

剂中不宜加入地西洋类成瘾性药物,故在制备缓释片时将地西洋去除,并继续考察缓释片在动物体内药动学及临床疗效。

本缓释片处方含有多种成分,氨茶碱为主药。由于氨茶碱含量远远高于其他组分,故用紫外分光光度法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吸收(< 1%)。本方法简便、快捷,结果可靠。用 HPLC 法测定地巴唑及氯苯那敏。由于氢溴酸东莨菪碱在处方中含量很低,故未做定量。

处方中的成分均为水溶性药物,实验证明单独使用 HPLC 缓释效果不理想。加入疏水性辅料乙基纤维素(EC)为阻滞剂,可明显延缓药物的释放。

随着 EC 及 HPMC 的含量增大,缓释效果更明显。本实验制备的缓释片,体外释放度测定可以达到预期的释放效果。同时符合中国药典 2005 年版氨茶碱缓释片每片在 2, 4, 6 h 分别释药应为标示量的 25% ~ 45%, 35% ~ 55% 和 50% 以上的规定。

本缓释片剂量参照中国药典 2005 年版氨茶碱缓释片的规格,定为 0. 1 g/ 片。

参考文献:

[ 1] 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.  
[ 2] 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.  
[ 3] 中国药典. 二部[ S]. 2000. 724.

[收稿日期] 2005-07-04

## 米索前列醇片人体药动学及生物利用度研究

杨艳青<sup>1</sup>, 程弘夏<sup>1</sup>, 钟大放<sup>2</sup>, 文爱东<sup>3</sup> (1. 湖北葛店人福药业有限公司, 湖北 葛店 436070; 2. 上海药物代谢研究中心, 上海 201200; 3. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的: 建立人血浆中米索前列醇浓度的液相色谱-质谱-质谱联用测定方法, 研究健康受试者口服米索前列醇片受试制剂和参比制剂的药动学及相对生物利用度和生物等效性。方法: 20 名健康女性受试者随机分为 2 组, 先后单剂量、交叉口服受试制剂和参比制剂 0. 6 mg 后, 采用液相色谱-质谱-质谱联用测定方法测定血药浓度。结果: 受试制剂、参比制剂的主要动力学参数为:  $t_{max}$  分别为 (28. 5 ± 12. 8) min 和 (31. 9 ± 11. 9) min,  $C_{max}$  分别为 (981 ± 737) ng • L<sup>-1</sup> 和 (857 ± 600) ng • L<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  分别为 (1. 18 ± 0. 31) h 和 (1. 12 ± 0. 33) h; AUC<sub>0-t</sub> 分别为 (1 054 ± 802) ng • h • L<sup>-1</sup> 和 (930 ± 575) ng • h • L<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-∞</sub> 分别为 (1086 ± 815) ng • h • L<sup>-1</sup> 和 (961 ± 589) ng • h • L<sup>-1</sup>。结论: 经方差分析、双单侧  $t$  检验及 90% 置信区间法统计表明两制剂具有生物等效性。

[关键词] 米索前列醇; 液相色谱-质谱-质谱; 药动学; 相对生物利用度

[中国分类号] R965 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)07-0817-03

### Study on relative bioavailability of misoprostol tablets by LC-MS/MS

YANG Yan-qing<sup>1</sup>, CHENG Hong-xia<sup>1</sup>, ZHONG Da-fang<sup>2</sup>, WEN Ai-dong<sup>3</sup> (1. Hubei Gedian Humanwell Pharmaceutical Company, Hubei Gedian 436070, China; 2. Shanghai Center for Drug Metabolism Research, Shanghai 201200, China; 3. The Fourth Military Medical University of Xijing Hospital, Shanxi Xi'an, 710032, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish LC/MS/MS method for determination of misoprostol in plasma and to study the pharmacokinetics and relative bioavailability following oral administration of reference misoprostol tablets and trial misoprostol tablets in healthy volunteers. **METHODS** Twenty volunteers were randomly divided into 2 groups. The plasma concentration of misoprostol was measured by LC/MS/MS. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters of trial preparation and reference preparation were as follow: AUC<sub>0-48</sub>,  $t_{1/2}$ ,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$  were (1 054 ± 802) ng • h • L<sup>-1</sup> and (930 ± 575) ng • h • L<sup>-1</sup>; (1. 18 ± 0. 31) h and (1. 12 ± 0. 33) h; (28. 5 ± 12. 8) min and (31. 9 ± 11. 9) min; (981 ± 737) ng • L<sup>-1</sup> and (857 ± 600) ng • L<sup>-1</sup>, respectively. **CONCLUSION** The two preparations were equivalent.

**KEY WORDS:** misoprostol; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics; relative biological availability

米索前列醇是前列腺素衍生物,对妊娠各期的子宫的平滑肌均有较强增加收缩频率和强度的作用,

临床多用于与米非司酮合用终止早孕。

#### 1 材料与方法

[作者简介] 杨艳青, 女, 硕士, 执业药师, 电话: 0711-3812409, E-mail: cucola@163. com

## 1.1 材料

1.1.1 研究对象 因米索前列醇为妇科用药, 故选用女性受试者。按试验方案的入选标准和排除标准, 选择健康女性志愿受试者 20 名, 年龄为 20~30 岁, 身高 164~169 cm, 体重指数均在正常值 19~24 范围内, 受试者无既往病史和药物过敏史, 试验前 14 d 内未用任何药物。受试者于试验前接受医院健康检查, 心电图、肝、肾功能均正常。由于该药的特殊性, 每次试验服药前均需要进行妊娠检查, 结果阴性者方可参加试验, 受试者均签署知情同意书。

1.1.2 药品 受试制剂: 米索前列醇片(规格: 0.2 mg/片, 湖北葛店人福药业有限责任公司, 批号: 20050701, 密封, 阴凉干燥处保存)。参比制剂: 米索前列醇片(规格: 0.2 mg/片, 北京紫竹药业有限公司, 批号: 43051105, 有效期至 2006 年 11 月, 低于 30 °C, 干燥处保存)。

1.1.3 主要仪器与试剂 API 4000 型三重四极杆串联质谱仪, 配备电喷雾离子源(Turbo IonSpray)以及 Analyst 1.4.1 软件(美国 Applied Biosystems 公司); Agilent 1100 液相色谱系统(包括 G1311A 型四元输液泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱和 G1379A 型脱气机)(美国 Agilent 公司); 分析柱为 Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱, 5 μm 粒径, 150 mm × 4.6 mm I.D. (美国 Agilent 公司); 预柱为 C<sub>18</sub> 保护柱, 4 mm × 3.0 mm I.D. (美国 Phenomenex 公司)。米索前列酸对照品(台湾 Everlight 公司, 含量: 93.8%); 内标物为氢氯噻嗪(内蒙古元和药业有限公司, 含量: 99.7%); 甲醇为色谱纯(德国 Tedia 公司); 氨水、磷酸、二氯甲烷和乙醚均为分析纯, 空白人血浆由临床药理基地提供。

## 1.2 方法

1.2.1 血浆样品的处理 向 200 μL 血浆中分别加入 40 μL 甲醇水(50:50, v/v), 40 μL 内标溶液(50 ng•mL<sup>-1</sup> 氢氯噻嗪溶液)和 100 μL 3 mol•L<sup>-1</sup> 的磷酸, 混匀; 加 3 mL 乙醚-二氯甲烷(3:2, v/v), 涡流混合 1 min, 往复振荡 10 min(240 次/min), 4 °C 低温离心 5 min(3 500 r•min<sup>-1</sup>), 分取上清液于另一试管中, 于 30 °C 氮气流下吹干, 残留物加入 150 μL 流动相溶解, 涡流混合, 取 20 μL 进行 LC/MS/MS 分析。

1.2.2 色谱条件 流动相为甲醇-水-1% 氨水(55:45:0.075, v/v), 流速为 0.5 mL•min<sup>-1</sup>, 柱温为室温。

1.2.3 质谱条件 电喷雾离子源(Turbo IonSpray); 源喷射电压为 3 200 V; 温度为 450 °C; 离子

源气体 1(N<sub>2</sub>) 压力为 50 psi; 离子源气体 2(N<sub>2</sub>) 压力为 60 psi; 气帘气体(N<sub>2</sub>) 压力为 10 psi; 负离子方式检测; 去簇电压(DP) 为 58 V; 扫描方式为多反应监测(MRM), 碰撞能量(CE) 分别为 25 eV(米索前列酸) 和 27 eV(氢氯噻嗪); 用于定量分析的离子反应分别为  $m/z$  367.1<sup>+</sup>  $m/z$  249.1(米索前列酸) 和  $m/z$  296.0<sup>+</sup>  $m/z$  269.0(氢氯噻嗪); 碰撞气压力为 3 psi; 扫描时间为 200 ms。

1.2.4 标准曲线的制备 取空白血浆 200 μL, 加米索前列酸标准系列溶液 40 μL, 配制成相当于米索前列酸血浆浓度为 10.0, 25.0, 80.0, 200, 500, 1 500, 3 000 ng•L<sup>-1</sup> 的样品, 按“血浆样品的处理”依法操作, 每一浓度进行双样本分析, 进样 20 μL, 记录色谱图; 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权( $W=1/x^2$ ) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程为:  $Y=1.59 \times 10^{-4} + 3.76 \times 10^{-3}x$ ,  $r=0.9964$ , 根据标准曲线, 米索前列酸的线性范围为 10.0~3 000 ng•L<sup>-1</sup>。

取空白血浆 200 μL, 加入米索前列酸 50 ng•L<sup>-1</sup> 标准溶液 40 μL, 配制成相当于米索前列酸血浆浓度为 10.0 ng•L<sup>-1</sup> 的样品, 根据当日标准曲线计算每一样本浓度, 结果表明 LC/MS/MS 法测定血浆中米索前列酸的最低检测浓度可达 10.0 ng•L<sup>-1</sup>。

1.2.5 精密度与回收率试验 取空白血浆 200 μL, 按“标准曲线的制备”项下的方法配制米索前列酸低、中、高 3 个浓度(分别为 25, 200, 2 700 ng•L<sup>-1</sup>) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 计算样品的日内、日间精密度, 结果见表 1。

表 1 LC/MS/MS 法测定血浆中米索前列酸的精密度

Tab 1 The precision of misoprostol in plasma

| 浓度/ng•L <sup>-1</sup> | 均值/ng•L <sup>-1</sup> | RSD/% | 日内 RSD/% | 日间 RSD/% |
|-----------------------|-----------------------|-------|----------|----------|
| 25.00                 | 25.3                  | 1.2   | 7.1      | 3.5      |
| 200                   | 201                   | 0.4   | 6.7      | 1.7      |
| 2 700                 | 2 686                 | -0.5  | 5.3      | 8.3      |

取空白血浆 200 μL, 按“标准曲线的制备”项下的方法制备米索前列酸低、中、高 3 个浓度点(25, 200, 2 700 ng•L<sup>-1</sup>) 的样品。同时另取空白血浆 200 μL, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“血浆样品的处理”项下操作, 向获得的全部上清液中加入相应浓度的标准溶液和内标各 40 μL, 涡流混合, 30 °C 氮气流下吹干。残留物以 150 μL 流动相溶解, 进样分析, 获得相应峰面积(3 次测定的平均值)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率, 结果见表 2。

表 2 血浆中米索前列酸的回收率

| 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$         | 回收率均值/% | RSD/% |
|-------------------------------------------|---------|-------|
| 25.00                                     | 86.6    | 4.5   |
| 200                                       | 86.7    | 4.3   |
| 2 700                                     | 80.3    | 4.5   |
| 内标物( $10.0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 76.8    | 2.2   |

1.2.6 稳定性的考察 本试验考察了低、高两浓度(米索前列酸血浆浓度分别为 $80.0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\,700\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ )血浆样品-20℃冷冻放置30 d、血浆样品经历3次冷冻-解冻循环、血浆样品室温放置2 h及血浆样品经液-液萃取处理后室温放置4 h的稳定性。结果表明,米索前列酸血浆样品-20℃冷冻放置30 d, RSD 分别为2.2%、-1.2%, 经历3次冷冻-解冻循环 RSD 分别为3.5%、1.7%, 室温放置2 h RSD 分别为0.7%、1.5%, 血浆样品经液液萃取处理后室温放置4 h RSD 分别为3.2%、0.7%, 表明血浆样品稳定性良好。

1.2.7 生物利用度试验设计和方法 本试验采用双周期交叉试验。20 名受试者随机分为甲、乙两组, 每组 10 人。第一周期甲组口服受试制剂 3 片(相当于米索前列醇0.6 mg), 乙组口服参比制剂 3 片(相当于米索前列醇0.6 mg); 第二周期甲组口服参比制剂 3 片, 乙组口服受试制剂 3 片。两次试验间隔为一星期。

志愿者于试验前一日晚8:00 开始禁食, 于次日早晨空腹给药, 服药后2 h 方能饮水, 4 h 后进食统一的标准餐。采血期间禁烟酒和含咖啡因类饮料, 避免剧烈运动。志愿者于口服各药前(0 h)和服药后7.5、15、30、45、60、90、120、180、240、360 min 由前臂静脉取血4 mL, 并立即移入经肝素处理的离心试管中, 离心10 min( $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 分离血浆, 于-20℃冰箱中冷冻。

1.2.8 动力学参数计算及统计学处理 采用中国药科大学杨劲主编的BAPP 2.0 进行动力学参数计算, 采用梯形法计算 $\text{AUC}_{0-t}$ 值和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 值; 以半对数作图法, 由消除相的浓度点计算 $k_e$ 和 $t_{1/2}$ ;  $t_{\text{max}}$ 和 $C_{\text{max}}$ 采用实测值。

2 结果

2.1 质谱图 米索前列酸和内标氢氯噻嗪在 ESI 源负离子电离方式下, 主要生成 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 分子离子峰, 分别为 $m/z\,367.1$ 和 $m/z\,296.0$ 。选择性对 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 进行产物离子全扫描, 米索前列酸和内标氢氯噻嗪生成的主要碎片离子分别为 $m/z\,249.1$ 和 $m/z\,269$ , 将以上碎片离子作为定量分析时监测的产物离子。

2.2 LP/MS/MS 色谱图 图 1A, B, C 分别为空白

血浆、空白血浆加米索前列酸和氢氯噻嗪、受试者口服0.6 mg 受试制剂 15 min 后血浆样品的色谱图。米索前列酸的保留时间为2.89 min, 内标氢氯噻嗪的保留时间为2.97 min, 空白血浆中内源性物质不干扰米索前列酸及内标氢氯噻嗪的测定。

2.3 药动力学研究结果 20 名受试者单次服用0.6 mg 米索前列醇片受试及参比制剂后平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药动力学参数比较见表 3。

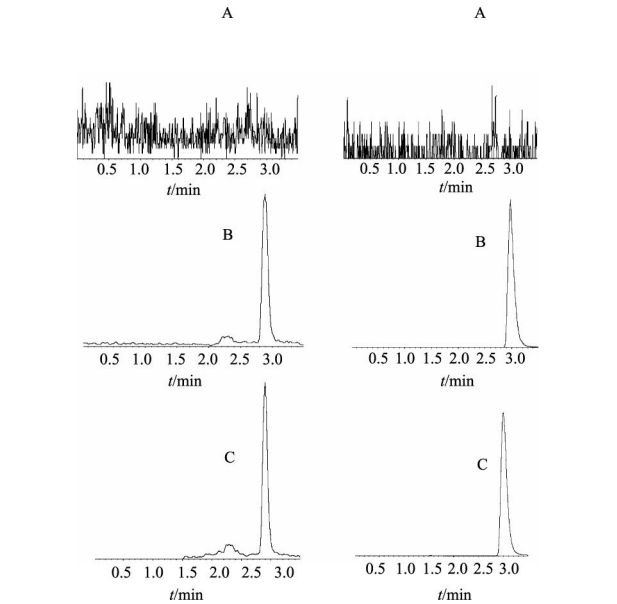


图 1 测定血浆中米索前列酸及内标氢氯噻嗪色谱图  
A. 空白血浆; B. 空白血浆加米索前列酸和氢氯噻嗪; C. 受试者口服 0.6mg 受试制剂 15min 后血浆样品的色谱图

Fig 1 chromatograms of Misoprostol acid and Hydrochlorothiazine in plasma

A. blank plasma; B. blank plasma spiked with misoprostol acid and hydrochlorothiazine; C. plasma chromatogram after oral administration of 0.6mg dose of misoprostol tablets

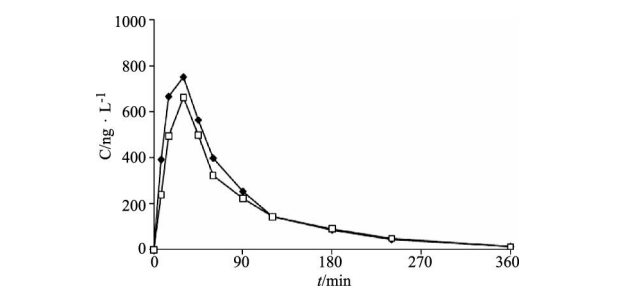


图 2 20 名受试者口服米索前列醇受试制剂和参比制剂后米索前列酸的平均药时曲线

—□—参比制剂; —●—受试制剂

Fig 2 Mean plasma misoprostol concentration-time curve after oral administration of 0.6mg dose of misoprostol tablets

—□—Control; —●—Test

2.4 相对生物利用度 受试制剂对参比制剂的相对生物利用度平均为 $(110.6\pm31.4)\%$ 。对主要药动力学参数对数转换后进行方差分析, 并进一步采用

表 3 受试者口服两种米索前列醇片后生物利用度参数比较 ( $n=20$ )

Tab 3 The comparison of pharmacokinetic parameters after oral two kind of misoprostol 0.6 mg ( $n=20$ )

| 参数                                                               | 受试制剂          | 参比制剂          |
|------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| $t_{1/2}/\text{h}$                                               | $1.18\pm0.31$ | $1.12\pm0.33$ |
| $C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$                           | $981\pm737$   | $857\pm600$   |
| $t_{\max}/\text{h}$                                              | $28.5\pm12.8$ | $31.9\pm11.9$ |
| $\text{AUC}_{0-1}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$      | $1054\pm815$  | $930\pm575$   |
| $\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ | $1086\pm815$  | $961\pm589$   |

双单侧  $t$  检验和(1-2 $\alpha$ ) 置信区间法进行生物等效性评价,其中  $t_{\max}$  采用非参数检验法,具体见表 4。结果表明:受试制剂中,米索前列酸  $\text{AUC}_{0-1}$  的 90% 置信区间为参比制剂相应参数的 95.4% ~ 119.1%,  $C_{\max}$  的 90% 置信区间为参比制剂相应参数的 93.6% ~ 134.5%。 $t_{\max}$  采用非参数检验,无显著性差异,判定两种制剂生物等效

表 4 受试制剂和参比制剂后的主要药动学参数双单侧  $t$  检验和(1-2 $\alpha$ ) 置信区间法检验结果

| Tab 4 Two one side test and 1-2 $\alpha$ confidence interval |                   |                   |                |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| 参数                                                           | $t^1$             | $t^2$             | 90% 置信区间       |
| $\text{AUC}_{0-1}$                                           | 4.47 <sup>a</sup> | 2.49 <sup>a</sup> | 95.4% ~ 119.1% |
| $\text{AUC}_{0-\infty}$                                      | 4.41 <sup>a</sup> | 2.55 <sup>a</sup> | 95.0% ~ 118.7% |
| $C_{\max}$                                                   | 4.52 <sup>a</sup> | 2.32 <sup>a</sup> | 93.6% ~ 134.5% |

注:  $t(1-0.05)(18) = 1.73$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

米索前列醇在体内迅速代谢成米索前列酸,从血浆中提取弱酸性药物时,在血浆中加入  $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸后药物分子以游离态存在,再用有机溶剂提取,得到较满意的提取效果。口服本品后血浆中浓度低,采用 LC/MS/MS 分析方法,血浆内源性物质对测定无干扰,精密度高。

本研究试验 90%  $\text{AUC}_{0-1}$  的置信区间在 80% ~ 125%,  $C_{\max}$  的 90% 置信区间在 70% ~ 143% 之间,  $t_{\max}$  采用非参数检验,结果无显著性差异。但  $\ln\text{AUC}_{0-1}$ ,  $\ln\text{AUC}_{0-\infty}$ ,  $\ln C_{\max}$  的方差分析表明制剂在个体见有显著差异,提示临床用药要注意个体。

参考文献:

[1] 中国药典. 二部[S]. 2005. 附录 173-176.  
[2] Foote EF, Lee DR, Karim A, *et al.* Disposition of misoprostol and its active metabolite in patients with normal and impaired renal function[J]. J Clin Pharmacol, 1995, 35(4): 384-389.  
[3] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志, 1996, 16: 343-346.  
[4] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, *et al.* Bioanalytical method validation: A revisit with a decade of progress[J]. Pharm Res, 2000, 17: 1551-1557.

[收稿日期] 2006-01-23

## 新鱼腥草素钠滴眼液对家兔细菌性角膜炎的影响

陈效<sup>1</sup>, 徐永红<sup>2</sup>, 王章元<sup>1</sup>, 孙汉清<sup>1</sup> (1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030; 2. 武汉大学人民医院眼科, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的: 研究新鱼腥草素钠滴眼液对家兔细菌性角膜炎的治疗作用。方法: 于家兔角膜实质层分别注射接种金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌制成两种角膜炎模型。接种后连续 6 d 分别以不同剂量新鱼腥草素钠滴眼液进行治疗。同期肉眼观察记录眼部症状, 于第 6 天取角膜分别作病理切片和细菌培养。结果: 新鱼腥草素钠滴眼液各剂量组中, 金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌所致角膜炎的积脓、红肿、角膜浑浊、溃疡等肉眼症状以及角膜增厚、溃疡、炎细胞浸润、成纤维细胞增生等镜下炎症表现均得到明显改善; 24 h 角膜细菌培养菌落计数也均显著低于模型组。病理切片所示以及细菌培养菌落计数均与肉眼症状评分相一致。结论: 新鱼腥草素钠滴眼液可抑制病原菌在眼表局部增殖, 并能促进角膜修复愈合, 能有效控制细菌感染所致的角膜炎症。表明本药具有临床应用前景。

[关键词] 新鱼腥草素钠; 角膜炎; 金黄色葡萄球菌; 绿脓杆菌

[中图分类号] R965 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)07-0820-04

### Effect of new sodium houttuynonate eye drops on experimental rabbit bacterial keratitis

CHEN Xiao<sup>1</sup>, XU Yong-hong<sup>2</sup>, WANG Zhang-yuan<sup>1</sup>, SUN Han-qing<sup>1</sup> (1. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China; 2. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital, Wuhan University, Hubei Wuhan 430060; China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effect of new sodium houttuynonate eye drop on rabbit bacterial keratitis models caused by staphylococcus aureus and bacillus pyocyanus. **METHODS** Rabbit keratitis models were established by intrastroma injection of staphylococcus aureus and bacillus pyocyanus. **RESULTS** The eye symptoms of bacterial keratitis caused by staphylococcus aureus and bacillus pyocyanus in the experimental rabbit models were significantly improved after treatment with sodium houttuynonate eye drops. The corneal thickness, ulcer, inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation and other signs of inflammation were significantly improved. The bacterial culture count of the cornea 24 h after treatment was significantly lower than that of the control group. The pathological sections showed that the bacterial culture count and the bacterial culture count were consistent with the clinical symptoms. **CONCLUSION** Sodium houttuynonate eye drops can inhibit the proliferation of pathogens on the ocular surface, promote the repair and healing of the cornea, and effectively control the bacterial infection of the cornea. It indicates that the drug has a clinical application prospect.

[作者简介] 陈效, 男, 博士, 讲师, E-mail: mornsmile@sohu.com