

盐酸伊托必利片在健康受试者中的生物等效性研究

谢斌, 刘杰, 陈新民, 杨沛欣, 杨琼, 陆司司, 蔡金兰, 钟克凤(珠海润都制药股份有限公司, 广东 珠海 519041)

摘要: 目的 评价盐酸伊托必利片的生物等效性。方法 采用 HPLC-MS/MS 测定血浆中伊托必利的浓度。64 例健康受试者(空腹 32 例, 餐后 32 例)随机交叉单剂量口服盐酸伊托必利片受试制剂和参比制剂 50 mg, 测定不同时间血药浓度, 采用 Phoenix WinNonlin 软件对药动学参数进行计算。结果 空腹试验 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 几何均数比值的 90% 置信区间分别为 89.42%~118.95%、93.25%~117.27%、92.78%~117.33%; 餐后试验 90% 置信区间分别为 90.53%~104.83%、96.72%~99.77%、96.76%~99.88%。结论 盐酸伊托必利片受试制剂和参比制剂具有生物等效性。

关键词: 盐酸伊托必利片; 生物等效性; 药动学; 高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)16-2145-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.16.016

引用本文: 谢斌, 刘杰, 陈新民, 等. 盐酸伊托必利片在健康受试者中的生物等效性研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(16): 2145-2150.

Study on the Bioequivalence of Itopride Hydrochloride Tablets in Healthy Subjects

XIE Bin, LIU Jie, CHEN Xinmin, YANG Peixin, YANG Qiong, LU Sisi, CAI Jinlan, ZHONG Kefeng(Zhuhai Rundu Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuhai 519041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the bioequivalence of itopride hydrochloride tablets. **METHODS** The concentration of itopride in plasma was measured by HPLC-MS/MS. Sixty-four healthy subjects(32 on fasting and 32 after meal) were randomly assigned to take a single dose of itopride hydrochloride tablets 50 mg orally as test preparation and reference preparation. The plasma concentrations of itopride hydrochloride tablets were determined at different times and the pharmacokinetic parameters were calculated by Phoenix WinNonlin software. **RESULTS** Under fasting conditions, the 90% confidence intervals of C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ for the test/reference geometric mean ratio were 89.42%~118.95%, 93.25%~117.27%, 92.78%~117.33%. Under fed conditions, the 90% confidence intervals of C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ for the test/reference geometric mean ratio were 90.53%~104.83%, 96.72%~99.77%, 96.76%~99.88%. **CONCLUSION** The test preparation and reference preparation of itopride hydrochloride tablets are bioequivalent.

KEYWORDS: itopride hydrochloride tablets; bioequivalence; pharmacokinetics; HPLC-MS/MS

随着时代的不断发展, 竞争的日趋激烈, 饮食不科学、不规律等因素导致胃肠道平滑肌收缩无力, 胃肠道动力下降, 引起胃肠功能紊乱, 胃肠道障碍疾病发病率呈现日益增高的趋势。胃肠动力是消化系统发挥生理功能的基本要素, 促进和恢复胃动力的正常运行是治疗这类疾病的基本方案, 胃肠动力紊乱可致多种消化道症状, 常见功能性消化不良、胃食管反流病、慢性胃炎等, 严重影响患者的生活质量, 因此促胃肠动力药物在治疗这类疾病过程中具有重要作用。

伊托必利是一种新型促胃肠动力药物, 其药理机制主要通过阻断多巴胺 D2 受体活性和抑制乙酰胆碱酯酶活性。通过刺激乙酰胆碱释放并抑制其水解而增强胃和十二指肠运动, 促进胃排空, 并具有中度镇吐作用。伊托必利在中枢神经系统

分布很少, 不引起 QT 间期延长或室性心律失常, 在肝脏的代谢不依赖于细胞色素 P450。因此伊托必利临床疗效显著, 安全性良好, 可改善患者生活质量, 值得推广临床应用^[1-2]。

本研究通过 HPLC-MS/MS 分析伊托必利血药浓度^[3], 对健康受试者空腹和餐后单剂量口服盐酸伊托必利片进行了生物等效性评价。

1 仪器与试剂

Triple Quad 4500 质谱仪(AB Sciex 公司); GL-2050MS 离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); LC-20ADXR 高效液相色谱泵、CTO-20AC 柱温箱均来自 Shimadzu 公司。

受试制剂: 盐酸伊托必利片(珠海润都制药股份有限公司, 批号: 20191201; 规格: 50 mg); 参比制剂: 盐酸伊托必利片(MYLAN EPD G.K.,

作者简介: 谢斌, 男, 博士, 高级工程师 E-mail: 42276143@qq.com

KATSUYAMA PLANT, 批号: 87601YQ1; 规格: 50 mg)。伊托必利对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100939-201803; 纯度: 99.8%); 伊托必利-d6 内标(TLC Pharmaceutical Standards, 批号: 2650-088A4; 含量: 99.7%)。乙腈、甲醇均为色谱纯, 甲酸铵为分析纯, 实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 色谱条件 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50.0 mm, 5.0 μm, Welch); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~1.0 min 30%B, 1.0~1.1 min 30%→95%B, 1.1~1.7 min 95%B, 1.7~1.8 min 95%→15%B, 1.8~2.5 min 15%→30%B; 流速为 1.00 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 进样量为 3.00 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式; 离子喷雾温度: 600 °C; 气帘气: 30.00 psi; 碰撞池气体种类: 9.00; 雾化气: 60.00 psi; 碰撞室出口电压: 15.00 V; 电喷雾电压: 5 500 V。多反应监测(MRM)作为扫描模式。用于定量分析的离子反应为: 359.2→72.2(伊托必利)和 365.2→78.2(伊托必利-d6 内标)。见图 1。

2.2 血浆样品处理

精密移取血浆样品 50.0 μL, 加入 25.0 μL 的内标溶液, 涡旋混合 3 min。加入 400 μL 乙腈, 涡旋混合 5 min。1 700×g 离心 15 min。然后移取 100 μL 上清液加入 300 μL 乙腈: 水(10: 90), 涡旋 5 min, 取 3.00 μL 用于分析测定。

2.3 方法学的验证

2.3.1 选择性试验 分别取 12 个不同供体/来源的空白基质(聊城市人民医院及潍坊高新技术产业开发区人民医院, 6 个为空腹-正常血浆, 6 个为餐后-高脂血浆)样品、3 个混合来源的空白基质, 按“2.2”项下操作; 同样取 12 个不同来源的空白基质配制定量下限质控样品, 处理后进行 HPLC-MS/MS 分析。结果表明不同类型空白样品中的干扰峰均未对分析物和内标造成影响, 见图 2。

2.3.2 标准曲线与定量下限 取适量空白血浆, 加入伊托必利溶液, 配制成浓度为 1.00, 2.00, 10.0, 50.0, 200, 300, 540, 600 ng·mL⁻¹ 的标准溶液。按“2.2”项下操作, 记录样品峰面积, 以分析物伊托必利与内标的色谱峰面积比对伊托必利浓度(权重 1/X²)进行线性回归, 得回归方程 $y=$

0.017 5x-0.000 611(R^2 为 0.998 1), 线性范围为 1.00~600 ng·mL⁻¹, 定量下限 1.00 ng·mL⁻¹。

2.3.3 精密度和准确度试验 取适量空白血浆, 加入伊托必利溶液, 配制成 1.00, 3.00, 36.0, 100, 450 ng·mL⁻¹ 浓度的质控样品。按“2.2”项下操作, 每一浓度质控样品均配制 6 个平行样, 计算批内和批间的准确度和精密密度。各浓度质控样品的批内与批间的准确度在 85.0%~115.0%, 精密密度均未>15%, 符合分析方法要求。结果见表 1。

表 1 伊托必利在人血浆中的精密密度与准确度

Tab. 1 Precision and accuracy of itopride in human plasma

浓度/ ng·mL ⁻¹	批内			批间		
	$\bar{x} \pm s$	精密密度 (CV%)	准确度/ %	$\bar{x} \pm s$	精密密度 (CV%)	准确度/ %
1.00	1.06±0.11	10.4	94.3	1.04±0.09	8.6	96.1
3.00	3.20±0.31	9.8	93.4	3.11±0.20	6.3	96.3
36.0	36.2±2.00	5.5	99.4	36.0±1.21	3.4	100
100	105±3.03	2.9	95.0	105±2.77	2.6	95.4
450	468±18.2	3.9	96.1	465±14.1	3.0	96.8

2.3.4 基质效应 精密吸取分析物和内标溶液, 用乙腈: 水稀释配制成 4 种纯溶液(分析物浓度为 15.79, 3.51, 1.263, 0.105 26 ng·mL⁻¹, 内标浓度均为 1.754 ng·mL⁻¹)。含基质样品: 取空白血浆, 按“2.2”项下操作, 移取上清液后加 300 μL 上述 4 种纯溶液, 每个浓度配制 1 个平行样。不含基质样品: 取空白试剂, 按“2.2”项下操作, 移取上清液后加 300 μL 上述 4 种纯溶液, 每个浓度配制 3 个平行样。通过含基质峰面积与不含基质峰面积的比值分别计算分析物和内标的基质因子。结果显示, 4 种浓度样品的内标归一化基质因子分别为 0.969, 1.02, 0.948, 1.01, 相对标准偏差均未超过 15%, 表明无明显基质效应。

2.3.5 提取回收率 取空白血浆, 加 25.0 μL 甲醇: 水, 按“2.2”项下操作, 移取上清液后加 300 μL “2.3.4”项下基质效应中的 4 种纯溶液, 每个浓度配制 3 个平行样, 即得回收率评价样品。分别测定采用正常血浆和高脂血浆配制而得的高中低浓度质控样品(每个浓度配制 6 个平行样)的分析物和内标的峰面积, 以及各浓度回收率评价样品中分析物和内标的峰面积, 回收率结果见表 2。

2.4 试验设计和数据处理

2.4.1 研究对象 64 例健康男性和女性受试者(空腹和餐后试验各 32 例), 受试者年龄在 20~47 岁、体质指数 BMI 为 19.4~25.8 kg·m⁻²。受试者来自

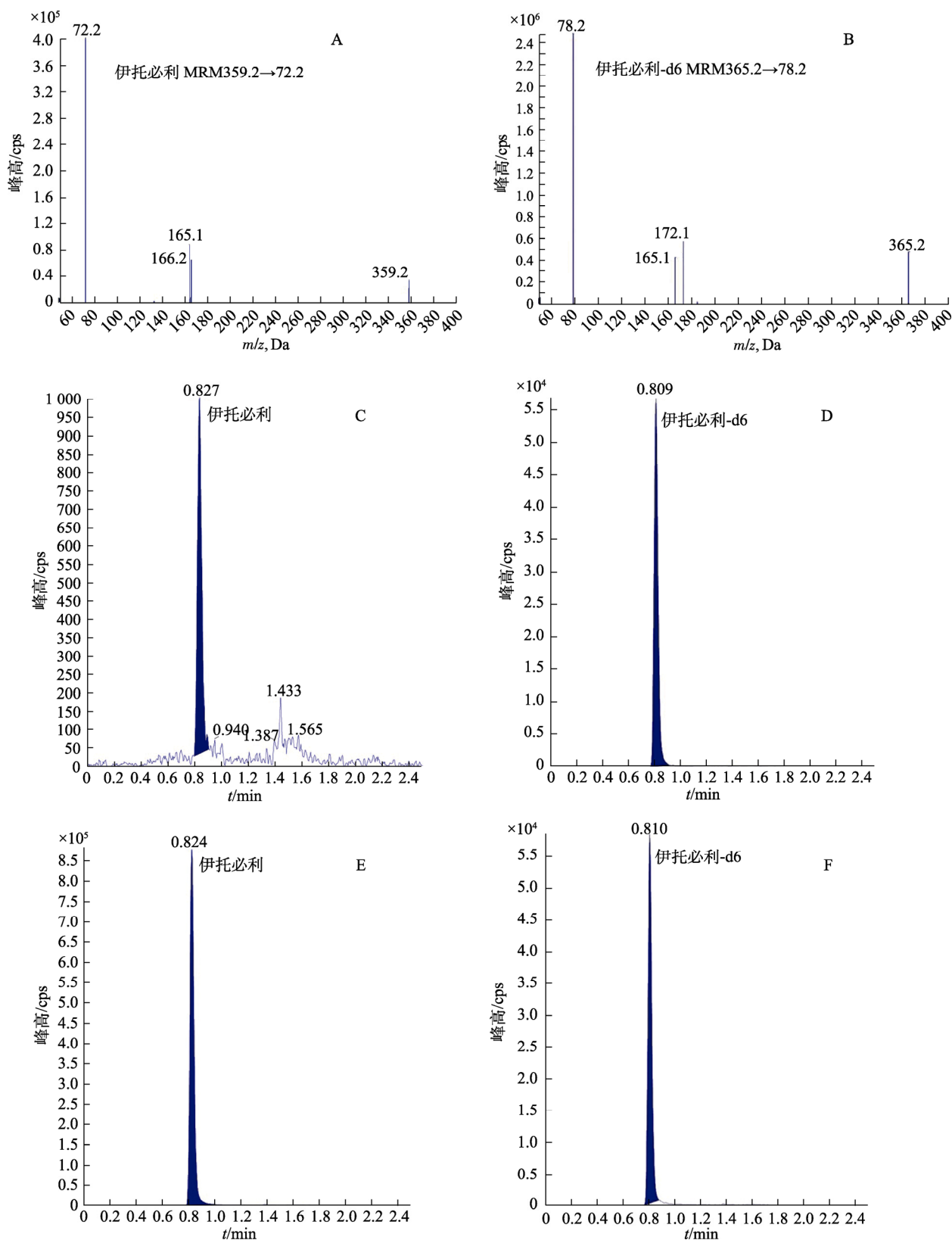


图1 伊托必利、伊托必利-d6 的质谱和典型色谱图

A-伊托必利的质谱图；B-伊托必利-d6 的质谱图；C-伊托必利定量下限典型色谱图；D-伊托必利-d6 定量下限典型色谱图；E-伊托必利典型色谱图；F-伊托必利-d6 典型色谱图。

Fig. 1 Mass spectrogram and typical chromatograms of itopride and itopride-d6

A-Itopride of mass spectrogram; B-itopride-d6 of mass spectrogram; C-typical chromatograms of itopride LLOQ; D-typical chromatograms of itopride-d6 LLOQ; E-typical chromatograms of itopride; F-typical chromatograms of itopride-d6.

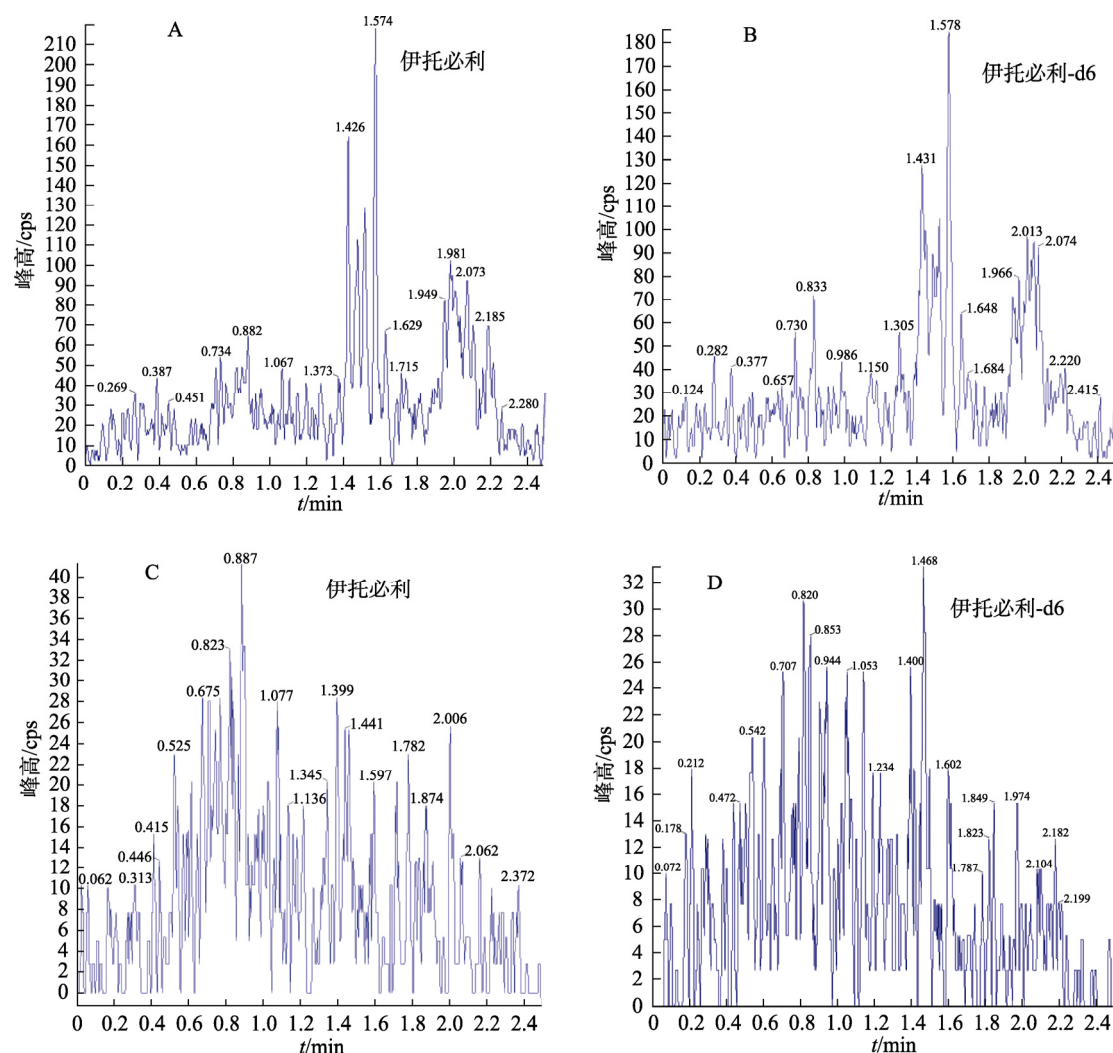


图2 不同来源、混合来源的空白基质伊托必利和伊托必利-d6 色谱图

A—不同来源的空白基质伊托必利色谱图；B—不同来源的空白基质伊托必利-d6 色谱图；C—混合来源的空白基质伊托必利色谱图；D—混合来源的空白基质伊托必利-d6 色谱图。

Fig. 2 Itopride and itopride-d6 chromatograms of blank matrix from different sources and mixed source

A—chromatograms of blank matrix itopride from different sources; B—chromatograms of blank matrix itopride-d6 from different sources; C—chromatograms of mixed source blank matrix itopride; D—chromatograms of mixed source blank matrix itopride-d6.

表2 伊托必利在人血浆中的回收率

Tab. 2 Recovery rate of itopride in human plasma

浓度/ng·mL ⁻¹	分析物/%	内标/%
正常血浆		
3.00	112.3	106.9
36.0	104.4	101.7
100	109.4	108.6
450	101.8	105.7
总回收率	107.8±5.41	107.1±1.42
高脂血浆		
3.00	115.7	105.0
36.0	104.3	107.2
100	104.8	108.1
450	99.2	109.1
总回收率	106.6±8.39	107.4±2.19

中国健康受试者(社会招募)，试验前体检结果均正常或异常无临床意义，试验前2周内未使用其他药物，禁止烟酒，对可能发生的不良反应表示理解并签署知情同意书，研究方案经邢台医学高等专科学校第二附属医院临床试验伦理委员会批准。

2.4.2 给药方案与血样采集 本研究空腹试验采用单剂量、随机、开放、双交叉生物等效性设计；餐后试验采用单剂量、随机、开放、完全重复交叉生物等效性设计^[4]。受试者在给药前1天晚餐后禁食，次日服药前后1h禁水。给药日上午空腹或进食高脂餐后服用受试制剂或参比制剂1片(相当于伊托必利50mg)，240mL温水送服。每周期分别在给药前0h及给药后0.167, 0.25, 0.5, 0.75,

1, 1.33, 1.67, 2, 2.33, 2.67, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 h, 采集静脉血 3 mL 至含 EDTA-K₂ 抗凝剂采血管中。离心(1 700×g, 4 °C)10 min, 抽取上层血浆用于测定(−60~90 °C保存)。

2.4.3 统计学分析 使用 Phoenix WinNonlin 软件(8.2 版本)以非房室模型进行药动学分析计算药动学参数, 将所得参数进行方差分析, 计算 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 几何均数比值的 90%置信区间, 评价 2 种制剂的生物等效性。

2.5 结果

2.5.1 血药浓度-时间曲线 空腹和餐后条件下各有 32 例受试者口服试验药物, 盐酸伊托必利片血药浓度-时间曲线分别见图 3~4。两制剂的血药浓度-时间曲线基本重叠, 表明两制剂在人体内吸收、消除过程相似。

2.5.2 药动学参数 按照实际采样时间, 用 Phoenix WinNonlin 程序以非房室模型进行药动学分析, 药代参数包括 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $T_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 λ_z 和 $AUC_{\%Extrap}$ 。结果见表 3。

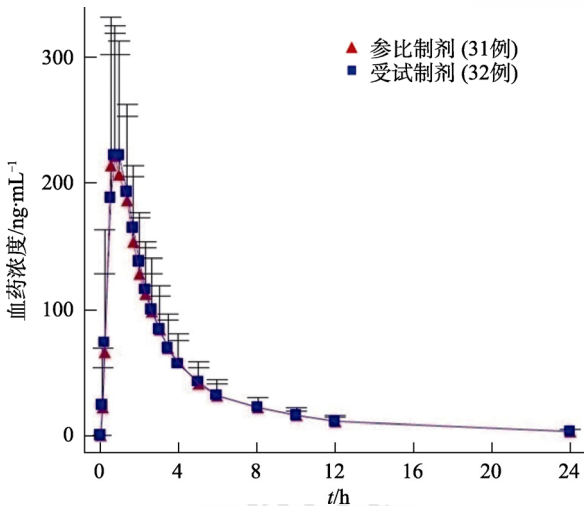


图 3 空腹口服受试制剂和参比制剂的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Mean concentration-time profiles of test and reference administered with fasting

表 3 健康受试者空腹和餐后条件下单次口服盐酸伊托必利片后药动学参数表

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of itopride hydrochloride tablets after single oral test and reference preparations under fasting and fed conditions

项目		$C_{\max}/ng \cdot mL^{-1}$	$AUC_{0-t}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	$t_{\max}/h$	$t_{1/2}/h$	$AUC_{\%Extrap}/\%$	$\lambda_z(1/h)$
空腹	受试制剂(n=32)	273.13±92.96	800.37±202.29	841.57±218.64	1.00(0.5,2)	6.98±1.63	4.69±2.01	0.10±0.02
	参比制剂(n=31)	270.78±94.85	786.04±224.07	828.31±240.58	0.75(0.5,2.67)	6.73±1.57	4.92±2.06	0.11±0.04
餐后	受试制剂(n=64)	267.75±92.17	867.77±202.64	908.98±210.40	1.00(0.5,3.5)	7.00±1.60	4.54±2.05	0.10±0.02
	参比制剂(n=64)	279.69±112.05	885.89±215.67	927.01±222.61	1.33(0.5,3.5)	6.90±1.63	4.47±2.13	0.11±0.02

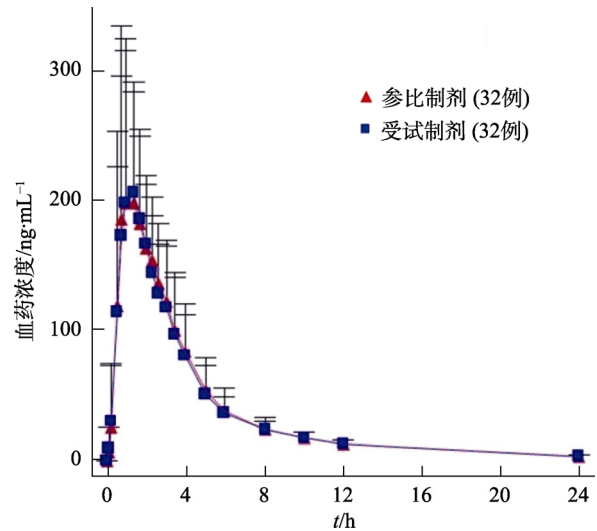


图 4 餐后口服受试制剂和参比制剂的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Mean concentration-time profiles of test and reference administered with fed

2.5.3 生物等效性分析 对两制剂的主要药动学参数 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 经对数转换后进行方差分析, 双单侧 t 检验。空腹试验: 受试与参比制剂 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 几何均数比值的 90%置信区间分别为 89.42%~118.95%、93.25%~117.27%、92.78%~117.33%(空腹试验中, 1 例受试者仅口服受试制剂)。餐后试验: 参比制剂的个体内标准差 S_{WR} 分别为 0.201, 0.058, 0.058; 90%置信区间分别为 90.53%~104.83%, 96.72%~99.77%, 96.76%~99.88%。空腹和餐后试验的 90%置信区间均落在 80%~125%, 且双单侧 t 检验结果显示 P 值均 <0.05 , 因此两制剂具有生物等效性。

3 讨论

本研究采用 HPLC-MS/MS 测定人体血浆中伊托必利的浓度, 生物样品分析中采用内标, 该测定方法无杂质干扰, 重现性好, 精密度高, 从而保证了结果的准确性和可靠性。根据笔者所在单位既往开展的盐酸伊托必利片预试验研究显示, 空腹条件下受试制剂与参比制剂 $C_{\max}$ 的个体内变异系数为

20.18%，餐后条件下受试制剂与参比制剂 $C_{\max}$ 的个体内变异系数为 40.86%，表明餐后条件下盐酸伊托必利存在高变异的可能，因此本次研究空腹试验采用单剂量、随机、开放、双交叉生物等效性设计；餐后试验采用单剂量、随机、开放、完全重复交叉生物等效性设计。盐酸伊托必利半衰期约为 6 h，本试验将清洗期设计为 5 d，满足清洗期大于药物 7 倍半衰期的法规要求^[5]。此外样本量设计在考虑合理脱落率的前提下共入组 64 例受试者，统计分析中未剔除脱落受试者已完成的周期数据，因此实际研究中脱落 2 例受试者不影响研究的等效性评价。

基于上述结果表明，盐酸伊托必利片受试制剂与参比制剂具有生物等效性，本次试验可为我国盐酸伊托必利片生物等效性和药动力学研究提供参考依据。

REFERENCES

- [1] 胡卫东, 杨宇, 邓文. 促胃肠动力药临床研究概况[J]. 中国药业, 2008, 17(10): 77-78.
- [2] 孙菁, 袁耀宗. 伊托必利在胃肠疾病治疗中的研究进展[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(10): 791-792.
- [3] MIAO L X, FANG Z J, ZHAO H L, et al. Determination of itopride in human plasma by HPLC-MS[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35(14): 1501-1504.
- [4] NASIRI M I, YOUSUF R I, SHOAIB M H, et al. Comparative pharmacokinetic evaluation of extended release itopride HCl pellets with once daily tablet formulation in healthy human subjects: A two treatment, four period crossover study in fasted and fed condition[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2019, 45(3): 415-422.
- [5] 国家药品监督管理局药品审评中心. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则[S]. 2016.

收稿日期: 2021-08-04

(本文责编: 沈倩)