

阿莫西林克拉维酸钾胶囊的生物等效性研究

舒成仁¹, 黄露², 邓彬¹ (1.湖北省黄石市中心医院, 湖北 黄石 435000; 2.武汉市第六医院药剂科, 武汉 430015)

摘要: 目的 研究两种阿莫西林克拉维酸钾胶囊的生物等效性。方法 采用 2 制剂 2 周期自身对照交叉试验设计, 利用高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中阿莫西林和克拉维酸钾药物浓度。结果 受试胶囊和参比胶囊中阿莫西林的 AUC_{0-10} 分别为 (19.132 ± 4.196) , $(19.001 \pm 4.076) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (19.376 ± 4.197) , $(19.301 \pm 4.086) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $C_{\max}$ 分别为 (6.294 ± 1.819) , $(6.293 \pm 1.973) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{\max}$ 分别为 (2.000 ± 0.585) , $(2.100 \pm 0.447) \text{h}$; 克拉维酸钾的 AUC_{0-10} 分别为 (4.333 ± 2.317) , $(4.275 \pm 2.231) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (4.383 ± 2.320) , $(4.320 \pm 2.236) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $C_{\max}$ 分别为 (1.722 ± 0.961) , $(1.623 \pm 0.813) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{\max}$ 分别为 (1.850 ± 0.651) , $(1.950 \pm 0.647) \text{h}$; 两制剂的阿莫西林和克拉维酸钾的相对生物利用度分别为 $(101.8 \pm 14.8)\%$, $(112.5 \pm 62.0)\%$ 。结论 两种胶囊具生物等效性。

关键词: 阿莫西林克拉维酸钾胶囊; 相对生物利用度; 生物等效性; 高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R945.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0454-04

Bioequivalence of Amoxicillin Sodium and Clavutante Potassium Capsules in Chinese Healthy Volunteers

SHU Chengren¹, HUANG Lu², DENG Bin¹ (1. Pharmacy Department of Huangshi Central Hospital, Huangshi 435000, China; 2. Pharmacy Department of The 6th Hospital of Wuhan City, Wuhan 430015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the bioequivalence of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium capsules in Chinese healthy volunteers. **METHODS** Concentrations of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium in plasma were determined by HPLC/MS/MS after healthy volunteers received a single dose of test dispersible capsule and reference capsule in two-treatment, two-period, crossover design. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium capsules were as follows: AUC_{0-10} (Amoxicillin) were (19.132 ± 4.196) and $(19.001 \pm 4.076) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ (Amoxicillin) were (19.376 ± 4.197) and $(19.301 \pm 4.086) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $C_{\max}$ (Amoxicillin) were (6.294 ± 1.819) and $(6.293 \pm 1.973) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{\max}$ (Amoxicillin) were (2.000 ± 0.585) and $(2.100 \pm 0.447) \text{h}$; AUC_{0-10} (Clavutante) were (4.333 ± 2.317) and $(4.275 \pm 2.231) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ (Clavutante) were (4.383 ± 2.320) and $(4.320 \pm 2.236) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; $C_{\max}$ (Clavutante) were (1.722 ± 0.961) and $(1.623 \pm 0.813) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $T_{\max}$ (Clavutante) were (1.850 ± 0.651) and $(1.950 \pm 0.647) \text{h}$; The relative bioavailability of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium were $(101.8 \pm 14.8)\%$ and $(112.5 \pm 62.0)\%$. **CONCLUSION** The results of statistic analysis show that two capsules of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium were bioequivalent.

KEY WORDS: Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium capsules; relative bioavailability; bioequivalence; HPLC/MS/MS

阿莫西林为半合成的广谱青霉素类抗生素, 克拉维酸钾具有与青霉素类似的 β -内酰胺结构, 本身只有微弱抗菌活性, 但能通过阻断 β -内酰胺酶的活性部位, 使许多细菌所产生酶失活, 两者合用, 可使阿莫西林免遭 β -内酰胺酶的水解破坏, 从而对

产 β -内酰胺酶的耐药菌仍然有效, 扩大了阿莫西林的抗菌谱。本文采用高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中阿莫西林和克拉维酸钾药物浓度, 以研究阿莫西林克拉维酸钾胶囊的相对生物利用度, 并对其生物等效性进行评价。

作者简介: 舒成仁, 男, 硕士学位, 副主任药师

Tel: (0714)6265539

E-mail: 397112615@qq.com

1 仪器与试药

HPLC/MS/MS 系统: API-4000 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystem Sciex 公司), Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 数据处理系统为 Analyst 1.5.1。

阿莫西林克拉维酸钾胶囊(4:1)(浙江巨泰药业有限公司新工艺产品作为受试药, 规格: 156.25 mg, 批号: 100601; 参比药品为该公司已上市的同规格胶囊, 批号: 20100401); 阿莫西林对照品(浙江省食品药品检验所, 批号: 20100607; 纯度: 86.6%); 克拉维酸钾对照品(浙江省食品药品检验所, 批号: 20091019; 纯度: 95%); 内标: 头孢羟氨苄(浙江巨泰药业有限公司, 批号: 1004202; 纯度: 95%); 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 研究对象

20 名男性健康志愿者, 年龄(23.2 ± 2.55)岁, 体质量(63.2 ± 5.17)kg, 身高(172.7 ± 4.39)cm。受试前体检(血、尿常规和心、肝、肾功能等检查)均正常。受试前 2 周及试验期间未服用任何药物, 受试者均无烟酒嗜好。试验方案经伦理委员会审批同意且受试者书面签署知情同意书。

2.2 试验方案

采用 2 周期 2 制剂交叉试验设计, 停药清洗期为 4 d, 然后进行交叉试验。受试者随机分为 2 组, 禁食 12 h 后, 次日清晨空腹用温开水 200 mL 分别送服 4 粒试验胶囊和参比胶囊。服药 2 h 后方可再饮水, 4 h 后统一低脂清淡饮食。试验期间忌烟酒, 禁饮含咖啡的饮料, 避免剧烈运动和长时间卧床。

2.3 血样采集

服药前及服药后 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 h 自肘静脉采血 4 mL 置于肝素化试管, 避光, 离心分离血浆, -80°C 贮存待测。

2.4 血药浓度检测方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱 ($2.1\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 预柱为 Phenomenex Security Guard TMC₁₈; 流动相为水(0.2%甲酸)-乙腈(87:13); 流速为 $0.3\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 35°C , 进样体积为 $5\text{ }\mu\text{L}$, 自动进样瓶温 5°C 。

2.4.2 质谱条件 离子化方式: ESI; 离子极性: 负离子(negative); 离子检测方式: 多反应离子检测(MRM); 温度: 500°C ; 辅助气 1 压力(GAS1): 50.0 psi; 辅助气 2 压力(GAS2): 50.0 psi, 碰撞气(CAD): 6.0 V; 用于定量分析的离子反应分别为 $m/z\ 198.1 \rightarrow 135.9$ (克拉维酸钾)、 $m/z\ 363.9 \rightarrow 222.7$ (阿莫西林)和 $m/z\ 362.0 \rightarrow 204.8$ (头孢羟氨苄)。

2.4.3 样品处理方法 精密吸取血浆样本 $200\text{ }\mu\text{L}$ 于 2 mL 离心管内, 精密加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 内标标准溶液($40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢羟氨苄), 加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇涡旋混匀 1 min, $15\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 取上清液到进样瓶中, $5\text{ }\mu\text{L}$ 进样, 测定阿莫西林、克拉维酸钾和内标的峰面积。

2.5 方法学确证

2.5.1 特异性考察 在选定分析条件下, 阿莫西林、克拉维酸钾和内标峰形良好, 空白血浆无干扰, 保留时间分别为 1.89, 1.96, 2.28 min。空白血浆、空白血浆+阿莫西林(终浓度 $0.02\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+内标($40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标液)、空白血浆+克拉维酸钾(终浓度 $0.02\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+内标($40\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标液), 按“2.4.3”项下方法处理后进样分析, 色谱图见图 1。

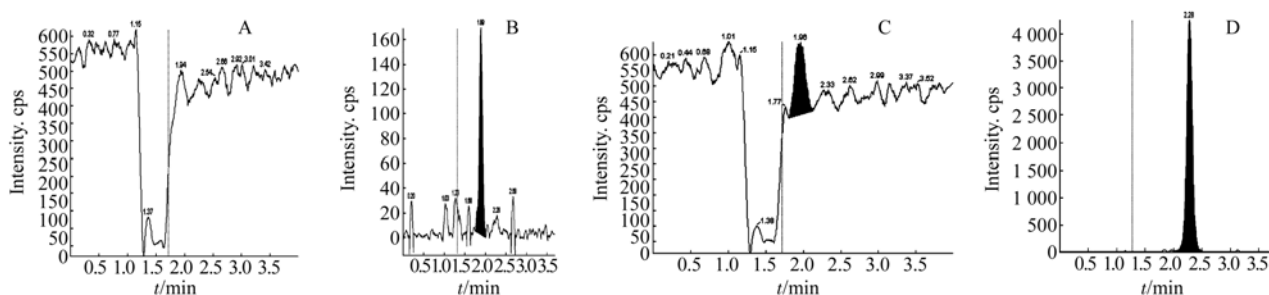


图 1 血浆中阿莫西林和克拉维酸钾典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+阿莫西林; C-空白血浆+克拉维酸钾; D-空白血浆+内标

Fig 1 Typical chromatograms of Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium in human plasma

A-blank plasma; B-blank plasma + Amoxicillin sodium; C-blank plasma + Clavutante Potassium; D-blank plasma + internal standard

2.5.2 标准曲线制备 分别精密称取阿莫西林、克拉维酸钾对照品适量,制备系列标准溶液。各取 180 μL 空白血浆于 2 mL 离心管中,精密移取 20 μL 不同浓度的标准溶液,配制成分别含阿莫西林和克拉维酸钾系列浓度的血浆样本,分别按“2.4.3”项下自“精密加入 20 μL 内标标准溶液”起同样操作进样分析,分别记录阿莫西林和克拉维酸钾色谱峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i),得到阿莫西林血浆样本标准曲线回归方程: $Y=1.74X-0.009319$, 相关系数 $r=0.9990$, 线性范围为 $0.02\sim 1.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最低定量限为 $0.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 克拉维酸钾血浆样本标准曲线回归方程: $Y=1.63X+0.0046$, 相关系数 $r=0.9992$, 线性范围为 $0.02\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最低定量限为 $0.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 精密度与回收率试验 分别配制成终浓度分别为 0.06, 0.5, 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿莫西林血浆标样,以及 0.04, 0.5, 3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的克拉维酸钾血浆标样,每个浓度各 5 份,按照“2.4.3”项下自“精密加入 20 μL 内标标准溶液”起同样操作,测定样品及内标峰面积,计算其峰面积比值(A_s/A_i),并按回归方程求算相应浓度,计算日内、日间精密度和相对回收率,结果见表 1 和表 2。

表 1 血浆中阿莫西林的精密度与回收率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab 1 Precision and recovery of Amoxicillin sodium in plasma($\bar{x}\pm s, n=5$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%		相对回 收率/%	绝对回 收率/%
	日内	日间		
0.06	4.789	14.008	101.400	86.718
0.50	6.016	3.473	102.253	99.508
12.00	3.286	5.506	100.167	97.067

表 3 2 种阿莫西林克拉维酸钾胶囊的药动学参数

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of 2 Amoxicillin sodium and Clavutante Potassium capsules

参 数	阿莫西林		克拉维酸钾	
	试验胶囊	参比胶囊	试验胶囊	参比胶囊
$T_{1/2}/\text{h}$	1.442 ± 0.214	1.573 ± 0.410	1.092 ± 0.223	1.099 ± 0.329
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6.294 ± 1.819	6.293 ± 1.973	1.722 ± 0.961	1.623 ± 0.813
$T_{\max}/\text{h}$	2.000 ± 0.585	2.100 ± 0.447	1.850 ± 0.651	1.950 ± 0.647
$AUC_{(0-10)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	19.132 ± 4.196	19.001 ± 4.076	4.333 ± 2.317	4.275 ± 2.231
$AUC_{(0-\infty)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	19.376 ± 4.197	19.301 ± 4.086	4.383 ± 2.320	4.320 ± 2.236

3 讨论

采用 HPLC/MS/MS 同时测定阿莫西林和克拉维酸钾的浓度,阿莫西林、克拉维酸钾的最低定

表 2 血浆中克拉维酸钾的精密度与回收率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab 2 Precision and recovery of Clavutante Potassium in plasma($\bar{x}\pm s, n=5$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%		相对回 收率/%	绝对回 收率/%
	日内	日间		
0.04	6.751	6.277	102.900	103.582
0.50	2.842	6.343	97.413	108.638
3.50	1.839	7.403	95.181	102.239

2.5.4 稳定性考察 按“2.5.2”项下方法分别配置低中高 3 种浓度的血样,按“2.4.3”项下样品处理方法分别考察短期室温稳定性(2 h, 25 $^{\circ}\text{C}$),样品处理后的稳定性(4 h, 4 $^{\circ}\text{C}$),冻融稳定性($-80\ ^{\circ}\text{C}$ 冻融 2 次)、长期冷冻稳定性($-80\ ^{\circ}\text{C}$, 2 周)。结果显示,阿莫西林和克拉维酸钾稳定性考察的 RSD 都 $<10\%$,表明在上述条件下药品稳定性良好。

2.6 药动学结果

20 名健受试者随机交叉单剂量口服阿莫西林克拉维酸钾胶囊和参比胶囊 625 mg 后平均血药浓度-时间曲线见图 2,2 种制剂的主要药动学参数见表 3。试验胶囊对参比胶囊阿莫西林和克拉维酸钾的相对生物利用度分别为 $(101.8\pm 14.8)\%$, $(112.5\pm 62.0)\%$ 。

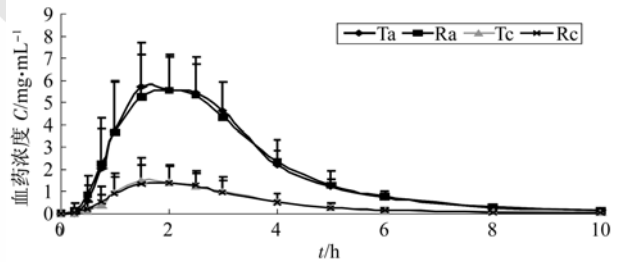


图 2 平均药-时曲线

T-受试制剂; R-参比制剂; a-阿莫西林; c-克拉维酸钾

Fig 2 Mean concentration-time curves

T-test; R-control; a-Amoxicillin; c-Clavutante

量限均可达到 $0.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,符合生物等效性血液测定的试验要求,比普通高效液相法更灵敏^[1-4]。

20 名健康受试者自身对照双交叉单剂量口服

阿莫西林克拉维酸钾受试胶囊(4:1)和参比胶囊,均无不适主诉,各项生命体征正常,无不良事件发生。

HPLC/MS/MS 测定阿莫西林、克拉维酸钾血药浓度,对试验胶囊的相对生物利用度进行研究,研究得到的药代参数跟文献报道基本一致^[3]。

数据显示,有个别受试者的受试药与参比药的 $AUC_{0\rightarrow10}$ 相差较大,分析认为可能是受试者周期间生理差别所致,若剔除这样异常数据,用 DAS 2.0 软件对血药浓度数据进行处理并计算参数,结果仍等效。考虑到个体间差异的问题属正常现象,仍保留这样数据参与统计分析。

AUC 和 C_{max} 采用方差分析、双单侧 t 检验和置信区间估计, T_{max} 采用非参数法检验(Wilcoxon 秩和检验),对制剂进行生物等效性评价。统计结果表明:试验胶囊阿莫西林和克拉维酸钾的 $AUC_{0\rightarrow10}$ 、 $AUC_{0\rightarrow\infty}$ 的 90%置信区间均落在参比胶

囊 80%~125%范围内,试验胶囊阿莫西林和克拉维酸钾 C_{max} 90%的置信区间落在参比胶囊 70%~143%范围内。 T_{max} 在制剂间无显著性差异($P>0.05$),说明试验胶囊与参比胶囊生物等效。

REFERENCES

- [1] ZHU Z F, SHANG Q P, LI J C. Determination of serum concentration of amoxicillin by RP-HPLC [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2008, 8(10): 753-755.
- [2] HUANG Y, ZHOU Y G, LIANG M Z. Simultaneous determination of amoxicillin sodium and clavulanic potassium by column switching HPLC [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2004, 29(5): 279-281.
- [3] ZHANG B, DU Z M, HUANG L Q. Bioavailability research of amoxicillin sodium and clavulanic potassium tablets in Chinese healthy volunteers [J]. China Pharm(中国药师), 2000, 3(3): 141-143.
- [4] CAO G Y, ZHANG Q, YU J C. Determination of amoxicillin sodium and clavulanic potassium in human plasma [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2004, 13(5): 291-294.

收稿日期: 2011-09-04