

国产异福片、胶囊人体生物利用度研究

宋兴发¹, 谈恒山², 李军生³, 卓海通² (1. 连云港市第一人民医院药剂科, 江苏 连云港 222002; 2. 南京军区南京总医院临床药理科, 江苏 南京 210002; 3. 临沂市第一人民医院药剂科, 临沂 276003)

摘要:目的 研究国产异福片(T_1)、胶囊(T_2)与进口片(R)在健康人体内的生物利用度和药动学比较。方法 21名受试者采用随机数字分组自身交叉对照给药方案。单剂量口服卫非宁片(R :含利福平(RFP)600 mg,异烟肼(INH)400 mg)和国产试验药(均含利福平、异烟肼各600 mg及300 mg),用HPLC分别测定利福平和异烟肼血药浓度变化。用3P97计算机程序求药动学参数。结果 参比药卫非宁片与 T_1 和 T_2 三种制剂中的利福平(RFP)的主要药动学参数为 $t_{1/2}$ 分别为(3.01±0.86)(R), (3.02±0.82)(T_1)和(2.81±0.63)(T_2); C_{max} 分别为(12.44±4.79),(11.77±4.39),(13.32±4.91)μg/mL; T_{max} 为(1.71±0.62),(1.79±0.82)和(1.83±0.76)h; AUC_{0-t} 为(79.26±25.89)(R),(77.71±23.32)(T_1)和(78.01±26.76)μg·h·mL⁻¹(T_2); T_1 和 T_2 的相对生物利用度为(99.48±15.05)%(T_1)和(99.16±14.12)%(T_2)。异烟肼的主要药动学参数为 $t_{1/2}$:(2.24±0.96),(2.32±0.95)和(2.32±1.04)h; C_{max} :(8.04±3.65),(6.15±1.52)和(6.12±2.19)μg/mL; T_{max} :(0.90±0.48),(0.79±0.54),(0.71±0.30)h; AUC_{0-t} :(35.27±18.28),(27.98±14.50)和(25.08±12.99)μg·h·mL⁻¹,相对生物利用度为(107.05±11.09)%和(95.20±13.42)%。结论 AUC, C_{max} 经双单侧t检验,三种制剂中的RFP和INH显示为生物等效制剂。

关键词:利福平;异烟肼;生物利用度;高效液相色谱法

中图分类号:R978.3;R945.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)03-0206-04

Study on Relative Bioavailability of Compound Rifampicin in Healthy Volunteers

SONG Xing-fa¹, TAN Heng-shan², LI Jun-sheng³, ZHUO Hai-tong² (1. Department of Pharmacy, First Hospital of Lianyungang 222002, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of Armed Forces of Nanjing, Nanjing. 210002, China; 3. Department of Pharmacy, First Hospital of Linyi 276003, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study pharmacokinetics and bioavailability of compound rifampicin tablets and capsules in health volunteers.

METHOD The pharmacokinetics and bioavailability of domestic and imported compound rifampicin tablets and capsules were studied in 21 healthy volunteers. A single oral dose of imported drug containing rifampicin (RFP) 600 mg and isoniazid (INH) 400 mg, and domestic drug containing RFP 600 mg and INH 300 mg were given to 21 volunteers in a randomized crossover study. Concentrations of RFP and INH in plasma were determined by HPLC method. The plasma concentration-time curves of two formulations were all fitted to one-compartment model. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3p97 program in the computer.

RESULTS The pharmacokinetic parameters of RFP for R , T_1 and T_2 were: $t_{1/2}$: (3.01±0.86)(R), (3.02±0.82)(T_1) and (2.81±0.63)h(T_2); C_{max} : (12.44±4.79)(R), (11.77±4.39)(T_1) and (13.32±4.91)mg/mL(T_2); T_{max} : (1.71±0.62)(R), (1.79±0.82)(T_1) and (1.83±0.76)h(T_2); AUC_{0-t} : (79.26±25.89)(R), (77.71±23.32)(T_1) and (78.01±26.76)μg·h·mL⁻¹(T_2); The relative bioavailability were (99.48±15.05)%(T_1) and (99.16±14.12)%(T_2). The main pharmacokinetic parameters of INH were $t_{1/2}$: (2.24±0.96)(R), (2.32±0.95)(T_1) and (2.32±1.04)h(T_2); C_{max} : (8.04±3.65)(R), (6.15±1.52)(T_1) and (6.12±2.19)mg/mL(T_2); T_{max} : (0.90±0.48)(R), (0.79±0.54)(T_1) and (0.71±0.30)h(T_2); AUC_{0-t} : (35.27±18.28)(R), (27.98±14.50)(T_1) and (25.08±12.99)μg·h·mL⁻¹(T_2), Relative bioavailability were (107.05±11.09)%(T_1) and (95.20±13.42)%(T_2). **CONCLUSION** The results of two one-sided tests statistical analysis showed that two formulations were bioequivalence.

KEY WORDS: rifampicin; isoniazid; Bioavailability; HPLC

利福平^[1](rifampicin, RFP)、异烟肼^[2-3](isoniazid, INH)二联复方制剂,是当前临床治疗结核的重要药物。国外已有同样制剂(卫非宁片)上市进入中国市场。本实验目的是对国产异福片和胶囊制剂与卫非宁片进行人体生物利用度等效性研究。异烟肼极性大,有机溶剂提取回收率 <

50%^[4]且方法繁琐。本实验用肉桂醛衍生化在340nm波长检测^[4],方法简便、灵敏度高,专属性强,回收率>95%。本实验研究了国产异福片的生物利用度及这两种药的药动学特性。

1 材料与与方法

1.1 药品与试剂

药品:参比药品卫非宁片,规格:每片含 RFP150 mg, INH100 mg,批号 990003,有效期至 2003 年 6 月,由意大利米兰 Gruppo Lepetit SPA 药厂生产。

供试品:异福片(T_1),每片含 RFP300 mg, INH150 mg,批号 981012,由南京兰本医药研究所研制。异福胶囊(T_2),每片含 RFP150 mg, INH75 mg,批号 981016。

对照品:利福平 91.5%,异烟肼 99.2%,由厂方提供。

试剂:甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、三氯醋酸、磷酸、桂皮醛均为分析纯。

1.2 仪器及设备

惠普 1100 HPLC 仪及色谱工作站,紫外检测器, Rheodyne7725i 进样伐,20 μ L 定量管, Sartorius R200 十万分之一电子天平。张文贵等人编制的 3P97 程序。

1.3 实验设计

1.3.1 受试者和给药方法 21 名健康人受试者按随机表分为试验组 T_1 和 T_2 和对照组 R 三组,以 3×3 拉丁方排列服药,分别单剂量口服对照药(R:含利福平为 600 mg,异烟肼为 400 mg)和试验药(T_1 , T_2 :均含利福平 600 mg,异烟肼 300 mg)。在试验前 1 wk 及试验期间不服用任何其它药物,采用自身交叉对照试验方法,每次服药间隔为 7d。受试者在试验前禁食 12h 后于次日早晨 8:00 开始,用 200 mL 温开水服药,服药后 4h 统一进标准餐,服药后禁止剧烈运动或卧床休息。

1.3.2 采血时间^[4] 受试者服药后 0.17,0.33,0.75,1,1.5,2,4,6,7,8,9,11,13 h 取静脉血 4 mL,肝素抗凝,立即离心取出血浆,-40 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 RFP 的血药浓度测定

1.4.1 色谱条件 惠普 1100 HPLC 仪,紫外检测器,波长 254 nm,分析柱 Zorbax XDB C₁₈ 150 mm \times 4.6 mm,5 μ m 填料,流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH=6.8)-乙腈(63.5:36.5),流速 1.0 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C。

1.4.2 血浆样品处理 取待测血浆样品 0.1 mL,加入 0.2 mL 甲醇,涡旋振荡后 10 000 r/min 离心 10 min,上清液 20 μ L 直接进样,以峰面积外标法定量。

1.4.3 标准曲线及回收试验和精密度 RFP 标准曲线线性范围以 0.225,0.449,0.899,1.797,3.594,7.188,14.38。17.200 μ g/mL 为取样点,测定峰面积(A)。以浓度 C 为 X 轴,响应值峰面积(A)为 Y 轴作直线回归方程:求浓度 $C = 17.38 A - 5.50$, $r = 0.99985$ 。线性范围为 0.225 ~ 17.20 μ g/mL,用 0.449,3.594,14.380 μ g/mL 三个已知浓度按血样处理后进行回收率,计算日内和日间 RSD。血浆样品最小检测限 0.225 μ g/mL。

1.5 INH 血药浓度测定^[2]

1.5.1 色谱条件 仪器:惠普 1100 HPLC 仪,紫外检测器,波长 340 nm。Rheodyne7725i 进样伐。分析柱 Zorbax BD C₁₈ 150 mm \times 4.6 mm,5 μ m 填料,流动相:冰醋酸水溶液(pH=4.2)-乙腈(64:36),流速 0.9 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C。

1.5.2 血浆样品处理 取待测血浆样品 0.2 mL,加入 20% 三氯醋酸 0.2 mL,混匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.2 mL 加入 1% 肉桂醛甲醇溶液 10 μ L,混匀后在室温放置 15 min,20 μ L 进样。以外标法峰面积定量。

1.5.3 标准曲线及回收试验和精密度 INH 标准曲线以 0.068,0.136,0.272,0.544,1.090,2.180,4.360,8.710,17.420,20.000 μ g/mL 为取样点,测定峰面积(A)。以浓度 C 为 X 轴,响应值峰面积(A)为 Y 轴作直线回归方程:求浓度 $C = 99.45 A + 0.34$, $r = 0.9997$ 。线性范围为 0.068 ~ 20.000 μ g/mL,用 0.136,2.178,17.420 三个浓度,按血样处理后进行测定,求出回收率和日内、日间 RSD。血浆样品最小检测限 0.068 μ g/mL。

1.6 干扰试验 将含有 RFP 和 INH 两种化合物的血标样品,用上述各自的色谱条件血样处理测定,观察两个化合物之间是否有干扰。

1.7 药动学及相对生物利用度研究

将 21 名受试者各时间点 RFP 和 INH 血药浓度分别用 3P97 药动学程序进行拟合求算药动学参数。 T_{max} , C_{max} 用实测值,AUC 用实测血药浓度以梯形法计算。相对生物利用度以下式计算:

$$F(\%) = \frac{AUC_T \times D_R}{AUC_R \times D_T} \times 100$$

对 $\ln AUC$, $\ln C_{max}$ 用 SAS 程序进行方差分析和双单侧 t 检验,对 T_{max} 用非参数法配对秩和检验统计。对 INH 的 AUC 和 C_{max} 分别先对每个受试者,经校正后作方差分析和双单侧 t 检验。

2 结果

2.1 HPLC 测定方法评价

用 HPLC 分别测定 RFP 和 INH 血药浓度,该方法测定结果基本能满足异福片及胶囊的人体生物利用度和药动学研究要求。

2.1.1 RFP,INH 测定方法的回收率结果 根据上述方法测定的 RFP,INH 高、中、低不同浓度其绝对回收率结果见表 1。RFP 和 INH 的回收率 > 95%。

表 1 RFP 和 INH 的回收率结果

Tab 1 Recovery of RFP and INH

药物	浓度 (mg·L ⁻¹)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
RFP	0.449	96.4	96.36
	3.59	93.57	
	14.38	99.12	
INH	0.136	98.35	101.22
	2.178	103.8	
	17.42	101.5	

2.1.2 测定方法的日内、日间 RSD

利福平和异烟肼的日内、日间 RSD < 10%,结果见表 2。

表2 RFP和INH的日内、日间RSD

Tab 2 Within-day and Between-day RSD of RFP and INH (n = 6)

药物	浓度 (mg·L ⁻¹)	日间 RSD %	日内 RSD %
RFP	0.28	5.24	3.14
	2.15	2.04	3.76
	14.38	2.49	2.39
INH	0.136	1.73	5.82
	2.178	5.40	4.24
	17.42	3.54	3.74

2.1.3 RFP和INH最小检测浓度及干扰试验 RFP和INH血样中的最小检测限分别为0.225, 0.068 μg/mL。这两种化合物在各自的色谱条件下均互不干扰, RFP和INH的保留时间分别为6.242, 6.515 min。

2.2 血药浓度结果

21名受试者中RFP和INH的平均血药浓度结果见图1, 2。结果证明三种制剂中两种化合物的平均药时数据结果基本一致, 其药时曲线符合一房室模型。

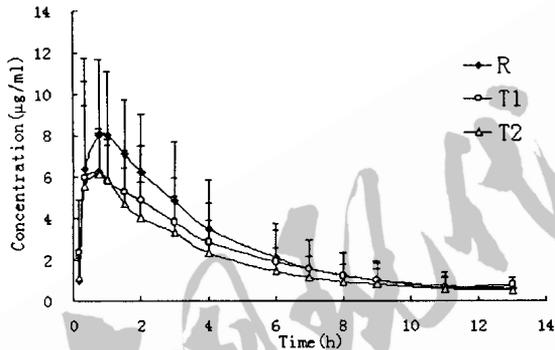


图1 RFP平均血药浓度

Fig 1 Mean plasma concentration-time curve of rifampicin

表3 RFP和INH的药动学参数 (n = 2, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Parameters of pharmacokinetics of RFP and INH (n = 2, $\bar{x} \pm s$)

参数	RFP			INH		
	R	T1	T2	R	T1	T2
$t_{1/2}$ (h)	3.01 ± 0.86	3.02 ± 0.82	2.81 ± 0.63	2.24 ± 0.96	2.32 ± 0.95	2.32 ± 1.04
范围	1.56 ~ 4.69	1.95 ~ 4.64	1.73 ~ 3.77	0.99 ~ 4.66	0.89 ~ 4.14	0.91 ~ 4.72
T_{max} (h)	1.71 ± 0.62	1.79 ± 0.82	1.83 ± 0.76	0.90 ± 0.48	0.79 ± 0.54	0.71 ± 0.30
范围	0.75 ~ 3.0	0.75 ~ 4.0	1.0 ~ 3.0	0.33 ~ 2.0	0.33 ~ 2.0	0.33 ~ 1.5
C_{max} mg·L ⁻¹	12.44 ± 4.79	11.77 ± 4.39	13.32 ± 4.91	8.04 ± 3.65	6.19 ± 1.52	6.12 ± 2.19
范围	5.70 ~ 23.55	6.87 ~ 22.89	5.2 ~ 23.96	5.45 ~ 19.79	4.46 ~ 11.84	3.02 ~ 19.55
Vd/F (L)	36.17 ± 17.68	37.93 ± 18.35	36.28 ± 16.9	40.9 ± 14.9	37.35 ± 10.95	46.27 ± 21.33
范围	16.61 ~ 87.7	20.24 ~ 90.7	17.58 ~ 76.05	21.1 ~ 83.7	21.57 ~ 61.49	20.77 ~ 99.38
AUC_{0-t} (mg·h·L ⁻¹)	79.26 ± 25.89	77.71 ± 23.32	78.01 ± 26.76	35.27 ± 18.28	27.98 ± 14.50	25.08 ± 12.99
范围	24.97 ~ 114.5	21.56 ~ 112.7	30.09 ~ 124.8	12.87 ~ 66.9	12.3 ~ 56.8	8.36 ~ 46.36
F (%)	99.48 ± 15.05	99.16 ± 14.12	107.05 ± 11.09	95.20 ± 13.42		
范围	80.87 ~ 131.6	79.77 ~ 125.9	90.85 ~ 127.4	79.71 ~ 121.6		

3 讨论

血浆中同时存在RFP, INH两种化合物, 并且要分别进行定量测定, 国内文献报道不多。尤其是INH血药浓度比

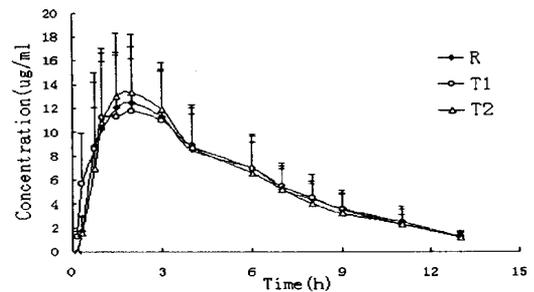


图2 INH的平均血药浓度

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of isoniazid

2.3 药动学参数结果

对国产异福片剂及胶囊剂与卫非宁片三种制剂中的RFP和INH两种化合物口服吸收的药时数据, 结果经3P97计算机程序拟合, 符合一房室模型。三种制剂的主要药动学参数结果见表3, 与文献报道基本一致。AUC和 C_{max} 用SAS程序进行多因素方差分析和双单侧t检验; T_{max} 经非参数法秩和配对检验, P值均大于0.05。结果显示三种制剂生物等效。

2.4 相对生物利用度

国产异福片剂及胶囊剂中的RFP和INH的相对生物利用度结果列于表3。AUC和 C_{max} 结果表明三种制剂中的RFP, INH为生物等效制剂。两种试验药(T_1)和(T_2)的相对生物利用度结果RFP为(99.48 ± 15.05)%(T_1 片剂), (99.16 ± 14.12)%(T_2 胶囊), INH为(107.05 ± 11.09)%(T_1), (95.20 ± 13.24)%(T_2)。其相对生物利用度结果在80% ~ 120%范围内。

较低, 用有机溶剂提取回收率小于50%。本实验将INH用1%肉桂醛衍生化生成INH和肉桂醛衍生物, 并在340nm波长检测, RFP在该波长下无响应, INH既增加了专属性又

提高了灵敏度。用本法还可使回收率大于 95 %。INH 血样用 20 %三氯醋酸沉淀蛋白后上清液放置于 - 20 ℃冰箱中,稳定性可提高到 1 个月。

参考文献

- [1] 吴文芳,多伟,张环,等.利福平胶囊.软胶囊的药代动力学及相对生物利用度[J].天津药学,1994;6:19.
- [2] Seifort HI, Gent WL, Parkin DP, *et al.* High performance Liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazide and hydrazine in biological fluids[J]. J Chromatog Biomed Appli, 1995, 674: 269.

- [3] William A. Spectrophotofluorometric assay for isoniazid and Acetylisoniazid in plasma adapted to pediatric studies[J]. Clin Chem, 1997, 23: 745.
- [4] Peloquin CA, Jaresko GS, Yong CL, *et al.* Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin and pyrazinamide[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 2670.
- [5] Zent C, Smith P. Study of the effect of concomitant food on the bioavailability of rifampin, isoniazid pyrazinamide[J]. Tuber Lung Dis, 1995, 76: 109.

收稿日期:2001-10-09