

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.010

◇ 药学研究 ◇

富含铁元素食物对非洛地平片在 Beagle 犬体内药动学的影响

陈仕云¹, 何勇², 于艳英², 彭扶云², 高永好², 吴宗好²作者单位:¹合肥学院分析测试中心, 安徽 合肥 230601; ²合肥华方医药科技有限公司, 安徽 合肥 230088

通信作者: 吴宗好, 男, 研究员, 研究方向为药理学, E-mail: hfsci@163.com

摘要:目的 研究高铁饮食对非洛地平在 Beagle 犬体内药动学影响。方法 采用随机、开放、单剂量给药、双交叉试验设计。12 条健康 Beagle 犬采用随机数字表法分为两组, 每组 6 条, 分别空腹和餐后服用 5 mg 非洛地平片, 给药前后按不同采血时间点采集血样, 采用液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 法测定血浆中非洛地平浓度, 用 DAS3.2.8 软件计算药动学参数。结果 空腹与餐后主要药动学参数如下: C_{max} (12.59±2.17)、(7.13±2.96) ng/mL, t_{max} (1.25±0.24)、(1.32±0.35) h, $t_{1/2}$ (1.1±0.69)、(1.2±0.72) h, AUC_{0-12} (19.46±5.23)、(11.87±3.85) ng·h⁻¹·mL⁻¹, $AUC_{0-∞}$ (20.69±5.75)、(12.76±4.18) ng·h⁻¹·mL⁻¹。以 AUC_{0-12} 计算, 实验组的相对生物利用度 F 为 (61.0±12.7)%。与对照组相比, 实验组 Beagle 犬的生物利用度偏低, 而且达峰浓度也降低, 说明食物中 Fe³⁺ 抑制了非洛地平药物的吸收。结论 高铁饮食可显著降低非洛地平片在 Beagle 犬体内的吸收程度, 但不影响其吸收速度。

关键词: 非洛地平; 药代动力学; 高效液相色谱-串联质谱法; 食物药物相互作用

Effects of foods rich in Fe³⁺ on pharmacokinetics of felodipine tablets in Beagle dogs

CHEN Shiyun¹, HE Yong², YU Yanying², PENG Fuyun², GAO Yonghao², WU Zonghao²Author Affiliation: ¹Analytical & Testing Center, Hefei University, Hefei, Anhui 230601, China; ²Hefei

Huafang Pharmaceutical Science & Technology Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ferrum diets on pharmacokinetics of Felodipine in Beagle dogs. **Methods** A randomized, open-label, single dose and two-way crossover clinical study was conducted. Twelve healthy Beagle dogs were randomly divided into two groups, then 5 mg of felodipine were admitted respectively before and after meal. Blood samples were collected at different time points before and after drug administration. The concentration of felodipine in plasma was determined by HPLC-MS / MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS3.2.8. **Results** The main pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} (12.59±2.17) and (7.13±2.96) ng·mL⁻¹, t_{max} (1.25±0.24) and (1.32±0.35) h, $t_{1/2}$ (1.1±0.69) and (1.2±0.72) h, AUC_{0-12h} (19.46±5.23) and (11.87±3.85) ng·h⁻¹·mL⁻¹, $AUC_{0-∞}$ (20.69±5.75) and (12.76±4.18) ng·h⁻¹·mL⁻¹, Respectively according to AUC_{0-12h} , the relative bioavailability of felodipine in the experimental group was (61.0±12.7)%. Compared to the control group, the bioavailability of felodipine in the experimental group was low and the peak concentration decreased. **Conclusion** High ferrum Diets can significantly reduce the extent of absorption of felodipine in Beagle dogs, however, with no influence on the absorption rate of felodipine.

Key words: Felodipine; Pharmacokinetics; HPLC-MS/MS; Food-drug interaction

非洛地平为第 II 代二氢吡啶类钙通道阻滞药, 通过抑制小动脉平滑肌细胞外钙内流并增加冠状窦血流量, 降低全身冠状动脉血管阻力, 低血压降, 具有长效、不良反应少等优点, 临床用于轻度以及中度高血压治疗^[1]。非洛地平经胃肠道吸收快而完全, 空腹服用易被肝脏代谢为非活性代谢物, 从而使生物利用度降低; 进食后, 食物中的有效活性成分抑制或改变药物非洛地平的体内代谢过程, 服用葡萄柚汁^[2]可引起非洛地平以及代谢产物的 AUC 和 C_{max} 增加几倍, 是因为葡萄柚汁能减少其首过效应, 通过抑制非洛地平在肠室的代谢而起作用^[1]。

文献报道了非洛地平餐后给药药动学参数试验^[3], 本试验自 2017 年 1 月至 2018 年 3 月探讨高铁饮食对非洛地平片在 Beagle 犬体内的药动学的影响, 通过液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 方法^[4-10]测定受试者血浆中的非洛地平浓度, 分别计算空腹、餐后药动学参数, 分析其差异来评价食物效应^[11]对非洛地平在 Beagle 犬体内的药动学影响。

1 材料与与方法

1.1 材料 非洛地平片, 每片规格: 5 mg (江苏联环药业股份有限公司; 批号: 20160703); 非洛地平对照品 (纯度 99.9%, 批号: 100717-201403) 购自中国

食品药品检定研究院, 尼群地平对照品(纯度 \geq 95%, 批号: C10039115)购自上海麦克林生化科技有限公司。甲醇(色谱纯, Tedia); 其它试剂均为AR级。

1.2 仪器 Agilent1290-2超高压液相色谱仪, AB4000三重四级杆串联质谱仪(ESI+源), Analyst1.6.3数据采集系统; GL-16G型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); SZ-1型快速混匀器(常州国宇仪器制造有限公司); BF-2000氮气吹干仪(冠森生物科技(上海)有限公司); AG135型电子分析天平等。

1.3 试验对象 健康Beagle犬, 雌雄各半[安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(皖)2011-002]。试验前Beagle犬在S P F动物实验室饲养1周。于试验前12 h禁食, 试验过程中自由饮用去离子水。本研究对犬的处置符合动物学伦理标准。

1.4 方法

1.4.1 液相色谱-质谱条件 色谱条件: 色谱柱 岛津C₁₈(1.5 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水相(4 mmol/L醋酸铵, 含0.15%甲酸) = 85:15; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μ L; 柱温: 室温。

质谱条件: 离子源: 电喷雾电离源(ESI源), 正离子检测模式; 检测模式多反应监测(MRM); 帘气流速: 25.0 L/min; 碰撞气流速中等; 喷雾电压: 5 500.0 V; 离子源温度: 500.0 $^{\circ}$ C; 雾化气: Gas1 50.0 L/min; 辅助气: Gas2 50.0 L/min; 扫描时间: 100.0 ms; 监测离子对 m/z384.1 \rightarrow m/z338.1(非洛地平), m/z361.2 \rightarrow m/z 315.2(尼群地平); 去簇电压分别为77 V和85 V; 碰撞能量分别为14 V和17 V。

1.4.2 试验设计 采用随机、开放、单剂量给药、双交叉试验设计, 将健康Beagle犬12条, 体质量(20 \pm 2) kg, 采用随机数字表法分为A、B两组, 每组6条。A组依次空腹给药、高铁食物餐后给药; B组依次高铁食物餐后给药、空腹给药, 洗脱期为7 d, 给药量均为每片5 mg。

试验前1 d所有受试者Beagle犬进入饲养动物房, 正常饲养, 确保试验前禁食不禁水10 h以上。于次日早晨A组用200 mL温水送服非洛地平片1片; B组于给药前30 min统一进食高铁试验餐(5 g紫菜-200 mL去离子水), 并于30 min内进餐完毕后立即服药。除给药前1 h至给药后1 h外任意饮水, 4 h后统一饲养。于给药前0和给药后0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12、24、48 h前腿静脉处采集血样约3 mL。血样置于含EDTA抗凝管中, 立即在3 000 r/min条件下离心10 min, 分取上层血浆, 于-20 $^{\circ}$ C保存, 备用。

1.4.3 血浆样品预处理 精密量取血浆200 μ L, 内标物10 μ L, 混合混匀; 加甲醇600 μ L, 涡旋3 min; 3 000 r/min离心10 min, 取上清液, 过0.22 μ m膜滤, 10 μ L进样分析(避光操作)。

1.4.4 溶液配制 非洛地平标准溶液: 取非洛地平对照品约15 mg, 精密称定, 置50 mL棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作标准储备液I(300 μ g/mL)。精密吸取标准储备液I 1.0 mL, 置10 mL棕色量瓶中, 甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 作为标准储备液II(30 μ g/mL)。精密量取标准储备液II适量, 用甲醇稀释即得。

内标物溶液: 取尼群地平对照品约10 mg, 精密称定, 置100 mL棕色量瓶中, 用甲醇溶解、稀释定容至刻度, 摇匀, 作为内标储备液(100 μ g/mL)。精密量取内标储备液0.1 mL, 置100 mL棕色量瓶中, 甲醇稀释、定容至刻度, 摇匀, 得内标溶液(100 ng/mL)。

1.4.5 方法专属性 依次取6条受试犬空白血浆200 μ L, 按“血样处理”项下方法(未加内标物溶液), 参照2.1项下色谱-质谱条件下进样分析, 得色谱图1A; 将内标物溶液和一定浓度非洛地平标准溶液加至空白血浆中, 依次操作, 得色谱图1B; 取口服给药后受试犬血浆样品并加内标物, 依次操作, 得色谱图1C。空白血浆中代谢物质、内源性物质不干扰血浆内标物和非洛地平测定, 非洛地平、内标物保留时间为6.8 min和5.5 min。

1.4.6 线性试验 取空白血浆200 μ L, 分别加非洛地平标准储备液溶液10 μ L, 配置相当于非洛地平血浆浓度1.0、2.0、50、10.0、20.0、30.0 ng/mL的模拟血浆样品, 按“2.3”项下操作, 进样10 μ L, 记录色谱图。以非洛地平浓度(C, ng/mL)为横坐标, 非洛地平与内标物的峰面积比(R)为纵坐标, 计算直线回归方程, 得标准曲线: $R = 0.064 43X + 0.255 77$, $r = 0.999 4$ 。结果表明, 非洛地平血浆浓度在1.0~30.0 ng/mL范围之间与峰面积线呈线性关系, 相关性较好, 定量限1.0 ng/mL。

1.4.7 方法精密度与准确度 取空白血浆200 μ L于试管中, 加非洛地平储备溶液适量, 配成高、中、低3个浓度(非洛地平浓度分别为25.0、10.0、1.0 ng/mL)模拟血浆的样品, 各5份, 进行样品测定。代入方程, 计算浓度, 测得值/加入值计算回收率, 连续3 d配样测定、计算日内差、日间差。结果显示: 准确度在85%~115%范围内, 日内、日间差RSD均小于15%。

1.4.8 回收率和基质效应试验 分别配制高、中、低浓度(25.0、10.0、1.0 ng/mL)非洛地平对照品溶液

(含内标物)A;取空白血浆,按“2.3”项下方法操作,吹干后并加入非洛地平和内标对照溶液,分别制备高、中、低浓度血样B;取空白血浆,分别加入适量药和内标对照品溶液,按“血样处理”项下方法操作,分别制备低、中、高浓度血样C。依次进样,记录色谱图。计算非洛地平基质效应为93.4%~108.9%,内标的基质效应为96.7%~105.3%;非洛地平的萃取回收率为75.76%~81.44%,内标的平均萃取回收率为83.6%。

1.4.9 稳定性试验 分别配制低、中、高3个浓度的血浆样品,于室温条件下放置8 h、经反复冻融3次、-20℃保存15 d后测定。结果显示,非洛地平血浆样品,在室温放置8 h、反复冻融3次上、-20℃保存保存15 d条件下稳定,不影响试验结果。

2 结果

采用DAS3.2.8软件处理血药浓度数据,用非房室模型参数计算,根据各受试犬血药浓度实测数据计算主要药动学参数。得主要药动学参数见表1。两组Beagle犬给药后药代动力学参数经方差分析和*t*检验, C_{max} 、 AUC_{0-12} 和 $AUC_{0-\infty}$,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组的 C_{max} 、 AUC_{0-12} 和 $AUC_{0-\infty}$ 明显比正常组低,说明实验组的吸收程度不如正常组,食物中的 Fe^{3+} 可能抑制非洛地平吸收。

表1 12条Beagle犬空腹和高铁饮食后

口服非洛地平片5 mg的主要药动学参数($n = 6, \bar{x} \pm s$)

参数	空腹	高铁饮食后	F值	P值
T_{max}/h	1.25±0.24	1.32±0.35	0.294	0.599
$C_{max}/(ng/mL)$	12.59±2.17	7.13±2.96	17.014	0.002
$T_{1/2}/h$	1.1±0.69	1.2±0.72	0.128	0.728
$AUC_{0-12}/(ng \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1})$	19.46±5.23	11.87±3.85	10.381	0.009
$AUC_{0-\infty}/(ng \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1})$	20.69±5.75	12.76±4.18	10.613	0.009

3 讨论

本研究每片非洛地平5 mg,属于小剂量制剂,给药后血药浓度比较低,选择液-质联用方法进行血样定量分析;此研究的方法专属性强、灵敏度高、快速准确。非洛地平和内标均见光易分解,整个样品处理过程中应在避光条件下快速进行;因此,采用沉淀法处理血浆样品,操作简单,提取回收率高,而血浆中的内源性成分或代谢产物不干扰检测。

分析药时曲线图和药动学参数可知,与空腹相比较,高铁食物组Beagle犬对非洛地平的吸收相对较差,达峰浓度降低,其相对生物利用度(F)(61.0±12.7)%;查阅相关文献^[12-13], Fe^{3+} 在酸性条件中可将二氢吡啶类化合物氧化,推测富含 Fe^{3+} 食物在酸性条件下可将非洛地平氧化成杂质^[14],说明食物中的 Fe^{3+} 抑制了非洛地平吸收。降解杂质产生机制见图2。

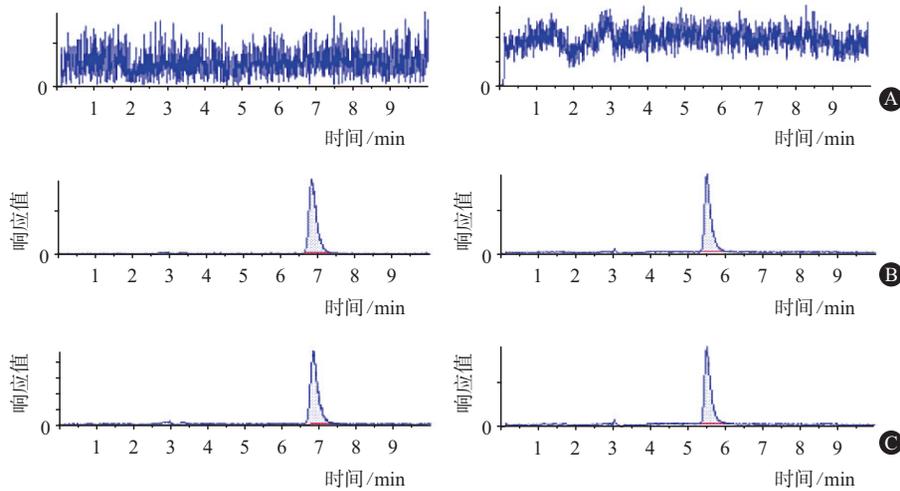


图1 血浆中非洛地平和内标尼群地平的典型色谱图:A为空白血浆;B为空白血浆加入非洛地平(15 ng/mL)和内标尼群地平(10 ng/mL);C为受试犬服药后2 h血浆加入内标尼群地平(10 ng/mL)

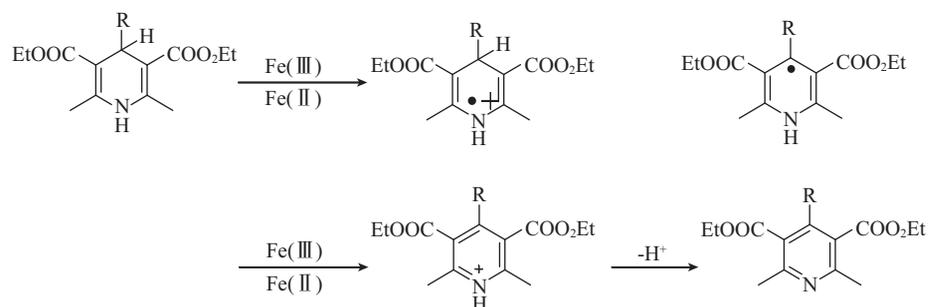


图2 降解杂质路线图

由此推测,食用含有 Fe^{3+} 食物后^[15-16],服用二氢吡啶类药物,降解杂质或有关物质增加,可影响生物利用,也可能是二氢吡啶类药物不良反应^[14]较多原因之一。因此口服非洛地平片建议餐前服用或餐后补充维生素C消耗体内 Fe^{3+} ^[17]。

参考文献

- [1] 孙冬妮.非洛地平的药理分析及临床应用研究[J].中国现代药物应用,2017,11(15):105-107.
- [2] 刘丹,张永慧,李小山,等.葡萄柚汁与药物相互作用的研究进展[J].科技视界,2016(27):127.
- [3] 柯晓丹,任丽,楼一层,等.非洛地平缓释片生物利用度及生物等效性[J].中国医院药学杂志,2014,34(5):342-346.
- [4] 朱永乐,迟敏,齐永秀.高效液相色谱-串联质谱法同时测定大鼠血浆中阿托伐他汀钙和非洛地平的浓度[J].中国医院药学杂志,2018,38(11):1148-1152.
- [5] 丁晓莉,朱玉莲,任远志,等.固体分散技术对缓释片中非洛地平的体外释放和在Beagle犬体内药动学的影响[J].中国医药工业杂志,2016,47(2):172-177.
- [6] 陈美玲,张礼金,周杰兆,等.LC-MS/MS同时测定比格犬血浆中非洛地平和美托洛尔[J].解放军药学报,2016,32(3):202-205,210.
- [7] 张彩云,易加明,袁慧玲,等.姜黄素及其制剂的药代动力学研

- 究进展[J].安徽医药,2014,18(1):1-3.
- [8] 陈平雄,齐芸.阿米卡星在严重败血症患者体内的药代动力学研究[J].安徽医药,2015,19(3):431-434.
- [9] 苏汉中,张善堂,陈卫东,等.群体药动学及其应用研究进展[J].安徽医药,2015,19(2):205-209.
- [10] 过林,裘福荣,王猛猛,等.LC-MS/MS法测定人血浆中双氯芬酸浓度的不确定度评定[J].安徽医药,2015,19(4):627-631.
- [11] 杨婷玉,黄希希,周嘉黎,等.高脂高热量饮食对头孢呋辛酯片药动学的影响[J].中国药理学杂志,2017,52(17):1531-1535.
- [12] 陈仕云,何勇,彭扶云,等.在不同介质中金属铁离子对非洛地平片溶出度影响[J].佳木斯大学学报(自然科学版),2018,36(2):264-267.
- [13] 路军,白银娟,杨秉勤,等.1,4-二氢吡啶衍生物合成方法的改进和芳构化研究[J].有机化学,2000,20(4):514-517.
- [14] 张娜,庾莉菊,李婕,等.非洛地平及其片剂的杂质研究[J].药学报,2012,47(2):223-228.
- [15] 邵紫秋.紫外分光光度法测定食物铁元素研究[J].食品安全导刊,2016(18):154-156.
- [16] 林君英,计时华.食物中游离态二价铁及游离态三价铁的测定[J].广东微量元素科学,1996,3(8):29-33.
- [17] 孟凡德,赵全芹,李明霞.紫菜多糖 $\text{Fe}(\text{III})$ 配合物的生物利用度初步研究[J].中国现代应用药学,2002,19(3):207-209.

(收稿日期:2018-05-07,修回日期:2018-07-21)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.011

◇ 药学研究 ◇

白细胞介素 10 对体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞成骨样分化与钙化的影响

路霞林,宋熙薇,曹参,王楠

作者单位:解放军东部战区总医院药品科,江苏 南京 210002

通信作者:王楠,女,副主任药师,研究方向为医院药学,E-mail:njpicew@163.com

摘要:目的 探究白细胞介素 10(IL-10)对体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞(VSMCs)成骨分化,钙化和可能的信号传导途径。方法 提取大鼠胸VSMCs,采用钙浓度测定,碱性磷酸酶(ALP)活性测定和茜素红染色观察IL-10对钙化的影响。实时聚合酶链反应(Real-Time PCR)探究IL-10对成骨样分化的作用;蛋白质免疫印迹(Western Blot)用于检测成骨分化蛋白,观察IL-10对高钙高磷诱导的VSMCs钙化的作用。**结果** IL-10促进高钙高磷引起的VSMCs钙化,上调成骨分化标志物的表达,激活骨形态形成蛋白2/白细胞抑制因子1,5/Runt相关转录因子2通路(BMP2/Smad1,5/RUNX2),并且抑制活化T细胞核因子c1(NFATc1)的表达。**结论** IL-10能够诱导VSMCs成骨样分化,这可能是临床上观察到IL-10与血管钙化相关的机制之一。IL-10这一作用与其激活BMP2/Smad1,5/RUNX2通路,抑制NFATc1激活有关。

关键词:白细胞介素 10; 血管钙化; 血管平滑肌细胞; 高钙高磷

Role of interleukin 10 in osteogenic transition and calcification of rat vascular smooth muscle cells in vitro

LU Xialin, SONG Xiwei, CAO Can, WANG Nan

Author Affiliation: Department of Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA
Nanjing, Jiangsu 210002, China