

· 研究简报 ·

有限采样法估算中国健康志愿者氨氯地平药时曲线下面积

王 鲲, 盛玉成, 何迎春, 杨 娟, 张 密, 许 聆, 石劲敏, 郑青山*

(上海中医药大学药物临床研究中心, 上海 201203)

关键词: 氨氯地平; 有限采样法; Jackknife; Bootstrap; 药时曲线下面积

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 12-1582-05

Limited sampling strategy models for estimating AUC for amlodipine in Chinese healthy volunteersWANG Kun, SHENG Yu-cheng, HE Ying-chun, YANG Juan, ZHANG Mi, XU Ling,
SHI Jin-min, ZHENG Qing-shan*

(Center for Drug Clinical Research, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study aims to save cost of sampling for estimating the area under the amlodipine plasma concentration versus time curve in 24 hours ($AUC_{0-24\text{ h}}$). Limited sampling strategy (LSS) models was developed and validated by multiple regression model within 4 or fewer amlodipine concentration values. Absolute prediction error (APE), root of mean square error (RMSE) and visual predict check were used as criterion. The results of Jackknife validation showed that fifteen (9.4%) of the 160 LSS based on regression analysis were not within an APE of 15% by using one concentration-time point. 156 (97.5%), 159 (99.4%) and 160 (100%) of the 160 LSS model were capable of predicting within an APE 15% by using 2, 3, 4 points, separately. Limited sampling strategies have been developed and validated for estimating $AUC_{0-24\text{ h}}$ of amlodipine. The present study indicated that the implementation of both 5 mg and 10 mg dosage could enable accurate predictions of $AUC_{0-24\text{ h}}$ by the same LSS model. This study shows that 12, 4, 24, 2 h after administration are key sampling time points. The combination of (12, 4), (12, 4, 24) or (12, 4, 24, 2 h) might be chosen as sampling hours for predicting $AUC_{0-24\text{ h}}$ in practical application according to requirement.

Key words: amlodipine; limited sampling strategy; Jackknife; Bootstrap; AUC

有限采样法 (limited sampling strategy, LSS) 由 Johnston A 等^[1]于 1990 年提出, 可应用于治疗药物监测的统计学方法, 用有限的采样点建立数学模型, 对监测药物的治疗参数如药时曲线下面积 (AUC) 等进行较为准确的估算。已经有文献^[2]报道有些 AUC 和药效动力学相关。临床上通过监测 AUC 作为调整治

疗患者的给药方案参考的方法已被大量使用。然而, AUC 的计算依赖于足够多的采血点数据, 多次采血往往使患者难以接受。使用有限采样技术可以在保证 AUC 监测质量的前提下, 减少采血点 (只用 2~4 个点), 这一方面可以大大减少患者的痛苦, 显著减少医护人员的采血工作及分析成本, 另一方面, 也可以处理部分采血点数据缺失的情形。至今已经有一些应用有限抽样技术监测 AUC 的可行性研究^[3-8]。

氨氯地平为一线抗高血压及心绞痛药物, 有研究^[2]表明氨氯地平的药浓度与降压效果有线性关系。本研究使用了 4 个人体生物等效性临床试验共

收稿日期: 2010-06-25.

基金项目: 上海市教委创新项目 (10YZ61); 预算内科研项目 (09JW17);
上海市高校 E 研究院项目 (E0308); 创新团队建设项目和
上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目
(szy08061).

*通讯作者 Tel: 86-21-51323006, E-mail: zhengqscn@21cn.com

160 例药时数据,应用有限采样法建立模型估算 AUC, 目的在于只用有限几个采血点来估计 AUC, 且保证一定的准确度。这样可以采取少数几个关键的时间点采血, 优化治疗药物监测, 减少对计算 AUC 影响不大的采血点, 从而降低研究成本, 对研究药效学与药动学之间的关系有重要意义。

材料与方法

研究对象与方法 数据来自 4 个随机双交叉氨氯地平人体生物等效性试验, 每试验组有 20 人分别服用苯磺酸氨氯地平参比剂及试验药, 共有 80 名受试者 160 例数据。所有受试者均为健康男性, 年龄为 21.7 ± 1.1 (19~25) 岁, 身高 (cm) 为 171.5 ± 5.8 (157~186), 体重 (kg) 为 63.4 ± 6.7 (51~87)。试验制剂和参比制剂来自辉瑞、彼迪、云鹏、俞氏、新斯顿和东瑞等 6 家制药公司。在安徽、辽宁等 3 家医院完成试验, 试验前均已签署知情同意书, 通过伦理委员会批准。

服药前受试者禁食过夜 (10 h 以上), 次日早晨 7:30 空腹服用药物, 用温开水 200 mL 送服, 分别于服药前 (0 h)、服药后 1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96、120 和 144 h 从静脉采血 3 mL, 取血清, 于 -20°C 储存, 用于血药浓度检测。其中 5 mg 为普通片剂, 10 mg 为分散片, 试验为双周期随机交叉设计, 洗脱期为 2 周。

药物浓度分析方法 5 mg 组血浆中苯磺酸氨氯地平浓度和 10 mg 组血浆中的苯磺酸左旋氨氯地平浓度均采用 LC-MS/MS 内标法测定^[9]。实验仪器主要有: Finnigan TSQ Quantum Discover Max 型 LC-MS/MS 联用仪, ESI 离子源; TGL-16H 高速离心机; XS105 电子天平; XW-80A 微型旋涡混合仪。血浆中内源性物质不干扰样品测定, 检测方法的灵敏度、特异性、精密度、准确度、标准曲线、样品稳定性及质控均符合生物样品分析要求。

数据分析 所有受试者按方案完成试验, 4 个等效试验的 AUC_{0-n} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 的 90% 可信限在 80%~125% 内, $C_{\max}$ 90% 的可信限在 70%~143% 之间, 双向单侧 t 检验提示均为试验药和参比药具有生物等效性。

有限采样分析方法 应用 7 个采血时间点 (1, 2, 4, 6, 8, 12 和 24 h) 估算 $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$, 方程式为 $\text{AUC}_{0-24\text{ h}} = A_0 + A_1 \times C_1 + A_2 \times C_2 + \dots + A_n \times C_n$, C_n 和 A_n 分别表示用于建模的第 n 个采血点的血药浓度和系数。用 7 个采样点以梯形法计算 $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$ 近似作为实测值,

从这 7 个点中分别选取 1、2、3 和 4 个点代入上述方程作为有限采样点估算 $\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$, 所有可能组合数为 $C_7^1 + C_7^2 + C_7^3 + C_7^4$, 共 98 个回归方程。计算求解所有方程的回归系数, 按决定系数 r^2 及参数个数排序。 r^2 作为检测模型优劣的一个重要参数, 同时采用一阶 Jackknife 方法^[10, 11]验证模型, 总例数为 160 例, 每次切掉 1 例, 用其他 159 例计算拟合参数得到回归方程估算切掉的 1 例, 采用绝对预测误差 (absolute prediction error, APE) 和均方根误差 (root of mean square error, RMSE) 来评价模型, 见式 (1)、(2)。

$$\text{APE} (\%) = (|\text{Pred} - \text{Obs}|) / \text{Obs} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{(1/N) \times \sum (\text{APE})^2} \times 100\% \quad (2)$$

式中 Pred 为模型预测值, Obs 为实测值。如此方法逐一切掉每个例数并计算, 共得到 160 个结果。

另外也做了预测值和实测值的关系分析, 并以实测值的加減 10% 和 15% 线作为参考线。用非参数 Bootstrap 方法^[12]进行了参数的可信区间的估计。针对 1、2、3 和 4 个采样点分别选出最佳模型用 Bootstrap 方法抽样 2000 次来计算中位数及 95% CI。程序采用 Excel 的 VBA 语言编写。

结果

1 典型药时曲线和药动学参数

8 个组的平均血药浓度曲线见图 1。图中相同形状的实心与空心符号为一对等效性试验。从图中可以看出, 5 mg 组药时曲线基本一致, 10 mg 组为分散片, 药时曲线形状略不同于其他 5 mg 组, 但 AUC 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用非房室模型拟合得到的参数见表 1。5 mg 组和文献^[2]报道结果相符。苯磺酸氨氯地平包括左旋和右旋两种成分, 其中左旋成分的药效是右旋成分的近千倍。有文献^[13]报道 5 mg 的左旋氨氯地平同 10 mg 的氨氯地平相比左旋成分的药代参数无显著差异。在本文中 10 mg (苯磺酸氨氯地平分散片) 组检测的是血液中苯磺酸左旋氨氯地平浓度, 因此, AUC 和 5 mg 组无明显区别。

2 有限采样的多元回归方程

对数据首先进行正态性检验, 由于数据符合正态分布, 因此未做对数转换。计算 1~4 个采血点估算 AUC 的所有组合后, 按决定系数排序后各取数值最大的 2 或 3 个方程, 共 14 个, 结果见表 2。1 个采样点的最高决定系数为 0.871, 最佳采样点为 12 h; 2 个采样点的最高决定系数为 0.944, 最佳点为 (12, 4) h;

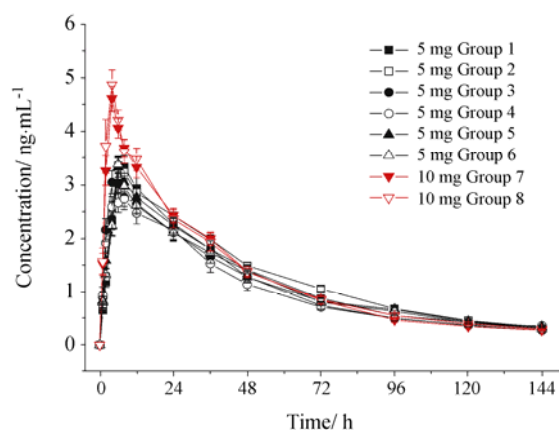


Figure 1 Concentration-time curve of amlodipine after administration of 5 mg or 10 mg amlodipine orally to 8 Chinese health volunteer groups. The two groups of data collected from the same bioequivalence study were indicated by solid and empty symbols with sample shape. Values are given as mean $\pm$ SE

Table 1 Pharmacokinetic parameters of amlodipine in healthy Chinese volunteers. $\bar{x} \pm s$

Parameter	5 mg (n = 120)	10 mg (n = 40)
$AUC_{0-t} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	160.80 ± 47.80	176.16 ± 51.53
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	181.67 ± 57.70	190.23 ± 54.40
$t_{1/2} / \text{h}$	42.92 ± 24.70	31.59 ± 5.94
$t_{\text{max}} / \text{h}$	7.12 ± 2.75	4.35 ± 1.75
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	3.41 ± 0.81	5.04 ± 1.36

3 个采样点的最高决定系数为 0.981, 最佳采样点为 (24, 12, 4); 4 个采样点最高决定系数为 0.987, 采样时间点为 (24, 12, 6, 4) 或 (24, 12, 6, 2)。

3 模型验证

回归方程的决定系数可作为模型优劣的一个重要指标, 但决定系数无法反映模型稳定性问题。因此, 本文应用 Jackknife 法做内部验证^[10, 11]。按对象与方法部分所述每次切去一个样本的结果见表 3, 当只使

Table 2 Coefficient of determination of some of the best linear equations for estimation of $AUC_{0-24 \text{ h}}$ in 1–4 sampling times strategy

Sampling time/h	r^2	Linear equation
12	0.871	$11.905 + 17.750 \times C_{12}$
8	0.790	$7.887 + 17.413 \times C_8$
12, 4	0.944	$8.580 + 14.225 \times C_{12} + 4.415 \times C_4$
12, 6	0.929	$2.620 + 12.777 \times C_{12} + 6.990 \times C_6$
12, 2	0.919	$11.267 + 15.567 \times C_{12} + 3.374 \times C_2$
24, 12, 4	0.981	$3.103 + 7.143 \times C_{24} + 10.538 \times C_{12} + 4.408 \times C_4$
24, 12, 2	0.964	$5.138 + 7.921 \times C_{24} + 11.320 \times C_{12} + 3.601 \times C_2$
12, 6, 4	0.960	$4.160 + 12.347 \times C_{12} + 4.029 \times C_6 + 3.177 \times C_4$
24, 12, 6, 4	0.987	$0.927 + 6.285 \times C_{24} + 9.775 \times C_{12} + 2.587 \times C_6 + 3.617 \times C_4$
24, 12, 4, 2	0.987	$3.455 + 7.464 \times C_{24} + 10.327 \times C_{12} + 3.221 \times C_4 + 1.527 \times C_2$
24, 12, 8, 4	0.986	$1.453 + 6.281 \times C_{24} + 8.835 \times C_{12} + 2.962 \times C_8 + 4.113 \times C_4$

用一个参数建模时, 有 46 (28.8%) 例预测结果误差超过了 10%, 15 (9.4%) 例的预测结果误差超过 15%, 可见, 只用一个参数估计准确度和稳定性较差。而采用两个参数预测结果有显著提高, 两点 (12, 4) 估计的 RMSE 较小, 预测误差也优于其他 3 组, 因此 (12, 4) 为采用两点估算时的最佳采样点。采用 3 个点 (24, 12, 4) 的有限采样模型除决定系数有较大提高外, RMSE 和超过 10%、15% 预测误差的个数也显著减小, 为最佳采样点。采用 4 个点估计的准确度进一步提高, 有 (24, 12, 6, 4) 和 (24, 12, 4, 2) 两种组合决定系数可达到 0.987, 但后者预测误差均在 15% 以内, 且只有 1 例超过 10%, RMSE 增加较小, 因此后者较佳。1~4 个点的最佳组合分别为 (12)、(12, 4)、(24, 12, 4)、(24, 12, 4, 2), 即关键时间点重要程度排序依次为 12, 4, 24, 2。

这 4 种最佳组合的模型参数的 95% 可信区间的计算采用了 Bootstrap 方法^[12], 这一方法也适合非正

Table 3 Jackknife validation of absolute prediction error (APE) and root of mean square error (RMSE) in the different sampling strategies for prediction of $AUC_{0-24 \text{ h}}$. a: Lower limited prediction error; b: Up limited prediction error; c: Number and ratio of calculated $AUC_{0-24 \text{ h}}$ with a prediction error beyond 10%; d: Number and ratio of calculated $AUC_{0-24 \text{ h}}$ with a prediction error beyond 15%

Sample time/h	r^2	RMSE	L_{APE}^a	U_{APE}^b	>10% N (%) ^c	>15% N (%) ^d
12	0.871	10.23	0.174	32.827	46 (28.8)	15 (9.4)
8	0.790	13.38	0.089	39.381	72 (45.0)	45 (28.1)
12, 4	0.944	6.83	0.000	37.314	17 (10.6)	4 (2.5)
12, 6	0.929	7.04	0.024	20.123	28 (17.5)	10 (6.3)
12, 2	0.919	8.44	0.011	25.821	33 (20.6)	14 (8.8)
24, 12, 4	0.981	4.10	0.013	20.117	2 (1.3)	1 (0.6)
24, 12, 2	0.964	5.92	0.009	20.723	14 (8.8)	4 (2.5)
12, 6, 4	0.960	5.68	0.003	30.486	12 (7.5)	2 (1.3)
24, 12, 6, 4	0.987	3.38	0.007	17.672	3 (1.9)	1 (0.6)
24, 12, 4, 2	0.987	3.46	0.031	10.419	1 (0.6)	0 (0.0)
24, 12, 8, 4	0.986	3.38	0.006	15.745	3 (1.9)	1 (0.6)

态分布的数据。95%置信区间的计算采用抽样 2 000 次, 取 0.025 和 0.975 分位数的方法, 结果见表 4, 所有参数的 95%置信区间均不包括零。

为了更直观评价预测的准确程度, 作者做了有限采样的 B-A 关联图^[14]。图 2 中 a, b, c 和 d 分别为取 1, 2, 3 和 4 个采样点的所有可能组合中的最佳组合做图。图中同形状的实心、空心标记符号为一对等效试验组。横坐标为观测值和预测值的均值, 纵坐标为观测值减预测值的百分比误差, 中心水平为零误差线, 所有的点越集中在零误差线附近, 则说明其准确度越高。点虚线为 15%预测误差线, 虚线为 10%预测误差线。图 2a 中有许多点落在 15%预测误差线外, 对 10 mg 组的部分点估计偏低而对 5 mg 组的部分点估计偏高, 表明用一个时间点估计 AUC 的不确定性较大。而采用两个点后结果有很大改善, 见图 2b, 只有

少数几个点超过 15%预测误差线。若采用 3 个采样点, 预测精度进一步提高, 体现出很好的线性, 决定系数接近于 1 ($r^2 = 0.981$)。采用 4 个点, 大多数点 (99.5%) 预测误差都在 10%预测误差线内 (仅 1 例预测误差 > 10% 为 11.4, 占总数的 0.6%), 达到了非常高的精度。在实际应用中可参考实际情况按需选择。在图 2d 中可以看到 5 mg 组同 10 mg 组都可以很好的拟合。

模型的进一步外部验证选用文献^[15]中人体药动学研究数据。18 名健康受试者口服 10 mg 苯磺酸氨氯地平分散片, 试验为双交叉设计, 共 36 例数据。采用 2~4 个点的有限采样模型预测的 $AUC_{0-24\text{h}}$ 结果见表 5。两点预测的 RMSE 值为 10.93, 略大于内部验证误差 6.83, 且有一半的预测误差大于 10%, 有 4 (11.1%) 例预测误差大于 15%。采用 3、4 个采样点预测结果有显著提高, 两个方程结果比较接近。

Table 4 The median (95% CI) of the intercept and the coefficient (A_i) results of different LSS (limited sampling strategy) model calculated by using Bootstrap method

Sample time/h	Intercept	A_1	A_2	A_3	A_4
12	11.91 (8.31–15.01)	17.74 (16.6–19.13)			
12, 4	8.57 (6.42–10.48)	14.21 (13.32–15.33)	4.41 (3.82–4.95)		
24, 12, 4	3.11 (2.07–4.14)	7.13 (6.45–7.8)	10.53 (10.07–11.07)	4.41 (4.05–4.74)	
24, 12, 4, 2	3.45 (2.65–4.25)	7.46 (6.86–8.13)	10.31 (9.85–10.8)	3.22 (2.95–3.56)	1.53 (1.22–1.74)

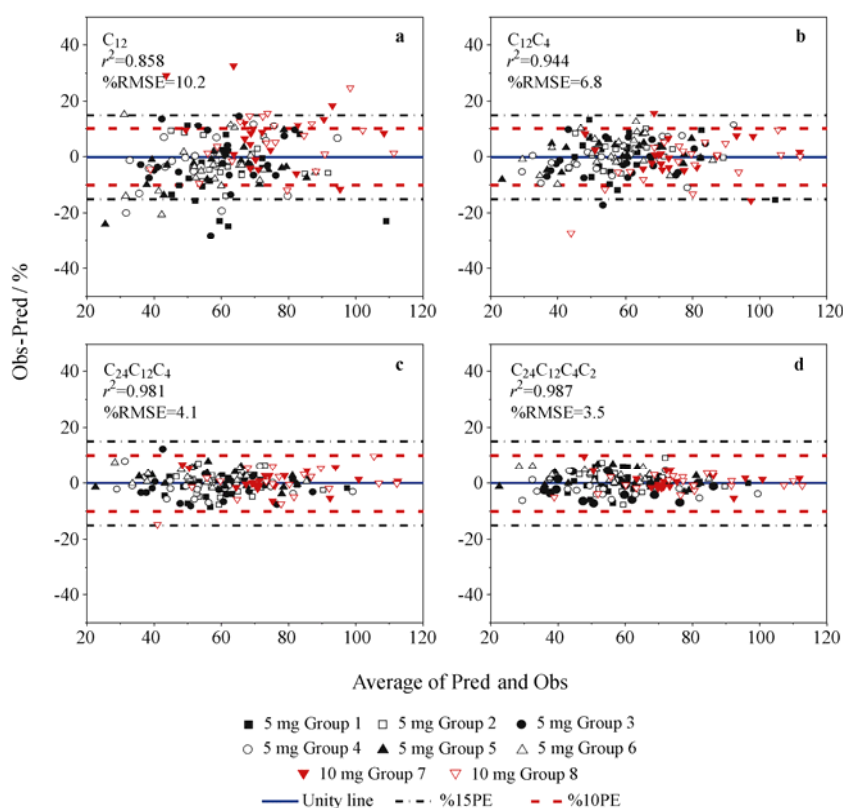


Figure 2 B-A plots of $AUC_{0-24\text{h}}$ predicted by each LSS. Pred: Value of prediction; Obs: Value of observation. a: 1-sample LSS; b: 2-sample LSS; c: 3-sample LSS; d: 4-sample LSS

Table 5 Predictive performance for the LSS for prediction of $AUC_{0-24\text{ h}}$ for 10 mg amlodipine orally to 36 Chinese health volunteers

LSS equation	RMSE	L_{APE}	U_{APE}	>10% N (%)	>15% N (%)
$8.58+14.23\times C_{12}+4.42\times C_4$	10.93	3.11	20.65	18 (50.0)	4 (11.1)
$3.10+7.14\times C_{24}+10.54\times C_{12}+4.41\times C_4$	6.04	0.41	13.65	2 (5.6)	1 (2.8)
$3.46+7.46\times C_{24}+10.33\times C_{12}+3.22\times C_4+1.53\times C_2$	5.70	0.33	11.67	2 (5.6)	1 (2.8)

讨论

有限采样以采样点同 AUC 之间存在线性关系为基础,除了可以对 AUC 应用有限采样策略外,其他指标(如 $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 等)也可以尝试。随着取点数选取的增加,有限采样的模型估算准确度会逐渐提高,但这也意味着成本的增加。本研究采用多元回归模型,借助计算机编程实现计算 1~4 个点的所有可能组合,按决定系数排序。这种方法和逐步法相比可更直接方便的实现优选。本例中应用了较大样本量的数据,得到的回归模型相对可靠,特别对于同本例受试者相似的样本有较大参考价值。在做多元回归模型建模过程中需做正态检验,若数据符合对数正态分布,则需要对数转换。有限采样模型参数 95% CI 的计算采用了非参数 Bootstrap 方法,所有 95% CI 不包括零。在建模过程中,也考虑过体重是否会对模型有影响,但结果发现其影响很小,无统计学意义。这意味着不必引入体重对血药浓度进行修正,采样点的血药浓度较低可能对应较低的 AUC,血药浓度较高则可能对应较高的 AUC,但都可能应用同样的公式预测。本例对苯磺酸氨氯地平及左旋苯磺酸氨氯地平组一起建模,通过 Jackknife 方法作内部验证,应用 Bootstrap 方法计算了 95% 置信区间,并采用文献 10 mg 数据作外部验证,模型表现很稳定。这也证实了氨氯地平及左旋氨氯地平的有限采样模型有较高的准确度,可以按需要采用 2~4 个点预测。

References

- [1] Johnston A, Sketris I, Marsden JT, et al. A limited sampling strategy for the measurement of cyclosporine AUC [J]. *Transplant Proc*, 1990, 22: 1345–1346.
- [2] Meredith PA, Elliott HL. Clinical pharmacokinetics of amlodipine [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1992, 22: 22–31.
- [3] Suarez-Kurtz G, Vicente FL, Ponte CG, et al. Limited-sampling strategy models for estimating the area under the plasma concentration-time curve for amlodipine [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1999, 55: 651–657.
- [4] Monchaud C, Rousseau A, Leger F, et al. Limited sampling strategies using Bayesian estimation or multilinear regression for cyclosporin AUC(0–12) monitoring in cardiac transplant recipients over the first year post-transplantation [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 58: 813–820.
- [5] Yu ZC, Zhou PZ, Xu D, et al. Investigation on pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese adult renal transplant patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62: 446–452.
- [6] Bolon-Larger M, Chamouard V, Bressolle F, et al. A limited sampling strategy for estimating individual pharmacokinetic parameters of coagulation factor VIII in patients with hemophilia A [J]. *Ther Drug Monit*, 2007, 29: 20–26.
- [7] Dickinson L, Back D, Pozniak A, et al. Limited-sampling strategy for the prediction of boosted hard-gel saquinavir exposure at a dosage of 1000/100 mg twice daily in human immunodeficiency virus-infected individuals [J]. *Ther Drug Monit*, 2007, 29: 361–367.
- [8] Jiao Z, Zhong JY, Zhang M, et al. Total and free mycophenolic acid and its 7-O-glucuronide metabolite in Chinese adult renal transplant patients: pharmacokinetics and application of limited sampling strategies [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007, 63: 27–37.
- [9] Zhang Y, Liu M, Wen AD, et al. Bioequivalence between two kinds of amlodipine besilate tablets in healthy volunteers [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)*, 2006, 25: 743–746.
- [10] Quenouille MH. Approximate tests of correlation in time series [J]. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 1949, 11: 68–84.
- [11] Quenouille MH. Notes on bias in estimation [J]. *Biometrika*, 1956, 43: 353–360.
- [12] Efron B. Bootstrap methods: another look at the Jackknife [J]. *Ann Stat*, 1979, 7: 1–12.
- [13] Park JY, Kim KA, Park PW, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of a new S-amlodipine formulation in healthy Korean male subjects: a randomized, open-label, two-period, comparative, crossover study [J]. *Clin Ther*, 2006, 28: 1837–1847.
- [14] Dupuis LL, Sibbald C, Schechter T, et al. IV busulfan dose individualization in children undergoing hematopoietic stem cell transplant: limited sampling strategies [J]. *Biol Blood Marrow Transpl*, 2008, 14: 576–582.
- [15] Wang Y. Pharmacokinetics and Relative Bioavailability of Amlodipine Dispersible Tablets Among Healthy Chinese People (苯磺酸氨氯地平分散片健康人体药动学和相对生物利用度研究) [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2007.