

高效毛细管电泳法研究盐酸班布特罗国产胶囊与进口片剂的人体生物等效性

史爱欣*, 李可欣, 孙春华, 曹国颖

(卫生部北京医院 临床药理基地 100730)

摘要: 目的 研究国产盐酸班布特罗胶囊和进口片剂的人体生物等效性。方法 采用高效毛细管电泳法测定血浆中班布特罗及其代谢物特布他林的浓度。结果 单次口服国产班布特罗胶囊和进口班布特罗片剂后班布特罗的药代动力学参数: AUC_{0-t} 分别为 (71 ± 18) 和 $(72 \pm 13) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 实测 C_{max} 分别为 (8.1 ± 1.8) 和 $(9.2 \pm 2.3) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 实测 T_{max} 分别为 (3.6 ± 1.3) 和 $(3.7 \pm 1.0) \text{h}$ 。特布他林药代动力学参数: AUC_{0-t} 分别为 (129 ± 33) 和 $(130 \pm 34) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 实测 C_{max} 分别为 (7.8 ± 2.3) 和 $(8.5 \pm 2.9) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 实测 T_{max} 分别为 (5.4 ± 0.8) 和 $(5.6 \pm 1.1) \text{h}$ 。国产班布特罗胶囊单次给药后的相对生物利用度为 $(100 \pm 16) \%$ (班布特罗), $(101 \pm 13) \%$ (特布他林)。结论 经统计学证明两制剂具有生物等效性。

关键词: 高效毛细管电泳; 班布特罗; 特布他林; 生物等效性

中图分类号: R945.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)12 - 0942 - 04

Study on bioequivalence of domestic bambuterol capsules and imported tablets by high performance capillary zone electrophoresis

SHI Ai-xin*, LI Ke-xin, SUN Chun-hua, CAO Guo-ying

(Department of clinical pharmacology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: **Aim** To study bioequivalences of bambuterol and its metabolites terbutaline in 20 healthy male volunteers. **Methods** A single oral dose of domestic bambuterol capsule or imported bambuterol tablet was given according to a randomized 2-way cross-over design. The plasma bambuterol and terbutaline concentrations were determined by high performance capillary zone electrophoresis (HPCZE). **Results** The pharmacokinetic parameters of the capsule and tablet of bambuterol: AUC_{0-t} were (72 ± 18) and $(72 \pm 13) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{max} were (8.1 ± 1.8) and $(9.2 \pm 2.3) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} were (3.6 ± 1.3) and $(3.7 \pm 1.0) \text{h}$, respectively; terbutaline: AUC_{0-t} were (129 ± 32) and $(130 \pm 34) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{max} were (7.8 ± 2.2) and $(8.5 \pm 2.9) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} were (5.4 ± 0.8) and $(5.6 \pm 1.1) \text{h}$, respectively. The bioavailability of the capsule was $(100 \pm 16) \%$ (bambuterol) and $(101 \pm 13) \%$ (terbutaline). **Conclusion** The results demonstrated that the two preparations of bambuterol and terbutaline were bioequivalent by analysis of variance, with two one sided test at 90% confidential level.

Key words: high performance capillary zone electrophoresis; bambuterol; terbutaline; bioequivalence

盐酸班布特罗 (bambuterol hydrochloride) 是肾上腺素 β_2 受体激动剂特布他林 (terbutaline) 的双氨基甲酸酯前体药物, 本身无活性, 口服后在体内被血浆丁基胆碱酯酶水解成特布他林而产生疗效, 其亲脂

性比特布他林强, 抗水解作用也较强, 且可避免胃肠及肝的首过效应。盐酸班布特罗在肺组织中缓慢水解产生平稳持续血药浓度的特布他林, 主要激活 β_2 受体, 对支气管平滑肌产生松弛作用, 适用于支气管哮喘、慢性支气管炎、肺气肿及其他支气管痉挛的肺部疾病。1 天 1 次给药后, 能产生稳定、持久的特布他林血药浓度 24 h 以上^[1]。

本文采用高效毛细管电泳法 (HPCE) 同时测定

收稿日期: 2003-01-13

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 65132266 - 2253,

Fax: 86 - 10 - 65283696 - 5, E-mail: aixins@sohu.com

健康受试者服药后血浆中班布特罗和特布他林的浓度,进行盐酸班布特罗国产胶囊和进口片剂的生物等效性研究,为其临床应用提供参考。

材料和方法

仪器及试剂 被试制剂:盐酸班布特罗胶囊,10 mg/粒,含量为102.3%,批号990120,湖南长沙维神医药科技开发有限公司。参比制剂:盐酸班布特罗片(帮备),10 mg/片,含量为99.5%,批号AH267,瑞典阿斯特拉制药有限公司。班布特罗对照品由湖南长沙维神医药科技开发有限公司提供,含量为99.8%。特布他林对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号0273-9701,含量为99.9%)。内标物普奈洛尔由英国ZENECA制药有限公司提供(批号HH781C)。甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,磷酸二氢钠、磷酸为分析纯。

美国Beckman公司P/ACE system 5000高效毛细管电泳系统及紫外检测器,P/ACE工作站,Beckman公司未涂渍的熔融石英毛细管(67 cm×75 μm ID,有效分离长度50 cm),BAKEN 2管真空固相萃取装置,Bond-Elut SPE小柱(C₁₈ 100 mg,1 mL)。

电泳条件 运行缓冲液:80 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠缓冲液(用磷酸调至pH 3.15),使用前用0.45 μm滤膜过滤并用超声波脱气。毛细管活化用1 mol·L⁻¹盐酸、0.1 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶液、重蒸馏水运行缓冲液各冲洗5 min。两次分析之间用0.1 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶液、重蒸馏水和缓冲液各冲洗1 min。进样条件:检测波长200 nm,进样电压10 kV,运行电压25 kV,进样时间10 s(低浓度30 s),温度20 ℃,进样前在毛细管内注入1个短的稀缓冲液塞(气压进样5 s),电泳时间15 min。

对照品溶液的配制 精密称取班布特罗对照品20 mg,置100 mL量瓶中,用蒸馏水溶解成200 mg·L⁻¹,取1 mL于100 mL量瓶中用蒸馏水稀释使成2 mg·L⁻¹贮备溶液。精密称取特布他林对照品约50 mg,置100 mL量瓶中,用蒸馏水溶解成500 mg·L⁻¹,取1 mL于100 mL量瓶中用蒸馏水稀释,使成5 mg·L⁻¹贮备溶液。

受试者选择以及试验设计 20名健康受试者均为男性,年龄20~25岁,身高164~189 cm,体重63~79 kg。受试者在试验前进行体格检查均正常,受试者试验前两周及试验期间未服用过其他任何药物,试验前均签署知情同意书,试验方案事先经北京医院伦理委员会通过。

采用随机自身交叉试验设计,20名受试者根据体重、身高分层分为10组,每组2人,随机给予被试制剂或参比制剂,禁食12 h后清晨空腹口服试验药品,其中10名口服被试制剂,10名口服参比制剂,剂量均为20 mg,用温开水250 mL吞服。受试者在服药抽血期间禁烟、酒,采血后2 h给予低脂肪饮食。血样自给药后0.5,1,1.5,2,3,4,5,6,8,10,12,24,36,48和72 h,取上肢静脉血3 mL,将血标本置于肝素化且已加入1 mmol·L⁻¹毒扁豆碱溶液10 μL的试管中,离心(3 000 r·min⁻¹,5 min),分离出血浆,-40 ℃避光保存至测定。20名受试者在服药2周后自身交叉给药重复实验。整个实验在医生、护士监护下进行。

血样的预处理 血浆样品1 mL加10 mg·L⁻¹普萘洛尔溶液10 μL混匀,固相萃取小柱(C₁₈ 100 mg,1 mL)分别用甲醇2 mL、蒸馏水1 mL活化后,上样,抽滤,分别用蒸馏水1 mL,5%甲醇1 mL淋洗,淋洗液弃去,再用甲醇1 mL洗脱,收集洗脱液,直接进样。

数据处理 用中国药理学学会数学专业委员会编制的3P97(生物利用度计算程序)处理血样数据,计算各药代动力学参数,并用3P97程序对梯形法计算的AUC_{0-t}及实测的C_{max},T_{max}进行统计分析来考察其生物等效性。

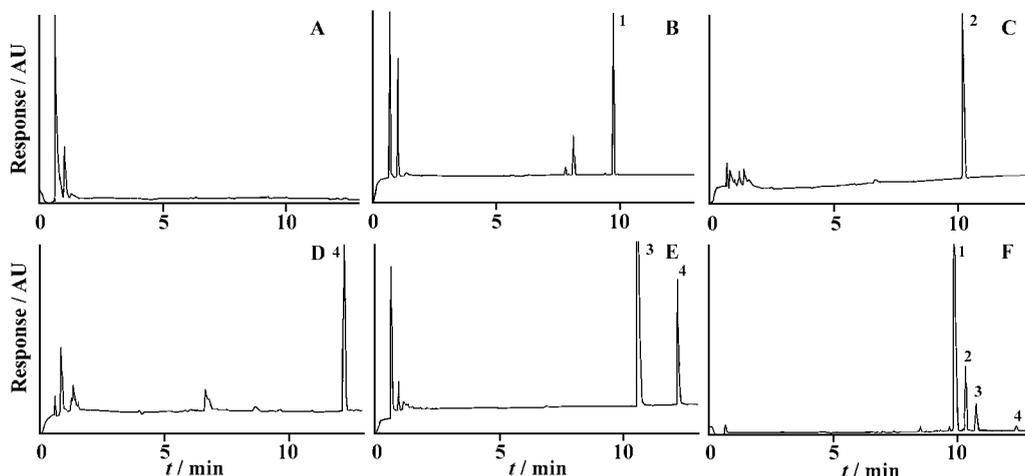
结果

1 毛细管电泳

由图1可见,血浆中普萘洛尔、特布他林、班布特罗的保留时间分别为10.4,10.8和12.4 min,各峰分离良好,且血浆组分无干扰。

2 线性关系考察

将班布特罗对照品贮备液及特布他林对照品贮备液各80 μL加入试管中,加空白血浆至10 mL,使班布特罗浓度为16 μg·L⁻¹,特布他林浓度为40 μg·L⁻¹。用空白血浆依次稀释使班布特罗质量浓度为8,4,2,1,0.5,0.25和0.125 μg·L⁻¹;特布他林为20,10,5,2.5,1.25,0.625和0.312 5 μg·L⁻¹。按“血样预处理”项操作,由班布特罗、特布他林峰面积与内标峰面积的比值A对浓度C(μg·L⁻¹)进行线性回归,得班布特罗及特布他林回归方程(n=5)分别为:A=5.29×10⁻⁴+2.87×10⁻³C,r=0.997 6;A=2.69×10⁻³+5.90×10⁻³C,r=0.999 7。线性范围分别为:16~0.125及40~0.312 5 μg·L⁻¹,最低定量限分别为0.1及0.3 μg·L⁻¹。



A: Blank plasma; B: Blank plasma with physostigmine; C: Blank plasma with propranolol (internal standard); D: Blank plasma with bambuterol; E: Blank plasma with bambuterol and terbutaline; F: Plasma sample of a volunteer after oral administration of 10 mg bambuterol with physostigmine and propranolol (internal standard); 1: Physostigmine (9.9 min); 2: Propranolol (10.3 min); 3: Terbutaline (10.8 min); 4: Bambuterol (12.4 min)

Figure 1 Capillary electropherogram of bambuterol and terbutaline

3 回收率及精密度的测定

将班布特罗对照品贮备液 80 μL 加入干净试管中,加入空白血浆至 10 mL 使成 $16 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的血浆样品,用空白血浆稀释成 2 和 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度样品,将特布他林对照品贮备液 20 μL 加入干净试管中,加入空白血浆至 10 mL 使成 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的血浆样品,用空白血浆稀释成 2.5 和 $0.625 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,按

血样处理方法处理后进样,各浓度日内重复测定 5 次,并连续测定 5 日,计算方法回收率及日内、日间的精密度;另用蒸馏水配制相应浓度班布特罗、特布他林溶液,直接进样,以此为标准,将两组峰面积进行比较计算班布特罗、特布他林的萃取回收率,结果见表 1。

Table 1 Precision and recoveries of bambuterol and terbutaline from human plasma ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Drug	Concentration $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Extraction Recovery/ %	Method Recovery/ %	RSD/ %	
				Within-day	Between-day
Bambuterol	16	95.0 ± 2.6	102 ± 7	7.5	8.7
	2	95 ± 3	105 ± 5	5.1	10.3
	0.25	96.5 ± 1.3	106 ± 11	10.3	11.2
Terbutaline	10	95.4 ± 2.6	97 ± 6	6.6	7.4
	2.5	96.3 ± 2.6	106 ± 3	3.1	5.0
	0.625	95.4 ± 2.4	98 ± 6	5.8	7.4

4 血样测定结果

20 名健康受试者单次 *po* 盐酸班布特罗胶囊 (20 mg) 与进口片剂后,班布特罗和特布他林的血药

浓度数据结果表明(图 2),其血药浓度均值-时间曲线的变化趋势基本一致。

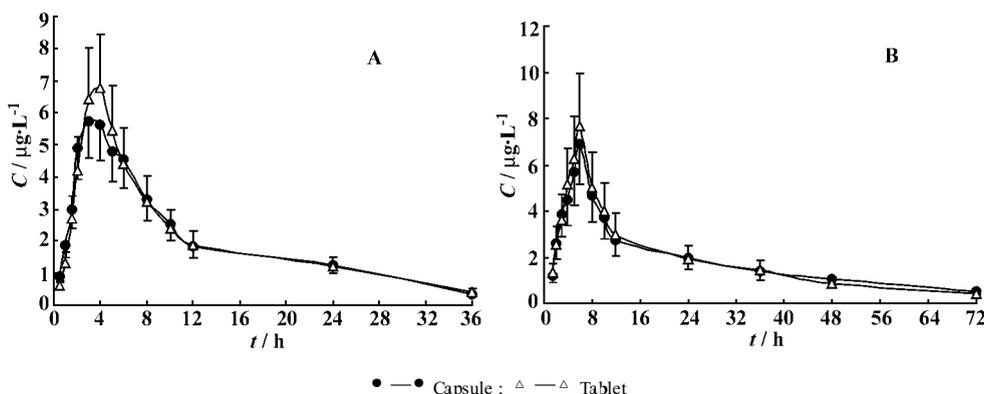


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of bambuterol (A) and terbutaline (B) after a single oral dose of 20 mg bambuterol in 20 volunteers

6 药代动力学研究

20 名健康受试者单次 po 20 mg 胶囊与片剂后, 班布特罗和特布他林的药代动力学参数见表 2。

Table 2 Pharmacokinetics parameters of bambuterol and terbutaline in healthy volunteers after oral administration of 20 mg domestic capsule and imported tablets ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

Parameter	Capsule		Tablet	
	Bambuterol	Terbutaline	Bambuterol	Terbutaline
$AUC_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	71 \pm 18	129 \pm 32	72 \pm 13	130 \pm 34
$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	77 \pm 19	146 \pm 35	78 \pm 16	144 \pm 37
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	8.1 \pm 1.8	7.8 \pm 2.2	9.2 \pm 2.3	8.5 \pm 2.9
T_{\max}/h	3.6 \pm 1.3	5.4 \pm 0.8	3.7 \pm 1.0	5.6 \pm 1.1
MRT_{0-t}/h	11.3 \pm 0.9	24 \pm 3	11.1 \pm 2.0	22.2 \pm 2.7
$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	14.1 \pm 1.8	33 \pm 7	14 \pm 3	30 \pm 5
$T_{1/2K_e}/\text{h}$	9.8 \pm 2.1	22 \pm 4	10.1 \pm 1.8	21 \pm 4
$F/\%$	100 \pm 16	101 \pm 13		

7 生物利用度研究

用 3P97 程序对被试制剂与参比制剂进行生物等效性分析, 被试制剂的相对生物利用度为 100% \pm 16% (班布特罗), 101% \pm 13% (特布他林), 两制剂的班布特罗和特布他林统计分析结果见表 3。可见, 班布特罗和特布他林的 AUC_{0-t} , C_{\max} , T_{\max} 在制剂间、周期间均无显著性差异, 双单侧检验结果表明两制剂具有生物等效性。

Table 3 Results of statistical analysis ($t_{1-\alpha} = 1.734$)

Parameter	Bambuterol			Terbutaline		
	t_1	t_2	90% Confidential interval	t_1	t_2	90% Confidential interval
$\ln AUC_{0-t}$	6.194	7.232	92.8 - 104.1	8.050	8.257	95.1 - 104.6
$\ln C_{\max}$	1.842	5.782	80.5 - 98.6	1.755	3.468	80.1 - 107.8
$\ln T_{\max}$	2.793	3.892	85.9 - 108.2	3.355	4.069	88.2 - 108.6

讨论

文献^[2]报道用二次堆积进样以及 SLM(固定化液膜) 预处理技术测定班布特罗的浓度, 但未见同时测定两种成分的报道。本试验建立了 HPCE 法同时测定血浆中班布特罗和特布他林的浓度, 两种成分

分离良好, 无杂质峰干扰。试验采用固相萃取方法进行样品提取, 方法简便, 试剂耗量少, 污染少, 回收率高, 同时通过电迁移场放大进样进行在柱预浓缩, 提高了检测的灵敏度。

配制不同浓度的 pH 3.15 的磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钠溶液, 用磷酸调至 pH 3.15), 分别测定, 电流随离子强度的增加而增加, 由于高电流将产生高焦耳热, 低离子强度会导致样品吸附, 但由于柱上富集需用高浓度的缓冲液, 故选择 80 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液作为运行缓冲液。据文献^[3]报道, 加入毒扁豆碱后, 可抑制血浆中胆碱酯酶的活性, 以保持班布特罗与特布他林的稳定不变, 并且在预试验中, 受试者血浆中加入毒扁豆碱, 保存 1 周, 测定血浆中班布特罗与特布他林的浓度没有显著变化。

第 1 次试验过程中, 服药 2 h 后, 有 3 名受试者出现轻度手颤, 1 名出现心悸, 1 名出现眩晕, 症状均较轻微, 其中国产胶囊 3 例, 进口片剂 2 例。第二次试验过程中, 服药 2 h 后, 有 2 名受试者出现轻度心悸, 国产胶囊和进口片剂各 1 例, 经观察 4 h 后症状均缓解, 未影响试验进行。

试验结果表明: 被试制剂与参比制剂在人体内的吸收、分布、代谢性质颇为相似, 其数据与文献^[3]报道较为一致, 国产盐酸班布特罗胶囊与进口片剂在人体内具有生物等效性。

References:

- [1] Zheng YX. The pharmacology specialty and clinical applications of bambuterol [J]. *World Pharm* (国外药理学合成药、生化药、制剂分册), 1999, 20(3): 170 - 173.
- [2] Palmardottir S, Mathiasson L, Jonsson JA, et al. Determination of a basic drug, bambuterol, in human plasma by capillary electrophoresis using double stacking for large volume injection and supported liquid membranes for sample pretreatment [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 688: 127 - 134.
- [3] Claes L, Sven J, Jan P. Determination of bambuterol, a prodrug of terbutaline, in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1990, 19: 218 - 224.