

复方卡托普利片剂的人体相对生物利用度测定

陈铁锋, 余细勇, 杨敏, 江桂芬, 钱忆芝, 林曙光(广东省心血管病研究所临床药理室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 测定复方卡托普利片剂的相应生物利用度。方法 建立人血浆卡托普利、氢氯噻嗪的高效液相色谱法。色谱条件: Zorbax C18 柱。卡托普利分析流动相为: 乙腈/水/冰醋酸(44/56/0.2, v/v), 检测波长: UV258nm。氢氯噻嗪分析流动相为: 乙腈/甲醇/水/冰醋酸(10/10/80/0.2, v/v), 检测波长: UV272nm。样品处理: 卡托普利带药血浆 p-BPB 衍生后酸化, 乙酸乙酯提取。氢氯噻嗪带药血浆碱化, 乙酸乙酯提取, 分别行色谱测定。结果 10 名健康志愿者口服复方卡托普利片的血药浓度数据经 3P97 程序自动拟合。卡托普利吸收较快, 0.5~1h 血药浓度已达峰值; 消除亦快, 服药后 10h, 血药浓度已低于 7mg/L。受试药与对照药比较, 两药的达峰时间(T_{peak})分别为 $0.65 \pm 0.24h$ 和 $0.71 \pm 0.19h$, 实测峰浓度(C_{max})分别为 $229.5 \pm 105.5mg/L$ 和 $228.1 \pm 122.4mg/L$, 以实测值计算的药时曲线下面积(AUC_{0-1})分别为 $359.5 \pm 114.8mg \cdot h/L$ 和 $356.2 \pm 99.8mg \cdot h/L$, 其相对生物利用度为 $100.7 \pm 11.6\%$ 。氢氯噻嗪药吸收较慢, 血药浓度峰值多出现于 2~3h, 消除半衰期约为 3h 左右。受试药与对照药比较, 两药的达峰时间(T_{peak})分别为 $2.15 \pm 0.63h$ 和 $2.00 \pm 0.62h$, 实测峰浓度(C_{max})分别为 $73.0 \pm 22.6mg/L$ 和 $72.9 \pm 16.4mg/L$, 以实测值计算的药时曲线下面积(AUC_{0-1})分别为 $387.3 \pm 65.7mg \cdot h/L$ 和 $387.0 \pm 54.6mg \cdot h/L$, 其相对生物利用度为 $100.2 \pm 10.7\%$ 。结论 复方卡托普利片剂与对照药相比具有相同生物等效性。

关键词: 卡托普利; 氢氯噻嗪; 高效液相色谱; 生物利用度

复方卡托普利片剂主要成份为卡托普利(captopril, 简称 Cap)和氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide, 简称 HCT)。广德天寿药业有限责任公司研制了该制剂。为测定其相对生物利用度, 本文参考国内外有关文献^[1,2]建立了人血浆卡托普利、氢氯噻嗪的高效液相色谱法(HPLC), 测定了 10 名健康志愿者口服此复方卡托普利片剂后血药浓度, 求出其相应的药物动力学参数, 并对其片剂中的卡托普利和氢氯噻嗪的生物等效性作出评价。

1 分析方法

1.1 药品与试剂

受试药复方卡托普利(广德天寿药业有限公司, 批号 980502; 含卡托普利 10mg/片、氢氯噻嗪 6mg/片), 对照药“开富特”(常州制药厂, 批号 970505; 含卡托普利 10mg/片、氢氯噻嗪 6mg/片); 衍生剂: 对溴苯乙酰基溴(p-bromophenacyl bromide, 简称 p-BPB, Sigma 公司); 乙色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司); 乙酸乙酯分析纯(国产); 实验用水为三重蒸馏水。

1.2 标准液配制

精密称取卡托普利标准对照品 5mg, 用甲醇溶解稀释至 10.0mL 即为 0.5mg/mL, 再吸取此液 16.0mL 用甲醇稀释至 1.0mL, 浓度为 8mg/mL (临用即配)。精密称取氢氯噻嗪标准对照品 5mg, 用甲醇溶解稀释至 10.0mL, 再吸取此液 8.0mL 用甲醇稀释至 1.0mL, 浓度为 4mg/mL。

1.3 色谱条件

LC-3A 高效液相色谱仪, C-R3A 数据处理仪(日本岛津公司); Spectra 100 型紫外检测器(美国 SP 公司); Zorbax C18 色谱柱(4.6mm × 15cm, 5μm, 大连物化所装填)。卡托普利分析流动相为: 乙腈/水/冰醋酸(44/56/0.2, v/v), 流速 1.5mL/min; 柱温 25℃, 柱压为 80kg/cm², 检测波长: UV258nm。氢氯噻嗪分析流动相为: 乙腈/甲醇/水/冰醋酸(10/10/80/0.2, v/v), 流速 1.2mL/min; 柱温 25℃, 柱压为 80kg/cm², 检测波长: UV272nm。

1.4 样品处理

血浆中卡托普利分析: 吸取 400mL 带药血浆加至 5mL 锥形带塞离心管内, 即时加入衍生试剂 p-BPB 乙腈液(1mg/mL)40mL 旋涡振荡数秒, 室温放置 20min 后, 加 2mol/L HCl 25mL、1mL 乙酸乙酯旋涡振荡 1min, 2000 × g 离心 2min, 吸尽有机层至 2mL 锥形带塞管内, 50℃ N₂ 吹干。4℃ 放置, 进样前内容物用乙腈 40mL 溶解, 吸取 20mL 进样行色谱测定。色谱图见图 1。

血浆中氢氯噻嗪分析: 吸取 400mL 带药血浆加至 5mL 锥形带塞离心管内, 加入 0.1mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(pH10)100mL, 再加入 1mL 乙酸乙酯旋涡振荡 1min, 2000 × g 离心 2min, 吸尽有机层至 2mL 锥形带塞管内, 50℃ N₂ 吹干, 进样前内容物用乙腈 40mL 溶解, 吸取 10mL 进样行色谱测定。色谱图见图 2。

1.5 标准曲线的测定

血浆卡托普利分析: 取 6 支 5mL 锥形离心管, 分别加卡

托普利标准液(8.0mg/mL)1, 2.5, 5, 10, 15, 25mL, 取后三支管 N₂ 轻吹甲醇干, 各管再加入志愿者服药前空白新鲜血浆(已加抗氧剂)400mL 旋涡振荡数秒, 即配成血药浓度分别为 20、50、100、200、300、500mg/L 的 6 支标准血样, 即时加入衍生剂后按血浆中卡托普利分析处理进行色谱测定。经 HPLC 分析, 测得卡托普利衍生物峰面积(A)作纵坐标, 以血浆卡托普利浓度(C)作横坐标绘制标准曲线。在 20~500 范围内的血药浓度线性良好, 其回归方程为: $A = 1.662C + 0.648$, $r = 0.9994$ 。



图 1 人血浆卡托普利衍生物 HPLC

a. 志愿者服药前空白血浆被 p-BPB 衍生后色谱图; b. 志愿者口服 Cap 30mg 后 1h 血浆被 p-BPB 衍生后色谱图 Cap-pBPB Rt-5.565min (200μg/L)

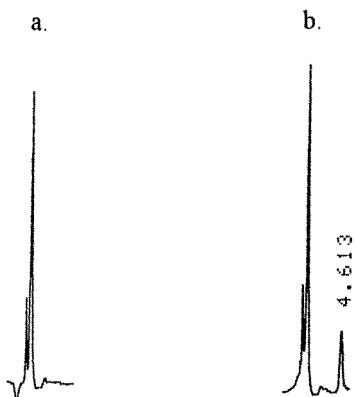


图 2 人血浆氢氯噻嗪 HPLC 色谱图

a. 空白血浆 b. 志愿者口服 HCT 18mg 后 1h 血浆色谱图, HCT Rt-4.6min(50mg/L)

血浆氢氯噻嗪分析: 取 5 支 5mL 锥形离心管, 分别加入氢氯噻嗪标准液(4mg/mL) 1, 3, 5, 10, 20mL, 后两支管用 N₂ 轻吹甲醇干, 各管再加入空白血浆 400mL 旋涡振荡数秒, 即配成血药浓度分别为: 10, 30, 50, 100, 200mg/L 的 5 支标准

血样,每管加 pH10 碳酸钠缓冲液和乙酸乙酯提取按血浆中氢氯噻嗪分析处理进行色谱测定。经 HPLC 分析,测得氢氯噻嗪的峰面积(A)作纵坐标,以血浆氢氯噻嗪浓度(C)作横坐标绘制标准曲线,在 10~200mg/L 范围内的血药浓度线性良好,其回归方程为: $A = 1.698C - 1.248, r = 0.9993$ 。

1.6 方法学回收率和精密度

按标准曲线配制血浆卡托普利的高(0.5mg/L)、中(0.1mg/L)、低(0.02mg/L)浓度标样,按样品处理项下处理,日内测定 5 次,隔日测定 1 次,共 5 次,分别计算相对回收率,日内及日间变异。另按标准曲线配制血浆氢氯噻嗪的高(0.2mg/L)、中(0.05mg/L)、低(0.01mg/L)浓度标样,同上按样品处理进行日内和日间测定。

2 药动学实验

2.1 受试者基本情况

健康男性志愿者 10 人,年龄 27~38 岁,平均 31.8 ± 4.0 岁;体重 60~85kg,平均 68.7 ± 8.2 kg。所有受试者均为本院职工,常规体检和血液生化检查肝、肾功能未见异常。志愿者试验前签署知情同意书,受试期间停用任何药物,并禁烟和酒。

2.2 标本采集

受试者于实验日的前一天晚上开始禁食 12h,第二天早晨 7:30 空腹开始实验。采用自身对照、随机交叉的方法,分别一次性口服受试药(复方卡托普利片)3 片或对照药(开富特)3 片,100mL 温开水送服。服药前(0)和服药后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、7、10、14h 前臂静脉取血 5mL,立即注入含有 0.5mol/L EDTA 100mL 和 1mol/L 维生素 C 50mL 的试管中,轻轻混匀,尽快离心 $3000 \times g, 10\text{min}$,分离的血浆分为 2 部分:一部分立即用于卡托普利的衍生,即 0.4mL 血浆加衍生试剂 p-BPB 乙腈液(1mg/mL)40mL 旋涡振荡数秒,室温放置 20min 后,随即用乙酸乙酯提取,方法同上(1.4);另一部分血浆则用于氢氯噻嗪的测定。

2.3 数据处理

所有数据均用 $\bar{c} \pm SD$ 表示。血药浓度-时间数据在奔腾 586 PC 机上采用 3P97 药动学程序进行拟合计算,达峰时间(T_{peak})和峰浓度(C_{max})采用实测值,药时曲线下面积(AUC)采用统计矩方法计算实测值,即 AUC_{0-t} 。所得药代动力学参数均采用配对 t 检验进行对照药与受试药之间的比较, AUC_{0-t} 和 C_{max} 采用 NDST 统计软件进行生物等效性分析。相对生物利用度(F)采用下式计算:

$$F(\%) = \frac{\text{受试药 } AUC_{0-t}}{\text{对照药 } AUC_{0-t}} \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 方法与评价

Cap 其结构缺乏对紫外具有特征吸收的官能团,又含有巯基极易氧化。为了能较灵敏地测定 Cap,加入具有较强紫外吸收的 p-BPB 作为衍生剂与 Cap 的羧基反应^[3]生成 Cap-BPB,使 Cap 在 HPLC 的紫外检测能满足药动学实验要求。

另外实验中抽取志愿者全血时加入 EDTA 和抗坏血酸起到抗凝和能防止 Cap 的氧化,即使如此,实验中抽取的全血还是即分离血浆,先进行衍生提取处理,有机层吹干的样品置 4℃ 保存待进样。进样前才用乙腈定容,测定结果满意。

两药的测定方法取血量仅为 400mL,样品处理用试剂量少,提取过程简便。两药的提取率均达到 80% 以上,其最低检测浓度,Cap 为 7mg/L, HCT 为 2mg/L。两药的保留时间分别为 5.6min 和 4.6min。本实验 Cap 血药浓度标准曲线建立在 20~500mg/L 范围, HCT 则在 10~200mg/L 范围。两药的 HPLC 分析的相对回收率和精密度见表 1 和表 2。

Tab 1 Precision and relative recovery of captopril in serum ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Within-day		Between-day		Relative Recovery (%)
	Mean \pm SD	RSD (%)	Mean \pm SD	RSD (%)	
20	18.0 \pm 0.3	1.7	16.6 \pm 2.0	11.9	86.6
100	99.8 \pm 1.6	1.6	98.9 \pm 6.2	6.3	99.4
500	502.5 \pm 2.6	0.5	496.3 \pm 12.1	2.4	99.9

Tab 2 Precision and relative recovery of hydrochlorothiazide in serum($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Within-day		Between-day		Relative Recovery (%)
	Mean \pm SD	RSD (%)	Mean \pm SD	RSD (%)	
10	9.6 \pm 0.4	4.5	9.5 \pm 0.6	6.4	95.7
50	46.1 \pm 2.0	4.3	45.6 \pm 1.7	3.7	91.8
200	190.8 \pm 7.8	4.1	190.7 \pm 14.3	7.5	95.4

3.2 卡托普利的药代动力学与相对生物利用度

卡托普利的血药浓度——药时曲线见图 3。血药浓度数据经 3P97(3P87 新版)程序自动拟合,根据 F 检验和 AIC 值选择一房室开放模型计算药代动力学参数,结果见表 3。卡托普利的药代动力学特点是,吸收较快,0.5~1h 血药浓度已达峰值;消除亦快,服药后 10h,血药浓度已低于最低检测浓度,小于 7mg/L。受试药(B)与对照药(A)比较,两药的达峰时间(T_{peak})分别为 $0.65 \pm 0.24\text{h}$ 和 $0.71 \pm 0.19\text{h}$,实测峰浓度(C_{max})分别为 $229.5 \pm 105.5\text{mg/L}$ 和 $228.1 \pm 122.4\text{mg/L}$,以实测值计算的药时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为 $359.5 \pm 114.8\text{mg} \cdot \text{h/L}$ 和 $356.2 \pm 99.8\text{mg} \cdot \text{h/L}$,经配对 t 检验, T_{peak} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 以及其它的药动学参数在两种制剂之间均无显著性差异($P > 0.05$),说明两种制剂的卡托普利的体内过程基本一致。受试药卡托普利的相对生物利用度为 $100.7 \pm 11.6\%$ 。

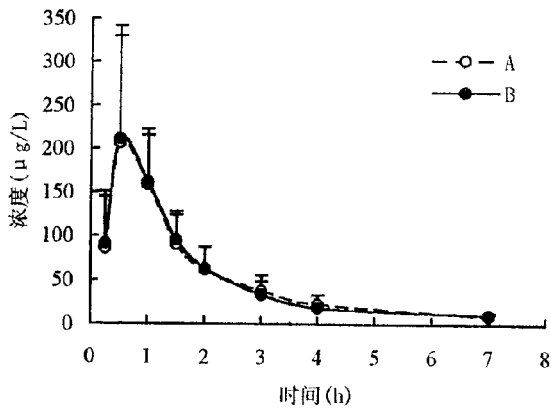


图3 卡托普利的血药浓度-时间曲线
A: 为对照药; B: 为受试药

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of captopril after a single oral dose of composite captopril ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Parameters	Control	Test
$K_e (h^{-1})$	1.07 ± 0.68	1.05 ± 0.33
$K_a (h^{-1})$	20.78 ± 32.30	21.61 ± 22.96
Lag-time (h)	0.18 ± 0.09	0.21 ± 0.03
$t_{1/2} K_a (h)$	0.14 ± 0.12	0.14 ± 0.15
$t_{1/2} K_e (h)$	0.86 ± 0.42	0.71 ± 0.19
$T_{peak} (h)$	0.70 ± 0.26	0.65 ± 0.24
$C_{max} (\mu g \cdot L^{-1})$	228.1 ± 122.4	229.5 ± 105.5
CL/Fs (L·h)	101.6 ± 27.5	104.3 ± 30.4
V/Fc (L)	117.1 ± 47.8	105.0 ± 31.2
MRT (h)	2.36 ± 0.50	2.61 ± 0.72
$AUC_{0-1} (\mu g \cdot h \cdot L^{-1})$	356.2 ± 99.8	359.5 ± 114.8

3.3 氢氯噻嗪的药代动力学与相对生物利用度

氢氯噻嗪的血药浓度—药时曲线见图4。血药浓度数据经3P97程序自动拟合,选择一房室开放模型计算药代动力学参数,结果见表4。氢氯噻嗪的药代动力学特点是,吸收较慢,15min的血药浓度大部分低于检测限(2mg/L),血药浓度峰值多出现于2~3h,消除半衰期约为3h左右。受试药(B)与对照药(A)比较,两药的达峰时间(T_{peak})分别为 $2.15 \pm 0.63h$ 和 $2.00 \pm 0.62h$,实测峰浓度(C_{max})分别为 $73.0 \pm 22.6mg/L$ 和 $72.9 \pm 16.4mg/L$,以实测值计算的药时曲线下面积(AUC_{0-1})分别为 $387.3 \pm 65.7mg \cdot h/L$ 和 $387.0 \pm 54.6mg \cdot h/L$,经配对t检验, T_{peak} 、 C_{max} 、 AUC_{0-1} 以及其它的药代动力学参数在两种制剂之间均无显著性差异($P > 0.05$),说明两种制剂的氢氯噻嗪的体内过程亦基本一致。受试药氢氯噻嗪的相对生物利用度为 $100.2 \pm 10.7\%$ 。

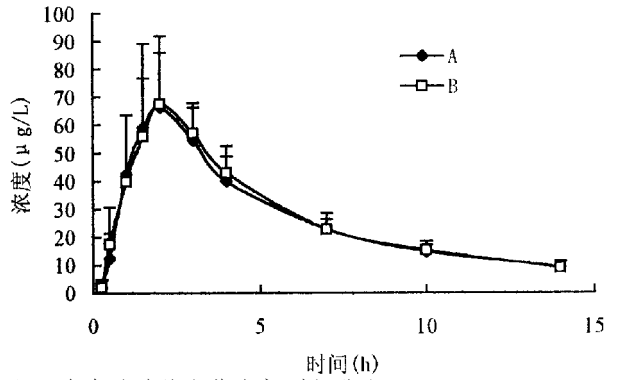


图4 氢氯噻嗪的血药浓度-时间曲线
A: 为对照药; B: 为受试药

Tab 4 Main pharmacokinetic parameters of hydrochlorothiazide after a single oral dose of composite captopril ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Parameters	Control	Test
$K_e (h^{-1})$	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.09
$K_a (h^{-1})$	1.36 ± 0.59	1.09 ± 0.55
Lag-time (h)	0.32 ± 0.11	0.28 ± 0.13
$t_{1/2} K_a (h)$	0.63 ± 0.35	0.79 ± 0.35
$t_{1/2} K_e (h)$	3.22 ± 0.92	2.96 ± 0.73
$T_{peak} (h)$	2.00 ± 0.62	2.15 ± 0.63
$C_{max} (\mu g \cdot L^{-1})$	72.9 ± 16.4	73.0 ± 22.6
CL/Fs (L·h)	46.2 ± 7.1	47.1 ± 7.4
V/Fc (L)	213.6 ± 65.0	201.3 ± 58.8
MRT (h)	7.27 ± 0.75	7.17 ± 1.25
$AUC_{0-1} (\mu g \cdot h \cdot L^{-1})$	387.0 ± 54.6	387.3 ± 65.7

3.4 生物等效性评价

AUC_{0-1} 的原始数据进行方差分析,结果显示,卡托普利和氢氯噻嗪在受试药与对照药之间均无显著性差异($P > 0.05$),而且服药周期亦无明显影响($P > 0.05$)。将原始数据进行双向t检验,并将等效判断标准定为(0.8, 1.2),结果显示受试药中卡托普利和氢氯噻嗪两种成份的AUC生物等效性均合格;若将 AUC_{0-1} 的原始数据对数转换后再行双向t检验,此时将等效判断标准定为(0.8, 1.25),同样合格。此外,我们还对峰浓度(C_{max})的实测值对数转换后进行双向t检验,设定判断标准为(0.8, 1.25),结果显示,受试药中卡托普利和氢氯噻嗪两种成份的 C_{max} 生物等效性均合格。上述统计学分析表明,受试药(B)与对照药(A)具有相同的生物等效性。

参考文献

- [1] 李克等. RP-HPLC测定人血浆中卡托普利. 中国药学杂志, 1995, 30(12): 740.
- [2] 高立勤等. 口服复方氢氯噻嗪片后氢氯噻嗪血药浓度的HPLC测定法. 药物分析杂志, 1995, 25(增刊): 213.
- [3] 安登魁. 药物分析. 第一版. 济南: 济南出版社, 1994. 503.

收稿日期: 2003-04-17