

- nostimulating effects of Anoectochilus formosanus Hayata[J]. Phytomedicine, 2006, 13(5): 366-370.
- [4] Shih CC, Wu YW, Lin WC. Ameliorative effects of Anoectochilus formosanus extract on osteopenia in ovariectomized rats[J]. J Ethnopharmacol, 2001 77(3): 233-238.
- [5] 陈卓, 黄自强. 金线莲降血糖作用的初步研究[J]. 福建医药杂志, 2000, 22(1): 207-208.
- [6] 赵卿, 赵丽, 郭青龙, 等. 中药多糖的免疫调节及抗肿瘤作用机制探讨[J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 19(4): 454-457.
- [7] 林丽清, 黄丽英, 郑艳洁, 等. 金线莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(5): 37-39.
- [8] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(2): 802-809.
- [9] 叶辉, 杨婉身, 金丽琴, 等. 纳米磁性干扰素脂质体在裸鼠移植性肝癌靶向治疗过程中对 VEGF 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学报, 2008, 24(6): 730-735.
- [收稿日期] 2010-10-10

2 种匹伐他汀钙片在人体内的生物等效性

周华¹, 郑恒², 钱振宇³, 周莉萍³, 彭可堃³, 陈小梅², 李冬艳² (华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 儿科, 2. 药学部, 3. 药学院, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 评价 2 种匹伐他汀钙片在人体内的生物等效性。方法: 20 例男性健康志愿者随机交叉单剂量口服试验制剂和参比制剂, 利用 LC-MS/MS 法测定匹伐他汀体内血药浓度。结果: 试验制剂和参比制剂的主要药动学参数如下: AUC_{0-t} 分别为 $(180.2 \pm 37.6) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(182.6 \pm 36.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(190.0 \pm 38.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(189.6 \pm 37.4) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; C_{max} 分别为 $(54.3 \pm 18.2) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(65.1 \pm 22.4) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; t_{max} 分别为 $(0.80 \pm 0.25) \text{h}$ 和 $(0.78 \pm 0.26) \text{h}$; $t_{1/2}$ 分别为 $(13.4 \pm 4.5) \text{h}$ 和 $(12.0 \pm 2.8) \text{h}$; 经方差分析和双单侧 t 检验显示, 主要药动学参数无显著差异, 以 AUC_{0-t} 计算匹伐他汀钙片的相对生物利用度为 $(100.3 \pm 19.9) \%$ 。结论: 试验制剂与参比制剂具有生物等效性。

[关键词] 匹伐他汀; 生物等效性; 液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)13-1087-04

Bioequivalence of pitavastatin calcium tablets in healthy volunteers

ZHOU Hua¹, ZHENG Heng², QIAN Zhen-yu³, ZHOU Li-ping³, PENG Ke-long³, CHEN Xiao-mei², LI Dong-yan² (1. Department of paediatrics, 2. Department of Pharmaceutics, 3. College of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the bioequivalence of two preparations of pitavastatin calcium tablets in healthy volunteers. **METHODS** In a two-way cross-over study, 20 healthy volunteers were randomly divided into two groups and taken a single oral dose of pitavastatin calcium tablets of test and reference preparation respectively. The concentration in plasma was determined with LC-MS/MS. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters of test and reference were as follows: $AUC_{(0-t)}$ $(180.2 \pm 37.6) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(182.6 \pm 36.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{(0-\infty)}$ $(190.0 \pm 38.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(189.6 \pm 37.4) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; C_{max} $(54.3 \pm 18.2) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(65.1 \pm 22.4) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; t_{max} $(0.80 \pm 0.25) \text{h}$ and $(0.78 \pm 0.26) \text{h}$; $t_{1/2}$ $(13.4 \pm 4.5) \text{h}$ and $(12.0 \pm 2.8) \text{h}$; The relative bioavailability of pitavastatin calcium was $(100.3 \pm 19.9) \%$. **CONCLUSION** The test and reference preparation of pitavastatin calcium tablets are bioequivalent.

KEY WORDS: pitavastatin; bioequivalence; LC-MS/MS

匹伐他汀钙(pitavastatin)是新一代他汀类药物, 为 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 临床用于治疗高脂血症和冠心病^[1], 同时匹伐他汀钙可以增加低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)受体数量, 恢复细胞内胆固醇代谢稳态, 并加速从血浆中清除 LDL-C 而发挥降脂作用, 可显著降低血浆中总胆固醇及三酰甘油的水平, 为一强效的、具有肝选择性的、长效的

HMG-CoA 还原酶抑制剂。国内关于匹伐他汀血药浓度的测定多采用 HPLC 法^[3-4]、LC-MS 法^[1,4] 和 LC-MS/MS 法^[5]。本试验采用甲醇沉淀蛋白, LC-MS/MS 法测定血浆中匹伐他汀的浓度(内标法定量), 以评价单剂量口服匹伐他汀钙片 2 mg 后受试制剂和参比制剂的生物等效性。

[作者简介] 周华, 男, 主治医师, 硕士, Email: zhoushuyiyun@163.com [通讯作者] 郑恒, 男, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 电话: 027-83662498, E-mail: pencontainer@yahoo.com.cn

1 材料

API 4000LC—MS/MS System, 配备电喷雾离子化源(ESI) (美国 Applied Biosystem 公司); Agilent Technologies 1200 series 液相色谱包括四元泵、自动进样器、柱温箱。受试制剂:匹伐他汀钙片(山东齐都药业有限公司,批号 090601,规格 1 mg/片);参比制剂:匹伐他汀钙片(力清之,规格 2 mg/片,进口注册证号 H20080553,日本兴和株式会社);匹伐他汀钙对照品(山东齐都药业,批号 D090501,含量 99.7%);卡马西平对照品(内标,湖北省药检所,批号 0142-9502,纯度 >99.5%);乙腈为色谱纯;甲醇为分析纯;试验用水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 分析柱 Ultimate C₁₈ (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm); 预柱: C₁₈ 保护柱 (4 mm $\times$ 3.0 mm I. D. 英国 Phenomenex 公司); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (35:65); 流速: 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化源(ESI), 喷雾电压 4 500 V; CUR: 10; CAD: 8; GAS1: 50; GAS2: 70; 检测方式: 正离子检测, 扫描方式: 多反应监测(MRM)方式; 匹伐他汀和内标卡马西平用于定量的离子对分别为 m/z 421.9—290.1, m/z 237.2—194.3; 匹伐他汀和内标卡马西平的 DP 分别为 110 v 和 85 v, CE 分别为 39 v 和 27 v, EP: 9 v, CXP 分别为 9 v 和 10 v。

2.2 溶液的配制

2.2.1 匹伐他汀钙标准溶液 取匹伐他汀钙对照品适量, 换算为相应匹伐他汀质量, 精密称定, 以甲醇为溶剂溶解, 定量配制成含匹伐他汀 2.236, 7.452, 26.08, 74.52, 207.0, 414.0, 828.0 μ g $\cdot$ L⁻¹ 的标准溶液, 及质量浓度为 4.918, 74.52, 720.4 μ g $\cdot$ L⁻¹ 的质控标准溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

2.2.2 内标(卡马西平)标准溶液 取卡马西平适量, 精密称定, 以甲醇为溶剂溶解, 定量配制成 11.4 μ g $\cdot$ L⁻¹ 的溶液, 作为内标工作液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

2.3 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 0.2 mL, 置 1.5 mL 的 Ep 管中, 加甲醇 20 μ L, 精密加入内标溶液 20 μ L, 涡旋混匀后, 加甲醇 600 μ L, 涡旋 1 min, 于 15 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 吸取 200 μ L 上清液于进样瓶中, 取上清液 5 μ L 进行 LC-MS/MS 分析。全过程于避光条件下进行。血样复溶吸

取后迅速冻存。

2.4 血浆样本的收集

2.4.1 受试者的选择 按照国家食品药品监督管理局 GCP 指导原则设计试验方案并获华中科技大学同济医学院伦理委员会批准。受试者签署知情同意后, 在试验前后接受全面体检, 结果均正常。20 名男性健康受试者人口统计学特征为: 年龄 (23.4 $\pm$ 2.6) 岁, 身高 (175 $\pm$ 10) cm, 体质量 (71 $\pm$ 5) kg, 体质量指数 (22.3 $\pm$ 0.9)。无既往病史和过敏史, 试验前 2 周及试验完成期间未用任何其他药物。

2.4.2 试验方案 20 名受试者随机分为 2 组, 每组 10 人, 按自身前后对比 2 周期交叉给药设计, 20 名受试者于试验前一日晚餐后开始禁食不禁水 10 h。试验当日晨间空腹服用受试制剂或参比制剂 2 mg, 用 200 mL 温水送服。服药 2 h 后方可饮水, 4 h 后统一进低脂清淡饮食, 分别于给药前 (0 h) 及给药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h, 采集上肢静脉血 4 mL, 置于肝素抗凝管中, 3 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 取血浆, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。一周清洗期后, 进行第 2 周期给药, 样本收集方法同第一周期。

2.5 标准曲线制备及最低检测限测定 取空白血浆 0.2 mL, 加入匹伐他汀标准溶液 20 μ L, 按“2.3”项下自“精密加入内标 20 μ L”起同法操作, 配制相当于匹伐他汀血浆质量浓度为 0.223 6, 0.745 2, 2.608, 7.452, 20.70, 41.40, 82.80 μ g $\cdot$ L⁻¹ 的样品, 记录色谱图, 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标峰面积比值 f 为纵坐标, 用加权 ($W=1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的典型直线回归方程即为: $Y=0.215X+0.0254$ ($r=0.9993$)。本分析方法下匹伐他汀的线性范围为 0.223 6~82.80 μ g $\cdot$ L⁻¹, 血浆中匹伐他汀的定量下限为 0.223 6 μ g $\cdot$ L⁻¹。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性考察 在本试验所采用的色谱条件下, 分别取 6 名受试者的空白血浆 0.2 mL, 除不加内标外, 其余按“2.3”项下操作, 进样分析得色谱图 1A; 将中浓度质控标准液和内标溶液加入空白血浆中, 同法操作得色谱图 1B, 取受试者给药后的血浆样品, 按“2.3”项下操作得色谱图 1C。结果表明, 血浆样品中内源性物质不干扰待测物及内标的测定。

2.6.2 精密度与准确度 按标准曲线配制方法制备含匹伐他汀分别为 0.491 8, 7.452, 72.04 μ g $\cdot$ L⁻¹ 的低、中、高质量控制(QC)样品, 每个浓度各配制 5 份样品, 按“2.3”项下操作。共做 3 个分析批, 每批每个浓度做 5 份样品, 按照当天的标准曲线, 计算

QC 样品的浓度,根据 QC 样品的测定结果评价本方法的精密度与准确度。结果见表 1。

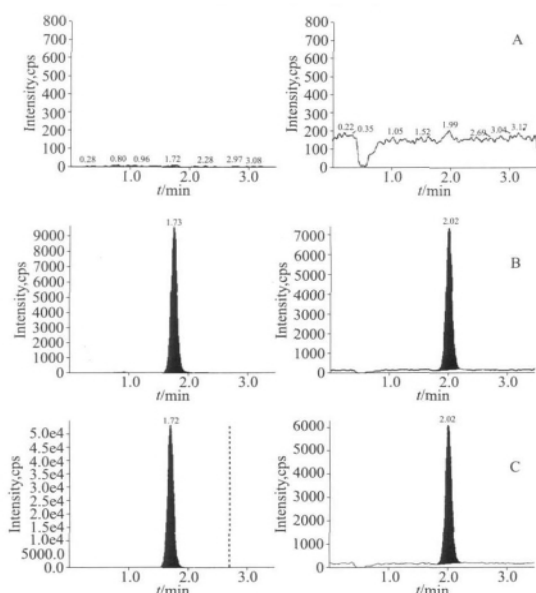


图 1 血浆中匹伐他汀及内标的 MRM 色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+匹伐他汀标准液($74.52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + 卡马西平标准液(内标); C. 受试者口服 2 mg 匹伐他汀钙片 0.75 h 后的血浆样品色谱图(左边为匹伐他汀色谱峰,右边为内标峰)

Fig 1 Chromatogram of pitavastatin and carbamazepine in human plasma

A. blank plasma; B. blank plasma + pitavastatin($74.52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + carbamazepine(IS); C plasma sample of 0.75 h after an oral dose of 2 mg pitavastatin(The left peak is pitavastatin and the right is IS)

2.6.3 提取回收率 精密吸取空白血浆 0.2 mL, 除不加内标外其余按“2.3”项下操作, 吸取全部上清液于另一 Ep 管中, 精密加入质量浓度分别为 $4.918, 74.52, 720.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准贮备液 20 μL 及内标溶液 20 μL , 每个浓度分析 3 个样本作为对照, 另按“2.5.2”项下标准曲线的方法配制匹伐他汀血药质量浓度为 $0.4918, 7.452, 72.04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低、中、高质量控制(QC)样品, 每个浓度各配制 5 份样品。计算匹伐他汀的回收率, 结果见表 1。

表 1 血浆中匹伐他汀测定方法的精密度和回收率($n=5$)

Tab 1 Precision and recovery of pitavastatin in human plasma ($n=5$)

加入质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测得质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度/%	日间精密度/%	绝对回收率/%
0.49	0.50	2.42	4.10	87.01
7.45	7.47	3.84	6.02	91.69
72.04	70.56	7.64	6.36	92.87

2.6.4 稳定性考察 考察了匹伐他汀在不同条件下的放置稳定性, 结果表明匹伐他汀血浆样品在室温下放置 2 h、进样器放置 8 h、反复冻融 3 次及 -80°C 放置 30 d 条件下稳定性良好。

2.6.5 基质效应 在本试验条件下, 低、中、高 3 个质控浓度样品的基质效应分别为 $(97.1 \pm 5.4)\%$,

$(87.4 \pm 1.9)\%$, $(91.1 \pm 3.2)\%$, 均在指导原则要求范围内, 可认为本方法在测定血浆中匹伐他汀时无基质效应。

2.7 血浆样本的测定 20 名健康受试者单剂量口服匹伐他汀钙片试验制剂和参比制剂 2 mg 后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

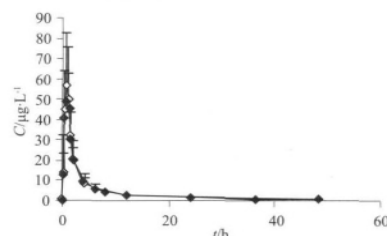


图 2 20 名健康受试者单次口服匹伐他汀钙片 2 mg 试验制剂(A)和参比制剂(R)后平均血药浓度-时间曲线

—◇—R 药; —◆—A 药

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of pitavastatin after a single oral dose of 2 mg in 20 healthy volunteers

—◇—R(reference preparation); —◆—A(test preparation)

2.8 药动学参数及等效性评价 20 名健康受试者单剂量口服匹伐他汀钙片 2 mg 后的血药浓度数据用 DAS 2.1.1 软件采用非房室模型处理, 其主要药动学参数见表 2。对受试制剂和参比制剂的 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 及 $C_{\max}$ 进行方差分析和双向单侧 t 检验及 90% 可信限考察, 结果表明两制剂具有生物等效性。

表 2 20 名健康受试者单剂量口服 2 mg 匹伐他汀钙片后的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 2 The main pharmacokinetic parameters of pitavastatin in 20 volunteers after an oral dose of 2 mg pitavastatin($\bar{x} \pm s, n=20$)

参数	受试制剂	参比制剂
$t_{\max}/\text{h}$	0.80 ± 0.25	0.78 ± 0.26
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	54.3 ± 18.2	65.09 ± 22.44
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	180.2 ± 37.6	182.6 ± 36.1
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	190.0 ± 38.1	189.6 ± 37.4
$t_{1/2}/\text{h}$	13.4 ± 4.5	12.0 ± 2.8

3 讨论

国内外关于匹伐他汀的测定采用了高效液相色谱法^[2-3]和 LC-MS 法^[1,4], 分析时间长, 灵敏度低, 样品处理过程繁杂, 不适合于临床分析测试中大量血浆样本的分析, 刘晟等^[5]采用的 LC-MS/MS 法测定血浆中匹伐他汀的浓度采用外标法定量, 准确度低。本文建立了灵敏度高, 重复性好, 操作简单的 LC-MS/MS 分析方法, 测定了 20 例受试者口服受试制剂和参比制剂后的血药浓度, 对受试制剂和参比制剂进行了等效性分析, 用甲醇直接沉淀蛋白的样品处理方法然后进行 LC-MS/MS 分析, 分析时间 3.5 min, 灵敏度高, 操作简单, 可满足匹伐他汀药

动力学及生物等效性等大批量样本分析的需要。

对匹伐他汀钙受试制剂和参比制剂的药动学参数 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 经对数转换后进行方差分析,并进一步采用双向单侧 t 检验及 $[1-2\alpha]\%$ 可信区间法进行生物等效性评价。 $t_{\max}$ 采用 Wilcoxon 符号秩检验法。受试制剂 $AUC_{(0-t)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 90% 的可信限分别为 91.6%~106.2%、92.8%~108.2%,受试制剂 $C_{\max}$ 90% 的可信限为 73.6%~94.7%, $t_{\max}$ 经秩和检验差异无显著性 ($P>0.05$),表明两制剂具有生物等效性。

在试验过程中 20 例受试者均未见不良反应。

参考文献:

- [1] 邱畅,张明. 匹伐他汀钙在健康人体内的药动学研究[J]. 药学服务与研究,2009,9(3):225-227.
- [2] 金承怀,谭鸿毅. 高效液相色谱法测定人血浆中匹伐他汀浓度[J]. 药物分析杂志,2009,28(9):1270-1272.
- [3] Ojha A, Gtikar S, Vayeda C, et al. Determination of Pitavastatin from human plasma using high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. 2007, 25(5): 715-718.
- [4] 温金华,熊玉卿. LC-MS 测定人血浆中匹伐他汀浓度及其应用[J]. 中国现代应用药学,2010,27(1):62-65.
- [5] 刘晟,尹桃. 简单灵敏的 LC-MS/MS 方法检测人血浆匹伐他汀浓度[J]. 中国新药杂志,2009,18(12):1113-1115.

[收稿日期]2011-01-17

大黄酸固体分散体的制备

韩刚¹,王传胜²,索炜¹,刘莉¹,王彦雪¹,郭肖菲¹ (1. 华北煤炭医学院药理学系,河北 唐山 063000;2. 沈阳化工大学,辽宁 沈阳 110142)

[摘要] 目的:选择不同的载体制备大黄酸固体分散体,以提高大黄酸的溶出度。方法:选用聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)和聚乙二醇(PEG 6000)为载体,采用溶剂法制备大黄酸固体分散体;建立测定大黄酸固体分散体外溶出度的高效液相色谱方法;对固体分散体进行差热分析和红外光谱分析。结果:以聚乙烯吡咯烷酮为载体制备的大黄酸固体分散体能显著增加大黄酸的溶解度和溶出度。制备的大黄酸固体分散体(1:4),40 min 时,大黄酸的累积溶出百分率达 85%。物相鉴定表明,大黄酸以无定形态分散在载体中。结论:以聚乙烯吡咯烷酮为载体制备的大黄酸固体分散体有效地提高大黄酸的溶出速率。

[关键词] 大黄酸;固体分散体;溶出度;聚乙烯吡咯烷酮;聚乙二醇;高效液相色谱法

[中图分类号] R944.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)13-1090-04

Preparation of rhein solid dispersion and their dissolution *in vitro*

HAN Gang¹, WANG Chuan-sheng², SUO Wei¹, LIU Li¹, WANG Yan-xue¹, GUO Xiao-fei¹ (1. Pharmaceutical Department of North China Coal Medical University, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Department of Applied Chemistry; Shenyang University of Chemical Technology; Liaoning Shenyang 11014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the preparation process of solid dispersions of rhein for improving the drug dissolution. **METHODS** To prepare rhein solid dispersion by solvent method with polyvinyl pyrrolidone (K30) and polyethylene glycol (PEG), the determination of dissolution methods was established with HPLC *in vitro*. **RESULTS** The rhein solid dispersion could significantly increase the solubility of rhein and its dissolution. Dissolution percentages of solid dispersions were more than 85 percent in the drug carrier ratio of 1:4. The differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectroscopy were used to characterize the rhein solid dispersions. **CONCLUSION** Solid dispersions could significantly improve solubility and dissolution rate of rhein.

KEY WORDS: rhein; solid dispersion; dissolution; polyvinyl pyrrolidone; polyethylene glycol; HPLC

大黄酸(rhein)是大黄的主要活性成分,属蒽醌类化合物^[1],具有抗氧化、保肝、抗炎、降血脂、抗肿瘤、抗菌、泻下等作用^[2]。大黄酸在水中溶解度低,溶出速度慢因而生物利用度低。提高难溶性药物的溶解度和溶出度,是提高药物生物利用度的有效途径之一^[3]。利用固体分散技术提高难溶性药物溶解

的方法已得到了广泛的应用^[4]。固体分散技术是将难溶性药物以分子、微晶或无定形态分散在载体中,提高其溶出度^[5]。本文选用水溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和聚乙二醇(PEG)为载体,将大黄酸制成固体分散体并对其体外溶出度进行考察,为大黄酸制剂的开发提供参考。

[作者简介] 韩刚,男,教授,电话:0315-3726303, E-mail: tsyxhg@163.com