

文章编号: 1008-9926(2009)04-0301-04 中图分类号: R965 文献标识码: A

马来酸依那普利片的人体生物等效性研究

梁宇光, 李海燕, 高洪志, 王晓芳, 郝光涛, 刘泽源

(军事医学科学院附属医院 药学部 北京 100071)

摘要:目的 考察两种马来酸依那普利片的相对生物利用度, 评价两者的生物等效性。方法 采用双周期自身随机交叉试验设计。20名健康男性志愿者单剂量口服受试制剂或参比制剂, 血药浓度采用高效液相色谱-串联质谱测定。结果 受试制剂及参比制剂马来酸依那普利实测平均血药峰浓度 C_{max} 分别为 (32.74 ± 9.01) 、 $(35.48 \pm 11.44) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 实测平均达峰时间 T_{max} 分别为 (0.76 ± 0.17) 、 (0.87 ± 0.17) h; 受试制剂及参比制剂 $t_{1/2}$ 分别为 (2.52 ± 2.95) 、 (3.10 ± 5.79) h; $AUC_{(0-48h)}$ 平均值分别为 (59.22 ± 20.46) 、 $(64.43 \pm 23.42) \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$; $AUC_{(0-\infty)}$ 平均值分别为 (60.01 ± 20.39) 、 $(65.09 \pm 23.43) \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$; 以 $AUC_{(0-48h)}$ 计算, 受试制剂的相对生物利用度为 $(97.8 \pm 34.1)\%$ 。结论 受试制剂和参比制剂具有生物等效性。

关键词:马来酸依那普利片; 高效液相色谱-串联质谱; 生物等效性

Bioequivalence of Enalapril Maleate Tablets in Healthy Volunteers

LIANG Yu-Guang, LI Hai-Yan, GAO Hong-Zhi, WANG Xiao-Fang, HAO Guang-Tao, LIU Ze-Yuan

(Department of Pharmacology, Affiliated Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071 China)

ABSTRACT: **Aim** To evaluate the relative bioavailability and the bioequivalence between two kinds of enalapril maleate tablets. **Methods** A single oral dose of enalapril maleate tablet was given respectively to 20 healthy volunteers in a two-way cross over test. Plasma concentration of enalapril maleate was determined by HPLC-MS/MS. **Results** The main pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, $AUC_{(0-48h)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ of test preparation and reference preparation were (32.74 ± 9.01) , $(35.48 \pm 11.44) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; (0.76 ± 0.17) , (0.87 ± 0.17) h; (2.52 ± 2.95) , (3.10 ± 5.79) h; (59.22 ± 20.46) , $(64.43 \pm 23.42) \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$; (60.01 ± 20.39) , $(65.09 \pm 23.43) \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and $F_{0-\infty}$ of test preparation was $(97.8 \pm 34.1)\%$. **Conclusion** The test preparation is bioequivalent to the reference preparation.

KEY WORDS: Enalapril maleate tablet; HPLC-MS/MS; bioequivalence

马来酸依那普利 (Enalapril Maleate) 属第二代血管紧张素转换酶抑制剂, 依那普利口服后在体内水解成依那普利拉 (Enalaprilat), 作用于肾素-血管紧张素系统, 与血管紧张素转换酶结合, 强烈抑制其功能而降低血管紧张素的含量; 减少缓激肽的降解, 增高血中缓激肽的水平, 继而引起全身血管舒张, 外周血管压力减少, 可使心输出量轻度增加, 但不增加心率, 从而达到降低血压的目的。对肾型高血压、肾型高血压及自发性高血压均有明显降压作用, 降压效果比卡托普利 (巯甲丙脯酸) 强且毒副作用低, 更宜病人长期服用。

有关马来酸依那普利的临床研究包括人体药代

动力学和生物利用度的研究已有文献报道^[1-4], 本试验评价两种马来酸依那普利片在人体内的药代动力学特性, 为临床制定合理安全用药方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 试药 受试制剂: 马来酸依那普利片 (规格: 10mg/片, 石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: 04100); 参比制剂: 马来酸依那普利片 (规格: 10mg/片, 常州制药厂有限公司, 批号: 0506011); 内标: 大豆苷元 (纯度 97.9%, 中国生物药品检定所); 甲醇为色谱纯, 其它试剂为分析纯; 空白人血浆 (吉林大学第一医院)。

作者简介: 梁宇光 (1979-), 女, 山西大同人, 实习研究员, 硕士。研究方向: 药理学和临床药理学。Tel: (010) 66947268; E-mail: roc212@tm.com

通讯作者: 刘泽源, Tel: (010) 66947251; E-mail: 13311010528@189.cn

1.2 仪器 Q TRAPTM四极杆线性离子阱质谱仪,配有离子喷雾离子化源以及 Analyst 1.32数据处理软件(美国 Applied Biosystem公司);Agilent 1100高效液相色谱系统,包括二元输液泵,自动进样器,切换阀;色谱柱为 Zorbax Extend-C₁₈柱,(5 μ m,150mm \times 4.6mm I.D.)均为美国 Agilent公司)。

1.3 液相色谱-质谱条件 色谱条件:流动相:甲醇-1%甲酸(70:30)(V/V);流速:0.7mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。质谱条件:离子源:离子喷雾离子化源;离子喷射电压:5000V;温度:500 $^{\circ}$ C;源内气体 1(GS1, N₂)压力:344.5kPa;气体 2(GS2, N₂)压力:344.5kPa;气帘气体(N₂)压力:103.35kPa;正离子方式检测;扫描方式为多重反应监测(MRM);依那普利、依那普利拉和内标-大豆苷元的解簇电压(DP)分别为:67、67、83V;碰撞能量(CE)分别为:28、28、34eV;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 377.0 \rightarrow m/z 234.1(依那普利)、m/z 349.2 \rightarrow m/z 206.3(依那普利拉)和 m/z 255.1 \rightarrow m/z 199.1(内标-大豆苷元)。

1.4 给药方案与血样采集 本次试验选择男性健康受试者 20名,平均年龄(36.3 \pm 3.48)岁,平均身高(1.70 \pm 0.05)m,平均体质量(66.3 \pm 4.99)kg,血常规、尿常规、肝功能、肾功能、血压、心电图及胸透等检查未发现异常。受试前两周及试验期间不服用任何其它药物。本试验经医学伦理委员会审查批准。试验前本课题负责人向受试者说明试验目的、药物特性、临床应用及主要不良反应等,由本人签署知情同意书,并于试验前一日住院。

本试验采用双周期自身随机交叉试验设计。将 20名受试者随机分为 A、B 两组,每组受试者分别服用受试或参比制剂。受试者给药前禁食不禁水 10h,以 200mL 温开水服药 10mg,服药 2h 后可自由饮水,4h 后进统一标准餐。试验前后 24h 内不得饮酒。两次用药间清洗期为 7d。

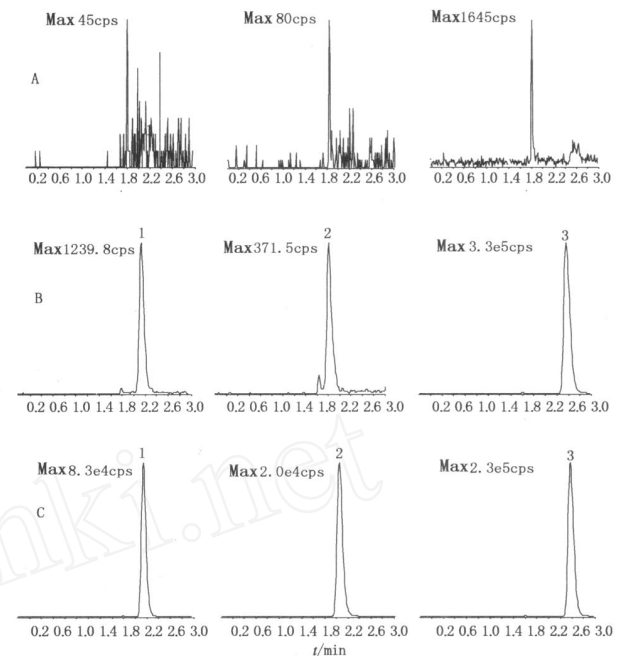
受试者须严格按试验方案参加本试验,并分别于给药前及给药后 0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、18、24、36、48h 时间点采静脉血 5mL,3000r/min 离心 10min,上层血浆于 -20 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.5 血样处理 取血浆样品 250 μ L,分别加入内标溶液 50 μ L,甲醇-水(50:50,V/V)溶液 50 μ L 和乙腈 450 μ L,涡流混合 30s,离心 10min(3500 r/min),取上清液 10 μ L 进行 HPLC-MS/MS 分析。

2 结果

2.1 方法专属性 取空白血浆 250 μ L,按 1.5 项下

进样 10 μ L,得空白样品色谱图 1A;将一定浓度的依那普利、依那普利拉和内标-大豆苷元标准溶液加入空白血浆中,依同法操作,得相应色谱图 1B;取受试者给药后收集的血浆样品,依同法操作,得相应色谱图 1C。结果表明:空白血浆中的内源性物质不干扰依那普利、依那普利拉和内标-大豆苷元的测定。



A 空白血浆 B 空白血浆 + 对照品 C 血浆样品

1 依那普利 2 依那普利拉 3 内标-大豆苷元

图 1 测定血浆中依那普利、依那普利拉和内标-大豆苷元的色谱图

Fig 1 MRM chromatogram of enalapril, enalaprilat and internal standard daidzein

2.2 标准曲线绘制 取空白血浆 250 μ L,依次加入依那普利和依那普利拉混合标准系列溶液 50 μ L,配制成相当于依那普利和依那普利拉血浆浓度为 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0、100 μ g \cdot L⁻¹的血浆样品,按样品处理与测定方法进行测定,以样品浓度(X)为横坐标,依那普利和依那普利拉峰面积与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标,用加权($W=1/X^2$)最小二乘法进行回归运算^[5],分别得:依那普利、依那普利拉回归方程:

$$Y=0.0224X-0.0069, r^2=0.9997, n=6$$

$$Y=0.0074X-0.0016, r^2=1.000, n=6$$

表明依那普利及依那普利拉血药浓度在 0.1~100 μ g \cdot L⁻¹范围内呈良好线性关系。最低定量限为 0.1 μ g \cdot L⁻¹。

2.3 精密度与回收率 按 1.5 项下操作,在空白人血浆中加入不同量的依那普利和依那普利拉配制低、中、高(0.3、10.0、80.0 μ g \cdot L⁻¹)不同浓度的标准

血样,每个浓度各 6 个样品,按上述测定方法分别测定日内、日间 RSD,同法配成低、中、高 3 个浓度的血浆样品各 3 份测定相对回收率,结果见表 1。

表 1 血浆中依那普利和依那普利拉的精密性 (n=6)与回收率 (n=3)

Tab 1 Precision and recovery of enalapril and enalaprilat in plasma

成分	加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	测得量 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)	
				日内	日间
依那普利	0.30	0.31 \pm 0.02	99.7 \pm 0.6	5.6	7.5
	10.0	10.10 \pm 0.63	95.7 \pm 4.7	6.6	2.1
	80.0	78.50 \pm 4.20	96.1 \pm 5.9	5.4	5.2
依那普利拉	0.30	0.31 \pm 0.02	74.8 \pm 4.2	4.8	12.0
	10.0	10.00 \pm 0.71	76.7 \pm 1.2	7.3	6.0
	80.0	78.50 \pm 3.90	81.2 \pm 1.2	4.5	7.6

2.4 稳定性试验 按 1.5 项下方法制备 QC 样品,每一浓度、每点进行 3 样本,经反复 3 次 -20 冰冻、室温溶解后,测定样品浓度。结果显示所有冻融试验测定值与添加值的 RSD 均 < 15%。即血浆样品可以进行反复冻融,整个分析过程中的数据真实,可靠。

2.5 数据处理 用 3P97 药代动力学程序软件,对各受试者血药浓度实测数据进行曲线拟合,并计算药代动力学参数,以梯形面积法计算 $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} 为试验的实测值。

2.6 20 名受试者口服受试制剂和参比制剂 10mg 后血浆中依那普利和依那普利拉平均血药时间曲

线见图 2。

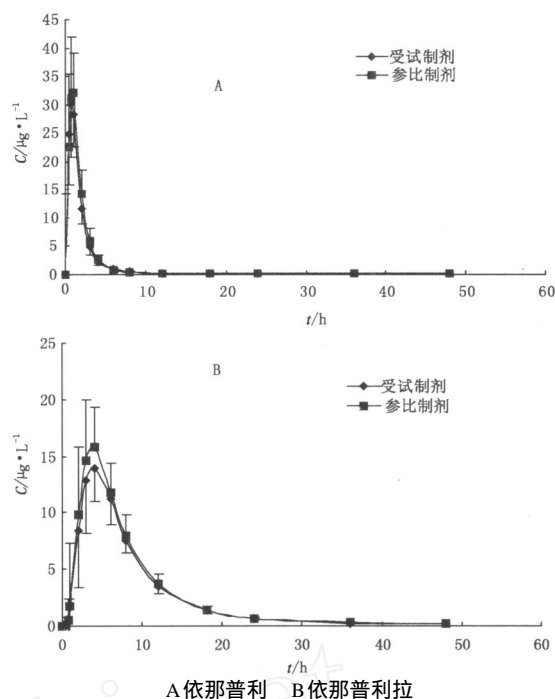


图 2 受试者血浆中依那普利及依那普利拉平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of enalapril in volunteers' plasma

受试者口服受试制剂和参比制剂马来酸依那普利片后血浆中依那普利和依那普利拉的主要药代动力学参数见表 2。

表 2 受试者口服受试制剂或参比制剂 10mg 后依那普利及依那普利拉的平均药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 2 Average pharmacokinetic parameters of enalapril and enalaprilat following a single oral dose (10mg) of two enalapril formulations ($\bar{x} \pm s, n=20$)

参数	受试制剂		参比制剂	
	依那普利	依那普利拉	依那普利	依那普利拉
C_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	32.74 \pm 9.01	14.48 \pm 4.86	35.48 \pm 11.44	16.12 \pm 5.57
T_{max} (h)	0.76 \pm 0.17	4.05 \pm 0.94	0.87 \pm 0.17	3.80 \pm 0.7
$t_{1/2}$ (h)	2.52 \pm 2.95	6.50 \pm 1.02	3.10 \pm 5.79	6.43 \pm 0.77
$AUC_{(0-48h)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	59.22 \pm 20.46	124.23 \pm 32.45	64.43 \pm 23.42	133.91 \pm 40.75
$AUC_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$)	60.01 \pm 20.39	122.64 \pm 32.52	65.09 \pm 23.43	136.12 \pm 40.75

以 $AUC_{0-\infty}$ 计算,受试制剂的相对生物利用度为 (97.8 \pm 34.1) %。受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-48h} 及 $AUC_{0-\infty}$ 经对数转换后进行方差分析及双向单侧 t 检验,结果表明两制剂在周期间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

目前以 HPLC-UV 法测定血浆中依那普利的方已有多篇相关文献报道,但因其检测方法专属性较差,灵敏度不高,对低浓度的药物测定有一定困难。本研究采用 HPLC-MS/MS 技术对血浆中依那普利及依那普

里拉进行血药浓度的测定,结果表明,依那普利血药浓度在 0.1 ~ 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r^2 = 0.9997$),最低检测浓度为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,样品浓度测定稳定。证明本方法重复性好,专一性强,灵敏度高,完全能够满足血药浓度测定的要求。

在整个试验过程中,不良反应主要由负责医师询问及受试者自诉获得,负责医生于给药前及药后 1、4、6、12、24、36、48h 测量受试者的血压、体温、呼吸、脉搏,并在试验结束后进行血液生化、血常规及尿常规检查。试验期间,受试者给药后 4 ~ 6h 血压降低较明显,推测与药物的降压作用有关。试验结

束后检查有 1 例受试者谷丙转氨酶有所升高, 7d 后复查恢复到正常范围之内, 判断为一过性升高。其他受试者无不良反应发生, 检查指标未见异常, 表明试验药物在试验剂量下具有较好的安全性。

对受试制剂与参比制剂药动学参数 AUC、 C_{max} 进行多因素方差分析及双单侧 t 检验, 对药动学参数 T_{max} 进行非参数法检验, 结果表明两制剂在处方与周期间无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明试验与参比制剂具有生物等效性。

参考文献:

- [1] 孙玉明, 杨炳华. HPLC 法测定复方片剂中依那普利相关物质 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 363

- [2] 张毕奎, 李坤艳, 王启斌, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定人血浆中的依那普利浓度 [J]. 中国药房, 2002, 13(12): 737
- [3] Jaeick L, Junghyun S. Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2003, 17(2): 1157
- [4] Qi G, Xiaoyan Ch, Dafang Zh, et al. Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J of Chromatography B*, 2004, 813(3): 337
- [5] 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

(收稿日期: 2008-10-31; 修回日期: 2009-01-13)

(本文编辑 狄亚敏)

文章编号: 1008-9926(2009)04-0304-05 中图分类号: R943 文献标识码: A

防治继发性骨质疏松的补肾壮骨中药组方优化实验研究

韩丽萍, 杨威, 陈行愉, 邓伟民

(广州军区广州总医院 药学部 广东 广州 510010; 广州市医药工业研究所 广东 广州 510240)

摘要:目的 对防治继发性骨质疏松的中药补肾壮骨颗粒进行处方优化筛选。方法 维甲酸诱导大鼠继发性骨质疏松症模型, 以仙灵骨葆为阳性对照, 观察补肾壮骨颗粒 3 个组方对血液生化指标、骨生物力学和组织计量学的影响。结果 与模型组相比, 阳性对照和补肾壮骨处方均可降低骨吸收, 以处方 3 低剂量组最为明显 ($P < 0.05$); 阳性对照和处方 3 有增加 ALP、BGP 的作用, 以及提高骨湿重系数 ($P < 0.05$)、增加骨体积的作用; 各给药组大鼠胫骨近端骨松质的骨小梁面积百分数、骨小梁厚度、骨小梁数量和骨小梁分离度均有显著变化 ($P < 0.01$), 3 个处方间无显著性差异。各给药组左侧股骨和胫骨弯曲试验 (折断) 和第 4 腰椎压碎试验的最大荷载均有增加的趋势, 以处方 3 的低剂量组最明显, 分别增加了 16.2%、17.7%、15.4%。**结论** 补肾壮骨方剂 3 个处方均有对抗维甲酸致 SD 大鼠骨质疏松的作用, 以处方 3 效果更好。

关键词:继发性骨质疏松症; 维甲酸; 补肾壮骨中药

Optimization of Formulating Prescriptions in Bushen Zhuanggu Granule for Secondary Osteoporosis

HAN Li-Ping, YANG Wei, CHEN Xing-Yu, DENG Wei-Min

(General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong China)

(Pharmaceutical Industrial Research Institute, Guangzhou 510240, Guangdong China)

ABSTRACT: **Aim** To optimize the prescriptions of TCM Bushen Zhuanggu Granule for osteoporosis. **Methods** Rat models of osteoporosis induced by retinoic acid were established. Xianlinggubao Capsules was used as positive control to observe the effect of three Bushen Zhuanggu granule prescriptions on blood biochemical index of blood, bone index, bone vitodynamics and bone histomorphometry. **Results** Compared with the model group, positive control and Bushen Zhuanggu prescription were able to decrease bone resorption. The low-dose group of prescription 3 was

基金项目: “十一五”军队中医药研发推广专项课题, No. 2006062004

作者简介: 韩丽萍 (1958-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 主任药师。研究方向: 中药研发。Tel: (020) 36654456; E-mail: hanliping@163.com

通讯作者: 邓伟民, Tel: (020) 36653360