

家犬单剂量和多剂量口服阿昔莫司缓释制剂的 药代动力学和生物等效性研究

杨星钢¹, 聂淑芳¹, 白海娇¹, 张国华², 潘卫三^{1*}

(沈阳药科大学 1. 药学院; 2. 成人教育学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 研究阿昔莫司缓释片在家犬体内单剂量和多剂量的药代动力学和生物等效性。方法 测定 6 只家犬单剂量和多剂量口服缓释片和普通胶囊后的血药浓度。结果 阿昔莫司的药-时曲线符合非隔室模型。单剂量给药后, 缓释片和普通胶囊的 AUC 分别为 (158 ± 30) 和 $(147 \pm 37) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; T_{max} 分别为 (4.3 ± 0.8) 和 (2.6 ± 1.3) h; C_{max} 分别为 (29 ± 6) 和 $(42 \pm 10) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{1/2}$ 分别为 (2.3 ± 0.7) 和 (1.60 ± 0.10) h; MRT 分别为 (6.0 ± 0.8) 和 (3.9 ± 0.7) h; F_r 为 $(108 \pm 16)\%$ 。多剂量给药后, 缓释片和普通胶囊的 AUC 分别为 (209 ± 23) 和 $(195 \pm 26) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; T_{max} 分别为 (6.3 ± 0.8) 和 (3.4 ± 1.5) h; C_{max} 分别为 (27 ± 4) 和 $(36 \pm 5) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{min} 分别为 (2.2 ± 1.0) 和 $(0.20 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{av} 分别为 (8.7 ± 1.0) 和 $(8.1 \pm 1.1) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; FI 分别为 $(293 \pm 73)\%$ 和 $(448 \pm 91)\%$; F_r 为 $(114 \pm 19)\%$ 。结论 单剂量实验的双单侧检验结果表明: 缓释片和普通胶囊生物等效; 缓释片具有良好的缓释效果。多剂量实验结果表明: 缓释片和普通胶囊生物等效; 缓释片的波动系数优于普通胶囊。

关键词: 高效液相色谱法; 阿昔莫司; 缓释片; 单剂量和多剂量; 药代动力学; 生物等效性

中图分类号: R917.101

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2005)05 - 0457 - 05

The pharmacokinetics and bioequivalence of acipimox sustained-release tablets after a single and multiple oral administration in healthy dogs

YANG Xing-gang¹, NIE Shu-fang¹, BAI Hai-jiao¹, ZHANG Guo-hua², PAN Wei-san^{1*}

(1. School of Pharmacy, 2. Adult Education Institute, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Aim** To study the pharmacokinetics and bioequivalence of acipimox sustained-release tablets (SRT) after a single and multiple oral dose in healthy dogs. **Methods** The plasma concentrations of SRT and reference capsules with a single and multiple oral doses. **Results** The drug concentration-time profiles fitted to a noncompartment model. After a single dose administration of sustained-release tablets and capsules, the pharmacokinetic parameters were as follows: AUC were (158 ± 30) and $(147 \pm 37) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; T_{max} were (4.3 ± 0.8) and (2.6 ± 1.3) h; C_{max} were (29 ± 6) and $(42 \pm 10) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{1/2}$ were (2.3 ± 0.7) and (1.60 ± 0.10) h; MRT were (6.0 ± 0.8) and (3.9 ± 0.7) h, respectively. The relative bioavailability of the sustained-release tablet was $(108 \pm 16)\%$. After a multiple oral administration of sustained-release tablets and capsules, the pharmacokinetic parameters were as follows: AUC were (209 ± 23) and $(195 \pm 26) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; T_{max} were (6.3 ± 0.8) and (3.4 ± 1.5) h; C_{max} were (27 ± 4) and $(36 \pm 5) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{min} were (2.2 ± 1.0) and $(0.20 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; C_{av} were (8.7 ± 1.0) and $(8.1 \pm 1.1) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; FI were $(293 \pm 73)\%$ and $(448 \pm 91)\%$, respectively. The relative bioavailability of the sustained-release tablet was $(114 \pm 19)\%$. **Conclusion** The results of two one-side test from single dose administration shown that two preparations were bioequivalent. The C_{max} of sustained-release tablet was lower than that of capsules, while the T_{max} and MRT

of sustained-release tablet were higher than that of capsule, which indicating a good retarding effect. The results from multiple dose administration also shown that two preparations were bioequivalent and the DF of sustained-release tablet was significant lower than that of capsule.

Key words: HPLC; acipimox; sustained-release tablets; single dose and multiple dose; pharmacokinetics; bioequivalence

阿昔莫司 (acipimox) 是一种新型长效降血脂药,有良好的调脂作用,广泛应用于高脂血症,能有效降低冠心病的危险,是迄今烟酸类制剂中最有前途的调血脂药物^[1,2]。但现在市场上仅有普通胶囊剂,每天需服药 2-3 次,为了减少服药次数,维持较长时间的有效血药浓度,本实验室制备了日服一次的阿昔莫司缓释片。本文新建了血浆中阿昔莫司浓度测定的高效液相色谱法,该方法未见有关文献报道,并对其在家犬体内药代动力学进行了研究;同时还对市售阿昔莫司胶囊和自制缓释片进行了生物等效性研究。

材料和方法

药品与试剂 参比制剂:阿昔莫司胶囊, 250 mg 粒,批号 020703,鲁南制药股份有限公司。受试制剂:自制阿昔莫司缓释片, 250 mg/片;甲醇,二氯甲烷,异丙醇为色谱纯,水为重蒸水,四丁基氢氧化铵溶液,磷酸为分析纯。

缓释片的制备 按处方称取过 80 目筛的阿昔莫司与辅料,充分混合,乙醇溶液为粘合剂制软材, 20 目筛制粒, 60 °C 烘干 2 h, 18 目筛整粒,加 0.5% 硬脂酸镁混匀,压片。

仪器 JASCO-PU980 型高效液相色谱仪 (日本分光公司), JASCO-UV975 型检测器 (日本分光公司), KQ-100DB 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

色谱条件 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱;流动相:甲醇-四丁基氢氧化铵溶液 (20:80),用磷酸调至 pH 6.0;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:264 nm;柱温:室温。

对照溶液的配制 精密称取阿昔莫司对照品 100 mg,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解、定容,配制成 1 mg·mL⁻¹ 的母液,分别将此溶液用流动相稀释成质量浓度为 2, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 400, 800 μg·mL⁻¹ 的对照溶液。

内标溶液的配制 精密称取沙纳唑 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解、定容,配制成 100 μg·mL⁻¹ 的溶液。

单剂量给药实验设计^[3] 6 条健康成年家犬,随机分成 2 组,实验前一天禁食 12 h,给药 4 h 后统一进食。自身对照 1 次,随机交叉口服自制阿昔莫司缓释片或市售普通胶囊各 500 mg。实验前,先对家犬进行手术,在其前肢小隐静脉处安置一个滞留针,给药前取空白血,将自制阿昔莫司缓释片或市售普通胶囊各 500 mg 直接塞入会厌部,使家犬自动吞咽并注入清水 20 mL 送下,胶囊组分别于 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 h 共 13 个时间点取前肢静脉血 3-4 mL,缓释片组分别于 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 36 h 共 15 个时间点取前肢静脉血 3-4 mL,并立即移入涂有肝素的试管中,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆,于 -20 °C 冰箱保存,待分析。一周后两组自身交叉给药。

多剂量给药实验设计^[4,5] 另 6 条健康成年家犬,实验前一天禁食 12 h,给药 4 h 后统一进食,其余时间按平常习惯进食,实验期间不进食油腻食物。自身对照,随机交叉口服自制阿昔莫司缓释片或市售普通胶囊,连续给药 7 d,给药前取空白血。口服胶囊家犬每日早晚 8:00 各给胶囊 250 mg, d 4 - d 6 于早晨 8:00 服药前取静脉血 3-4 mL, d 7 给药后于 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 24, 28, 36 h 共 22 个时间点取前肢静脉血 3-4 mL,口服缓释片家犬每日早 8:00 给缓释片 500 mg, d 4 - d 6 于早晨 8:00 服药前取静脉血 3-4 mL, d 7 给药后于分别于 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 36 h 共 18 个时间点取前肢静脉血 3-4 mL,并立即移入涂有肝素的试管中,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆,于 -20 °C 冰箱保存,待分析。一周后两组自身交叉给药。

血浆样品处理方法 取血浆样品 0.5 mL,加入 100 μg·mL⁻¹ 内标 (沙纳唑) 40 μL 和磷酸 0.25 mL,振摇,加入混合试剂 (二氯甲烷-异丙醇 90:10) 5 mL,用涡旋混合器混合 1 min,混匀后置于高速离心机中,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。精密吸取有机相 4 mL,在 60 °C 水浴中用氮气挥干,残留物加 200 μL 流动相超声溶解,移入 1 mL 尖底离心试管置于

高速离心机中,10 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液直接进样,进样量 20 μL。

数据处理 应用 Microsoft Excel编程处理血样数据,计算各药代动力学参数并考察其生物等效性。

结果

1 色谱系统的适用性实验

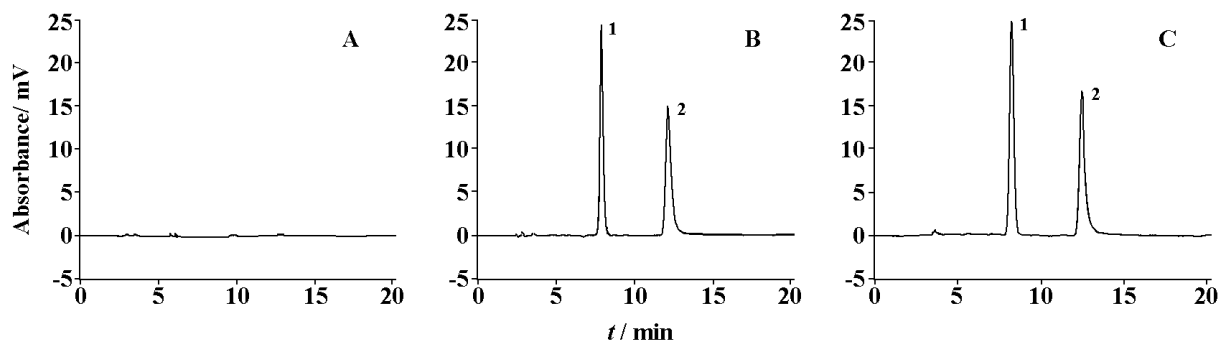
由图 1 可见,血浆中阿昔莫司和内标沙纳唑保留时间分别为 12.50 和 8.25 min,各峰分离良好,且血浆组分无干扰。

2 标准曲线的绘制

精密量取空白狗血浆 0.5 mL 分别置于 10 mL 的具塞离心管中,精密加入 2, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 400, 800 μg·mL⁻¹ 的梯度浓度贮备液 20 μL,内标贮备液 40 μL,按血浆样品处理方法项下操作,取上清液 20 μL 进样,以浓度 C 对相应的峰面积比(阿昔莫司的峰面积/内标峰面积, S_y/S_n)进行线性回归,得标准曲线方程 (n=5) 为: C = 11.026 × S_y/S_n + 0.004, r = 0.999 8,线性范围为 0.2 - 80 μg·mL⁻¹,最低定量限为 2 ng。

3 回收率及精密度的测定

精密量取空白犬血浆 0.5 mL,分别置于 10 mL 的具塞离心管中,精密加入 2, 40 和 800 μg·mL⁻¹ 的贮备液 20 μL,内标贮备液 40 μL,配制成高、中、低 3 个浓度的血浆样品,浓度分别为 0.2, 4 和 80 μg·mL⁻¹,按血样处理方法项下操作,取上清液进样,记录色谱图和峰面积。另取一批离心管,不加空白血浆,其余操作同上平行进行,取上清液进样,分别计算方法回收率和提取回收率。各浓度日内重复测定 5 次并连续测定 5 d,分别计算日内、日间精密度。结果见表 1。



A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with acipimox standard solution; C: Plasma sample obtained from a dog given acipimox sustained-release tablets (SRT). Peaks 1: Internal standard (sanazole); Peaks 2: Acipimox

Figure 1 HPLC chromatograms of acipimox in different plasma samples

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

| Concentration /μg·mL ⁻¹ | Recovery /% | | RSD /% | |
|------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|
| | Extraction | Method | Within-day | Between-day |
| 0.2 | 70 ± 6 | 98.8 ± 1.2 | 8.4 | 7.9 |
| 4 | 74 ± 4 | 99.4 ± 1.9 | 2.6 | 3.2 |
| 80 | 76.0 ± 1.8 | 99.3 ± 1.5 | 1.5 | 1.7 |

4 单剂量给药药代动力学和生物等效性

4.1 血浆样品测定结果 6 条家犬单次口服阿昔莫司胶囊和缓释片后各时间点测得药时曲线见图 2。

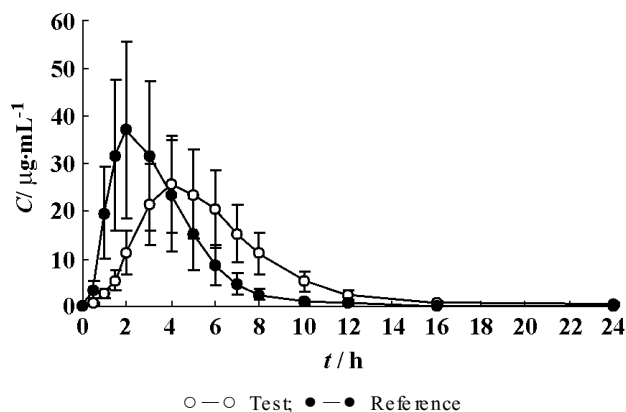


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of acipimox after a single dose of two preparations (n=6)

4.2 药代动力学研究 6 条家犬单次口服阿昔莫司胶囊和缓释片后,应用 Microsoft Excel编程处理血样数据,计算各药代动力学参数。通过计算,单隔室和双隔室一级吸收模型都不能很好的描述体内药物动力学的行为,所以决定采用非隔室模型对体内数据进行分析。主要药代动力学参数见表 2。

4.3 生物利用度研究 以非隔室模型统计结果中的 AUC_{0-∞} 求算相对生物利用度 F_r, 受试制剂的相

Table 2 Pharmacokinetic parameters of acipimox after a single oral dose of two preparations (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

| Parameter | SRT | Capsule |
|--|-------------|-------------|
| $T_{1/2} (K_e) / h$ | 2.3 ± 0.7 | 1.6 ± 0.1 |
| T_{max} / h | 4.3 ± 0.8 | 2.6 ± 1.3 |
| K_e / h^{-1} | 0.33 ± 0.10 | 0.43 ± 0.03 |
| K_a / h^{-1} | 0.5 ± 0.3 | 0.8 ± 0.4 |
| $C_{max} / \mu g \cdot mL^{-1}$ | 29 ± 6 | 42 ± 10 |
| $AUC_{0-24} / \mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$ | 158 ± 30 | 147 ± 37 |
| $AUC_{0-\infty} / \mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$ | 160 ± 31 | 148 ± 38 |
| MRT/h | 6.0 ± 0.8 | 3.9 ± 0.7 |
| MAT/h | 2.8 ± 1.5 | 1.5 ± 0.7 |

对生物利用度为 108% ± 16%。应用双单侧检验法验证缓释片的生物等效性,应用 (1 - 2 α) 置信区间法求出缓释片的 90% 置信区间^[6]。

两制剂的统计分析结果见表 3。自制缓释片的 C_{max} 有 90% 可信限落在市售普通胶囊 C_{max} 的 52.0% - 88.2% 区间内;自制缓释片的 T_{max} 有 90% 可信限落在市售普通胶囊 T_{max} 的 106.3% - 305.3% 区间内,表明自制缓释片与市售胶囊相比 C_{max} 降低, T_{max} 延长,具有良好的缓释效果。对缓释片的 $AUC_{0-\infty}$ 进行统计分析,其中 $t_1 > t_{(1-0.05)}(4)$, $t_2 > t_{(1-0.05)}(4)$ 同时成立,自制缓释片的 $AUC_{0-\infty}$ 有 90% 可信限落在市售普通胶囊 $AUC_{0-\infty}$ 的 91.2% - 121.8% 区间内,表明自制缓释片与市售普通胶囊具有生物等效性。

Table 3 Two one-sided test and (1 - 2 α) confidence interval analysis result of the main parameters after a single oral dose of two preparations (n = 6) $t_{(1-0.05)}(4) = 2.132$

| Parameter | t_1 | t_2 | 90% Confidence interval |
|----------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| $\ln AUC_{0-\infty}$ | 4.538 0 | 2.748 9 | 92.0 - 121.8 |
| $\ln C_{max}$ | - 1.457 0 | 5.441 9 | 52.0 - 88.2 |
| T_{max} | 1.609 4 | - 1.556 3 | 106.3 - 305.3 |

5 多剂量给药药代动力学和生物等效性

5.1 血样测定结果 6 条家犬多次口服阿昔莫司胶囊和缓释片,给药方案如前所述,分别于 d 4 - 6 早晨 8:00 服药前取静脉血 3 - 4 mL,按照血浆样品方法处理后得出血药浓度数据,结果见表 4。

从表 4 中可以看出,胶囊在 d 4 - 6 的最低血药浓度为零,而缓释片达到其稳态血药浓度,表明可开始进行多剂量给药药代动力学研究。两种制剂 d 7 给药后各时间点测得药时曲线见图 3。

Table 4 Mean plasma concentration of acipimox after 4 - 6 days repeated administration of two preparations (n = 6)

| Concentration / $\mu g \cdot mL^{-1}$ | 4 th day | 5 th day | 6 th day |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Capsule | 0 | 0 | 0 |
| SRT | 2.4 ± 1.3 | 2.4 ± 1.3 | 2.4 ± 1.3 |

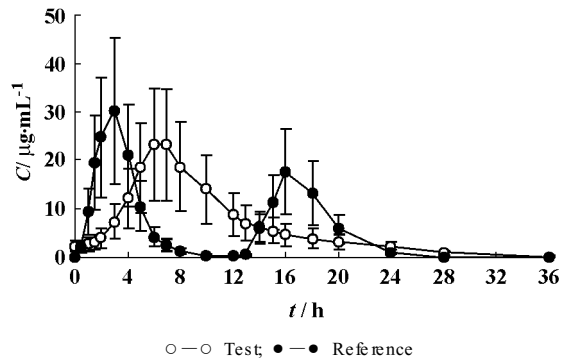


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of acipimox after 7 days repeated administration of two preparations (n = 6)

5.2 药代动力学研究^[6] 6 条家犬多次口服阿昔莫司胶囊和缓释片后,使用非隔室模型依赖方法分别处理上述血药浓度测定数据,求算药代动力学参数。 AUC_{0-t} 采用梯形法计算; C_{max} 用普通胶囊和缓释片的实测 C_{max} ; 普通胶囊 C_{min} 用 d 7 零时间的 C_{min} 与 12 h (d 7 晚上服药前)的 C_{min} 的平均值;缓释片的 C_{min} 用 d 7 零时间的 C_{min} 与 24 h (d 8 早晨)的 C_{min} 的平均值。 C_{av} (平均稳态血药浓度)公式如下: $C_{av} = AUC_{0-24} / T$; FI% (波动系数)公式如下: $FI\% = (C_{max} - C_{min}) / C_{av} \times 100\%$; 主要药代动力学参数见表 5。可见缓释片的 $T_{max} >$ 普通胶囊的 T_{max} ; 缓释片的 $C_{max} <$ 普通胶囊的 C_{max} ; 缓释片的 $FI <$ 普通胶囊的 FI , 证明阿昔莫司缓释片具有良好的缓释效果。

Table 5 Pharmacokinetic parameters of acipimox after repeated administration of two preparations (n = 6)

| Parameter | SRT | Capsule |
|--|-----------|-------------|
| T_{max} / h | 6.3 ± 0.8 | 3.4 ± 1.5 |
| $C_{max} / \mu g \cdot mL^{-1}$ | 27 ± 4 | 36 ± 5 |
| $C_{min} / \mu g \cdot mL^{-1}$ | 2.2 ± 1.0 | 0.20 ± 0.20 |
| $C_{av} / \mu g \cdot mL^{-1}$ | 8.7 ± 1.0 | 8.1 ± 1.1 |
| $AUC_{0-24} / \mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$ | 209 ± 23 | 195 ± 26 |
| $AUC_{0-\infty} / \mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$ | 225 ± 29 | 197 ± 27 |
| FI% | 293 ± 73 | 448 ± 91 |

5.3 生物利用度研究 以非隔室模型统计结果中

的 $AUC_{0-\infty}$ 求算相对生物利用度 F_r , 缓释制剂的相对生物利用度为 $114\% \pm 19\%$, 表明两制剂具有生物等效性。

讨论

关于阿昔莫司的文献报道比较少, 没有可供参考的色谱条件。作者经过摸索发现阿昔莫司对于 pH 变化比较敏感, 经试验后发现用四丁基氢氧化铵溶液和磷酸调至 pH 6.0 所得到的流动相系统, 峰形良好, 与血浆中杂质分离度符合要求, 可以满足阿昔莫司的测定需要, 所以最终选择该系统作为阿昔莫司的色谱条件。

在确定药物的隔室模型时, 单室和双室模型都不能很好的拟和。非隔室模型估算药物动力学参数, 通常是建立在药-时曲线下面积的基础上的, 且不需预先设定药物属于任何隔室模型。利用该方法可以估算出药物的生物利用度、半衰期、消除速度常数和吸收速度常数等药物动力学参数。基于上述原因, 所以本文采用非隔室模型处理药物的体内数据。

根据文献 [7] 报道, 阿昔莫司的最小有效血药浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 缓释片的 C_{min} 大于最小有效血药浓度; 阿昔莫司的最大给药剂量为 $1200 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 相当于本文剂量的 2.4 倍, 并且缓释片的 C_{max} 小于普通胶囊的 C_{max} , 所以本文中缓释片的 C_{max} 与 C_{min} 均在有效治疗窗内。

多剂量给药时缓释片与普通胶囊的 T_{max} 均大于单剂量给药, 这是因为单剂量是在禁食状态下进行实验, 而多剂量是在正常进食状态下进行实验, 这将影响药物的达峰时间; 多剂量给药时缓释片的 C_{max} 与单剂量给药无显著性差异, 多剂量给药时普通胶囊的 C_{max} 大于单剂量给药, 这是因为缓释片单剂量与多剂量的给药方案相同, 而普通胶囊的给药方案不同所致; 多剂量给药时的相对生物利用度与单剂量给药无显著性差异。

按照中国药典的有关规定, 缓控释制剂需要进行单剂量实验和多剂量稳态实验, 达稳态后进行血药浓度波动性研究, 从而得出一些缓控释制剂的药代动力学参数, 如 C_{av} , FI 等。另外求算生物利用度时, 用多剂量稳态时的 AUC 比单剂量的 AUC 更有价值 [6]。基于上述原因, 很有必要进行缓控释制剂的多剂量给药药物动力学研究。

References

- [1] Seed M, O' Connor B, Perombelon N, *et al.* The effect of nicotinic acid and acipimox on lipoprotein (a) concentration and turnover [J]. *Atherosclerosis*, 1993, **101**(1): 61 - 68.
- [2] Locci-Cubeddu T, Bergamini E. Effects of antilipolytic agents on peroxisomal β -oxidation of fatty acids in rat liver [J]. *Biochem Pharm*, 1983, **32**(11): 1807 - 1809.
- [3] Efthymiopoulos C, Benedetti S, Fumagalli R, *et al.* Bioavailability of a sustained release formulation of acipimox, following a single dose in healthy volunteers in fasting and fed conditions [J]. *J Pharm Sci*, 1998, **87**(8): 1067 - 1072.
- [4] Li Juan, Wang GJ, Wang HG, *et al.* Studies on pharmacokinetics of sustained-release and conventional tablets of Naproxen after multiple dose in healthy human volunteers [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1999, **8**(11): 744 - 746.
- [5] Zhou TY, Sun HD, Zhang DW, *et al.* Determination of total coenzyme Q10 in plasma following dose oral administration of 50mg coenzyme Q10 sustained release tablets and regular tablets in healthy volunteers [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, **37**(3): 189 - 192.
- [6] Wei SL. *Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* (生物药剂学与药物动力学) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Chinese Union Medical College Publishing House, 1997. 185 - 199.
- [7] Fuccella LM, Lovisoio P, Mandelli V. Inhibition of lipolysis by nicotinic acid and by acipimox [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, **28**(6): 790 - 795.