

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA ×××××—××××

犬内服药物生物药剂学分类系统溶解度测定和分 类

Solubility determination and classification of biopharmaceutics classification system
for drugs taken orally in dogs

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

××××—××—××发布

××××—××—××实施

中国兽医协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、青岛农业大学

本文件主要起草人：郝智慧、王存才、王莘莘、李康、郎丰亭



犬内服药物生物药剂学分类系统溶解度测定和分类

1 范围

本标准规定了基于生物药剂学分类系统的规范性引用文件、术语和定义、犬内服药物生物药剂学分类系统溶解度测定和分类的影响因素、试验操作、分类方法等技术要求。

本标准适用于犬内服药物生物药剂学分类系统溶解度测定和分类的相关工作。

2. 缩略语表

缩略语	英文名称	中文名称
BCS	Biopharmaceutics Classification System	生物药剂学分类系统
MRI	Magnetic Resonance Imaging	核磁共振
GI	Gastrointestinal	胃肠道
RT	Repetition Time	重复时间
TE	Echo Time	回声时间
FOV	Field of View	视场
API	Active Pharmaceutical Ingredients	原料药
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
LOD	Limit of Detection	最低检测限
LOQ	Limits of Quantification	最低定量限
BE	Bioequivalence	生物等效性
MDCK	Madin-Daby Canine Kidney Cell	犬肾上皮细胞
M-199	Medium 199	M-199 细胞培养基
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution	汉克斯缓冲液
K-R	Krebs-Ringer Buffer	林二氏缓冲液
TEER	Trans-epithelial Electrical Resistance	跨上皮电阻
AP	Apical	顶端
BL	Basolateral	基底

3 仪器

3.1 高效液相色谱仪

3.2 色谱柱 Agilent SB C18 (250 mm×4.6 mm×5 μm)

3.3 电子分析天平

3.4 微型 pH 测定仪

3.5 数显恒温摇床

3.6 核磁共振仪

3.7 体重秤

3.8 微型离心机

3.9 水银温度计

3.10 电阻仪

3.11 二氧化碳恒温培养箱

3.12 超净台

4 试剂

4.1 盐酸（分析纯）

4.2 氢氧化钠（分析纯）

4.3 磷酸（分析纯）

4.4 磷酸二氢钾（分析纯）

4.5 磷酸氢二钠（分析纯）

4.6 磷酸二氢钠（分析纯）

4.7 氨水（分析纯）

4.8 甲酸（分析纯）

4.9 甲醇（色谱纯）

4.10 乙腈（色谱纯）

4.11 水合氯醛（医用级）

4.12 戊巴比妥钠（医用级）

4.13 凡士林（分析纯）

4.14 Krebs-Ringer 缓冲液

4.15 HBSS 缓冲液

4.16 其他试剂均为分析纯

5 对照品与原料药

5.1 标准品

5.1.1 土霉素

- 5.1.2 盐酸四环素
- 5.1.3 盐酸多西环素
- 5.1.4 甲矾霉素
- 5.1.5 氟苯尼考
- 5.1.6 替米考星
- 5.1.7 磺胺嘧啶
- 5.1.8 磺胺对甲氧嘧啶钠
- 5.1.9 磺胺二甲氧嘧啶钠
- 5.1.10 磺胺间甲氧嘧啶
- 5.1.11 磺胺氯哒嗪钠
- 5.1.12 磺胺甲噁唑
- 5.1.13 二甲氧苄啶
- 5.1.14 恩诺沙星
- 5.1.15 甲氧苄啶
- 5.1.16 美托洛尔
- 5.1.17 甲硝唑
- 5.2 原料药
 - 5.2.1 土霉素
 - 5.2.2 盐酸四环素
 - 5.2.3 盐酸多西环素
 - 5.2.4 甲矾霉素
 - 5.2.5 氟苯尼考
 - 5.2.6 替米考星
 - 5.2.7 磺胺嘧啶
 - 5.2.8 磺胺对甲氧嘧啶钠
 - 5.2.9 磺胺二甲氧嘧啶钠
 - 5.2.10 磺胺间甲氧嘧啶
 - 5.2.11 磺胺氯哒嗪钠
 - 5.2.12 磺胺甲噁唑
 - 5.2.13 二甲氧苄啶
 - 5.2.14 恩诺沙星
 - 5.2.15 甲氧苄啶
 - 5.2.16 美托洛尔
 - 5.2.17 甲硝唑

6 溶液的配制

6.1 不同 pH 水性缓冲溶液的配制方法见附录 A。

pH2.0 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.1 配制）

pH5.0 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.2 配制）

pH6.8 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.3 配制）

pH7.0 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.4 配制）

pH7.4 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.5 配制）

pH7.8 磷酸盐缓冲液（按照附录 A.6 配制）

6.2 细胞渗透液配制

pH=6.4: 准确量取 1000mL K-R 缓冲液，逐滴滴加 0.2 mol/L 盐酸调 pH 为 6.4。

pH=7.0: 准确量取 1000mL K-R 缓冲液，逐滴滴加 0.2 mol/L 盐酸调 pH 为 7.0。

7 药物 HPLC 测定方法

7.1 测定条件

根据查阅文献结合《中华人民共和国国家标准》以及 2015 年版《中国兽药典》，结合本实验室仪器设备，建立 17 种犬常用药物的 HPLC 条件，具体的 HPLC 条件见附录 B。

7.2 HPLC 方法学考核

7.2.1 专属性

取适量贮备液，添加一定体积稀释液稀释至不同浓度，相应稀释液作为空白对照，比较空白样品与样品色谱图，以药品出峰时间处无杂质干扰为准，确定方法的特异性。

7.2.2 线性范围

取空白 pH 缓冲液，添加适量药物贮备液，稀释成一系列不同浓度的工作液，涡旋 1 min ~ 2 min，0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 检测，每个浓度 3 次重复，将对应浓度与平均峰面积值作线性回归，得线性回归方程与相关系数。

7.2.3 灵敏度

精确量取药物工作液备用，用特定稀释液稀释成一系列不同浓度的工作液样品，每个浓度 3 次重复，记录测得的信号强度 S 与背景信号强度 N，以 $S/N \geq 3$ 时样品浓度为最低检测限 (Limit of detection, LOD)。以 $S/N \geq 10$ 时样品浓度为最低定量限 (Limit of quantitation, LOQ)。

7.2.4 精确度

取空白稀释液，添加适量的药物标准贮备液，配置低、中、高 3 个浓度，各 5 份，每天测定 1 次连续测定 3 天，取平均值，计算日内变异系数与日间变异系数以及回收率。

8 药物溶解度测定过程

8.1 生理常数测定

8.1.1 犬的麻醉

本研究采用 12 只健康 Beagle 犬（公母各 6 只），体重 9 kg ~12 kg，采用 12 h 光暗周期饲养。核磁共振 (MRI)扫描前 16 小时禁食，并在扫描前 4 小时停止供水。称重并记录后，先肌肉注射含量为 10%的水合氯醛 (0.1 mL/kg)，2 min 后静脉注射戊巴比妥钠 (0.05 mL/kg) 麻醉。该方法已被证实对胃肠道分泌的影响可以忽略不计。。

8.1.2 胃液体积的测量

使用MRI扫描仪进行图像扫描。将犬置于俯卧位，腹部缠绕一个双通道偏振圆线圈。横断面和矢状面扫描参数为重复时间 (TR) 1100 ms，回声时间 (TE) 122 ms，层厚4 mm，无层间隙，视场 (FOV) 308 mm ~ 380 mm。冠状面扫描的特征序列为TR为4.5 ms, TE为2.25 ms。每只扫描时间为15min。扫描完成后，每只犬灌胃水100 mL，稳定2 min，重复上腹部扫描。扫描期间，至少有一人在场观察犬在紧急情况下的状态。

使用 Amira 6.0.1 图形软件处理核磁图像，该软件自动识别所有包含液体的区域并生成三维模型，并直接给出模型的体积数据。使用 GraphPad Prism 7 进行统计分析胃液体积并以平均标准偏差 (SD)表示。

8.1.3 体温与胃肠道 pH 的测量

实验动物麻醉前进行体温测量。在水银温度计前均匀涂抹凡士林保持润滑，旋转入直肠 5 cm ~ 8 cm，直至获得稳定读数。

采用外科手术方法将麻醉犬的腹腔切开约 10 cm 的开口，依次暴露胃、十二指肠、空肠、回肠和结肠，将微 pH 探针插入相应肠内容物中测量各肠段的 pH 值。实验结束后，所有的动物交由兽医护理直到完全康复。

8.2 药物平衡溶解度检测

准确称取药物的单次最大使用剂量，记录后置于50 mL锥形瓶中，加入24 mL的pH为3 ~ 7.8的缓冲介质，在温度为 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，在转速为30r/min的 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水恒温水浴摇床中振摇24h后，再在该温度下静置2h，取上清液离心，再经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液，每种药物按《中国兽药典》2015版规定的检测方法进行检测。

缓冲液根据中国兽药典规定的常用不同 pH 缓冲液配制方法进行配制，具体见附录 A。

8.3 计量数 (Do) 的计算

将收集的溶液用 10000 r/min 离心，离心 5 min，吸取上清液， $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后于 HPLC 进行测定。

根据以下公式计算药物的计量数：

$$D_o = \frac{M/V_0}{C_s}$$

式中：式中 M 为固体药物的最高剂量强度， V_0 为给药体积 (24mL)， C_s 为药物的平衡溶解度 (mg/mL)。

9 溶解度测定标准和分类

根据 MRI 扫描犬的胃液体积, 得到胃液体积为 24.0 mL; 在体肠道测量法得到犬在禁食与进食两种状态下胃肠道各部分(胃、十二指肠、空肠了、回肠)的 pH 值, 使用肛门测温法测得犬的核心体温。结合人用药物 BCS 中胃肠道生理学常数研究, 制定出犬口服药物生理学测定标准, 并得到犬用药物体外溶解度标准, 即单次给药最大剂量可在 38.5 °C, pH3.0 ~ 7.8 时完全溶解在 24.0 mL 液体中。根据建立的溶解度测定标准检测 17 种犬口服药物的 D_o 值, 并对其进行溶解度分类。

10 BCS 溶解度分类标准

根据 FDA 指导原则, 溶解度高低的判定用计量数 D_o 表示, 本研究以此为依据建立犬常用内服药物 BCS 溶解度标准。根据计量数的数值, $D_o \geq 1$ 的药物被分为低溶解度, $D_o < 1$ 的为高溶解度。

11 药物渗透系数 (P_{app}) 测定过程

11.1 细胞的培养

根据调研文献提供方法进行细胞培养, 培养方法见附录 C。

将第 10~15 代的 LLC-PK1 细胞培养在含有 10% FBS 和 1% 青霉素链霉素的 M199 中。所有细胞均在温度为 37°C, CO_2 含量为 5% 的培养箱中生长。将 LLC-PK1 细胞以 8×10^4 细胞/cm² 的密度接种在 Transwell 板的聚碳酸酯膜上, 并分别在细胞培养箱中生长。通过跨上皮电阻 (TEER) 值评估细胞单层的生长状态, 并在 TEER 值大于 300 Ω /cm² 时用于渗透研究。

11.2 药物在细胞模型上的渗透性测定

将 HBSS 缓冲液用于基底外侧 (BL) 一侧, K-R 缓冲液 (pH 6.4 和 7.0) 用于顶端 (AP) 一侧。在实验之前, 除去细胞培养基并用空白缓冲液冲洗, 然后与空白缓冲液一起温育 15 min。15 min 后, 用 0.5 mL 药物溶液 (pH 6.4 或 7.0) 替换 AP 侧的空白缓冲液, 并在 BL 侧添加 1.5 mL HBSS 缓冲液用于 AP-BL 方向研究。将 BL 侧的空白缓冲液替换为 1.5 mL 含药物的 HBSS 缓冲液, 并将 0.5 mL 的空白缓冲液 (pH 6.4 和 7.0) 添加到 AP 侧以用于 BL-AP 方向研究。每隔 15 min (15、30、45、60、75、90、105 和 120 min) 从空白缓冲液一侧收集样品, 并及时补充相同体积的空白缓冲液。在第 120 min 时收集供体侧的样品, 并在实验结束后立即通过 HPLC 分析所有样品。

11.3 渗透系数 (P_{app}) 的计算

将收集的渗透液 10000 r/min, 25°C, 离心 5 min, 吸取上清液, 0.22 μ m 滤膜过滤后于 HPLC 进行测定。

根据以下公式计算药物的渗透性:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{AC_0}$$

式中：其中 dQ/dt 是药物在接收器腔室中的出现率 ($\mu\text{mol/s}$)， C_0 是供体隔室中的初始浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)， A 是细胞培养插入物的渗透面积 (cm^2)。

12 渗透性测定标准和分类

美托洛尔是被国际认可的用于区分药物渗透性高/低的边界性药物 (P_{app} 值高于美托洛尔则被分为高渗透性，反之为低渗透性)。利用 LLC-PK1 细胞模型测定药物的渗透性，并以 P_{app} 值表示，将各模型药物在不同浓度和 pH 时的 P_{app} 值与美托洛尔进行比较并建立渗透性测定标准。其中药物浓度根据药物最高给药剂量的 1、0.1 和 0.01 倍而设定，而 pH 则分别为犬胃肠道的平均值与最高值。根据建立的渗透性测定标准检测 17 种犬口服药物的 P_{app} 值，并对其进行渗透性分类。

13 BCS 分类

利用确定的溶解度分类标准和渗透性分类标准对 17 种犬口服药物进行 BCS 分类。

附录 A
(规范性)
缓冲溶液的配制方法

A.1 pH2.0 磷酸盐缓冲液:

甲液: 取磷酸 16.6 mL, 加水至 1000 mL, 摇匀; 乙液: 取磷酸氢二钠 71.63 g, 加水使溶解成 1000 mL。取上述甲液 72.5 mL 与乙液 27.5 mL, 摇匀, 即得。

A.2 pH5.0 磷酸盐缓冲液:

取 0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液一定量, 用氢氧化钠试液调节 pH 至 5.0, 即得。

A.3 pH6.8 磷酸盐缓冲液:

取 0.2mol/L 磷酸二氢钾溶液 250 mL, 加 0.2 mol/L 的氢氧化钠溶液 118 mL, 用水稀释至 1000 mL, 即得。

A.4 pH7.0 磷酸盐缓冲液:

取磷酸二氢钾 0.68 g, 加 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 29.1 mL, 用水稀释至 100 mL, 即得。

A.5 pH7.4 磷酸盐缓冲液:

取磷酸二氢钾 1.36 g, 加 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 79 mL, 用水稀释至 200 mL, 即得。

A.6 pH7.8 磷酸盐缓冲液:

甲液: 取磷酸氢二钠 35.9 g, 加水溶解并稀释至 500 mL; 乙液: 取磷酸二氢钠 2.76 g, 加水溶解并稀释至 100 mL。取上述甲液 91.5 mL 与乙液 8.5 mL 混合, 摇匀, 即得。

附录 B
(规范性)
MDCK 细胞培养

B.1 培养条件:

37°C, 含 CO₂ 浓度为 5%, 湿度 90% 环境中。

B.2 M199 培养全液:

89% M199 培养基+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素

B.3 细胞传代:

当细胞在培养瓶中贴壁生长至大约 80% 融合时, 用无菌移液管吸出培养基, 弃掉; 然后加入 2 mL 胰蛋白酶 (TE) 润洗 1 次, 轻轻晃动培养基, 使 TE 浸洗到瓶底的所有部位, 大约 10 S 后, 吸出弃掉; 再加入 2 mL 胰蛋白酶, 放入二氧化碳培养箱中静置; 约 3 min ~ 5 min 后, 轻轻晃动培养瓶, 肉眼可观测到白色粒状细胞脱落, 显微镜下观察, 发现胞质回缩, 细胞间隙变大, 细胞变圆后, 加入 4 mL 的 M199 培养全液, 终止消化, 用移液管将细胞吹打成细胞悬液; 将细胞混悬液平均分成几份, 接种于新的细胞培养瓶中, 置于培养箱中培养。

B.4 试验前操作:

在细胞生长状态良好时, 按照细胞传代方式消化细胞, 制成细胞悬液, 待细胞计数完成后, 计算出自己所需要的细胞液体积量, 按照每孔 80,000 个细胞的密度接种于 24 孔 Transwell 培养板上, 细胞的顶侧 (AP) 加入培养液 0.5 mL, 基底侧 (BL) 加入培养液 1.5 mL, 在加入细胞液时, 液体不要直对半透膜打入, 否则会对半透膜造成创口, 要对着小室的边缘壁打入。接种完成后, 轻轻的将培养板拿到二氧化碳培养箱中进行培养, 注意, 此时千万不要晃动培养板, 一定要平稳的拿, 否则细胞会聚集在一起, 形成团块。

跨膜电阻测定 (单层细胞膜完整性评估):

取出 Transwell 细胞培养板, 现进行细胞换液, 将之前的细胞培养液抽出, 再在 AP 侧加入培养液 0.5 mL, BL 侧加入培养液 1.5 mL, 置于细胞培养箱中温育 10 min (注意, 在细胞换液时, 枪头一定不要接触到半透膜, 否则容易把半透膜戳漏), 然后取出于操作台中用细胞电阻仪测定在 37 °C 时的电阻值 (测定电极要提前用酒精浸泡 15 min 进行消毒才可使用), 为 $\Delta\Omega$ 空白组。取接种有 LLC-PK1 细胞的 Transwell 培养板, 抽出 AP、BL 侧液体, AP 侧加入培养液 0.5 mL, BL 侧加入培养液 1.5 mL, 置于细胞培养箱中温育 10 min, 取出于操作台中用细胞电阻仪测定其在 37 °C 时的电阻值, 为 $\Delta\Omega$ 测定组。由于电阻值与细胞和培养液的性质以及环境温度有关, 所以每次细胞换上新鲜的同一批配制的培养液后, 用电阻仪在 37 °C 的条件下测定电阻值。

B.5 细胞跨膜电阻值 (TEER) 计算公式:

$$TEER = (\Delta\Omega_{\text{测定组}} - \Delta\Omega_{\text{空白组}}) \times \Delta A$$

其中 $\Delta\Omega$ 测定组为生长有 LLC-PK1 细胞的 Transwell 培养板电阻值; $\Delta\Omega$ 空白组为未培养细胞但是具有相同体积培养液的 Transwell 培养板的电阻值; ΔA 为膜的表

面积,本试验中是 24 孔 Transwell 培养板,其中细胞的接种表面积为 0.3 cm^2 、孔径为 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 。

中国兽医协会
CVMA