

盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性研究

郭小瑞,毕开顺,陈晓辉* (沈阳药科大学药学院,沈阳 110016)

摘要:目的 研究 2 种盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性。方法 18 名健康男性受试者随机交叉单剂量口服盐酸左氧氟沙星胶囊受试制剂或参比制剂,采用反相高效液相色谱法测定血药浓度,计算其药动学参数和相对生物利用度,评价其生物等效性。结果 受试制剂和参比制剂的 $t_{\max}$ 分别为 $(1.0 \pm 0.1) \text{ h}$ 和 $(1.0 \pm 0.1) \text{ h}$, $C_{\max}$ 分别为 $(3.1 \pm 0.7) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(3.3 \pm 0.9) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ 分别为 $(6.8 \pm 1.4) \text{ h}$ 和 $(6.9 \pm 1.7) \text{ h}$, AUC_{0-1} 分别为 $(20.7 \pm 6.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(20.1 \pm 5.4) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(22.1 \pm 6.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(21.6 \pm 5.5) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, 受试制剂的相对生物利用度为 $(103.0 \pm 8.2) \%$ 。结论 盐酸左氧氟沙星 2 种制剂具有生物等效性。

关键词: 盐酸左氧氟沙星胶囊;反相高效液相色谱法;生物等效性

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)02-0130-03

Study on the Bioequivalence of Levofloxacin Hydrochloride Capsules in Healthy Volunteers

GUO Xiao-ni, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui* (School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the bioequivalence of 2 kinds of levofloxacin hydrochloride capsules. **METHODS** 18 healthy male volunteers were administered orally with single dose of either the tested or the referenced formulations by randomized crossover way. The blood concentrations of Levofloxacin hydrochloride were determined by RP-HPLC, and the pharmacokinetics parameters and the relative bioavailability were calculated. **RESULTS** The $t_{\max}$ of the tested and referenced formulations were $(1.0 \pm 0.1) \text{ h}$ and $(1.0 \pm 0.1) \text{ h}$, respectively $C_{\max}$ were $(3.1 \pm 0.7) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(3.3 \pm 0.9) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ were $(6.8 \pm 1.4) \text{ h}$ and $(6.9 \pm 1.7) \text{ h}$, AUC_{0-1} were $(20.7 \pm 6.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(20.1 \pm 5.4) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ were $(22.1 \pm 6.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(21.6 \pm 5.5) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, the relative bioavailability of tested to referenced capsules was $(103.0 \pm 8.2) \%$. **CONCLUSION** The 2 kinds of levofloxacin hydrochloride capsules are bioequivalent.

KEY WORDS: levofloxacin hydrochloride capsule; RP-HPLC; bioequivalence

盐酸左氧氟沙星为氧氟沙星的左旋体,其体外抗菌活性约为氧氟沙星的两倍。盐酸左氧氟沙星口服吸收快,抗菌谱广,国内外广泛应用于临床,治疗呼吸道、耳鼻喉、泌尿生殖系统感染等。其作用机制是通过抑制细菌 DNA 旋转酶的活性,阻止细菌 DNA 的合成和复制而导致细菌死亡。本实验建立了反相高效液相色谱-紫外检测法对血浆中盐酸左氧氟沙星浓度进行测定,样品经沉淀蛋白后直接进样分析,处理方法简便,分析方法灵敏、可靠,并评价了两种盐酸左氧氟沙星制剂的生物等效性,为临床合理用药提供参考。

1 材料与方

1.1 药品与试剂

受试制剂(盐酸左氧氟沙星胶囊,批号 050201,规格:0.1

g,石家庄华新制药厂研制);参比制剂(盐酸左氧氟沙星胶囊,批号 041105,规格:0.1 g,海南海灵制药有限公司生产)。乙腈为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与色谱条件

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);数据处理程序为 CLASS-VP 系统(日本岛津公司);CAY-1 型液体快速混合器(北京长安仪器厂),TDL-40B 和 TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂),3P97 统计软件(中国药理学会)。

色谱条件:色谱柱为 Kromasil C_8 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ,大连中汇达公司), C_8 保护柱(10 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ,大连中汇达公司),流动相为乙腈-0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 枸橼酸溶液(三乙胺调 pH 值为 3.5) = 18:82,紫外检测波长为 293 nm,

* 通讯作者:陈晓辉

流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 35°C 。

1.3 研究对象

18名健康男性志愿者, 年龄平均 (21.5 ± 3.5) 岁, 体重平均 $(63.6 \pm 6.3) \text{ kg}$ 于试验前接受全面体检, 受试者无既往病史和药物过敏史, 精神状态良好, 受试前两周内未服用任何药物, 禁忌烟酒, 整个受试期间不得服用其他药物。于实验前签署知情同意书。

1.4 试验设计

采用开放、随机、交叉、单剂量给药方式, 将受试者随机分为两组。禁食 12 h 后于次日晨空腹给药。18 名受试者分别服用受试制剂 ($0.1 \text{ g} \times 2$ 粒) 或参比制剂 ($0.1 \text{ g} \times 2$ 粒), 均用 250 mL 温开水送服。用药后 4 h 进食统一标准餐, 并于给药前和给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、12、24 和 48 h 分别取静脉血 5 mL, 肝素抗凝后, 离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min 分离血浆, 于 -20°C 冰箱中保存待测。1 周后交叉重复上述试验。

1.5 血药浓度测定方法

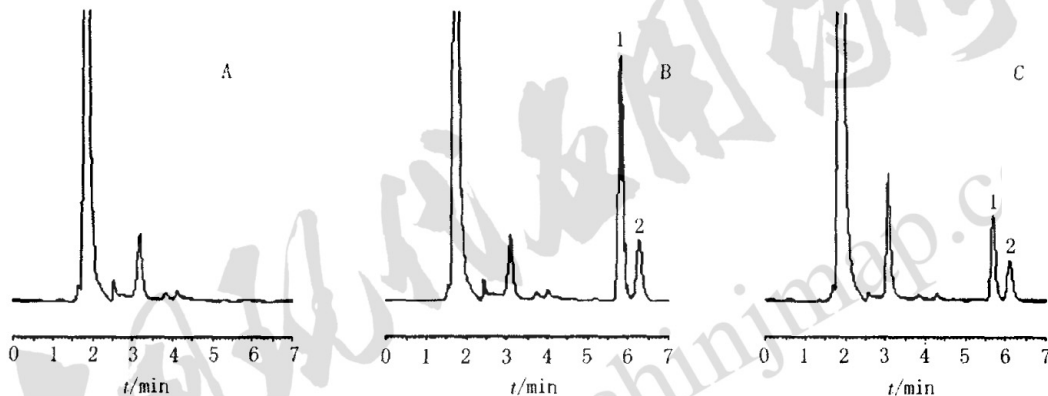


图 1 高效液相色谱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 左氧氟沙星 + 内标; C. 服药后血浆样品 + 内标; 1. 左氧氟沙星; 2. 内标

A. blank plasma; B. blank plasma + levofloxacin + internal standard; C. blood sample after drug administration + internal standard; 1. levofloxacin; 2. internal standard

1.5.4 线性范围 在健康人空白血浆中精密加入不同量的左氧氟沙星标准溶液, 使其浓度分别为 50、100、200、500、1000、2000、5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 自加入内标溶液开始, 按“1.5.2”项下方法处理并进行测定, 记录色谱图, 以左氧氟沙星浓度为横坐标, 左氧氟沙星与环丙沙星 (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, 得回归方程为 $y = 7.4 \times 10^{-4}x - 1.12 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9957$)。结果, 左氧氟沙星浓度在 50~5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 定量下限为 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.5.5 方法精密度与准确度 取健康人空白血浆 200 μL , 按“1.5.4”项下的方法制成高、中、低三个浓度 (左氧氟沙星浓度分别为 100、500 和 4000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的测得浓度。根据 QC 样品测定结果

1.5.1 标准溶液和内标溶液的配制 取左氧氟沙星适量, 精密称定, 加水溶解制成浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。取环丙沙星适量, 精密称定, 加水溶解制成 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

1.5.2 血浆样品处理 精密吸取离心后的血浆 200 μL , 加水 20 μL , 内标溶液 20 μL , 混匀, 加入 10% 三氯醋酸溶液 80 μL , 涡旋 3 min, 离心 ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液 20 μL 进样。

1.5.3 专属性试验 分别取 6 名受试者的空白血浆 200 μL , 按“1.5.2”项下 (不加内标溶液) 操作, 进样 20 μL , 得色谱图 1A; 将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图 1B。左氧氟沙星和环丙沙星 (内标物) 的保留时间分别为 5.70 min 和 6.20 min。取受试者服药后的血浆样品, 同法操作, 得色谱图 1C。结果表明, 空白血浆中的内源性物质和代谢物不干扰血浆中左氧氟沙星和内标的测定。

计算本法的精密度与准确度。精密度用 $\text{RSD}(\%)$ 表示, 准确度用 $\text{RE}(\%)$ 表示, 结果日内 $\text{RSD} \leq 8.3\%$, 日间 $\text{RSD} \leq 10.5\%$, $\text{RE} \leq 2.4\%$, 满足生物样品分析方法的要求。

1.5.6 提取回收率 取健康人空白血浆 200 μL , 按“1.5.5”项下方法制备低、中、高三浓度 (左氧氟沙星浓度分别为 100、500 和 4000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的模拟血浆样品, 每一浓度进行 6 样本分析。同时, 另取空白血浆 200 μL , 除不加标准系列溶液和内标溶液外, 其他按“1.5.2”项下操作, 离心后取上清液加入适量左氧氟沙星标准溶液和内标溶液, 进样分析, 获得相应峰面积 (三次测定的平均值)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。三种浓度的提取回收率分别为 $(61.2 \pm 2.2)\%$, $(67.8 \pm 3.0)\%$, $(67.3 \pm 1.5)\%$ 。

1.5.7 样品稳定性 取健康人空白血浆 200 μL , 按“1.5.5”项下方法制备左氧氟沙星低、中、高三浓度的 QC 样品 (每浓

度三样本分析),在室温下放置 24 h 后测定,所得 $RSD \leq 5.0\%$,结果表明处理后的左氧氟沙星样品溶液在室温放置 24 h 内稳定。

取健康人空白血浆 200 μ L,按“1.5.5”项下方法制备左氧氟沙星低、中、高三浓度的 QC 样品(每浓度三样本分析),经过三个冷冻-解冻循环后测定,所得 $RSD \leq 6.9\%$ 。结果表明左氧氟沙星血浆样品经过三个冷冻-解冻循环后稳定。

1.5.8 血浆样品测定与质量控制 测定血浆样品时,每天建立一条标准曲线,并随行测定低、中、高三浓度(双样本)的 QC 样品。根据当日标准曲线,求算 QC 样品和未知样品的浓度,当 QC 样品相对误差不大于 15% 时,当日数据方可接受。

1.6 数据处理

采用梯形法计算 AUC_{0-t} 值和 $AUC_{0-\infty}$ 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_{max} 和 C_{max} 采用实测值。根据受试制剂和参比制剂中左氧氟沙星的 AUC_{0-t} 计算相对生物利用度,并对所得数据经对数转换后进行方差分析、双单侧 t 检验和 90% 可信区间考察。

2 结果

2.1 血样测定结果

18 名健康受试者单次口服受试制剂和参比制剂后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。由图可以看出,受试制剂和参比制剂血浆中实测左氧氟沙星的浓度范围,均在本试验的线性范围内。

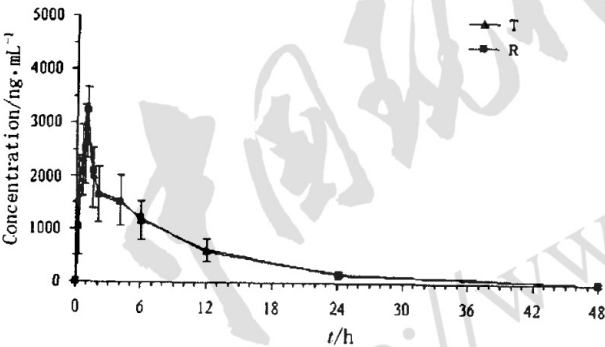


图 2 受试制剂和参比制剂的平均血药浓度-时间曲线
Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of trial preparations and reference preparations

2.2 药动学参数

18 名健康受试者服用受试制剂和参比制剂后的主要药动学参数比较详见表 1。

2.3 生物等效性评价

将主要药物动力学参数经对数转换后进行方差分析。结果显示,两种制剂中左氧氟沙星的 AUC_{0-t} 值、 $AUC_{0-\infty}$ 值和 C_{max} 均无显著性差异;进一步采用双单侧 t 检验和 (1-2 α) 置信区间法分析, AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 均拒绝不等假设。受

表 1 受试制剂与参比制剂的药动学参数比较 ($n = 18 \bar{x} \pm s$)
Tab 1 Comparison of pharmacokinetic parameters between trial preparations and reference preparations ($n = 18 \bar{x} \pm s$)

parameters	trial	reference
$t_{1/2} / h$	6.8 $\pm$ 1.4	6.9 $\pm$ 1.7
$K_e / (h^{-1})$	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
t_{max} / h	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
$C_{max} / (\mu g \cdot mL^{-1})$	3.1 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.9
$AUC_{0-t} / (\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	20.7 $\pm$ 6.1	20.1 $\pm$ 5.4
$AUC_{0-\infty} / (\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	22.1 $\pm$ 6.1	21.6 $\pm$ 5.5
$F / \%$	103.0 $\pm$ 8.2	

试制剂 AUC_{0-t} 的 90% 置信区间为 99.2% ~ 105.9%, 落在参比制剂的 80% ~ 125% 内,表明两种制剂具有生物等效性。

3 讨论

目前文献报道人血浆中盐酸左氧氟沙星的测定多采用 HPLC-荧光法^[1], HPLC-UV 法^[2-3]等,血浆样品处理方法多为有机溶剂沉淀蛋白法等,操作较为繁琐,本实验在上述研究基础上,建立了一种更为简单快捷灵敏的测定方法。采用 RP-HPLC-UV 法准确测定人血浆中左氧氟沙星的浓度,方法简单、灵敏;同时血浆样品经沉淀蛋白后即可直接进样分析,方法简便、快捷;以环丙沙星为内标物,与被测物左氧氟沙星保留时间接近,无干扰;选择乙腈-0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 枸橼酸溶液(三乙胺调 pH 值为 3.5) = 18:82 为流动相,被测物与内标物峰形锐,分离度好。将上述条件相结合,本实验研究了两种盐酸左氧氟沙星胶囊在中国健康受试者体内的生物等效性,方法灵敏、简便、快速、实用、重复性好,可用于盐酸左氧氟沙星胶囊体内药物动力学研究和生物利用度研究。

经统计学显示,盐酸左氧氟沙星受试制剂和参比制剂除个体间有显著性差异外,其余均无显著性差异,故可以认为 2 种制剂具有生物等效性。

参考文献

[1] YIN G Z, JIN Q, LI H L, *et al*. Determination of levofloxacin in human plasma and urine by HPLC [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 1998, 13(5): 195-196
[2] ZHOU W, LI Z W, XUE Y Y, *et al*. Pharmacokinetics and relative bioavailability of domestic levofloxacin distributive tablet in healthy volunteers [J]. China Pharmacy(中国药房), 2000, 11(4): 173-174
[3] ZHANG L, LI J K, ZHAO C Y, *et al*. Bioequivalence study of levofloxacin tablets in Chinese healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2001, 17(3): 199-202

收稿日期: 2006-02-21