

芬太尼口颊片在比格犬体内的药动学研究^Δ

何京亚*, 桑广泽, 乔友备, 贺欣, 余喆, 吴红[#](空军军医大学药学系药物化学与药物分析学教研室, 西安710032)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)15-2052-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.15.08

摘要 目的:建立比格犬体内枸橼酸芬太尼血药浓度的测定方法,并进行芬太尼口颊片的药动学研究。方法:取6只比格犬给予芬太尼口颊片1片(675 μg/片,含服),分别于给药后2、5、10、15、30、45、60、90、120、240、360、480、720 min取静脉血1 mL,经甲醇沉淀后,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法[色谱条件:色谱柱为Agilent C₁₈,流动相为甲醇-0.02%甲酸水溶液(95:5, V/V),流速为0.5 mL/min,进样量为5 μL,柱温为30 ℃;质谱条件:采用电喷雾电离源,正离子多反应监测,检测离子为枸橼酸芬太尼质荷比(*m/z*)337.1→188.0、卡马西平(内标)*m/z* 237.1→194.1],测定枸橼酸芬太尼的血药浓度,并采用DAS 2.0软件计算药动学参数。结果:枸橼酸芬太尼检测质量浓度的线性范围为1.0~325.0 ng/mL(*r*=0.998),精密度试验的日内RSD<5%(*n*=6),日间RSD<6%(*n*=3);平均回收率为(94.65±6.32)%~(99.21±3.24)%(*n*=6);基质效应的RSD<15%(*n*=6),稳定性试验的RE在±6.2%内(*n*=3)。芬太尼口颊片在比格犬体内的药动学参数 t_{max} 为(32.5±6.1) min, $t_{1/2}$ 为(211.8±47.4) min, c_{max} 为(40.3±1.9) ng/mL,CL_{Z/F}为(0.006±0.001) L/(min·kg),AUC_{0-720 min}为(7 564.0±1 576.7) ng·min/mL(*n*=6)。结论:本方法简便、可行、准确。芬太尼口颊片在比格犬体内具有良好的速释、缓释双相释药特性。

关键词 芬太尼;口颊片;液相色谱-串联质谱法;比格犬;血药浓度;药动学

Study on Pharmacokinetics of Fentanyl Buccal Tablet in Beagle Dogs

HE Jingya, SANG Guangze, QIAO Youbei, HE Xin, YU Zhe, WU Hong (Teaching and Research Section of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Dept. of Pharmacy, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for blood concentration determination of Fentanyl buccal tablet in Beagle dogs, and to study its pharmacokinetics. METHODS: A total of 6 Beagle dogs were given Fentanyl buccal tablet 1 tablet (675 μg/tablet, buccally). The blood samples were collected 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 720 min after administration. After precipitated by methanol, LC-MS/MS method [the determination was performed on Agilent C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.02% formic acid aqueous solution (95:5, V/V) at the flow rate of 0.5 mL/min. The sample size was 5 μL and the column temperature was 30 ℃. Mass spectrometric conditions: electrospray ionization source in the multiple reaction monitoring mode was used to detect ions, fentanyl citrate: *m/z* 337.1→188.0; carbamazepine (internal standard): *m/z* 237.1→194.1] was used to determine the blood concentration of fentanyl citrate; the pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS 2.0 software. RESULTS: The linear range of fentanyl citrate were 1.0-325.0 ng/mL(*r*=0.998); inter-day RSDs of precision test were lower than 5% (*n*=6), and intra-day RSDs were lower than 6% (*n*=3); average recoveries were (94.65±6.32)%~(99.21±3.24)% (*n*=6). RSDs of matrix effect was lower than 15% (*n*=6); RE of stability tests were within ±6.2% (*n*=3). The pharmacokinetic parameters of Fentanyl buccal tablet in Beagle dogs included that t_{max} was (32.5±6.1) min; $t_{1/2}$ was (211.8±47.4) min; c_{max} was (40.3±1.9) ng/mL; CL_{Z/F} was (0.006±0.001) L/(min·kg); AUC_{0-720 min} was (7 564.0±1 576.7) ng·min/mL (*n*=6). CONCLUSIONS: The method is simple, feasible and accurate. Fentanyl buccal tablet have good fast-release and slow-release biphasic release characteristics in Beagle dogs.

KEYWORDS Fentanyl; Buccal tablet; LC-MS/MS; Beagle dogs; Blood concentration; Pharmacokinetics

以吗啡为代表的麻醉性镇痛药物因作用于中枢神经阿片受体,能强效缓解疼痛,是临床上最常用的镇痛药物。国内常用的阿片类麻醉性镇痛药主要有吗啡、哌

替啶、芬太尼、二氢埃托啡、羟考酮、可待因等^[1]。其中芬太尼系人工合成的强效麻醉性镇痛药,亲脂性高,易于透过血脑屏障进入中枢神经系统与阿片受体结合,产生强效镇痛作用,其镇痛效能约为吗啡的80~100倍^[2-4]。但枸橼酸芬太尼在机体内吸收、代谢、消除迅速,需重复给药才能维持有效血药浓度。目前上市的芬太尼缓释制剂主要包括芬太尼透皮贴剂、芬太尼口腔黏膜贴片和芬太尼口颊含片,但我国上市的仅有透皮贴剂。芬太尼

Δ 基金项目:国家科技重大新药创制项目(No.2014ZX09J14107-04B)

* 硕士。研究方向:新药研发。电话:029-84776827。E-mail:365358549@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:药物合成与分析。电话:029-84776823。E-mail:wuhong@fmmu.edu.cn

透皮贴剂起效缓慢,20~48 h后才能发挥较好的镇痛作用,适于慢性钝痛治疗,且易发生累积中毒^[2-7]。

口腔黏膜给药作为芬太尼的新型给药途径,具有可避免肝脏首过效应、不易致敏、渗透性高、使用方便等特点,无需用水吞服,特别适合吞咽困难的患者,且可根据止痛需要决定口腔片在口腔中停留的时间,一旦出现不适,可随时终止用药。1998年美国Cephalon公司上市了芬太尼口腔黏膜给药剂(商品名:Actiq)^[8-9];2006年11月Cephalon公司采用OraVescent[®]释药发明技术开发了首个芬太尼口腔泡腾片(商品名:Fentora)^[10-15],Fentora起效迅速,5~10 min即可达到有效血药浓度,但是其镇痛作用短暂,不能完全满足长时间镇痛的需要。世界卫生组织对癌症患者制定了合理应用止痛药的3条基本原则,即三阶梯止痛原则:经口、按时、逐级,目前镇痛药的口腔给药研究已经成为镇痛领域中最具发展前景的研究之一^[16-17]。本课题组在参考Actiq、Fentora制剂基础上制备了芬太尼口腔片,构建了双相释药体系。其中,速释层采用泡腾联合崩解技术,药物释放后经口腔黏膜吸收快速达到有效血药浓度;缓释层采用高分子骨架黏性辅料制备,可直接黏附于口腔黏膜并缓慢释药,长时间维持有效血药浓度,实现快速、持久的镇痛效果。本文采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测比格犬体内枸橼酸芬太尼血药浓度,并研究芬太尼口腔片在比格犬体内的药动学。

1 材料

1.1 仪器

Usorvall ST40R 台式高速离心机(美国 Thermo 公司);Masshunter 液相色谱输液泵、RW20 涡旋振荡器(德国 IKA 公司);6460 三重四级杆 LC/MS(美国安捷伦公司)。

1.2 药品与试剂

芬太尼口腔片(空军军医大学药理学系药物分析学教研室自制,批号:20161104,规格:675 μg);枸橼酸芬太尼对照品(批号:171204-200704,纯度:100%)、卡马西平对照品(批号:100142-201105,纯度:99.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

比格犬,♂,体质量为(15±2) kg,由成都达硕生物科技有限公司提供,实验动物质量合格证号:No.6100-1960000098,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2014-189,本实验通过空军军医大学相关药物实验伦理委员会审查。

2 方法与结果

2.1 枸橼酸芬太尼血药浓度的测定

2.1.1 溶液的配制 ①对照品贮备液。精密称取枸橼酸芬太尼对照品 10.0 mg,甲醇溶解配制成质量浓度为

1.0 mg/mL 的贮备液,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。②内标贮备液。精密称量卡马西平对照品 50.0 mg,甲醇溶解配制成质量浓度为 5.0 mg/mL 的贮备液,4 ℃ 冰箱保存备用,临用时用甲醇稀释至所需浓度。

2.1.2 色谱与质谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(50 mm×4.6 mm,2.7 μm);流动相:甲醇-0.02% 甲酸水溶液(95:5, V/V);流速:0.5 mL/min;进样量:5 μL;柱温:30 ℃。检测离子:枸橼酸芬太尼质荷比(*m/z*)337.1→188.0,碰撞能:30 eV,裂解能:130 V;卡马西平 *m/z* 237.1→194.1,碰撞能:40 eV,裂解能:150 V;喷雾电压:3 500 V;毛细管温度:350 ℃;雾化气流速:12.0 L/min。采用电喷雾电离源(ESI),正离子多反应监测(MRM)扫描分析。

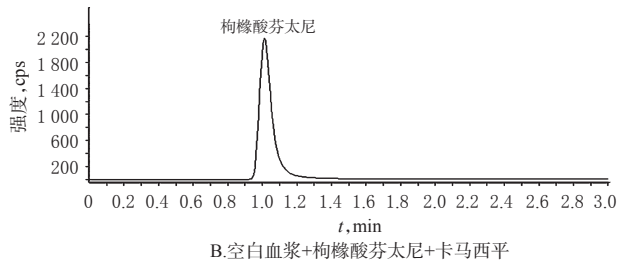
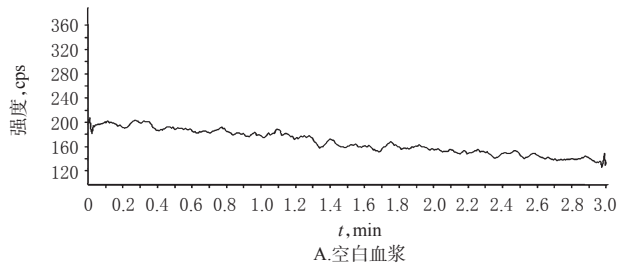
2.1.3 血浆样品的预处理 取比格犬血浆 200 μL,置于离心管中,加 10 μL 内标溶液(50 ng/mL)涡旋振荡 30 s,加入 1 mL 甲醇,涡旋混匀后 12 000 r/min 离心 15 min,移取 800 μL 上清液至 1.5 mL 离心管,氮气吹干,残渣用 80 μL 甲醇复溶,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.1.4 专属性考察 取比格犬空白血浆 200 μL,除用 10 μL 甲醇代替内标溶液外其余按“2.1.3”项下方法处理,再按“2.1.2”项下条件进样分析得空白血浆样品的色谱图;将 50 ng/mL 枸橼酸芬太尼对照品溶液和内标溶液加入空白血浆中,按上述方法操作得空白血浆+枸橼酸芬太尼+内标的色谱图。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰枸橼酸芬太尼和卡马西平的测定,枸橼酸芬太尼的保留时间为 1.1 min,卡马西平的保留时间为 1.3 min。色谱图见图 1。

2.1.5 线性关系考察 精密量取对照品贮备液适量,甲醇稀释成质量浓度为 3 250.0、1 000.0、550.0、100.0、55.0、32.5、10.0 ng/mL 的对照品系列溶液。分别吸取上述对照品系列溶液 20 μL 加入到 200 μL 空白血浆中,按照“2.1.3”项下方法处理,取上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。以枸橼酸芬太尼色谱峰面积与卡马西平色谱峰面积之比为纵坐标(*y*),枸橼酸芬太尼质量浓度为横坐标(*x*),进行线性回归。得回归方程为 $y=0.9647x+5.2841$ ($r=0.998$),结果表明,枸橼酸芬太尼在 1.0~325.0 ng/mL 质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,定量下限为 1.0 ng/mL。

2.1.6 精密度试验 按“2.1.5”项下方法,取比格犬空白血浆 200 μL 加入枸橼酸芬太尼对照品配制低、中、高 3 个质量浓度(2、50、300 ng/mL)的血浆样品,按照“2.1.3”项下方法处理,取上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,根据当日回归方程计算样品的质量浓度,计算日内、日间 RSD。结果表明,本分析方法的日内 RSD<5% ($n=6$),日间 RSD<6% ($n=3$),符合 2015 年版《中国药典》(四部)生物样品分析指导原则的有关规定。精密度结果见表 1。

枸橼酸芬太尼:



卡马西平:

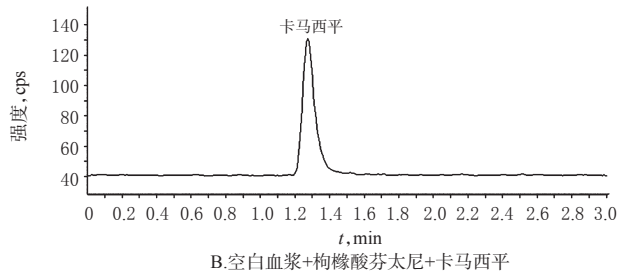
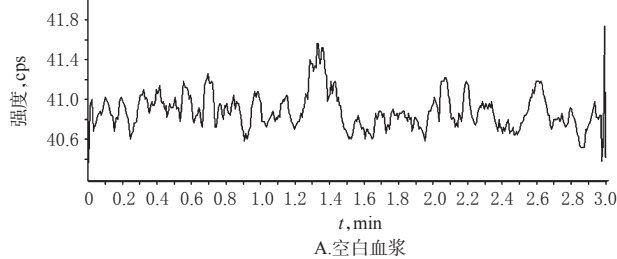


图1 LC-MS/MS图

Fig 1 LC-MS/MS chromatograms

表1 精密度结果

Tab 1 Results of precision

质量浓度, ng/mL	日内RSD($n=6$), %	日间RSD($n=3$), %
2	4.5	5.3
50	2.5	5.6
300	0.9	4.1

2.1.7 准确度试验 按“2.1.5”项下方法,取比格犬空白血浆 200 μL 加入枸橼酸芬太尼对照品配制低、中、高3个质量浓度(2、50、300 ng/mL)的血浆样品,按照“2.1.3”项下方法处理,取上清液 5 μL 进行LC-MS/MS分析,每一浓度进行6样本分析,根据当日回归方程计算样品的质量浓度,以测得浓度与配制浓度的比值计算回收率。结果显示,低、中、高3个质量浓度血浆样品的平均回收率分别为(94.65 \pm 6.32)%、(96.74 \pm 4.61)%、(99.21 \pm 3.24)%, RSD分别为5.7%、4.2%、3.2% ($n=6$)。

2.1.8 基质效应 取比格犬空白血浆 200 μL ,除不加入对照品和内标溶液外其余按照“2.1.3”项下方法处理后获得残渣,加入相应质量浓度的对照品和内标溶液,涡旋振荡,氮气吹干,以甲醇溶解后得到低、中、高3个质量浓度(2、50、300 ng/mL)的含有基质的样品,每一浓度进行6样本分析,与不含基质的相应峰面积的比值考察基质效应。结果显示,低、中、高3个质量浓度样品基质效应的RSD分别为4.1%、5.0%、8.3% ($n=6$),均 $<15\%$,符合2015年版《中国药典》(四部)生物样品分析指导原则的有关规定,表明可以忽略基质效应对本试验样品测定的影响。

2.1.9 稳定性试验 按“2.1.5”项下方法,取比格犬空白血浆 200 μL 加入枸橼酸芬太尼对照品配制低、中、高3个质量浓度(2、50、300 ng/mL)的血浆样品,分别考察于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻藏4周、3次冻融循环、室温(约 $20\text{ }^\circ\text{C}$)放置12 h和预处理后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻24 h的稳定性,每一质量浓度进行3样本分析。稳定性结果见表2。

表2 稳定性结果($n=3$)

Tab 2 Results of stability ($n=3$)

条件	指标	枸橼酸芬太尼, ng/mL		
		2	50	300
$-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻藏4周	RE, %	3.5	5.3	0.9
	RSD, %	5.1	7.1	4.1
3次冻融循环	RE, %	5.1	4.1	1.6
	RSD, %	7.3	6.1	4.2
室温 12 h	RE, %	2.4	-6.2	3.1
	RSD, %	4.5	5.1	3.3
处理后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻24 h	RE, %	-3.5	5.1	2.7
	RSD, %	6.1	3.1	7.4

2.2 药动力学实验

成人体质量按60 kg计算,根据人用剂量(900 μg /片)按体质量换算法换算犬用剂量为45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。取健康比格犬6只,给药前禁食12 h,自由饮水,然后口颊给予芬太尼口颊片1片,保证药物的含服时间在30 min以上,分别于给药后2、5、10、15、30、45、60、90、120、240、360、480、720 min取犬前肢内侧下静脉血1 mL左右,置于含有肝素钠的抗凝管中,分离血浆,备用。取各时间点的血浆样品,按照“2.1.3”项下方法处理后,按“2.1.2”项下条件进样分析,计算枸橼酸芬太尼的血药浓度,绘制药-时曲线。采用药物临床评价中心开发的DAS 2.0统计软件进行自动运算,对每只比格犬的药-时数据进行智能化处理拟合二室模型,计算药动力学参数。芬太尼口颊片在犬体内的药-时曲线图见图2,药动力学参数见表3。

由图2和表3可知,芬太尼口颊片在比格犬体内的血药浓度呈现先快速升高,后缓慢降低的趋势, t_{max} 为(32.5 \pm 6.1) min, $t_{1/2}$ 为(211.8 \pm 47.4) min,由此可见,芬太尼口颊片既能在给药后迅速发挥作用,又能维持长时间的药效。

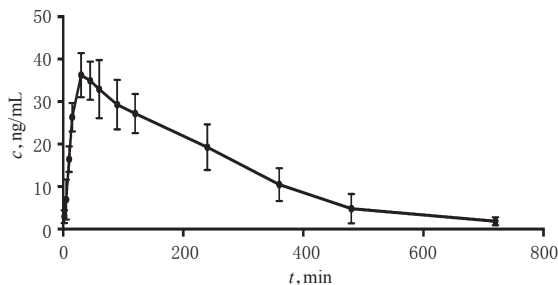


图2 芬太尼口颊片在犬体内的药-时曲线

Fig 2 Blood concentration-time curves of Fentanyl buccal tablet in Beagle dogs

表3 芬太尼口颊片在犬体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of Fentanyl buccal tablet in Beagle dogs($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	结果
AUC _{0-720min} , ng·min/mL	7 564.0 ± 1 576.7
AUC _{0-∞} , ng·min/mL	8 206.3 ± 1 633.5
CLz/F, L/(min·kg)	0.006 ± 0.001
c _{max} , ng/mL	40.3 ± 1.9
t _{1/2} , min	211.8 ± 47.4
t _{max} , min	32.5 ± 6.1

3 讨论

一个合适的内标物要求其性质稳定,不易分解,不干扰待测组分的检测。笔者最初选取了3个化合物(卡马西平、奈福泮、苯巴比妥)作为待选内标物。前期试验发现,卡马西平的提取条件、色谱保留行为与待测化合物枸橼酸芬太尼接近且回收率较高、质谱响应强,故选择了卡马西平作为内标物进行定量分析。

在血浆样品处理中,由于枸橼酸芬太尼在乙酸乙酯中溶解性较差,难以萃取,因此,用甲醇蛋白沉淀法处理样品,该法处理简单、回收率高,适用于测定比格犬血浆中枸橼酸芬太尼的浓度。

本文建立了比格犬体内枸橼酸芬太尼血药浓度测定的LC-MS/MS法,研究结果表明,本方法简便、可行、准确。药动学研究结果显示,芬太尼口颊片在比格犬体内具有良好的速释缓释双相释药特性。

参考文献

[1] 徐象威,李如雅.三种大剂量强阿片类药物治疗癌痛疗效及安全性的回顾性分析[J].中国药师,2017,7(20):1236-1240.

[2] 安红,武力勇,王琳,等.误用芬太尼透皮贴致呼吸衰竭[J].药物不良反应杂志,2016,18(3):233-234.

[3] 田野,徐子悦,管晓东,等.我国2014-2016年阿片类药物使用情况分析[J].中国药房,2019,30(9):1153-1157.

[4] KUIP EJ, ZANDVLIET ML, KOOLEN SL, et al. A review of factors explaining variability in fentanyl pharmacokinetics; focus on implications for cancer patients[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(2):294-313.

[5] BARRATT DT, KLEPSTAD P, DALE O, et al. Innate immune signalling genetics of pain, cognitive dysfunction and sickness symptoms in cancer pain patients treated with transdermal fentanyl[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):1-13.

[6] ZECCA E, MANZONI A, CENTURIONI F, et al. Pharmacokinetic study between a bilayer matrix fentanyl patch and a monolayer matrix fentanyl patch: single dose administration in healthy volunteers[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2015, 80(1):110-115.

[7] KANG JH, OH SY, SONG SY, et al. The efficacy of low-dose transdermal fentanyl in opioid-naïve cancer patients with moderate-to-severe pain[J]. *Korean J Intern Med*, 2015, 30(1):88-95.

[8] OOSTEN AW, ABRANTES JA, JÖNSSON S, et al. Treatment with subcutaneous and transdermal fentanyl: results from a population pharmacokinetic study in cancer patients[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2016, 72(4):459-467.

[9] GORDON D, SCHROEDER M. Oral transmucosal fentanyl citrate: OTFC(ACTIQ)#103[J]. *J Palliat Med*, 2008, 11(4):633-634.

[10] ZIESENITZ VC, VAUGHNS JD, KOCH G, et al. Pharmacokinetics of fentanyl and its derivatives in children: a comprehensive review[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57(2):125-149.

[11] WADMAN M. 'Biased' opioids could yield safer pain relief[J]. *Science*, 2017, 358(6365):847-848.

[12] ROGERS E, WRIGHT C, KING P. Fentanyl lozenge story part 2: from military procurement to package[J]. *J R Army Med Corps*, 2018, 164(6):458-462.

[13] TAYLOR DR, WEBSTER LR, CHUN SY, et al. Impact of breakthrough pain on quality of life in patients with chronic, noncancer pain: patient perceptions and effect of treatment with oral transmucosal fentanyl citrate (OTFC®, ACTIQ®)[J]. *Pain Medicine*, 2007, 8(3):281-288.

[14] PIEPER L, WAGER J, ZERNIKOW B. Intranasal fentanyl for respiratory distress in children and adolescents with life-limiting conditions[J]. *BMC Palliat Care*, 2018, 17(1):106.

[15] U. S. FDA. Safety alert for fentanyl buccal tablets[J]. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2008, 22(1):47.

[16] GUITART J, VARGAS MI, DE SANCTIS V, et al. Effects of age among elderly cancer patients on breakthrough pain management with sublingual fentanyl tablets[J]. *Drugs R D*, 2019. DOI: 10.1007/s40268-019-0276-x.

[17] 刘树林,叶华,翟永松,等.缓释/控释制剂的风险管理[J].中国医药导报,2014,11(30):120-124.

(收稿日期:2019-03-16 修回日期:2019-06-19)

(编辑:邹丽娟)