯地平药动学参数,并对其人体生物等效性进行评价,以期临床合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 试验制剂:苯磺酸氨氯地平片,

每片5mg,批号070101,琪宝(番禺南沙)制药有限公司研制;参比制剂:苯磺酸氨氯地平片,每片5mg,批号65805025,辉瑞制药有限公司生产;苯磺酸氨氯地平对照品,批号100374-200301,中国药品生物制品检定所;内标:盐酸尼卡地平对照品,批号100586-200401,中国药品生物制品检定所;甲醇由MERCK公司生产,色谱纯;甲酸由宜兴市化学试剂三厂生产,分析纯;乙酸乙酯由广东汕头市西陇化工厂生产,分析纯;超纯水。

1.2 仪器 美国 Thermo 公司 Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX 型 LC-MS/MS 联用仪(包括:ESI 离子源, Surveyor LC pump, Surveyor Autosample, Xcalibur 1.4 数据处理系统); TGL-16H 高速离心机, HEMA 公司; DZG-303A 纯水机, 台湾艾柯仪器厂生产。

1.3 研究对象 20名男性健康志愿者均为在校学生,体重(65.0±5.8)kg,年龄(22.1±1.1)岁,均无药物过敏史,无肝、肾疾病史,精神状态良好,全面体格检查均正常(其中包括肺部听诊、肝脾触诊、心

[收稿日期] 2007-12-06

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 药物分析教研室, 安徽 蚌埠 233030;

2. 合肥合源医药科技有限公司, 安徽 合肥, 230088

[作者简介] 马 涛(1974-),男,硕士,讲师。

[通讯作者] 蒋志文,博士,研究生导师,教授,研究方向:分子生化药理和药物动力学。

电图、心率、血压、肾功能、肝功能、血常规及尿常规等)。受试者在被告知所有与药物有关可能的不良反应后,自愿签署知情同意书。受试者在受试前两周内未服用任何药物,从开始进入试验后直至试验结束,不吸烟,不喝酒,饮用温开水,不饮用其他任何饮料。

1.4 试验设计 20 名受试者根据体重系数随机分成两组,每组 10 名,服药前禁食 10 h 以上,于此日早晨 7:30 分别空腹服用苯磺酸氨氯地平片试验制剂或参比制剂 10 mg,用 200 ml 温开水送服。分别在给药前及给药后 1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96、120、144 h 从受试者肘静脉采血 3 ml。血样经离心后取血清,置 -20 °C 冰箱中保存待测。受试者服药 2 h 后方可适量饮水,4 h 后统一进标准餐。受试者于服药后在观察室中停留 12 h。在临床医师的监护下,观察受试者不良反应发生情况以及一般情况。受试者在服药后避免剧烈活动,亦不得长时间卧床。2 周后两组交叉给药,方法同前。

1.5 血药浓度测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱: SHIMADZU VP-ODS 柱, 2.1 mm × 150 mm, 4.6 μm; 流动相: 甲醇: 0.1% 甲酸水溶液 = (64: 36, v/v); 流速 0.2 ml/min; 柱温为 35 °C。

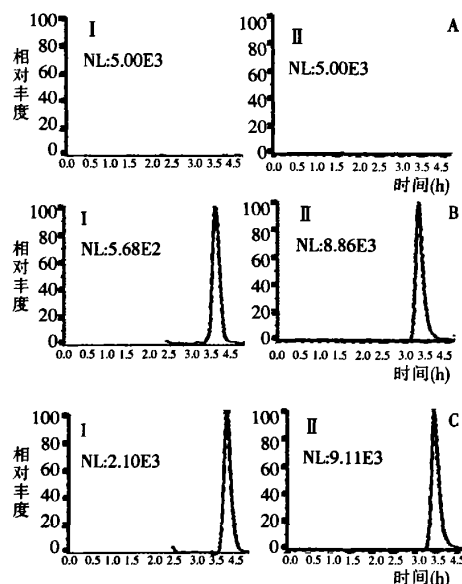
1.5.2 质谱条件 离子源为 ESI 源; 电喷雾电压 4.9 kV; 加热毛细管温度 340 °C; 正离子方式检测, 扫描方式为选择反应监测 (SRM), 用于定量的离子反应为氨氯地平母离子 m/z 409 → 子离子 m/z 238, 碰撞能 16 V 和内标尼卡地平母离子 m/z 480 → 子离子 m/z 315, 碰撞能 32 V; 扫描时间为 0.5 s。

1.5.3 血清样品处理 精确吸取 0.1 ml 血清加入 2 ml 空白 eppendorf 管中, 精密加入 20 ng/ml 尼卡地平内标溶液 10 μl, 涡旋 30 s 混匀, 再加入 1 ml 乙酸乙酯, 涡旋 3 min, 6 500 r/min 离心 5 min, 取有机层, 氮气吹干, 100 μl 流动相复溶, 6 500 r/min 离心 10 min, 10 μl 进样 LC-MS/MS 测定。

1.6 统计学方法 血药浓度经 DAS 2.0 软件处理, 求算药动学参数及相对生物利用度。T_{max}、C_{max} 为实测值, AUC 用梯形法计算。试验制剂与参比制剂的 C_{max}、AUC₀₋₁₄₄、AUC_{0-∞} 经对数转换后采用交叉试验设计的方差分析, 分析药剂间、个体间和周期间变异的统计学意义。C_{max}、AUC₀₋₁₄₄、AUC_{0-∞} 经对数转换后进行双单侧 *t* 检验, 试验制剂 AUC 在参比制剂的 80% ~ 125% 作为等效标准, C_{max} 在参比制剂的 70% ~ 143% 作为等效标准, 对 T_{max} 采用非参数法检验进行考察, 以此来评价试验制剂与参比制剂是否生物等效。

2 结果

2.1 方法的专属性 将空白血清、空白血清加氨氯地平对照品和内标对照品溶液及服药后血清样品按“血清样品处理”项下处理后, 用 LC-MS/MS 测定, 所得谱图见图 1。氨氯地平的保留时间为 3.6 min, 内标尼卡地平的保留时间为 3.3 min, 空白血清中内源性物质不干扰氨氯地平及内标的测定。



A: 空白血清; B: 空白血清加入氨氯地平 and 内标尼卡地平; C: 11 号受试者口服 10 mg 氨氯地平片 72 h 后的样品; 峰 I: 氨氯地平; 峰 II: 内标尼卡地平

图 1 血清中氨氯地平及内标尼卡地平的典型 SRM 色谱图

2.2 标准曲线 分别精密吸取不同浓度的氨氯地平对照品溶液 10 μl 于离心管中, 氮气吹干后加入 100 μl 空白血清配成, 加空白血清配成相当于氨氯地平血清浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 13.0 μg/L 的样品, 按“血清样品处理”项下依法操作, 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标用加权 ($W = 1/x$) 最小二乘法进行线性回归, 求得直线回归方程即为标准曲线。典型的回归方程 $\hat{Y} = 0.136 + 5.404X$, $r = 0.998$ ($n = 7$), 结果表明氨氯地平在 0.2 ~ 13.0 μg/L 范围内线性良好。

2.3 精密度 取空白血清, 按照“标准曲线”项下方法配制氨氯地平低、中、高三个浓度 (0.5、2.0 和 10.0 μg/L) 的样品, 每一浓度进行 5 样本分析, 连续测定 3 天, 计算日内、日间精密度。血清样品低、中、高三个浓度日内、日间相对标准差 (RSD) 低、中、高浓度均小于 15%。

2.4 提取回收率 取空白血清,按照“标准曲线”项下方法配制氨氯地平低、中、高三个浓度(0.5、2.0和10.0 μg/L)的样品,每一浓度进行3样本分析,得到氨氯地平药物峰面积 $A_s(H)$;另取100 μl 的空白血浆,加入1 ml 的乙酸乙酯,涡旋3 min,14 000 r/min 离心5 min,取有机层,再精密加入低、中、高三个浓度(5、20和100 μg/L)的氨氯地平标准溶液各10 μl 和20 ng/ml 尼卡地平内标溶液10 μl,氮气吹干,100 μl 流动相复溶,10 μl 进样分析,每一浓度进行3样本分析,得到氨氯地平药物峰面积,取其平均值 $A_s(D)$,按提取回收率(%) = $A_s(H)/A_s(D) \times 100\%$ 计算,其平均提取回收率为76.1% ~ 83.3%。

2.5 稳定性实验 按标准曲线配制方法配制浓度为高、中、低三个浓度(0.5、2.0和10.0 μg/L)各5份样本,分别立即处理(0 h)、12 h 室温放置、24 h 反复冻溶及7天冷冻等不同条件下考查样品的稳定性。结果放置不同时间段 $RSD < 15\%$,表明血清样品在室温放置和冷冻储存等情况下稳定。

2.6 血药浓度-时间曲线 20名健康志愿受试者交叉口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂后血药浓度-时间曲线见图2。

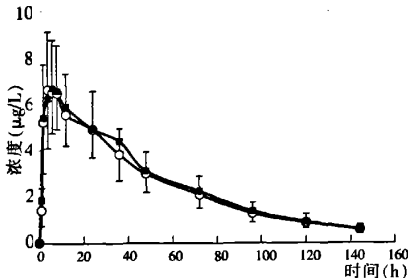


图2 20名健康受试者交叉口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂10 mg后的平均血药浓度时间曲线

2.7 主要药动学参数 经DAS 2.0软件计算的受试者口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂10 mg后的主要药动学参数见表1。

表1 健康受试者口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂的主要药动学参数比较 ($n_i = 20, \bar{x} \pm s$)

药动学参数	C_{max} (μg/L)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-144} (μg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$AUC_{0-\infty}$ (μg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
试验制剂	8.19 ± 2.20	5.60 ± 3.09	37.3 ± 6.7	365.5 ± 101	397.0 ± 115
参比制剂	8.22 ± 1.99	6.30 ± 2.85	39.7 ± 12.7	385.8 ± 80.8	421.2 ± 82.9

2.8 生物利用度和生物等效性评价 20名完成试验的男性健康受试者口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂健康人体血药浓度经时过程,经药代动力学参数计算,试验制剂苯磺酸氨氯地平片试验

制剂和参比制剂之间 $\ln(AUC_{0-144})$ 、 $\ln(AUC_{0-\infty})$ 、 $\ln(C_{max})$ 的经方差分析表明两制剂药剂间差异均无统计意义 ($F = 1.495$ 、 $F = 1.981$ 、 $F = 0.034$, $P > 0.05$, $MS_{组内} = 0.054$ 、 $MS_{组内} = 0.071$ 、 $MS_{组内} = 0.002$);经双向单侧 t 检验, $\ln(AUC_{0-144})$ 、 $\ln(AUC_{0-\infty})$ 的 $[1 - 2\alpha]$ 置信区间在80% ~ 125%, $\ln(C_{max})$ 的 $[1 - 2\alpha]$ 置信区间在70% ~ 143%,表明两种制剂在吸收程度和达峰浓度上具有生物等效性。 T_{max} 经非参数法检验差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明2种制剂在达峰时间上具有生物等效性。以参比制剂苯磺酸氨氯地平片为标准对照,试验制剂苯磺酸氨氯地平片的相对生物利用度为 $(96.1 \pm 26.6)\%$ ($n = 20$,以 AUC_{0-144} 计)

3 讨论

文献报道生物样品中氨氯地平浓度测定采用的方法,主要有HPLC-UV法^[1]、GC-ECD法^[2]、LC-MS法^[3,4]、ELISA法^[5]等。针对氨氯地平临床服用剂量少、血药浓度低的特点,本试验采用了LC-MS/MS法测定人血清中氨氯地平含量,方法采用ESI源,以尼卡地平为内标,利用乙酸乙酯提取,专属性考察表明血清中内源性物质不干扰氨氯地平和内标的测定,在0.2 ~ 13.0 μg/L浓度范围内线性良好,最低检测浓度为0.2 μg/L,精密度、回收率及稳定性考察均符合要求,检测方法稳定可靠,可应用于氨氯地平的药动学和生物等效性研究。

20名男性健康受试者双周期交叉口服苯磺酸氨氯地平片试验制剂和参比制剂各10 mg,经计算得到主要药动学参数与文献^[3,4]报道基本一致。 $\ln(AUC_{0-144})$ 、 $\ln(AUC_{0-\infty})$ 在药剂间、周期间差异均无统计意义,而在个体间差异有统计意义。临床上,氨氯地平治疗高血压一般需长期服用,在临床用药中应注意个体化用药,如有必要可进行治疗药物监测。

【参考文献】

- [1] 陈赛贞,徐珊珊,陈斌,等.健康志愿者口服氨氯地平片的药代动力学和生物等效性研究[J].中国药业,2005,14(9):25-27.
- [2] Vincent J, Harris SI, Foulds G, et al. Lack of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine[J]. Br J Clin Pharmacol, 2000, 50(5):455-463.
- [3] 梁超,程晓华,张红,等. LC-MS法评价两种苯磺酸氨氯地平片的人体生物等效性[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(3):299-301.
- [4] 张孝清,陆宏国,徐玉凤,等. 苯磺酸氨氯地平片相对生物利用度研究[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(10):849-851.
- [5] Matalka K, El-Thaher T, Saleem M, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for determination of amlodipine in plasma[J]. J Clin Lab Anal, 2001, 15(1):47-53.