

异福酰胺片人体药代动力学及生物利用度研究

顾世芬, 陈汇, 杨德隆, 吴贵宝, 李玲, 曾繁典(华中科技大学同济医学院临床药理研究所, 武汉 430030)

摘要:目的 研究国产抗结核复方制剂异福酰胺片与进口异福酰胺片(Rifater 卫肺特)比较的药代动力学及相对生物利用度。方法 20 名健康志愿者随机交叉单剂量口服两种复方制剂, 采用 RP-HPLC 法, 测定复方制剂中异烟肼、利福平、吡嗪酰胺血浆浓度。3P97 程序计算主要药代动力学参数并对国产制剂作出生物等效评价。结果 异烟肼、利福平、吡嗪酰胺在两种片剂的体内过程基本一致, 测得国产与进口复方制剂中异烟肼 $C_{\max}$ 分别为 (7.67 ± 2.14) 和 $(7.33 \pm 2.07) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{\max}$ 分别为 (0.89 ± 0.60) 和 $(1.18 \pm 0.66) \text{h}$, $T_{1/2}$ 分别为 (3.13 ± 1.07) 和 $(3.39 \pm 0.77) \text{h}$, AUC_{0-12} 分别为 (26.80 ± 10.61) 和 $(25.86 \pm 9.57) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。利福平 $C_{\max}$ 分别为 (8.32 ± 1.85) 和 (7.66 ± 1.68) , $T_{\max}$ 分别为 (2.52 ± 1.47) 和 $(2.65 \pm 1.42) \text{h}$, $T_{1/2}$ 分别为 (4.07 ± 1.09) 和 $(4.92 \pm 1.61) \text{h}$, AUC_{0-24} 分别为 (60.77 ± 17.62) 和 $(59.02 \pm 17.65) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吡嗪酰胺 $C_{\max}$ 分别为 (24.96 ± 4.69) 和 $(23.93 \pm 3.27) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{\max}$ 分别为 (1.35 ± 0.73) 和 $(1.78 \pm 1.12) \text{h}$, $T_{1/2}$ 分别为 (12.20 ± 2.40) 和 $(12.54 \pm 2.28) \text{h}$, AUC_{0-36} 分别为 (334.50 ± 60.21) 和 $(341.63 \pm 58.97) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。国产复方片剂的异烟肼、利福平、吡嗪酰胺与进口复方片剂比较的相对生物利用度分别为 $(104.9 \pm 19.93)\%$ 、 $(105.82 \pm 27.03)\%$ 和 $(99.94 \pm 22.46)\%$ 。结论 国产与进口两种复方片剂具有生物学等效性。

关键词: 异福酰胺片; 药代动力学; 生物利用度; 高效液相色谱法

Pharmacokinetics and relative bioavailability of fixed-dose combination of antituberculous tablets——rifampin tablets in healthy volunteers

GU Shi-fen, CHEN Hui, YANG De-long, WU Gui-bao, LI Ling, ZENG Fan-dian(*Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmacokinetics and bioavailability of domestic fixed-dose combination of antituberculous tablets——rifampin tablets (isoniazid, rifampin plus pyrazinamide), using the imported Rifater tablets as control. **METHOD** Therandomized, cross-over study was conducted in 20 healthy volunteers. After a single dose, the plasma drug levels were determined by RP-HPLC and the pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The plasma concentration-time curves of the sample and the control almost showed no difference. The pharmacokinetic parameters of the sample and the control for isoniazid were as follows: $C_{\max} = (7.67 \pm 2.14)$ and $(7.33 \pm 2.07) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{\max} = (0.89 \pm 0.60)$ and $(1.18 \pm 0.66) \text{h}$, $T_{1/2} = (3.13 \pm 1.07)$ and $(3.39 \pm 0.77) \text{h}$, $\text{AUC}_{0-12} = (26.80 \pm 10.61)$ and $(25.86 \pm 9.57) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, the pharmacokinetic parameters for pyrazinamide were as follows: $C_{\max} = (24.96 \pm 4.69)$ and $(23.93 \pm 3.27) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{\max} = (1.35 \pm 0.73)$ and $(1.78 \pm 1.12) \text{h}$, $T_{1/2} = (12.20 \pm 2.40)$ and $(12.54 \pm 2.28) \text{h}$, $\text{AUC}_{0-36} = (334.50 \pm 60.21)$ and $(341.63 \pm 58.97) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The Relative bioavailability of domestic tablets was (104.9 ± 19.93) for isoniazid, $(105.82 \pm 27.03)\%$ for rifampin and $(99.94 \pm 22.46)\%$ for isoniazid, $(105.82 \pm 27.03)\%$ for rifampin and pyrazinamide. **CONCLUSION** The sample and the control tablets were bioequivalent.

KEY WORDS: rifampin tablets; Pharmacokinetics; Bioavailability; HPLC

异福酰胺片系国产抗结核病化学治疗的三联复方制剂,系由异烟肼 (isoniazid, INH),利福平 (rifampin, RFP)和吡嗪酰胺 (pyrazinamide, PZA)组方,用于结核病短程化疗头2个月的强化期治疗,以控制结核病不再扩散。该三联复方与二联复方(含 INH,RFP)后4个月的巩固期治疗组成2+4短期化疗方案。上述抗结核复方制剂保证短程疗法中联合用药的合理性,延缓抗药菌的产生并提高患者用药的依从性,故为WHO及国际抗痨协会(IUAT)所推崇,亦为我国医药界所公认的标准治疗方案^[1-4]。1988年国际抗痨和肺病联合会建议^[1],在确保复合制剂生物利用度可靠的前提下,应尽可能使用三联或二联的复合剂,以保证抗结核病疗效,避免剂量差错。

本文以健康受试者为研究对象,采用经改良的高效液相色谱法测定抗结核复方制剂中主成分INH,RFP,PZA的血浆药物浓度,以进口同类产品作为参比,对国产抗结核三联复方制剂异福酰胺片进行人体药代动力学及生物利用度比较性研究,并对其生物等效性作出评价。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

国产异福酰胺片,(每片含RFP 120mg、INH 80mg、PZA250mg,批号990628,江西省药物研究所、浙江省海正药业股份有限公司);进口(Rifater 卫肺特,每片含RFP120mg、INH80mg、PZA250mg,进口注册证号X930382,Merion Merrel Dow公司);标准品(INH含量99.02%,RFP含量93.5%,PZA含量99.2%,上海市药检所);甲醇(色谱纯),香草醛(化学纯),庚烷磺酸钠(进口分装),异福酰胺其余试剂均系分析纯。

1.2 受试对象

20名男性健康志愿者,年龄(20.8±0.6)岁,体重(59.9±5.5)kg,身高(170.4±6.2)cm。受试者经全面体检:血、尿常规,肝、肾功能,X线胸透,血压及心电图均正常。受试者均签署知情同意书并报送校医学伦理委员会批准。

1.3 试验设计

采用两制剂双周期交叉试验设计,受试者按随机原则分为两组,分别依T(受试片剂)→R(参比片剂)或R→T顺序进入给药周期。在禁食12h后,于次日晨分别空腹服用受试片剂或参比片剂各5片,用150mL温开水送服。服药4h后进统一食谱饮食。试验期间规定饮水时间和饮水量,禁饮含酒精、咖啡因类饮料,禁烟酒。并禁止剧烈运动。试验前两周至试验期间不用任何其他药物。停药清洗期为1周。试验期间同时观察可能出现的不良反应。

表1 血浆中INH、RFP、PZA测定的日内、日间差异及相对回收率(n=5)

Tab 1 Preccision differences in a day and among days and relative recovery rate of Insoniazid、Rifampin、Pyrazinamide in plasma(n=5)

药物	浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内差异		日间差异		相对回收率 %
		测得浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD%	测得浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD%	
INH	0.8	0.85±0.02	2.56	0.83±0.03	3.77	103.2±3.9
	4.0	3.74±0.20	5.37	3.97±0.24	5.95	99.2±5.9
	12.0	11.70±0.52	4.47	11.93±0.63	5.24	99.4±5.2
RFP	0.6	0.59±0.02	3.54	0.59±0.03	4.28	97.7±4.2

1.4 血样采集

于服药前空白(0h)及服药后0.5,1,2,3,4,5,6,9,12,24,36h肘静脉采血4mL,离心分离血浆,血样于-20℃以下贮存待测。

1.5 血药浓度分析测定

1.5.1 色谱条件

采用RP-HPLC法。INH测定的流动相为0.02mol·L⁻¹磷酸二氢钾:甲醇(62:38 v/v),0.2mL70%高氯酸,0.4mL20%三乙胺,流速1mL·min⁻¹,YWG4.6×200mm 10 μ m C₁₈色谱柱,柱温26℃;YWG6×25mm C₁₈预柱,检测波长340nm。RFP测定的流动相为0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钾:甲醇:0.01mol·L⁻¹庚烷磺酸钠(21:75:4 v/v),流速1mL·min⁻¹,柱温35℃;检测波长340nm。PZA测定的流动相为0.01mol·L⁻¹磷酸二氢钾:甲醇:0.01mol·L⁻¹庚烷磺酸钠(90:6:4 v/v),流速1mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长265nm。

1.5.2 样品处理

INH:取0.25mL血浆,加入0.05mL10%三氯乙酸和0.04mL1.6%香草醛甲醇液,混匀,于50℃反应30min,离心(1500g)10min,取上清液20 μ L进样。

REP和PZA:取0.5mL,加入0.25mL甲醇沉淀蛋白,再加1.5mL1mol·L⁻¹磷酸二氢钾(含1% Vite),混匀,加二氯甲烷、乙醚(1:1 v/v)混合溶剂7mL,振摇20min后,离心取上清液6mL吹干,用甲醇0.2mL复溶,取25 μ L进样。

1.5.3 标准曲线制备

于0.5mL空白血浆中分别加于不同量的RFP、PZA和INH标准溶液,配制不同浓度的系列血浆标样,(每种浓度3份),按样品处理项下操作,以色谱峰面积A对药物浓度C作线性回归,得血浆标准曲线。INH回归方程C=0.20+3.37×10⁻⁶A(r=0.9993),最低检测浓度0.2 μ g·mL⁻¹;RFP回归方程C=-0.05+3.74×10⁻⁶A(r=0.9999),最低检测浓度0.12 μ g·mL⁻¹;PZA回归方程C=0.45+4.63×10⁻⁶A(r=0.9997),最低检测浓度1.0 μ g·mL⁻¹。

1.5.4 方法回收率与精密度

取空白血浆0.5mL,按标准曲线制备方法,配制INH、RFP和PZA低、中、高浓度的标准血样各5份,按样品处理项下操作,以标准曲线方程计算其检除量与加入量之比,得其方法回收率。按上述方法,3种浓度血样于1日内测定5次和5日内测定5次,计算日内和日间变异,结果见表1。

药物	浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内差异		日间差异		相对回收率 %
		测得浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD%	测得浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD%	
PZA	10.0	9.49 ± 0.22	2.31	9.65 ± 0.37	3.79	96.5 ± 3.7
	20.0	20.38 ± 0.65	3.19	20.02 ± 1.27	6.34	100.1 ± 6.4
	2.0	2.00 ± 0.01	0.61	2.02 ± 0.06	2.94	101.2 ± 3.0
	20.0	20.45 ± 0.84	4.10	20.30 ± 1.26	6.22	101.5 ± 6.3
	40.0	41.44 ± 0.67	1.62	40.07 ± 1.95	4.87	100.2 ± 4.9

1.5.5 萃取回收率 取空白血浆 0.5mL,按标准曲线制备方法,配制 INH、RFP 和 PZA 低、中、高浓度的标准血样各 5 份,按样品处理项下操作,另配制相应浓度的标准溶液,分别测其峰面积,计算血浆中药物萃取回收率,结果见表 2。

表 2 血浆中异福酰胺片与参比片 INH、RFP、PZA 测定的绝对回收率($n = 5$)

Tab 2 Absolute recovery rate of Isoniazid、Rifampin、Pyrazinamide in plasma($n = 5$)

药物	浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	绝对回收率 %	RSD %
INH	0.8	71.8 ± 3.7	5.2
	4.0	79.4 ± 5.0	6.3
	12.0	81.7 ± 4.3	5.3
RFP	0.6	73.4 ± 3.3	4.5
	10.0	89.7 ± 3.5	3.8
	20.0	76.5 ± 4.9	6.4
PZA	2.0	51.9 ± 1.9	3.7
	20.0	60.3 ± 3.8	6.3
	40.0	60.2 ± 3.0	4.9

1.6 数据处理

表 3 INH、RFP、PZA 药代动力学参数($n = 20, \bar{x} \pm s$)

	INH		RFP		PZA	
	T	R	T	R	T	R
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	7.67 ± 2.14	7.33 ± 2.07	8.32 ± 1.85	7.66 ± 1.68	24.96 ± 4.69	23.93 ± 3.27
$T_{\max}/\text{h}$	0.89 ± 0.60	1.18 ± 0.66	2.52 ± 1.47	2.65 ± 1.42	1.35 ± 0.73	1.78 ± 1.12
$T_{1/2}\text{ke/h}$	3.13 ± 1.07	3.39 ± 0.77	4.07 ± 1.09	4.92 ± 1.61	12.20 ± 2.40	12.54 ± 2.28
MRT	4.07 ± 1.15	4.37 ± 1.04	6.78 ± 1.20	7.66 ± 1.21	16.89 ± 2.49	17.54 ± 2.68
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	26.80 ± 10.61	25.86 ± 9.57	60.77 ± 17.62	59.02 ± 17.65	334.50 ± 60.21	341.63 ± 58.97
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	29.09 ± 13.35	28.21 ± 11.77	62.15 ± 18.18	61.26 ± 18.23	381.13 ± 68.45	395.32 ± 75.85
Fr(%)	104.99 ± 19.93		105.82 ± 27.03		99.94 ± 22.46	

INH、RFP 和 PZA 的 ACU_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $C_{\max}$ 数值经对数转换后方差分析表明,在两种片剂间均无显著性差异($P > 0.05$)。上述各参数进行双单侧 t 检验,计算得 AUC 、 $C_{\max}$ 值 t_1 、 t_2 均 > 1.734 (查表 $t_{1-0.05} = 1.734$),受试制剂 INH、RFP 和 PZA 的 $\text{AUC}_{0-t}90\%$ 可信限分别为 $95.9\% \sim 110.9\%$ 、 $94.1\% \sim 112.8\%$ 和 $89.7\% \sim 106.4\%$,INH、RFP、PZA 的 $C_{\max}90\%$ 的可信限分别为 $93.9\% \sim 116.9\%$ 、 $99.3\% \sim 118.4\%$ 和 $95.8\% \sim 111.5\%$,均落在参比制剂的 $70\% \sim 143\%$ 之间^[5]。 $T_{\max}$ 经秩和检验,在两制剂间无显著性差异($P > 0.05$),故认为两制剂生物等效。

2.3 药物不良反应

试验期间未发生任何不良反应,无中途退出试验的受试者。

3 讨论

采用 3p97 药代动力学程序进行参数计算及生物等效性分析。 AUC 采用梯形面积法计算, $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 为实测数值。相对生物利用度按下列公式计算: $\text{Fr} = \text{ACU}_{0-t}(\text{受试制剂}) \times 100\% / \text{AUC}_{0-t}(\text{参比制剂})$ 。 AUC 、 $C_{\max}$ 采用方差分析法进行统计学处理,并进行双单侧 t 检验及区间估计, $T_{\max}$ 进行非参数检验(秩和检验),对两种片剂作出生物等效性评价。

2 结果

2.1 色谱行为

在本实验所选分析条件下,血浆中内源性组分不影响 INH、RFP、PZA 的分离测定。

2.2 血药浓度和药动力学的主要参数

20 名健康志愿者随机交叉单剂量口服异福酰胺片受试片和参比片各 5 片(INH400mg , RFP600mg , PZA1250 mg)。

两种片剂的主要药代动力学参数见表 3。用药-时曲线下面积 AUC_{0-t} 计算,受试片与参比片比较的 INH 相对生物利用度分别为 $104.9 \pm 19.93\%$ 、RPF 为 $105.82 \pm 27.03\%$, PZA 为 $99.94 \pm 22.46\%$ 。

本文采用反相 HPLC 法测定抗结核复方剂中三种主成分的血浆药物浓度。由于 INH、PZA 的分子量、分子极性与 RFP 相差较大,故难于在同一色谱条件下检出且互不干扰。本实验中 INH、RFP、PZA 血浆浓度测定均选择非极性 C_{18} 柱,分别采用三种不同组成的流动相系统,均能有效分离各组分与内源性杂质,且分析时间适中。RFP 和 PZA 血浆浓度萃取按文献^[6]方法并调整提取液配比。INH 预处理采用柱前衍生化法,文献报道^[7],其衍生物以乙醚萃取,回收率低($< 55\%$)。改用乙酸乙酯做萃取溶剂,则衍生物萃取率明显提高,三个浓度的回收率均大于 70% ,符合生物样品测定的要求。

复方制剂中 INH、RFP 和 PZA 均为杀菌性抗结核药,INH、RFP 尤其作用于繁殖期细胞外菌群,并可杀灭细胞内菌群,RFP 对生长缓慢及间歇生长的结核菌亦有良好抗菌作

用。PZA 则主要作用于细胞内特别是巨噬细胞酸性环境中的菌群。药效学研究表明^[8], INH + RFP 复方制剂的体内和体外抗结核作用显著优于其组成各药单用的作用; PZA 和 INH、RFP 组成复方制剂用于强化期治疗时, 可以增加 INH 和 RFP 的杀菌活性^[9]。美国马乐道尔公司对健康志愿者药代动力学研究资料表明, 复方制剂的生物利用度与单剂药联合使用相似, 但复方制剂服用方便, 更易避免漏服, 在保证疗效、保障用药依从性方面更具优越性。本试验以马乐道公司同类产品作为参照, 对国产三联复方制剂福酰胺片在健康志愿者体内的药代动力学进行了比较性研究。结果表明, 两种片剂的三种主成分在人体内血药浓度变化过程基本一致。国产片剂空腹合药, INH 口服吸收较快, 约 1~2h 可达峰值, 平均 $C_{\max}$ $7.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均 $T_{1/2}$ 3.1h , 与文献^[10]报道的 $C_{\max}$ 值 ($6.4 \sim 9.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 近似, 比报道的 $T_{1/2}$ $3.4 \sim 4.2 \text{h}$ 略短, 这与不同人种乙酰化快、慢代谢型所占比例不同有关。RFP 口服后 2~3h 达峰值, 平均 $C_{\max}$ $8.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均 $T_{1/2}$ 4.1h 。PZA 口服吸收亦较迅速, 平均 $T_{\max}$ 1.4h , 平均 $C_{\max}$ $24.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均 $T_{1/2}$ 12.2h 。上述 RFP 和 PZA 各主要参数值与文献报道^[10,11] 基本接近。国产复方片剂的 INH、RFP 和 PZA 与进口复方片剂比较的相对生物利用度分别为 $104.99 \pm 19.93\%$ 、 $105.82 \pm 27.03\%$ 和 $99.94 \pm 22.46\%$ 。统计学检验证明, 两制剂为生物等效制剂。提示国产抗结核复方制剂的人体生物利用度达到临床应用要求, 本研究为国产复方制剂在我国结核病防治与控制中的应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis Regimens Treatment of the IUATLD. Dull Int Union Tuberc Lung Dis, 1988, 63:60.
- [2] 李眉. 抗结核复方制剂的研究进展. 中国临床药理学杂志, 1998, 14(4):239.
- [3] 宋文虎. 抗结核复合制剂的开发应用与质量控制. 中华防痨杂志, 1995, 17:44.
- [4] 毕德忠, 许伟明. 抗击结核病第三次回潮的有效药物 - 复方抗结核制剂. 上海医药, 1998, 19(2):28.
- [5] 魏树礼主编. 生物药剂学与药物动力学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997:138.
- [6] Woo J, Wong CL, Teoh R, *et al.* Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of pyrazinamide and rifampicin in serum samples from patients with tuberculous meningitis. J Chromatogr, 1987;420:73.
- [7] Peter JJ, Gordon AE. Determination of the isoniazid metabolite monoacetylhydrazine in urine by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1987;415:188.
- [8] 梁佳芳, 段连山, 李惠英, 等. 复方利福平抗结核作用的药效学研究. 结核病与胸部肿瘤, 1997;3:154.
- [9] Grosset J, Truffor-Pernot CH, Bismuth R, *et al.* Chemotherapy of tuberculosis. Bulletin Int Union Against Tuberc, 1983;58:75.
- [10] Acocella G, Conti R, Luisetti M, *et al.* Pharmacokinetic studies on antituberculosis regimens in humans. Absorption and metabolism of the compounds used in the initial intensive phase of the short-course regimens: single administration study. Am Rev Respir Dis, 1985;132:510.
- [11] Gordon AE, David RE, Bryan WA, *et al.* The bioavailability of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in two commercially available combined formulations designed for use in the short-course treatment of tuberculosis. Am Rev Respir Dis. 1985;133:1076.

收稿日期:2003-06-29