

贝那普利人体药动学和生物等效性研究

田蕾,黄一玲,宋蓉,华璐,况扶华,李一石^{*} (中国医学科学院阜外心血管病医院临床药理中心,卫生部心血管药物临床研究重点实验室,北京 100037)

摘要:目的 研究贝那普利的药动学特征,评价两种贝那普利制剂生物等效性。方法 24名健康男性受试者随机交叉,先后单剂量口服贝那普利被试制剂和参比制剂 20mg,采用液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)测定血浆中贝那普利及其活性代谢物贝那普利拉浓度。结果 被试制剂和参比制剂中贝那普利原型的 C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(193.8 \pm 84.0) \text{ ng/mL}$ 和 $(226.3 \pm 110.3) \text{ ng/mL}$, $(0.70 \pm 0.35) \text{ h}$ 和 $(0.47 \pm 0.20) \text{ h}$, $(1.22 \pm 0.20) \text{ h}$ 和 $(1.30 \pm 0.16) \text{ h}$, $(182.1 \pm 61.4) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 和 $(180.3 \pm 73.6) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$, 贝那普利拉的 C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(275.9 \pm 129.3) \text{ ng/mL}$ 和 $(266.6 \pm 105.9) \text{ ng/mL}$, $(1.44 \pm 0.42) \text{ h}$ 和 $(1.31 \pm 0.36) \text{ h}$, $(5.29 \pm 0.65) \text{ h}$ 和 $(5.41 \pm 0.80) \text{ h}$, $(1187.6 \pm 481.9) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 和 $(1155.3 \pm 481.8) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$, 根据贝那普利和贝那普利拉分别计算的相对生物利用度为 $(104 \pm 14) \%$ 和 $(103 \pm 9) \%$ 。结论 贝那普利两种制剂具有生物等效性。

关键词: 贝那普利; 贝那普利拉; 液相色谱-串联质谱法; 生物等效性

中图分类号: R972.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)01-0036-04

Studies on Pharmacokinetics and Bioequivalence of Benazepril in Healthy Volunteers

TIAN Lei, HUANG Yi-ling, SONG Rong, HUA Lu, KUANG Fu-hua, LI Yi-shi^{*} (*The Key Laboratory of Clinical Trial Research of Cardiovascular Drugs, Fuwai Cardiovascular Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmacokinetic profiles of benazepril and evaluate the bioequivalence of two benazepril tablet preparations. **METHODS** An open randomized, two-period crossover study was performed on 24 healthy volunteers with a single dosage of 20mg benazepril. A sensitive LC/MS/MS method was established to determine the plasma concentrations of benazepril and its active metabolite benazeprilat. **RESULTS** To benazepril, the main pharmacokinetic parameters of test and reference preparations were as follows: C_{max} $(193.8 \pm 84.0) \text{ ng/mL}$ and $(226.3 \pm 110.3) \text{ ng/mL}$, t_{max} $(0.70 \pm 0.35) \text{ h}$ and $(0.47 \pm 0.20) \text{ h}$, $t_{1/2}$ $(1.22 \pm 0.20) \text{ h}$ and $(1.30 \pm 0.16) \text{ h}$, $AUC_{0-\infty}$ $(182.1 \pm 61.4) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ and $(180.3 \pm 73.6) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$. To benazeprilat, the pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} $(275.9 \pm 129.3) \text{ ng/mL}$ and $(266.6 \pm 105.9) \text{ ng/mL}$, t_{max} $(1.44 \pm 0.42) \text{ h}$ and $(1.31 \pm 0.36) \text{ h}$, $t_{1/2}$ $(5.29 \pm 0.65) \text{ h}$ and $(5.41 \pm 0.80) \text{ h}$, $AUC_{0-\infty}$ $(1187.6 \pm 481.9) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ and $(1155.3 \pm 481.8) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$. The relative bioavailability of test preparation were $(104 \pm 14) \%$ for benazepril and $(103 \pm 9) \%$ for benazeprilat. **CONCLUSION** The two preparations were bioequivalent.

KEY WORDS: benazepril; benazeprilat; LC/MS/MS; bioequivalence

贝那普利是第一个能适用于肝、肾功能不全高血压患者的血管紧张素转换酶抑制剂类抗高血压药物。该药口服吸收迅速,在体内水解后形成二羧酸的活性代谢产物贝那普利拉,其活性是贝那普利的 1 000 倍。国外文献报道的血药浓度测定方法有高效液相色谱法^[1-2]、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)法^[3-4]、酶免法^[5]和液质联用法(LC/MS)^[6],但其灵敏度不高或专属性不强,不能满足药动学研究需要。笔者未见国内有相关的报道。本研究旨在建立液相色谱-串联质

谱法(LC/MS/MS)测定贝那普利及其代谢物血药浓度,研究其药动学特征,评价两种贝那普利制剂生物等效性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

API4000液相色谱-质谱-质谱联用仪(美国应用生物系统公司); Agilent1100液相色谱系统(美国安捷伦公司)。

贝那普利和贝那普利拉对照品(成都地奥制药集团有限公司); 喹那普利(哈尔滨制药集团总厂); 甲醇、乙酸乙酯、

基金项目: 863国家攻关项目《临床试验关键技术及平台研究》(2002AA2Z341A, 2004AA2Z3760)

作者简介: 田蕾(1973-),女,硕士,助理研究员,主要从事新药临床药动学研究。联系电话: (010)-88398547, E-mail: ittl@fuwaihospital.org

* 通讯作者: 李一石(1951-),女,主任医师,博士生导师,主要从事心血管药物临床研究。联系电话: (010)-68331753, E-mail: liyishi@publ-ic3.bta.net.cn

异丙醇(色谱纯,美国 Fisher公司);甲酸(分析纯,Fluka公司);贝那普利被试制剂(成都地奥制药集团有限公司,10mg/片,批号:030201);贝那普利参比制剂(北京诺华制药有限公司,10mg/片,批号:03046)。

1.2 研究对象

健康男性 24 名,年龄 (27.2 ± 4.9) 岁,体重 (67.08 ± 6.61) kg,体重指数 (22.37 ± 1.48) kg/m²。试验前受试者签署知情同意书。经病史询问、体检、胸片、心电图、血、尿常规、血生化检查均无异常。试验方案由阜外医院伦理委员会批准。

1.3 给药方案

采用开放的两制剂、两周期、随机交叉的试验设计,24 名受试者随机等分为 2 组,单剂量交叉口服贝那普利被试制剂和参比制剂 20mg,两次给药间隔 14d。给药前禁食 12h 后口服被试制剂或参比制剂 2 片,用 200mL 温开水送服,药后 4h 进食统一低脂标准餐,药后 8h 内统一饮水时间和饮水量。试验期间禁忌烟酒和含咖啡因的饮料。避免卧床,但也避免剧烈运动。

1.4 血浆样本采集

于每次用药前(0h)和用药后 0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,6,8,12,15,24h 由肘正中静脉取血 5mL,置于含肝素的离心试管中,离心分离血浆,存于 -20℃ 冰箱中待测。

1.5 血药浓度测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ 柱(150mm × 3.9mm, 4μm 美国 Waters 公司);流动相为甲醇-水-甲酸(70:30:1);流速:0.8 mL/min(柱后分流 6:1);柱温:30℃。

1.5.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(Turbo IonSpray),离子喷射电压 5 000V,温度为 380℃;气帘气体(N₂)压力为 15 unit,离子源气体 GSI(N₂)压力为 55 unit,离子源气体 GS2(N₂)压力为 35 unit,碰撞气 CAD(N₂)压力为 4 unit;正离子方式检测;多反应监测(MRM)方式扫描;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 425 → m/z 351(贝那普利)、 m/z 397 → m/z 351(贝那普利拉)和 m/z 439 → m/z 234(奎那普利,内标);贝那普利、贝那普利拉和内标的 DP 电压分别为 90,85 和 80V,碰撞能量(CE)分别为 30,30 和 28V。

1.5.3 血浆样品预处理 取 0.5mL 血浆样品,加入 0.5mol/L 盐酸溶液 0.2mL 酸化血样,混匀后加入提取剂(乙酸乙酯:异丙醇 = 90:10,含内标喹那普利 20μg/L)3mL 进行提取,涡流混合 3min,离心 5min(3 000 r/min),分取上层有机相于 45℃ 下氮气流吹干,残留物溶于 0.3mL 流动相中,高速离心(10 900 r/min)5min,取上清液 30 μL 进样。

1.5.4 标准曲线 取标准系列血浆样品 0.5 mL,分别对应贝那普利和贝那普利拉血浆浓度 0.2,0.5,1,2,5,10,20,50,100,200μg/L,其余同“血浆样品预处理”项下操作,依法测定,以待测物贝那普利和贝那普利拉的浓度为横坐标,以待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行线性回归。

1.6 数据处理

根据药时数据,用梯形法计算 AUC, C_{max} 和 t_{max} 用实测值表示,采用统计距方法计算其他药动学参数。应用 SAS 6.12 版统计软件包,将 C_{max} 和 AUC 对数转换(ln)后再进行方差分析,并用双单侧 t 检验和 (1 - 2α) 置信区间检验判定生物等效性。

2 结果

2.1 方法的专属性

将受试者空白血浆的色谱图和血浆中加入贝那普利、贝那普利拉和内标喹那普利得到的色谱图进行比较,证明血浆中的内源性物质不干扰测定,典型的色谱图见图 1。

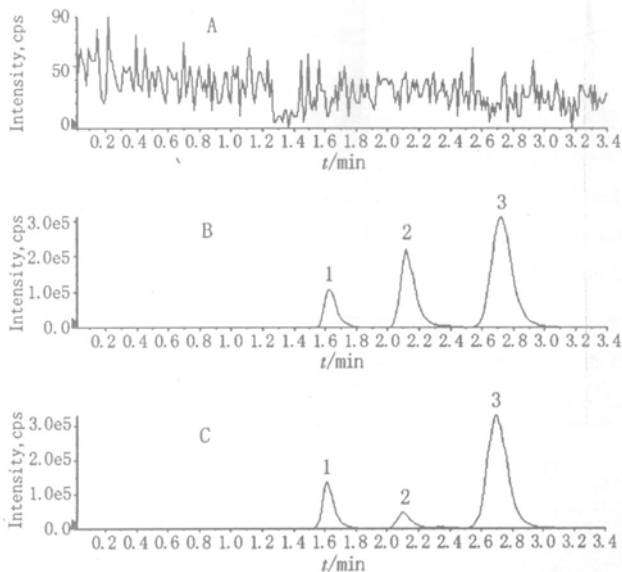


图 1 LC/MS/MS 法测定人血浆中贝那普利的色谱图

Fig 1 Chromatograms of benazepril, benazeprilat and internal standard (IS) determined by LC/MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) scan mode

A. 空白血浆; B. 空白血浆加入对照品; C. 受试者单剂量口服 20 mg 贝那普利后 1h 血样; 峰 1: 贝那普利拉; 峰 2: 贝那普利; 峰 3: 内标

A. blank plasma sample; B. plasma spiked with benazepril, benazeprilat and IS; C. plasma sample 1h after single dose of 20mg benazepril; Peak 1: benazeprilat; Peak 2: benazepril; Peak 3: internal standard

2.2 线性范围和灵敏度

测定血浆中贝那普利和贝那普利拉浓度的线性范围均为 (0.2 ~ 200) μg/L。最低定量浓度均为 0.2 μg/L。

2.3 精密度和回收率

贝那普利低、中、高浓度 (1, 10, 100 μg/L) 的日内 RSD 分别为 3.9%, 2.2% 和 1.3% (n = 6), 日间 RSD 分别为 3.8%, 4.5% 和 1.9% (n = 24), 回收率分别为 (100.0 ± 3.8)%, (102.4 ± 4.6)% 和 (100.0 ± 1.9)% (n = 24); 贝那普利拉低、中、高浓度的日内 RSD 分别为 6.6%, 4.3% 和 2.7% (n = 6), 日间 RSD 分别为 5.1%, 6.1% 和 7.2% (n = 24), 回收率分别为 (95.9 ± 5.2)%, (100.3 ± 6.1)% 和 (95.4 ± 6.9)% (n = 24)。

2.4 血药浓度结果

24 名受试者单剂量口服贝那普利被试制剂和参比制剂

20mg后的平均血药浓度-时间曲线见图 2(贝那普利)和图 3(贝那普利拉)。

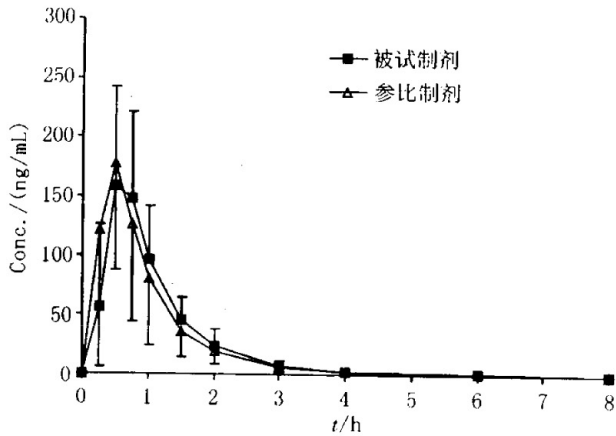


图 2 单剂量口服 20mg 被试制剂和参比制剂后贝那普利的平均血药浓度-时间曲线 (n = 24)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of benazepril after single oral administration of test and reference preparations 20mg in 24 volunteers

表 1 受试者单剂量口服 20mg 贝那普利被试制剂和参比制剂后的主要药动学参数 (n = 24)

Tab 1 Main pharmacokinetic parameters after single oral administration of test and reference benazepril preparations 20mg in 24 volunteers (n = 24)

参 数	贝那普利		贝那普利拉	
	被试制剂	参比制剂	被试制剂	参比制剂
$C_{max}/(ng/mL)$	193.8 ± 84.0	226.3 ± 110.3	275.9 ± 129.3	266.6 ± 105.9
t_{max}/h	0.70 ± 0.35	0.47 ± 0.20	1.44 ± 0.42	1.31 ± 0.36
$AUC_{0-1}/(ng \cdot h/mL)$	181.4 ± 61.2	179.7 ± 73.5	1154.3 ± 463.1	1124.8 ± 466.6
$AUC_{0-\infty}/(ng \cdot h/mL)$	182.1 ± 61.4	180.3 ± 73.6	1187.6 ± 481.9	1155.3 ± 481.8
MRT_{0-1}/h	1.15 ± 0.22	0.99 ± 0.16	6.32 ± 0.78	6.04 ± 0.72
$MRT_{0-\infty}/h$	1.18 ± 0.22	1.02 ± 0.16	6.98 ± 1.01	6.70 ± 0.79
$Ke/(1/h)$	0.583 ± 0.114	0.543 ± 0.070	0.133 ± 0.015	0.130 ± 0.017
$t_{1/2}/h$	1.22 ± 0.20	1.30 ± 0.16	5.29 ± 0.65	5.41 ± 0.80
$F/\%$	104 ± 14		103 ± 9	

方差分析和双单侧 t 检验结果表明, 被试制剂的 AUC 、 C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 与参比制剂相比均无显著性差异 ($P > 0.05$)。被试制剂贝那普利原型的 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 的 90% 置信区间为 96.0% ~ 106.3% 和 76.4% ~ 96.1%, 代谢物贝那普利拉的 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 的 90% 置信区间为 99.6% ~ 106.1% 和 97.7% ~ 109.7%, 相对生物利用度分别为 (104 ± 14)% 和 (103 ± 9)%, 故被试制剂与参比制剂生物等效。

3 讨论

据文献报道, GC/MS^[3] 测定贝那普利和贝那普利拉血药浓度的检测限分别为 1.8ng/mL 和 2.0ng/mL, LC/MS 法^[6] 为 2.5ng/mL 和 5ng/mL, 本研究将两种待测物的灵敏度提高到 0.2ng/mL, 且操作简便, 分析速度快 (3.5min/sample), 充分满足药动学研究需要。

本研究表明, 贝那普利口服吸收迅速, 药后 30min 左右

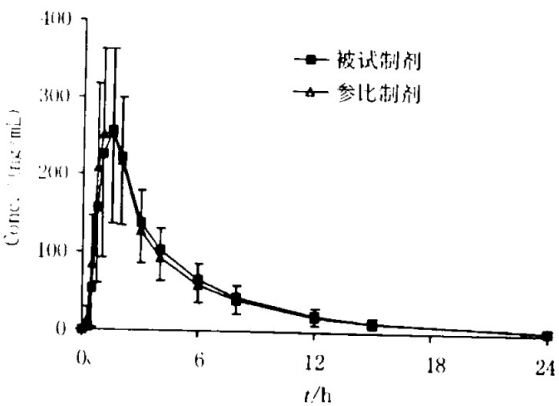


图 3 单剂量口服 20mg 被试制剂和参比制剂后贝那普利拉的平均血药浓度-时间曲线 (n = 24)

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of benazeprilat after single oral administration of test and reference preparations 20mg in 24 volunteers

2.5 药动学参数及统计结果

受试者单剂量口服贝那普利被试制剂和参比制剂 20mg 后的主要药动学参数见表 1。

即达到血药浓度峰值, 然后血药浓度迅速下降, 药后 6h 的浓度基本在 1ng/mL 以下 (约为峰浓度的 1/100), 消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 1~1.5h。贝那普利在体内经肝药酶水解, 迅速完全的转换为活性代谢物贝那普利拉, 后者的峰浓度出现在药后 1~2h, $t_{1/2}$ 较母体贝那普利显著延长, 为 5~8h。该试验结果与文献报道一致^[7]。

试验期间监测受试者的血压、心率、呼吸、心电图、血尿常规和血生化检查等指标, 均未发现有临床意义的异常变化。服药后有 1 例发生体位性低血压, 为贝那普利已知不良反应范畴。

参考文献

[1] GANA M, PANDERI I, PARISI-POULOU A, et al. Kinetics of the acidic and enzymatic hydrolysis of benazepril HCl studied by

- LC [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 27(1-2):107.
- [2] CIRILLI R, LA TORRE F. Stereoselective analysis of benazepril and its stereoisomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a chiral AGP column [J]. J. Chromatogr A, 1998, 818(1):53.
- [3] KAISER G, ACKERMANN R, DIETERLE W, *et al.* Determination of a new angiotensin converting enzyme inhibitor and its active metabolite in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J. Chromatogr, 1987, 419:123.
- [4] POMMIER F, BOSCHET F, GOSSET G. Quantitative determination of benazepril and benazeprilat in human plasma by gas chromatography mass spectrometry using automated 96-well disk plate solid-phase extraction for sample preparation [J]. J Chromatogr B, 2003, 783(1):199.
- [5] GRAF P, FRUEH F, SCHMID K. Determination of the angiotensin converting enzyme inhibitor benazeprilat in plasma and urine by an enzymic method [J]. J Chromatogr, 1988, 425(2):353.
- [6] XIAO W, CHEN B, YAO S, *et al.* Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and benazeprilat in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 814(2):303.
- [7] SHIONOIRI H, UEDA SI, MINAMISAWA K, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of benazepril in hypertensive patients with normal and impaired renal function [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20(3):348.

收稿日期:2005-12-08