

双氯芬酸钾胶囊的药代动力学与生物等效性研究

黄仲义¹, 俞志敏², 黄毅慧¹, 仇益群¹, 赵明华¹, 秦岭¹ (1. 上海市静安区中心医院临床药学与临床药理科, 上海 200040; 2. 温州市医药供销公司)

摘要:目的 研究双氯芬酸钾的药代动力学和通过两种双氯芬酸钾胶囊的药代参数的比较得出两种制剂是否具有生物等效性。方法 采用 HPLC-MS 法测定 20 名健康男性志愿者, 随机自身交叉单剂量口服双氯芬酸钾受试胶囊和参比胶囊 50mg 后的血药浓度, 得出两种胶囊剂的药时曲线, 计算各药代参数, 进行生物等效性的比较。结果 20 名健康志愿者单次口服双氯芬酸钾受试胶囊和参比胶囊 50mg 的主要药代动力学参数分别为: $t_{1/2} = 1.33 \pm 1.00\text{h}$ 和 $1.35 \pm 0.70\text{h}$; $C_{\max} = 1.27 \pm 0.40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.38 \pm 0.58\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{\max} = 0.9 \pm 0.7\text{h}$ 和 $1.0 \pm 0.7\text{h}$; $\text{MRT} = 1.97 \pm 0.70\text{h}$ 和 $1.93 \pm 0.78\text{h}$; $\text{AUC}_{0-8\text{h}} = 2.27 \pm 0.66\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2.16 \pm 0.58\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty} = 2.31 \pm 0.68\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2.20 \pm 0.58\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。LnAUC_{0-8h} 和 lnC_{max} 经方差分析和单双侧 t 检验, 均无显著性差异 ($P > 0.05$)。T_{max} 经非参数检验 (Wilcoxon 符号秩法) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 双氯芬酸钾受试胶囊与参比胶囊具有生物等效性, 且双氯芬酸钾受试胶囊相对于参比胶囊的相对生物利用度 (F) 为 $104.9 \pm 12.8\%$ 。

关键词: 双氯芬酸钾; 生物等效性; 药代动力学; HPLC-MS

双氯芬酸钾是一种强效的非甾体抗炎镇痛药, 由于其具有吸收迅速, 起效快的优点在临床得到广泛应用。本文通过 HPLC-MS 的测定方法测定两种双氯芬酸钾胶囊剂在 20 个健康志愿者体内的血药浓度, 得出药时曲线, 并计算药代参数, 对两种制剂作出生物等效性的判断, 为临床合理应用这两种制剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

双氯芬酸钾受试胶囊: 龙泉市辰龙药业有限公司提供, 批号: 020316, 规格: 25mg/粒。

双氯芬酸钾参比胶囊: 陕西白鹿制药股份有限公司市售

产品, 批号: 020709, 规格: 25mg/粒。

双氯芬酸钾标准品: 龙泉市辰龙药业有限公司提供, 批号: 020107, 含量: 99.50%。

内标: 吉非罗齐, 无锡市第七制药厂, 含量 99.70%。

甲醇、乙腈为 HPLC 级; 乙酸铵、乙酸为分析纯; 水为重蒸水。

1.2 仪器

美国 Agilent 公司 HPLC/MSD 高效液相色谱/质谱联用仪, 含在线脱气机、双高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源 (ESI)。

1.3 志愿者

20 名健康男性,平均年龄 21.1 ± 1.00 岁,平均身高 $173.2 \pm 4.48\text{cm}$,平均体重 $64.2 \pm 6.95\text{Kg}$ 。所有志愿者均无药物过敏史,经过临床体格检查,生化检查,血常规、肝肾功能、血压和心电图检查均正常符合试验要求者入选。试验前半个月停服一切药品,受试期间禁烟酒。所有入试志愿者均签署知情同意书。

1.4 给药与取样

采用双交叉设计试验方法进行。20 名健康志愿者随机分成 A、B 两组,禁食 12h 后于次日晨空腹口服 50mg 双氯芬酸钾受试胶囊或参比胶囊,均用 200mL 温水吞服。服药后 3h 内不进食。住院期间均统一用餐。在给药前及给药后 0、17、0.33、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8h,抽取前臂静脉血 3mL,血样置肝素抗凝管内,经离心后分离血清,置 -20°C 保存备用。间隔一周后交叉口服另一制剂,重复上述试验。

1.5 血药浓度分析测定

1.5.1 色谱分析条件

色谱柱: Alltima C_{18} , $150\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ (ID), $5\mu\text{m}$ (Alltech 公司)。柱温: 25°C 。流动相 0.01mol/L 乙酸铵水溶液: 甲醇 = 28 : 72。流速: 1mL/min 。电喷雾离子源参数: 喷雾电压为 4000V ; 干燥气为氮气, 流速 10L/min ; 喷雾压力 45psi ; 温度 350°C ; 裂解器电压: 80V 。离子化方式: 电喷雾离子化, 负离子方式; 选择离子监测 (SIM): m/z 250.0, 249.1。

1.5.2 血样处理与测定

取 10mL 尖底玻璃离心管, 加入待测血样 1mL , 加入内标溶液 (以甲醇配制成浓度为 $10.04\mu\text{g/mL}$) $25\mu\text{L}$ ($0.251\mu\text{g}$), 加 5% 乙酸乙腈 3mL , 涡漩 3min , 3500rpm 离心 10min , 取 $40\mu\text{L}$ 上层清液注入 HPLC/ESI/MS 仪, 记录分析结果。在液相分离条件下, 双氯芬酸钾和内标吉非罗齐的保留时间分别为 3.4min 和 8.6min 。双氯芬酸钾和内标吉非罗齐在电喷雾负离子条件下形成的主要离子分别是 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$, m/z 250.0 和 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 249.1。

1.5.3 标准曲线的制备

取 8 只 10mL 尖底玻璃离心管, 各加入空白血浆 1mL , 定量加入内标溶液 $25\mu\text{L}$ ($10.04\mu\text{g/mL}$), 定量加入双氯芬酸钾标准溶液, 分别配成浓度为 $0.020, 0.051, 0.101, 0.202, 0.506, 1.01, 2.02$ 和 $5.06\mu\text{g/mL}$ 的标准浓度系列; 按血样处理方法分析。以双氯芬酸钾的标准浓度为横坐标, 双氯芬酸钾与内标的峰面积比值 (A_s/A_{is}) 为纵坐标, 按 $1/y^2$ 权重进行线性回归, 绘制标准曲线图。结果表明, 在 $0.020-5.06\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 线性关系良好。回归方程: $y = 3.29x + 0.0424$, 相关系数 $r = 0.9972$ 。见图 1。

1.5.4 精密度实验

1.5.4.1 日内精密度

按标准曲线项下操作, 选取高、中、低三个浓度, 配制含双氯芬酸钾浓度分别为 $0.051, 0.506$ 和 $2.02\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 加入内标溶液 $25\mu\text{L}$ ($10.04\mu\text{g/mL}$), 按血样处理项下操作, HPLC/ESI/MS 分析, 计算双氯芬酸钾和内标的峰面积比值。同一天内, 每个浓度各做 5 份, 计算标准偏差, 得出

日内变异。

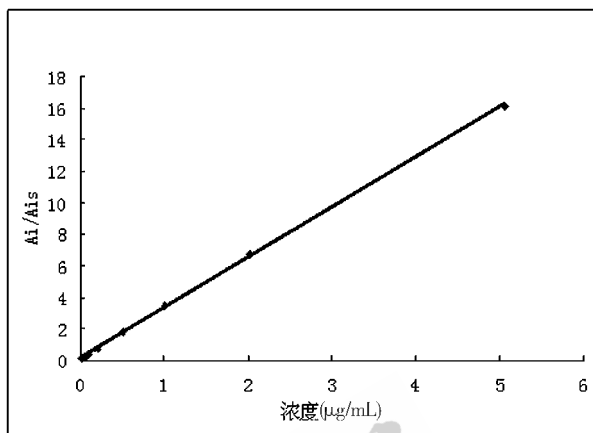


图 1 双氯芬酸钾的标准曲线图

1.5.4.2 日间精密度

按日内精密度项下, 每天将双氯芬酸钾高、中、低三个浓度的血样各做一份, 得到分析结果, 分别做 5 天, 得出日间变异。

表 1 日内和日间精密度

标准浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内 ($n=5$)	RSD (%)	日间 ($n=5$)	RSD (%)
0.051	0.1927 ± 0.003	1.56	0.2000 ± 0.009	4.45
0.506	1.742 ± 0.017	0.96	1.762 ± 0.030	1.72
2.02	6.509 ± 0.136	2.05	6.477 ± 0.176	2.72

1.5.5 回收率

1.5.5.1 绝对回收率

按标准曲线项下操作, 选取高、中、低三个浓度, 配制含双氯芬酸钾浓度分别为 $0.051, 0.506$ 和 $2.02\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 加入内标溶液 $25\mu\text{L}$ ($10.04\mu\text{g/mL}$), 按血样处理项下操作, HPLC/ESI/MS 分析, 计算双氯芬酸钾浓度测得值与真实值的比值, 得出绝对回收率。

1.5.5.2 相对回收率

按标准曲线项下操作, 用水代替血浆, 配制含双氯芬酸钾浓度分别为 $0.051, 0.506$ 和 $2.02\mu\text{g/mL}$ 的水相样品, 加入内标溶液 $25\mu\text{L}$ ($10.04\mu\text{g/mL}$), 按血样处理项下操作, HPLC/ESI/MS 分析, 计算双氯芬酸钾血样浓度与双氯芬酸钾水样浓度的比值, 得出相对回收率。

表 2 双氯芬酸钾的回收率

标准浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	绝对回收率 ($n=5$)	RSD (%)	相对回收率 ($n=5$)	RSD (%)
0.051	89.60 ± 1.79	2.00	97.95 ± 1.36	1.38
0.506	102.10 ± 0.99	0.97	98.79 ± 0.75	0.76
2.02	97.30 ± 2.02	2.08	99.33 ± 0.35	0.36

1.6 数据处理^[1]

采用中国药科大学药代中心编写的 BAPP2.0 软件包, 进行药代动力学参数的计算, $C_{\max}$ 和 $T_{\max}$ 采用实测值, 其余参数按下列公式计算:

$$\text{AUC}_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_{i-1} + C_i)}{2} (T_i - T_{i-1})$$

$$AUC_{0-\infty} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_{i-1} + C_i)}{2} (T_i - T_{i-1}) + \frac{C_n}{\lambda}$$

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} t C dt}{\int_0^{\infty} C dt} = \frac{AUMC}{AUC} \quad \frac{CL}{F} = \frac{D}{AUC_{0-\infty}} \quad T_{1/2} = \frac{0.693}{\lambda}$$

λ 为末端消除相速率常数。

所有参数均采用方差分析和单双侧 t 检验。其中, AUC 和 C_{max} 必须先进行自然对数转换后再进行方差分析和单双侧 t 检验的统计学检验; T_{max} 采用非参数法检验 (Wilcoxon 符号秩检验) 进行统计。AUC、 C_{max} 和 T_{max} 经统计学检验均无显著性差异, 方可判断两制剂具有生物等效性^[2]。

相对生物利用度按下列公式计算:

$$F = \frac{AUC_{0-8}(\text{受试胶囊})}{AUC_{0-8}(\text{参比胶囊})} \times 100\%$$

2 结果

2.1 血药浓度与药时曲线

20 名健康志愿者单次口服 50mg 双氯芬酸钾受试胶囊及参比胶囊后的平均血药经时浓度, 见表 3 和图 2。

表 3 20 名健康志愿者单次口服 50mg 双氯芬酸钾两种制剂的平均血药浓度 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

时间(h)	受试胶囊($\mu\text{g/mL}$)	参比胶囊($\mu\text{g/mL}$)
0.17	0.21 $\pm$ 0.28	0.40 $\pm$ 0.25
0.33	0.90 $\pm$ 0.55	0.97 $\pm$ 0.61
0.5	0.98 $\pm$ 0.44	1.05 $\pm$ 0.61
0.75	0.87 $\pm$ 0.43	0.65 $\pm$ 0.37
1	0.58 $\pm$ 0.38	0.51 $\pm$ 0.27
1.5	0.64 $\pm$ 0.21	0.57 $\pm$ 0.36
2	0.66 $\pm$ 0.42	0.66 $\pm$ 0.47
4	0.11 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.04
6	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
8	0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.02

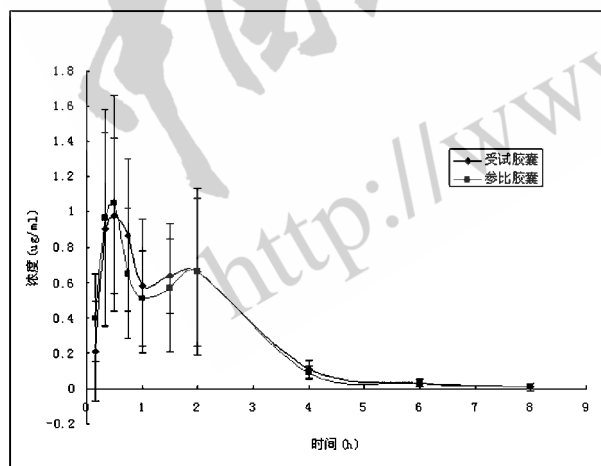


图 2 20 名健康志愿者单次口服 50mg 双氯芬酸钾两种制剂的平均药时曲线图

2.2 20 名健康志愿者单次口服 50mg 双氯芬酸钾受试胶囊及参比胶囊后的药代动力学参数, 见表 4。

表 4 20 名健康志愿者单次口服 50mg 双氯芬酸钾两种制剂的药代动力学参数

参数	受试胶囊	参比胶囊
C_{max}	1.27 $\pm$ 0.40	1.38 $\pm$ 0.58
T_{max}	0.9 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.7
$T_{1/2}$	1.33 $\pm$ 1.00	1.35 $\pm$ 0.70
MRT	1.97 $\pm$ 0.70	1.93 $\pm$ 0.78
AUC_{0-8}	2.27 $\pm$ 0.66	2.16 $\pm$ 0.58
$AUC_{0-\infty}$	2.31 $\pm$ 0.68	2.20 $\pm$ 0.58

2.3 对药代参数 AUC 和 C_{max} 进行自然对数转换后作方差分析和单双侧 t 检验。方差分析表明两种制剂的个体间均有显著性差异, 其余如药品间和周期间均无显著性差异。单双侧检验结果当判断标准为 $\pm 20\%$ 时, 两种制剂的 $\ln AUC_{0-8}$ 、 $\ln C_{max}$ 低侧高侧的 t 值均大于 $t_{0.05}$ 。 T_{max} 经非参数检验, $P > 0.05$, 两制剂无显著性差异。从这三个参数的统计学检验, 我们可以认为这两种制剂具有生物等效性。

2.4 双氯芬酸钾受试胶囊对于参比胶囊的相对生物利用度为 104.9 $\pm$ 12.8%。

3 讨论

从双氯芬酸钾受试胶囊和参比胶囊的平均药时曲线我们可以看到两种制剂均出现了双峰现象, 这与文献报道的情况相似^[3]。

通过上述的药代动力学比较和统计学检验, 我们可以认为这两种国产的双氯芬酸钾胶囊在生物等效性上具有生物等效。

我们在这里采用了双氯芬酸钾的 HPLS/ESI/MS 的检测方法, 这种方法大大地提高了双氯芬酸钾的检测限, 使整个实验能更深入和精确。

参考文献

- [1] 中国药典 2000 版二部附录 XIX《药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则》。
- [2] 黄圣凯, 韩可勤, 等,《生物等效性评价的几种统计方法》。中国临床药理学杂志, 1995, 11(2): 111。
- [3] 吴妍, 黄萍, 韩敏, 等, 双氯芬酸钾胶囊人体药代动力学与相对生物利用度研究。中国药房, 2001, 12(3): 158。

收稿日期: 2003-08-11