

说明缓释片药物的体外行为符合 Higuchi 方程。

2.3 初步稳定性试验 将缓释片密封于包装瓶里,置温度 40℃,相对湿度 75% 的条件下储藏 3 个月,室温留样 6 个月,分别观察外观,测定其含量及释放度,结果表明:缓释片稳定性较好,各项指标无明显变化。

3 讨论

3.1 本缓释片处方含有多种成分,氨茶碱为主药。并有氢溴酸东莨菪碱,地巴唑、安定等辅助成分。地巴唑对血管平滑肌有松弛作用,安定有抗焦虑,镇静,催眠作用,多种组分协同作用,取得了良好的治疗效果。

3.2 处方中氨茶碱含量远远高于其他组分,故用紫外分光光度计测定缓释片氨茶碱含量及体外释放度,其他成分基本无干扰,方法简便、快捷,结果可靠。用 HPLC 法测定地巴唑和安定。由于氢溴酸东莨菪碱在处方中含量很低,故未做定量。

3.3 本实验对不同的溶出介质、不同转速对缓释片溶出度的影响进行考察。结果显示,在稀盐酸(24[→]1 000ml)、水、磷酸盐缓冲液 3 种溶出介质中氨茶碱的释放度有一定差异。氨茶碱在酸性溶媒中的溶出

度较大。考察缓释片在转蓝转速 50、75、100r/min 时的溶出度,结果表明,转速对释放度结果影响不大。参考文献^[4],选择以稀盐酸为溶出介质,转速为 100r/min,作为释放度测定的条件。

3.4 处方中的成分多为水溶性药物,加入 EC 为阻滞剂,可延缓药物的释放。正交实验表明,HPMC 及 EC 的含量对药物的释放影响较大。这两种成分含量越高,缓释效果越明显。用本实验优选的处方制备的缓释片($n = 6$),溶出度测定,2h 氨茶碱累积释放率为(30.99±3.08)%,6h 累积释放率为(66.06±2.45)%,12h 累积释放率为(92.68±1.94)%,可以达到缓释的效果。

参考文献:

[1] 王卓,贾伟,唐星,等.羟丙基甲基纤维素对茶碱缓释片释放度的影响[J].沈阳药科大学学报,1997,14(4):225

[2] 何文,罗云,王芳,等.磷酸川芎嗪缓释片的研制[J].广东药学院学报,2003,19(3):214

[3] 李嘉煜,董娥,李华,等.盐酸二甲胍缓释片释药因素考察及处方筛选[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):88

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[S].北京:化学工业出版社,2005:618

(收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-10-13)
(本文编辑 魏萍)

文章编号:1008-9926(2006)01-0040-04 中图分类号:R969.1 文献标识码:A

吗替麦考酚酯片在男性健康志愿者体内生物等效性研究

王健康^①,张福成,张华峰,董晓莉,苗新

(中国人民解放军空军总医院 临床药理科 北京 100036)

摘要:目的 评价吗替麦考酚酯片剂在 20 名男性健康志愿者体内的生物等效性。方法 受试者随机、双交叉、单剂量口服国产吗替麦考酚酯分散片和进口吗替麦考酚酯片剂 1 000mg。药物血浆浓度采用 HPLC 法测定;药动学参数采用 DAS 软件处理获得。色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈,流动相为乙腈-水-三乙胺磷酸溶液(35 45 30, v/v),紫外检测波长为 250nm,4 乙基苯甲酸为内标。结果 两种制剂 $T_{1/2k}$ 分别为(12.58±5.27)、(10.59±2.64)h, C_{max} 分别为(31.47±11.16)、(30.65±10.81)mg·L⁻¹, T_{max} 分别为(0.63±0.35)、(0.61±0.23)h, AUC₀₋₄₈ 分别为(60.08±12.47)、(57.06±10.41)mg·L⁻¹·h。试验药相对生物利用度为(110±46)%。经双单侧 t 检验和方差分析,试验药和参比药符合生物等效标准。结论 国产与进口吗替麦考酚酯片剂具有生物等效性。

关键词:吗替麦考酚酯;高效液相色谱法;生物等效性

Bioequivalence of Two Oral Formulations of Mycophenolate Mofetil Tablet in Male Healthy Volunteer

WANG Jiarr Kang, ZHANG Fir Cheng, ZHANG HuarFeng, LIU ZherrYe, MIAO Xin

(Dept of Pharmacology, General Hospital of Air Force, Beijing 100036 China)

^① 作者简介:王健康(1974),男,北京人,在读硕士,主管药师。研究方向:体内药物分析。Tel:13701387551;E-mail:kzwk@sina.com

ABSTRACT: Aim To study the bioequivalence of the tested and reference mycophenolate mofetil tablets in 20 male healthy volunteers. **Methods** According to the crossover design, each volunteer was orally given 1000mg mycophenolate mofetil tablet. The plasma concentrations were determined by HPLC. Pharmacokinetic parameters were obtained using DAS program. Separation was achieved on the Agilent Zorbax SB C₁₈ column, and the mobile phase consisted of acetonitrile-water-triethylamine phosphate solution (35: 45: 30, v/v). The UV-detection wavelength was 250nm, with 4-ethylbenzoic acid as the internal standard. **Results** $T_{1/2ke}$ were (12.58 ± 5.27) and (10.59 ± 2.64) h; T_{max} were (0.63 ± 0.35) and (0.61 ± 0.23) h; AUC_{0-48} were (60.08 ± 12.47) and (57.06 ± 10.41) mg·L⁻¹·h. The relative bioavailability was (110 ± 46)%. The data of the reference and tested drugs were up to the standard of bioequivalence as shown by two one side t test and ANOVA. **Conclusion** The result shows that the two tablets are bioequivalent.

KEY WORDS: Mycophenolate mofetil; HPLC; Bioequivalence

吗替麦考酚酯(Mycophenolate mofetil, 简称MMF)是吗替麦考酚酸(Mycophenolic acid, 简称MPA)的2-乙基酯类衍生物,为一种免疫抑制剂。是高效、选择性、非竞争性、可逆性的次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPH)抑制剂,可抑制T、B细胞中嘌呤的合成,其对增殖的淋巴细胞有很高的选择作用,还能通过直接抑制细胞增殖来抑制抗体形成。临床上主要用于预防同种肾移植病人的排斥反应和治疗难治性排斥反应,可与环孢素和肾上腺皮质激素同时应用。对肾移植患者的排斥反应的预防和难治性排斥的治疗极其有效。MMF口服后迅速大量吸收,口服后在体内循环中检测不到MMF,代谢为活性成分MPA^[1]。

本试验目的是评价口服单剂量吗替麦考酚酯分散片(试验药A)和吗替麦考酚酯片(参比药R)在空腹、健康中国男性受试者中的药代动力学特点和生物等效性。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LG-10Avp 高效液相色谱仪; SPD-10Avp 紫外光检测器; Class-VP5.03 色谱工作站(均为日本岛津制作所); 循环水式多用真空泵(北京四环仪器厂); 过滤装置(北京迦腾仪器厂); XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); TGL-16G 高速离心机(上海医用分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂 试验药: 吗替麦考酚酯分散片, (商品名: 顺友, 规格: 250mg/片, 浙江尖峰药业有限公司, 批号 030321)。参比药: 吗替麦考酚酯片, (商品名: 骁悉, 规格: 500mg/片, 上海罗氏制药有限公司, 批号 B2065)。吗替麦考酚酸标准品(纯度为 99.6%, 上海泰仑医药技术有限公司); 4-乙基苯甲酸(简称 EBMA, 纯度为 97.8%, 购于 Fluka 公司, HPLC 级); 磷酸氢钠、三乙胺、磷酸等均为分析纯; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 试验用水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 试验方案 本试验采用双交叉设计。据文献^[1]报道, MPA 的 $T_{1/2}$ 为 16h 左右, 故将双交叉 2 周期试验洗脱期时间定为 1 周。

受试者于试验前 1d 吃清淡晚餐后入住我院 I 期病房, 禁食 10h, 受试当天早晨空腹用 250ml 温开水送服国产试验药或参比药 1 000mg。受试者于服药前、服药后 10、20、30、45、60min 及 1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12、24、36、48h 于肘静脉取血 4.0ml, 在 0.5h 内 3 000r/min 离心 10min 分离血浆, -20℃ 冰箱保存直至测定。受试者于服药后 2h 方可饮水, 4h 后进统一标准餐。服药期间禁用其他药物及含咖啡因类成分的饮料, 禁止吸烟、饮酒。试验洗脱期时间为 1 周。再次服药时, 20 名受试者交叉给药后重复试验。用高效液相-紫外检测法(HPLC-UV)检测血液中 MPA 的浓度。整个试验过程在 1 名医师及 2 名护士的监护下进行。本试验方案经空军总医院伦理委员会审核并获得通过。

2.2 数据分析方法 将受试者口服试验药及参比药后的血药浓度列表并计算均值及标准差, 绘制血药浓度-时间曲线, 采用孙瑞元教授主编的 DAS 程序计算受试药物与参比药物吗替麦考酚酸主要药代动力学参数。 C_{max} 、 T_{max} 以实测值表示, AUC_{0-48} 、 $AUC_{0\infty}$ 以梯形法计算; 其中 AUC_{0-48} 、 $AUC_{0\infty}$ 和 C_{max} 作对数转换后再代入统计计算。应用方差分析法和单侧 t 检验对 AUC_{0-48} 、 $AUC_{0\infty}$ 、 C_{max} 、 T_{max} 进行统计分析, T_{max} 同时采用 Wilcoxon Single Ranks 检验, 以此评价试验药与参比药的生物等效性。

2.3 色谱条件^[3,5] 色谱柱 Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6mm × 150mm, 5μm); 流动相: 乙腈-水-三乙胺磷酸溶液(35: 45: 3, v/v); 流速: 1.0ml/min; 内标: 4-EBMA(0.1mg·ml⁻¹); 检测波长: 250nm; 柱温: 25℃;

室温: (25 ± 3) °C。

2.4 样品处理方法 血样预处理: 采全血 4ml 置于离心管内以 3 000r/min 离心 10min, 分离上层血浆置于冰箱- 20 °C 储存。取血浆 100μl 加入含有内标物 4-EBMA 的乙腈溶液 150μl, 震荡, 以 10 000r/min 离心 10min, 取上清液 150μl 加入流动相 150μl 稀释、震

荡、离心, 取上清液进样, 进样量为 40μl。

2.5 样品色谱峰分离 在所设立的色谱条件下, MPA 保留时间为 8min 左右, 内标 EBMA 保留时间为 11min 左右, MPA 与内标 EBMA 及血浆中的干扰物质能得到良好分离。色谱图见图 1。

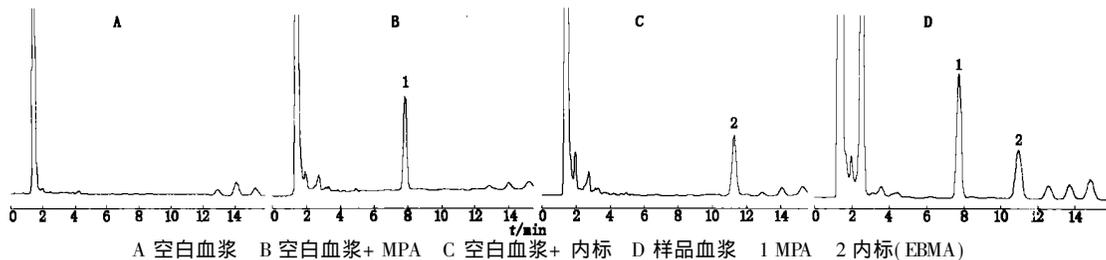


图 1 MPA 与内标 EBMA 色谱图

Fig 1 Chromatogram of MPA and internal standard

2.6 标准曲线与线性范围及最低检测浓度 精密吸取 MPA 标准品溶液, 加入空白血浆, 配成浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.1、10.1、25.3、50.6mg·L⁻¹ 的系列标准血浆浓度样品, 按 2.4 方法对样品进行处理后, 进样测定。以 MPA 峰面积对校正内标峰面积的比值(X) 对浓度(Y) 作图, 并用最小二乘法进行线性回归分析, 得回归方程为:

Y = 5.19X - 0.0046, r = 0.9999, n = 5

MPA 血浆的浓度在 0.1~ 50.6mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.7 回收率试验 于空白血浆中精密加入定量的 MPA 标准溶液, 配成 0.51、5.06、25.32mg·L⁻¹ 的浓度系列, 按前述方法处理进样, 每个浓度测定 5 个样品。测得平均回收率为 98.44%, RSD 为 0.47%。

2.8 精密度试验 取 MPA 标准液, 配成 0.51、5.06、25.32mg·L⁻¹ 的浓度系列, 按前述方法处理进样, 每个浓度测定 5 个样品, 连续测定 5d, 测得日内 RSD 为 0.47%; 日间 RSD 为 1.98%。

2.9 稳定性试验 按上述方法操作, 配成 0.51、5.06、25.32mg·L⁻¹ 的浓度系列, 分别在常温 24h、冰冻 24h、冻融 1 周后测定, 结果见表 1。

表 1 吗替麦考酚酸稳定性试验结果(x̄ ± s, n = 3)

Tab 1 Result of the stability test for MPA(x̄ ± s, n = 3)

放置条件	MPA 测得含量的百分比 (%)		
	0.51	5.06	25.32(mg·L ⁻¹)
室温(24h)	100.36 ± 0.01	100.38 ± 0.01	101.35 ± 0.079
冰冻(24h)	97.2 ± 0.01	100.24 ± 0.01	99.8 ± 0.04
冻融(1周)	96.52 ± 0.01	96.12 ± 0.01	99.22 ± 0.02

本实验中, 每次提取的血样均在室温下 1h 内进样, 血样在 - 20 °C 冰箱内保存不超过 1 周, 故在此条

件下, 血浆样品稳定性可以可满足实验要求。

2.10 血药浓度—时间曲线 20 名健康志愿者一次口服吗替麦考酚酯片 1 000mg 吸收后, 血浆中 MPA 药物浓度-时间曲线经拟合后, 符合一级动力学二室模型。测得结果见表 2。

表 2 血浆中吗替麦考酚酸浓度(x̄ ± s, n = 20)

Tab 2 The concentration of MPA in plasma(x̄ ± s, n = 20)

时间 (h)	参比药血药浓度 (mg·L ⁻¹)	试验药血药浓度 (mg·L ⁻¹)
0	0	0
0.17	7.06 ± 4.04	6.02 ± 4.06
0.33	20.92 ± 12.86	20.93 ± 14.54
0.5	24.64 ± 9.73	25.39 ± 12.02
0.75	22.66 ± 8.74	20.95 ± 10.87
1.0	18.11 ± 7.62	15.46 ± 7.99
1.5	8.28 ± 3.25	10.96 ± 7.48
2.0	4.10 ± 1.91	4.98 ± 3.31
4.0	0.87 ± 0.62	0.73 ± 0.36
6.0	0.97 ± 0.72	1.03 ± 0.57
8.0	1.02 ± 0.84	0.90 ± 0.43
10.0	1.10 ± 0.58	1.02 ± 0.54
12.0	1.03 ± 0.35	1.13 ± 0.43
24.0	0.69 ± 0.25	0.63 ± 0.20
36.0	0.21 ± 0.13	0.33 ± 0.27
48.0	0.13 ± 0.05	0.14 ± 0.07

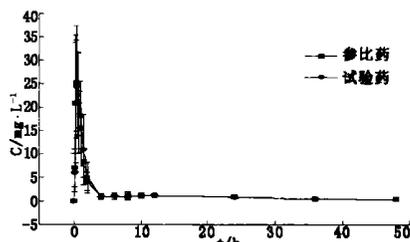


图 2 吗替麦考酚酯两种片剂的血药浓度—时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration time curve of two MMF s tablets

2.11 药代动力学参数及相对生物利用度 吗替麦考酚酯片试验药与参比药在人体中的药代动力学参数, 结果见表3。

表3 两种吗替麦考酚酯片在人体药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of tested and reference tablets($\bar{x} \pm s, n = 20$)

参数	参比药	试验药
$T_{1/2ke}$ (h)	10.59 ± 2.64	12.58 ± 5.27
T_{max} (h)	0.61 ± 0.23	0.63 ± 0.34
C_{max} (mg·L ⁻¹)	30.65 ± 10.81	31.47 ± 11.16
AUC_{0-48h} (mg·L ⁻¹ ·h)	57.06 ± 10.61	60.08 ± 11.47
$AUC_{0-\infty}$ (mg·L ⁻¹ ·h)	58.94 ± 10.72	62.99 ± 13.15

2.12 生物等效性评价 试验药与参比药的 $\lg(AUC_{0-48})$ 、 $\lg(AUC_{0-\infty})$ 、 $\lg(C_{max})$ 方差分析结果表明, 周期间、制剂间、个体间差异均无显著意义。 AUC_{0-48} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 的可信区间双单侧 t 检验和 95% 置信区间结果见表4。

表4 双单侧 t 检验和 95% 置信区间结果($n = 20$)

Tab 4 Result of the two one side t test and 95% confidence interval($n = 20$)

参数	T_L	T_H	95% 置信区间	等效标准	结论
AUC_{0-48}	2.77	4.38	94% ~ 117%	80% ~ 120%	合格
$AUC_{0-\infty}$	2.62	4.74	96% ~ 118%	80% ~ 120%	合格
T_{max}	1.95	2.57	81% ~ 127%	70% ~ 143%	合格
C_{max}	2.59	3.10	83% ~ 128%	70% ~ 143%	合格

受试药与参比药的相对生物利用度为:

$$AUC_T/AUC_R \times 100\% = (110 \pm 46)\%$$

4 讨论

经本试验评价证明口服单剂量吗替麦考酚酯分散片(试验药A)和吗替麦考酚酯片(参比药R)在空腹、健康中国男性受试者中具有生物等效性。

口服后, MMF 迅速水解代谢为 MPA, 即使是服药早期, MMF 在循环系统中也低于检测限^[1]。因此检测血浆中 MPA 的浓度来进行 MMF 的药代动力学参数和生物等效性研究^[6]。

试验药和参比药的药品使用说明书中推荐用药剂量为每次 1 000mg, bid 和每次 1 500mg, bid, 两种给药方案。据文献^[2]规定同时考虑到该药为免疫抑制剂, 为尽量减少给健康志愿者可能带来的不良事件, 故决定本试验给药方案为 1 000mg 每人, 同时该剂量下的血药浓度可以满足检测需要。

MPA 与血浆蛋白结合, 通过葡萄糖醛酸转移酶代谢后从尿中排泄, 原形排泄小于 1%。食物对肾移植人口服的 MMF 无影响, 但降低 MPA 的峰浓度。由于 MPA 唯一的代谢产物葡萄糖苷酸结合物 MPAG (酚花葡萄糖苷酸) 存在肝、肠循环, 在服 MMF 后的 6 ~ 12h, 将出现第 2 个 MPA 吸收峰^[5]。该峰在个别志愿者的药时曲线中能明显观察到, 但个体之间的达峰时间存在一定的差异, 故在 20 位健康志愿者数据统计处理后的药时曲线中, 此峰反而不明显。

试验药和参比药的药动学参数 AUC 和 $AUC_{0-\infty}$ 在等效标准设定在 80% ~ 120% 之间时, 经方差分析, 药物间、周期间和个体间均无统计意义; 经单侧 t 检验, 在高限和低限双向均符合等效标准。药动学参数 C_{max} 和 T_{max} 在进行 t 检验时, 若将等效标准设定在 80% ~ 120% 之间, 则在高限方向不合格, 根据文献^[2]规定, 可将等效标准设定在 70% ~ 143% 之间, 则试验药和参比药的 C_{max} 和 T_{max} 在高低双向都合格。其理论依据是试验药和参比药存在剂型上的差异, 分散片较普通片应该崩解较快、吸收较大。故此存在这种差异是合理的。同时 T_{max} 经 Wilcoxon Single Ranks 检验, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 综上所述, 可认为试验药和参比药具有生物等效性。

参考文献:

[1] 徐红冰, 寿佳慧, 归成. 新的免疫抑制剂-霉酚酸酯[J]. 上海医院药学, 1998, 9(2): 43

[2] 郑筱萸. 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则(试行)[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2002. 70 ~ 77

[3] Teshima D, Otsubo K, Kitagawa N, et al. High performance liquid chromatographic method for mycophenolic acid and its glucuronide in plasma and urine[J]. Clin Pharm Ther, 2003, 28(1): 17

[4] Pescovitz MD, Bungardner G, Gaston RS. Pharmacokinetics of daclizumab and mycophenolate mofetil with cyclosporine and steroids in renal transplantation[J]. Clin Transplant, 2003, 17(6): 511

[5] Pawinski T, Shaw IM. Stability of mycophenolic acid in plasma samples from patients during mycophenolate mofetil therapy[J]. Acta Pol Pharm, 2003, 60(2): 121

[6] Cho EK, Han DJ, Kim SC, Burckart GJ. Pharmacokinetic study of mycophenolic acid in Korean kidney transplant patients[J]. Clin Pharmacol, 2004, 44(7): 743

(收稿日期: 2005-04-11; 修回日期: 2005-11-30)

(本文编辑 梁爱君)