

氟伐他汀钠缓释片的制备及其 Beagle 犬体内药动学研究

徐兵勇^{1,2}, 潘迎锋¹, 平丽^{3*} (1.浙江省药品化妆品审评中心, 杭州 310012; 2.正大青春宝药业有限公司, 杭州 310023; 3.浙江大学药物安全评价研究中心, 杭州 310058)

摘要: 目的 制备氟伐他汀钠缓释片, 进行体外释放特性以及 Beagle 犬体内药动学研究。方法 以羟丙甲纤维素为缓释材料制备氟伐他汀钠缓释片, 测定其体外释放度和 Beagle 犬口服单剂量及多剂量后的血药浓度, 推算药动学参数。结果 制备的氟伐他汀钠缓释片体外释放行为相似, 口服单剂量和多剂量药动学参数 C_{max} 分别为 $(3\ 304.23 \pm 1\ 043.30) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(3\ 760.86 \pm 754.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ 分别为 $(7.37 \pm 4.09) \text{h}$ 和 $(6.04 \pm 2.63) \text{h}$, $\text{AUC}_{(0-t)}$ 分别为 $(15\ 052.91 \pm 3\ 878.01) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(15\ 374.91 \pm 2\ 712.20) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 制备的氟伐他汀钠缓释片具有较明显的缓释效果, 多次给药未出现明显的蓄积现象, 表现出良好的安全性。

关键词: 氟伐他汀钠; 缓释片; 药动学研究; 体外释放度

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)04-0421-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.008

引用本文: 徐兵勇, 潘迎锋, 平丽. 氟伐他汀钠缓释片的制备及其 Beagle 犬体内药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 421-425.

Study on Preparation of Fluvastatin Sodium Extended-release Tablet and Its Pharmacokinetics in Beagle Dogs

XU Bingyong^{1,2}, PAN Yingfeng¹, PING Li^{3*} (1.Zhejiang Center for Drug and Cosmetics Evaluation, Hangzhou 310012, China; 2.Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co. Ltd, Hangzhou 310023, China; 3.Center for Drug Safety Evaluation, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the fluvastatin extended-release tablet and investigate its pharmacokinetics in Beagle dogs and *in vitro* release. **METHODS** Hydroxypropyl methyl cellulose was used as a sustained release material to prepare fluvastatin sodium extended release tablet. The release degree *in vitro* and the concentration of blood drug after single and multi dose oral administration of Beagle dogs were measured. The pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The release behavior of fluvastatin extended-release tablets were similar *in vitro*, C_{max} in Beagle dogs after single dose and multi dose oral administration were $(3\ 304.23 \pm 1\ 043.30) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(3\ 760.86 \pm 754.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ were $(7.37 \pm 4.09) \text{h}$ and $(6.04 \pm 2.63) \text{h}$, $\text{AUC}_{(0-t)}$ were $(15\ 052.91 \pm 3\ 878.01) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(15\ 374.91 \pm 2\ 712.20) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The fluvastatin extended-release tablet shows a significant sustained release effect, and good security but not obvious accumulation phenomenon during repeated administration.

KEYWORDS: fluvastatin; extended-release tablet; pharmacokinetics; release degree *in vitro*

氟伐他汀钠为他汀类降血脂药, 属于羟甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂, 是一种全合成的亲水性降胆固醇药物^[1-2]。氟伐他汀钠胶囊剂(商品名: Lescol[®])于1993年在美国上市, 规格为20, 40 mg, 临床上主要用于高胆固醇及高脂血症的治疗。2009年美国诺华制药公司开发的氟伐他汀钠缓释片(商品名: Lescol[®]XL)批准上市, 规格为80 mg, 每日给药1次。

氟伐他汀钠具有半衰期短、无活性代谢产物以及肝脏首过效应明显等特点。由于半衰期仅0.5~1.2 h,

普通的氟伐他汀钠胶囊每天需要多次给药才能维持疗效, 且可能引发肝脏的首过饱和性, 增加进入循环系统的药量, 进而增加全身不良反应的发生率^[3-4]。将氟伐他汀钠制备成缓释制剂, 可以延长肠道吸收时间, 避免肝脏首过效应, 提高药物疗效, 降低不良反应, 具有较大的临床应用价值。目前国家药品监督管理局仅批准北京诺华制药公司生产的氟伐他汀钠缓释片上市。本实验研制了氟伐他汀钠缓释片, 进行体外释放度以及Beagle犬体内药动学研究, 为人体内药动学研究及其临床应用提供参考。

作者简介: 徐兵勇, 男, 硕士, 工程师 Tel: 13605819823 E-mail: 672852917@qq.com *通信作者: 平丽, 女, 硕士, 实验师 Tel: 18857112846 E-mail: 627463895@qq.com

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); Xevo TQ 超高效液质联用仪, 配备 Xevo TQ 三重四极杆质谱仪和 Masslynx 工作站(美国 Waters 公司); ZRS-8G 型溶出仪(天津大学无线电厂); XS205 型电子天平(瑞士梅特勒公司)。

1.2 试剂

氟伐他汀钠对照品(浙江海正药业, 批号: 12111001; 含量: 99.6%); 辛伐他汀对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100601-200502; 含量: 99.8%); 乙腈和甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

Beagle 犬 8 只, ♀♂各半, 体质量 8.7~10.6 kg, 由南京安立默科技有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(苏)2010-0002。

2 方法和结果

2.1 氟伐他汀钠缓释品的制备

称取处方量氟伐他汀钠 84.5 g(相当于氟伐他汀 80 g)、羟丙甲纤维素 K15M 80 g、微晶纤维素 120 g, 等量递增法混匀, 加 95%乙醇 PVP-K30 溶液制备软材, 过 20 目筛制粒, 60 °C 干燥, 过 18 目筛整粒。加入处方量的硬脂酸镁和微粉硅胶于颗粒中, 混合均匀。测定中间体含量, 压片。将欧巴代胃溶包衣粉溶于水, 搅拌溶解, 取氟伐他汀钠缓释片芯, 称重后置包衣锅内, 调节适宜转速, 向锅内喷包衣溶液适量, 同时吹热风, 当片剂增重约 3%时, 停止包衣、干燥即得。

2.2 体外释放度的测定

2.2.1 释放度测定方法 取本品, 照释放度测定法(中国药典 2015 年版四部 0931), 采用浆法, 转速为 50 r·min⁻¹, 释放介质为 900 mL 水。采用 HPLC 定量测定, 以十八烷基键合硅胶为填充剂, Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.1%磷酸(50:50)为流动相, 检测波长为 234 nm^[5], 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL, 柱温为 25 °C。

2.2.2 专属性试验 称取适量的空白辅料与氟伐他汀钠对照品, 用 900 mL 水溶解, 滤过, 分别作为空白对照和氟伐他汀钠对照溶液, 取 20 μL 注入

液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 结果见图 1。试验结果表明, 空白辅料色谱图在主峰处均无色谱峰出现, 对释放度测定无干扰。

2.2.3 线性关系考察 精密称取氟伐他汀钠对照品 5.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用释放介质溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液, 精密量取对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加释放介质稀释至刻度, 摇匀。注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 以各对照品浓度为横坐标(C), 峰面积为纵坐标(A), 得线性回归方程: $A=73.21C+25.22(r=0.9999)$, 结果表明在 5~100 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

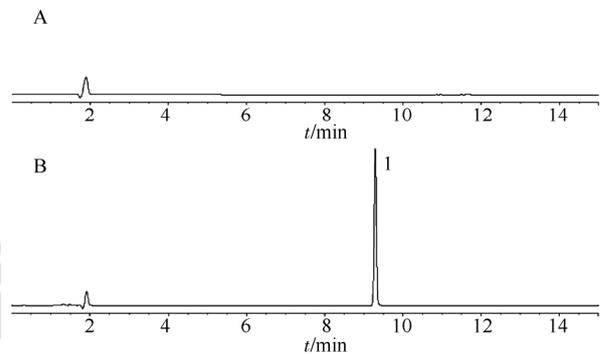


图 1 高效液相色谱图

A-空白对照溶液; B-对照品溶液; 1-氟伐他汀钠。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A-blank control solution; B-reference solution; 1-fluvastatin sodium.

2.2.4 加样回收率试验 精密称取氟伐他汀钠对照品 7.0 mg(相当于处方量 80%)、9.0 mg(相当于处方量 100%)、11.0 mg(相当于处方量 120%), 分别置于 100 mL 量瓶中, 按处方比例加入空白辅料, 用适量释放介质溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 计算平均回收率为 98.8%(n=9), RSD 值为 1.68%。

2.2.5 仪器精密度 按“2.2.3”项下方法配制浓度为 90 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积的 RSD 值为 0.55%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 样品溶液稳定性 按“2.2.3”项下方法配制浓度为 90 μg·mL⁻¹ 供试品溶液, 室温条件下放置 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”

项下色谱条件进样测定,记录色谱图,主成分峰面积 RSD 为 1.85%,样品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.7 释放度的测定 制备 3 批氟伐他汀钠缓释片,采用“2.2.1”项下释放度测定方法测定其累积释放度,结果见图 2。

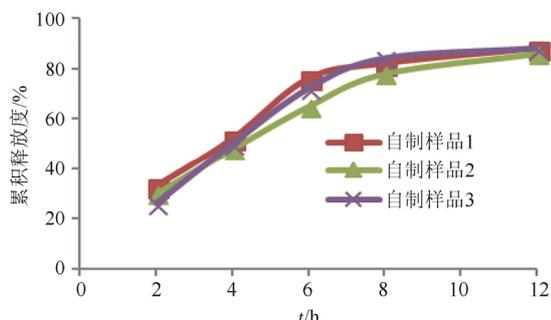


图 2 氟伐他汀钠缓释片释放度曲线

Fig. 2 Results of release curve of fluvastatin extended-release tablet

2.3 氟伐他汀钠缓释片在 Beagle 犬体内的药动学研究

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 以 0.1%甲酸为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 进行梯度洗脱(0.00~2.00 min, 90%→5%A; 2.01~3.50 min, 5%A; 3.51~4.00 min, 5%→90%A; 4.01~5.00 min, 90%A); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 7 μL。

2.3.2 质谱条件 采用多反应检测扫描(multi reaction monitoring, MRM)模式; 离子化方式: 电喷雾离子化(ESI); 电离电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 30 V; 源温: 150 °C; 雾化温度: 400 °C; 锥孔气流速: 50 L·h⁻¹; 碰撞气流速: 0.15 mL·min⁻¹; 雾化气流速: 800 L·h⁻¹。采用正离子 MRM 方式检测, MRM 检测参数见表 1。

表 1 MRM 检测参数表

Tab. 1 MRM detection parameters

名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	裂解电压/V	碰撞能量/eV
氟伐他汀钠	412.16	223.96	30	30
辛伐他汀	419.29	199.10	16	10

2.3.3 贮备液的配制 精密称取 10 mg 氟伐他汀钠对照品,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,制得 1 mg·mL⁻¹储备液,置低温避光保存备用。精密量取氟伐他汀钠储备液适量,分别用甲醇稀释成不同浓度的氟伐他汀钠对照品系列溶液。精密称取

10 mg 内标辛伐他汀对照品,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,制得 1 mg·mL⁻¹储备液,用乙腈稀释成浓度为 10 ng·mL⁻¹辛伐他汀对照品溶液,置低温避光保存备用。

2.3.4 血浆样品预处理 使用乙腈沉淀蛋白,取 0.2 mL 待测血浆样品加入 2 mL 离心管中,加入 0.6 mL 含 10.0 ng·mL⁻¹内标辛伐他汀的乙腈溶液,涡旋 1 min, 10 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液进行 LC-MS/MS 分析,进样体积 7 μL。

2.3.5 给药方案及血样采集 单剂量给药时,8 只 Beagle 犬口服氟伐他汀钠缓释片 1 片(80 mg),给药后 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 36, 48 h 四肢静脉交替采血。在单剂量试验结束后,8 只 Beagle 犬继续进行多剂量给药试验,即于试验的第 2~5 天每天给药 1 次,连续 4 d。并于第 5 天在给药前及给药后各时间点(同单剂量给药的时间点)抽取静脉血 0.5 mL。于给药的第 3~5 天在早晨给药前分别抽血 1 次,测定血药谷浓度,以观察是否达到稳态。抽取的血样置于肝素化试管内,以 4 500 r·min⁻¹离心 10 min,分离血浆,置 -20 °C 冰箱保存待测。

2.3.6 专属性试验 在“2.3.1”项下色谱条件和“2.3.2”项下质谱条件,血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定,且氟伐他汀钠和内标的峰形对称,分离度很好。氟伐他汀钠和内标的保留时间分别为 2.01, 2.58 min。结果见图 3。

2.3.7 线性关系考察及最低定量限测定 取空白 Beagle 犬血浆 190 μL,加入氟伐他汀钠系列浓度 10 μL,配制成为氟伐他汀钠血浆终浓度分别为 0.625, 10, 100, 500, 1 000, 5 000 ng·mL⁻¹的血浆样品。按“2.3.4”项下方法操作,建立标准曲线。以待测物浓度为横坐标(X),待测物与内标物色谱图的峰面积比值为纵坐标(Y),用加权(W=1/X)最小二乘法进行回归运算^[6],求得直线回归方程,即得标准曲线: Y=0.617 6X+1.304 2(r=0.999 2),结果表明,氟伐他汀钠在 0.625~5 000 ng·mL⁻¹内线性关系良好,最低定量限为 0.625 ng·mL⁻¹。

2.3.8 精密度与回收率试验 取空白 Beagle 犬血浆 190 μL,制备氟伐他汀钠低、中、高 3 个质控浓度(2, 100, 1 000 ng·mL⁻¹)的质控样品,按“2.3.4”项下方法操作,每个浓度进行 5 样本分析,连续测定 3 d,根据当日的标准曲线,计算质

控样品的测得浓度, 根据质控样品结果考察日内、日间精密度。另取犬空白血浆 190 μL , 按“2.3.4”项下方法操作, 移取上清液后精密加入氟伐他汀钠质控液(相当于氟伐他汀钠血浆药物浓度 2, 100, 1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 以每一浓度质控样品获得的峰面积与未经提取直接获得的峰面积之比计算提取回收率。结果见表 2。

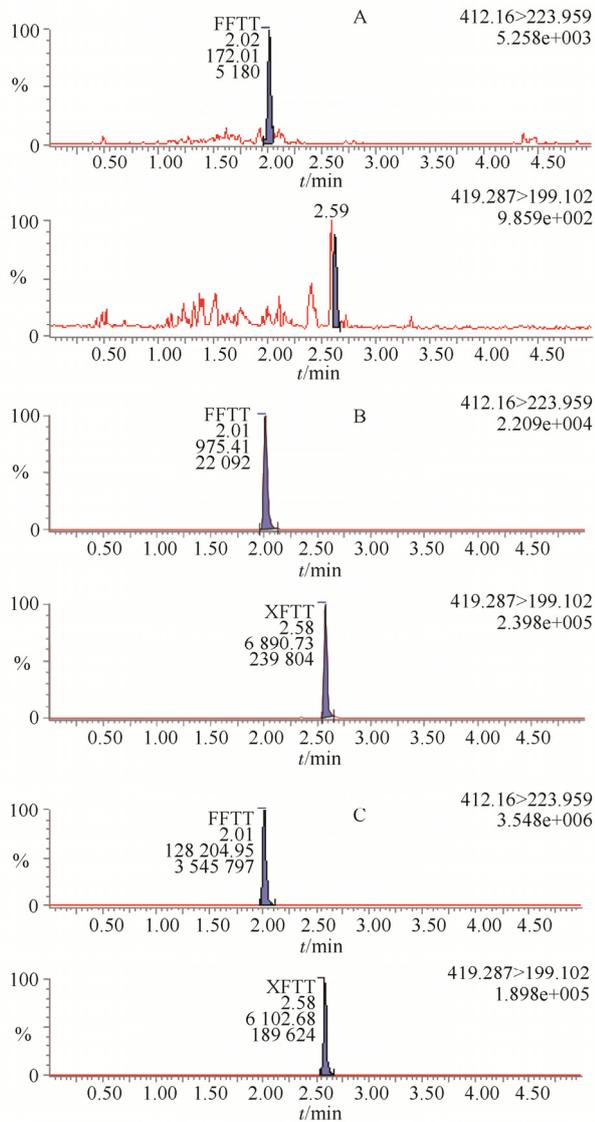


图 3 氟伐他汀钠和内标 LC/MS/MS 色谱图
A-空白血浆; B-空白血浆+对照、氟伐他汀钠 0.625 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、辛伐他汀 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; C-Beagle 犬口服氟伐他汀钠 1 h 后的血浆样品。

Fig. 3 LC-MS/MS chromatograms of fluvastatin sodium and internal standard

A-blank plasma; B-blank plasma+control, fluvastatin sodium 0.625 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, simvastatin 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; C-plasma samples from Beagle dogs after oral administration of fluvastatin sodium for 1 h.

2.3.9 稳定性试验 取空白 Beagle 犬血浆 190 μL , 加入适量浓度氟伐他汀钠对照品溶液

10 μL , 制备氟伐他汀钠低、中、高(2, 100, 1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的质控样品, 按“4.4”项下方法操作, 每个浓度进行 3 样本分析, 考察经 3 次 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻-室温溶解循环, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻放置 7 d 及处理后的质控样品室温放置 24 h 的稳定性, 结果见表 3。

表 2 氟伐他汀钠精密度及回收率试验($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Results of precision and recovery test($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

加入浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD		回收率/ %
		日内/%	日间/%	
2	2.0±0.1	4.8	5.7	95.9±10.8
100	92.2±4.7	3.3	5.0	93.5±4.9
1 000	967.7±9.8	5.2	9.8	91.2±5.7

表 3 氟伐他汀钠稳定性结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Results of stability test($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

条件	加入 QC 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得 QC 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/ %
3 次 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻- 室温溶解循环	2	1.9±0.1	5.4
	10	97.1±7.0	7.2
	1 000	933.4±83.7	9.0
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻放置 7 d	2	2.0±0.1	4.6
	10	92.7±4.6	5.0
	1 000	971.5±125.8	12.9
24 h 室温放置	2	1.9±0.1	5.3
	10	95.1±8.7	5.6
	1 000	901.4±24.5	2.8

2.3.10 药时曲线及药动力学参数计算 按“2.3.4”项下方法操作, 每个分析批制备 1 条标准曲线, 同时制备低、中、高(2, 100, 1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个质控浓度的质控样品, 质控样品数量 \geq 每个分析批中样品总量的 5%。根据每一分析批的标准曲线计算质控样品和血浆样品的浓度, 质控样品的浓度 \leq 理论值的 15%, 本实验每个分析批测得的质控样品浓度为理论浓度的 89.31%~107.82%。8 只 Beagle 犬单剂量和多剂量口服氟伐他汀钠缓释片的平均药时曲线见图 4。采用 DAS 3.0 软件计算 8 只 Beagle 犬单剂量和多剂量口服氟伐他汀钠缓释片的主要药动力学参数, 结果见表 4。

3 讨论

氟伐他汀钠半衰期较短(0.5~1.2 h), 本实验采用羟丙甲纤维素(HPMC K15M)为亲水凝胶骨架材料, 制备氟伐他汀钠缓释片, 并建立了体外释放度测定方法, 制备 3 批氟伐他汀钠缓释片进行体外释放度测定, 样品批间释放均一性良好。

表 4 单剂量和多剂量口服氟伐他汀钠缓释片的主要药动学参数

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters of fluvastatin sodium after single dose and multi dose oral administration of fluvastatin sodium sustained release tablets

药动学参数	单剂量	多剂量
$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3 304.23±1 043.30	3 760.86±754.77
T_{max}/h	2.94±0.73	3.19±0.88
$T_{1/2}/\text{h}$	7.37±4.09	6.04±2.63
$AUC_{(0-t)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	15 052.91±3 878.01	15 374.91±2 712.20
$AUC_{(0-\infty)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	15 148.65±3 893.26	15 409.27±2 696.66
$MRT(0-t)/\text{h}$	6.07±1.89	6.32±1.19
$CL/L\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	5.63±1.58	5.34±1.01
$C_{av}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-	624.89±116.96
DF/%	-	6.18±1.71

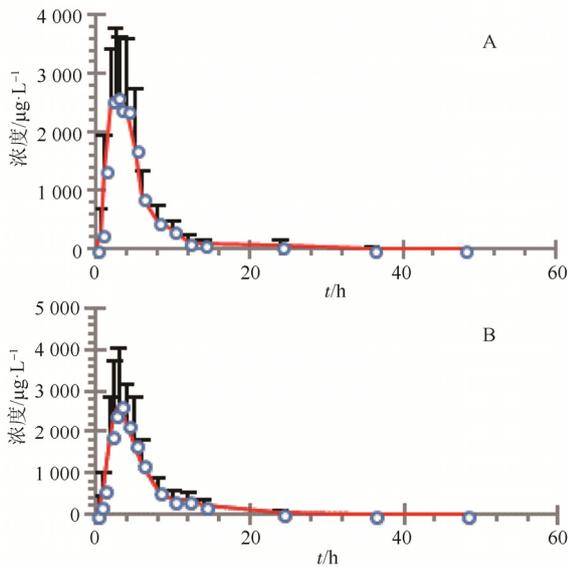


图4 单剂量(A)和多剂量(B)口服氟伐他汀钠缓释片平均药时曲线

Fig. 4 Mean plasma concentration time curves of fluvastatin sodium after single dose(A) and multi dose(B) oral administration of fluvastatin sodium sustained release tablets

建立了LC-MS/MS测定Beagle犬血浆中氟伐他汀钠浓度的方法,此法具有良好的专属性,氟伐他

汀钠、内标物与犬血浆中的内源性杂质能较好地分离,方法的精密度、准确度及稳定性等结果均符合生物样品分析要求。将制备氟伐他汀钠缓释片进行Beagle犬体内药动学研究,结果表明,单剂量或多剂量口服氟伐他汀钠缓释片后,血药浓度在2.5~3.5 h达峰值, T_{max} 、MRT等参数与文献[7-8]中氟伐他汀钠普通片相比均明显延长,说明氟伐他汀钠缓释片具有较好的缓释特征。单剂量给药与多剂量给药相比, AUC和 C_{max} 进行对数转换,各组药动学参数进行配对t检验,均无显著性差异,表明氟伐他汀钠缓释片多次给药未出现明显的蓄积现象,表现出良好的安全性。

REFERENCES

- [1] 韩秀峰, 刘广辉. 单用氟伐他汀钠及联用那格列奈片时体内药代动力学特点分析[J]. 中国处方药, 2016, 14(9): 33-34.
- [2] TIAN G H, ZHAO Z X. Levetiracetam-a novel antiepileptic drug with a unique preclinical profile [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2006, 25(10): 782-785.
- [3] 林义兆, 张如钿, 郑晨曦, 等. 氟伐他汀钠胶囊和缓释剂型的疗效比较[J]. 中外医学研究, 2012, 10(29): 124.
- [4] LUO X, SHI L M, WANG R L. Clinical Pharmacokinetics of Fluvastatin extended release formulation [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 2010, 19(18): 1680-1683.
- [5] ZHANG S J, XU F L, ZHANG G B. Determination of fluvastatin sodium extended-release tablets by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2007, 18(34): 2698-2699.
- [6] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 343-346.
- [7] ZHAO N, ZHAO X, XU J Y, et al. Study on pharmacokinetics of fluvastatin in healthy subjects after single and multiple doses of porolonged-extended release fluvastatin and immediate-release fluvastatin [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2014, 30(8): 689-692.
- [8] YANG M F, XU WW, CHENG X H. Effect of oleanolic acid on the pharmacokinetics of fluvastatin in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(6): 811-814.

收稿日期: 2018-02-06

(本文责编: 曹粤锋)