

氟氯西林镁颗粒的人体生物等效性研究

唐思*, 夏素霞#, 董晓茜, 张世良, 杨瑞 (辽宁省中医药研究院临床药理实验室, 沈阳 110034)

中图分类号 R969.1; R978.1*7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)02-0132-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.02.12

摘要 目的: 比较氟氯西林镁颗粒与氟氯西林钠胶囊的人体生物等效性。方法: 24名健康受试者随机分为两组, 采用双周期自身交叉方法, 单剂量口服受试制剂氟氯西林镁颗粒或参比制剂氟氯西林钠胶囊0.5 g。用液-质联用(LC-MS/MS)法测定氟氯西林的血浆浓度, 并计算其药动学参数, 比较二者的人体生物等效性。结果: 受试制剂与参比制剂的药动学参数分别为: $t_{1/2}$ (1.53 ± 0.29)、(1.55 ± 0.25) h, c_{max} (34.56 ± 8.13)、(34.67 ± 8.89) mg/L, t_{max} (0.72 ± 0.25)、(0.74 ± 0.25) h, AUC_{0-24h} (69.51 ± 15.34)、(70.47 ± 16.19) mg·h/L, 受试制剂的相对生物利用度为(99.29 ± 10.34)%。结论: 氟氯西林镁颗粒与氟氯西林钠胶囊在吸收程度上具有生物等效性。

关键词 氟氯西林镁; 液-质联用法; 药动学; 生物等效性

Study on Bioequivalence of Flucloxacillin Magnesium Granules in Healthy Volunteers

TANG Si, XIA Su-xia, DONG Xiao-qian, ZHANG Shi-liang, YANG Rui (Lab of Clinical Pharmacology, Liaoning Academy of TCM, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics of Flucloxacillin magnesium granules and Flucloxacillin sodium capsules in healthy volunteers. METHODS: 24 subjects were randomized into 2 groups and enrolled in bi-periodic crossover test. They were given test preparation Flucloxacillin magnesium granules or reference preparation Flucloxacillin sodium capsules of 0.5 g. Plasma concentrations of flucloxacillin were determined by LC-MS/MS. The main pharmacokinetic parameters were calculated, and bioequivalency of them were compared. RESULTS: The main pharmacokinetic parameters of test preparation vs. reference preparation were as follows: $t_{1/2}$ (1.53 ± 0.29) h vs. (1.55 ± 0.25) h; c_{max} (34.56 ± 8.13) mg/L vs. (34.67 ± 8.89) mg/L; t_{max} (0.72 ± 0.25) h vs. (0.74 ± 0.25) h; AUC_{0-24h} (69.51 ± 15.34) mg·h/L vs. (70.47 ± 16.19) mg·h/L. The relative bioavailability of test preparation was (99.29 ± 10.34)%. CONCLUSIONS: The results demonstrate that the two preparations are bioequivalent.

KEYWORDS Flucloxacillin magnesium; LC-MS/MS; Pharmacokinetics; Bioequivalence

氟氯西林是Beecham公司1978年研究开发的异噁唑类青霉素, 是青霉素家族中具有耐酸、耐酶性质的优秀产品。氟氯西林杀菌的作用机制是通过凝固细菌细胞壁上的青霉素结合蛋白, 干扰细菌胞壁的甘氨酸合成, 使细菌胞壁变软, 细胞膨胀、破裂、死亡, 并通过侧链改变使其具有耐青霉素酶和耐酸的作用。氟氯西林对青霉素敏感的金黄色葡萄球菌、青霉素耐药的金黄色葡萄球菌、 α -溶血性链球菌、 β -溶血性链球菌、肺炎链球菌、枯草芽胞杆菌、类炭疽芽胞杆菌、白喉棒状杆菌、产单核李斯特氏菌、青霉素敏感的淋病奈瑟氏菌及脑膜炎双球菌均有较强的抗菌活性, 对流感嗜血杆菌抗菌活性较弱, 对甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌无效。氟氯西林镁在国外已上市多年, 并被《英国药典》和《欧洲药典》收载, 目前, 我国尚无该品的生产和销售。由于研制单位的氟氯西林镁颗粒属于改变已上市销售盐类的金属元素、但不改变其药理作用的制剂, 因此, 按国家食品药品监督管理局的有关规定, 需要进行对比药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

Agilent6410型液-质联用(LC-MS/MS)仪, 包括电喷雾离

* 助理研究员。研究方向: 临床药理学。电话: 024-86803171。
E-mail: tangsi81@163.com

通信作者: 研究员, 硕士研究生导师。研究方向: 临床药理学。
电话: 024-86803043。E-mail: xiasuxiazfq@163.com

子源(ESI), Quantitative Analysis version B.01.04数据处理系统(美国安捷伦公司); XW-80A微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂); XS105分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Sigma3-18k低温高速离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

氟氯西林镁颗粒(山西仟源制药股份有限公司, 批号: 20100202, 规格: 0.25 g/袋); 氟氯西林钠胶囊(山西同达药业有限公司, 批号: 20100201, 规格: 0.25 g/粒); 氟氯西林标准品(中国药品生物制品检定研究院, 批号: 130529-200301, 含量: 92.6%); 萘普生标准品(中国药品生物制品检定研究院, 批号: 100198-201004, 含量: 99.9%)。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱: Agilent poroshell 120 SB-C₁₈ (4.6 mm×75 mm, 2.7 μ m); 流动相: 水(A)-乙腈(B), 采用梯度洗脱[0 min:A:B(85:15), 0.5 min:A-B(80:20), 1.50 min:A-B(10:90), 4.50 min:A-B(10:90), 4.51 min:A-B(85:15)]; 流速: 0.6 ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l。

离子源: 电喷雾离子源(ESI源); 干燥气流速: 10 L/min; 温度: 350 $^{\circ}$ C; 喷雾气压力: 60 psi; 毛细管电压: 4 000 V; 负离子方式检测; 扫描方式: 选择反应监测(MRM), 用于定量的离子分别为氟氯西林(m/z): 母离子452.0, 子离子290.9, 碎裂电压:

90 V, 碰撞能: 13 V; 内标萘普生(m/z): 母离子 229.0, 子离子 170.0, 碎裂电压: 80 V, 碰撞能: 10 V; 扫描时间: 200 ms。

2.2 受试对象选择与试验方案

24名受试者均为男性健康志愿者, 体质量 53~82 kg, 平均体质量(67.54±7.66) kg; 年龄 19~27岁, 平均年龄(22.77±3.01)岁; 所有受试者均无药物过敏史, 无烟、烟嗜好。试验前所有受试者的血压、脉搏等生命特征检查、心电图检查及血、尿常规和肝、肾功能等检查, 均在正常值范围。试验前2周至试验结束前停用任何其他药物。受试者试验前均签署知情同意书。本试验方案经该院伦理委员会审批后通过。

采用双周期自身交叉试验方法。24名受试者(男、女各半)分成两组, 每组各12人, 单剂量交叉为受试制剂每人0.5 g(2袋)或参比制剂每人0.5 g(2粒)。给药方式为空腹口服, 先用50 ml温开水充分溶解, 服下后, 用150 ml温开水涮洗杯子并服下, 药后4 h进食统一标准餐。分别于服药前(0 h)和给药后10、20 min及0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24 h采集肘静脉血4 ml, 置于肝素化的试管中, 立即在低温4℃条件下4 000 r/min(离心半径: 8 cm, 下同)10 min, 分离血浆, 于-70℃以下冰箱中冷冻保存。

2.3 溶液制备

2.3.1 氟氯西林标准溶液: 准确称取氟氯西林标准品 11.68 mg 于 10 ml 量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 折算后得 1 081.57 mg/L 氟氯西林贮备液。用乙腈稀释配制 0.14、0.27、0.68、2.70、5.40、27.04、54.08、108.16、216.31、270.39 mg/L 的氟氯西林系列标准溶液。

2.3.2 萘普生内标溶液: 准确称取萘普生标准品 10.20 mg 于 100 ml 量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 折算后得 101.90 mg/L 萘普生贮备液。用乙腈稀释配制 10.19 mg/L 的内标溶液。

2.4 血浆样品处理

取血浆 50 μl 于空白离心管中, 再加入内标溶液(10.19 mg/L 萘普生)10 μl, 涡旋混匀, 再加入乙腈 200 μl, 涡旋 5 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 提取上清液 100 μl 于另一空白离心管中, 再加入纯净水 100 μl 涡旋 5 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 提取上清液 10 μl 进样分析。

2.5 专属性考察

在所建立的色谱条件下, 氟氯西林、内标与内源性杂质分离良好, 氟氯西林和内标保留时间分别约为 3.7、4.2 min。

2.6 标准曲线的制备

精密量取不同浓度的氟氯西林标准溶液各 10 μl, 加入 50 μl 空白血浆配成血浆中含药物分别为 0.03、0.14、0.54、1.08、10.82、21.63、54.08 mg/L 的样品, 再按“2.4”项方法操作进行检测, 记录氟氯西林色谱峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i)。以峰面积比 $y(y=A_s/A_i)$ 为横坐标, 浓度比($x, x=c_s/c_i$)为纵坐标, 用最小加权法进行回归计算, 求得标准曲线为 $y=5.79x-0.00$ ($r=0.9950$)。结果表明, 氟氯西林血药浓度在 0.03~54.08 mg/L 范围线性关系良好, 最低检测浓度为 0.03 mg/L。

2.7 精密度与回收率试验

配制低、中、高 3 个质量浓度(0.05、5.41、43.26 mg/L)的氟氯西林血浆标准溶液各 6 份, 再按“2.4”项方法操作并进行检测。于同日内测定和连续 3 d 测定, 计算方法回收率以及日内、日间精密度。另同法配制低、中、高 3 个质量浓度(0.05、5.41、43.26 mg/L)的氟氯西林血浆样品, 再按“2.4”项方法操作

并进行检测, 与对应浓度的标准样品进样所得面积相比, 计算绝对回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果

Tab 1 Results of recovery and precision tests

加入量, mg/L	测定量, mg/L	回收率		精密度	
		提取回收率, %	方法回收率, %	日内 RSD, %	日间 RSD, %
0.05	0.055±0.003	91.88	94.51	6.16	6.36
5.41	5.22±0.31	92.11	96.72	2.99	5.93
43.26	44.70±3.22	83.75	91.05	3.31	7.21

2.8 稳定性考察

对氟氯西林低、中、高 3 个质量浓度血浆样品考察发现, 血浆样品 4℃ 放置 4 h、预处理后 4℃ 下放置 24 h、反复冻融 3 次及在 -70℃ 长期冷冻 3 个月, 在本试验条件下均保持稳定且 RSD<15%, 符合方法学要求。

2.9 血药浓度测定结果及药动学参数

2.9.1 药-时曲线: 24名健康受试者单剂量口服受试制剂氟氯西林镁颗粒和参比制剂氟氯西林钠胶囊 0.5 g 后的平均药-时曲线见图 1。

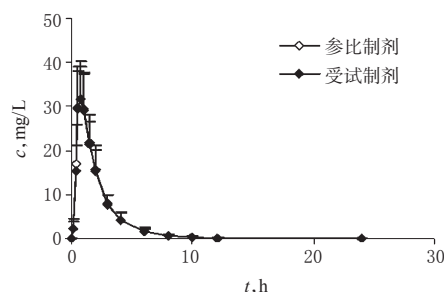


图 1 24名健康受试者单剂量口服受试制剂与参比制剂后氟氯西林的药-时曲线

Fig 1 Mean plasma concentration-time curves of flucloxacillin after a single dose of test preparation vs. reference preparation

2.9.2 药动学参数: 24名健康受试者单剂量口服受试制剂氟氯西林镁颗粒和参比制剂氟氯西林钠胶囊 0.5 g 的主要药动学参数见表 2。

表 2 24名健康受试者单剂量口服受试制剂与参比制剂后氟氯西林的主要药动学参数($n=24$)

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of flucloxacillin after a single oral dose of test preparation vs. reference preparation($n=24$)

药动学参数	受试制剂	参比制剂
C_{max} , mg/L	34.56±8.13	34.67±8.89
t_{max} , h	0.72±0.25	0.74±0.25
$t_{1/2}$, h	1.53±0.29	1.55±0.25
AUC_{0-24h} , mg·h/L	69.39±15.35	70.47±16.19
$AUC_{0-\infty}$, mg·h/L	69.54±15.42	70.65±16.28
F , %	99.29±10.34	

2.10 安全性评价

24名受试者在临床试验过程中耐受性良好, 受试者服药前后的血压、心电图和血常规、血生化检验均在正常范围内, 未发现药品不良反应。

3 讨论

参考文献报道^[1-4], 笔者改进了测定人血浆中氟氯西林浓

HPLC法测定人血浆中恩他卡朋的浓度

胡松^{1*}, 刘宝礼², 张耕^{1#}(1. 武汉市第一医院, 武汉 430030; 2. 武汉市石化医院, 武汉 430082)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)02-0134-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.02.13

摘要 目的: 建立测定人血浆中恩他卡朋浓度的方法。方法: 血样采用正己烷处理后, 以高效液相色谱法测定。色谱柱为 Thermo C₁₈, 流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.9)-乙腈 (66:34), 流速为 1 ml/min; 柱温为 30 ℃。结果: 恩他卡朋血药浓度在 19.60~1 960 ng/ml 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 3$)。低、中、高 3 种浓度相对回收率分别为 98.50%、98.23%、100.71%, 日内、日间 RSD < 10%。结论: 本方法快速、简便、灵敏准确, 可用于恩他卡朋血浆中浓度的测定以及药动学研究。

关键词 高效液相色谱; 恩他卡朋; 血药浓度; 帕金森病

Determination of the Concentration of Entacapone in Human Plasma by HPLC

HU Song¹, LIU Bao-li², ZHANG Geng¹(1. Wuhan Municipal First Hospital, Wuhan 430030, China; 2. Wuhan Petrochemical Hospital, Wuhan 430082, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the concentration of entacapone in human plasma. METHODS: Blood samples were treated with n-hexane. HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo C₁₈ column with mobile phase consisted of 20 mmol/L monometallic sodium orthophosphate (pH 2.9)-acetonitrile (66:34) at the flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of entacapone was 19.60-1 960 ng/ml ($r=0.999\ 3$). The average recoveries were 98.50%, 98.23% and 100.71% for low, medium and high concentrations, and RSD of intra-day and inter-day were all lower than 10%. CONCLUSIONS: The method is rapid, simple, sensitive and accurate for the determination of plasma concentration and pharmacokinetic study of entacapone.

KEYWORDS HPLC; Entacapone; Plasma concentration; Parkinson's disease

恩他卡朋属于儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 抑制剂, 它是一种可逆的、特异性的、主要作用于外周的 COMT 抑制剂。其通过抑制 COMT 酶减少左旋多巴代谢为 3-氧位-甲基多巴 (3-OMD), 可使左旋多巴的生物利用度增加, 并增加脑内可利用的左旋多巴总量。恩他卡朋可作为左旋多巴/苄丝肼或左旋多巴/卡比多巴的辅助用药, 用于治疗以上药物不能控制的帕金森病及剂末现象 (症状波动)。笔者建立了人体血浆中恩他卡朋的高效液相色谱 (HPLC) 法, 可用于恩他卡朋片的人体药动学和生物等效性研究。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪, 包括 SPD-M20A 检测器、

CBM-20A 工作站 (日本岛津公司); AB204-N 型万分之一电子天平 (瑞士梅特勒公司); LG-80 型离心机 (上海安亭医学仪器有限公司); SK-1 型快速混匀器 (上海沪西分析仪器有限公司);

1.2 药品与试剂

盐酸恩他卡朋对照品 (美国 Sigma 公司, 批号: 15u0765, 含量: 99.9%); 内标: 塞来昔布对照品 (中国药品生物制品检定研究院, 批号: 110982-000516, 含量: 100%); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯。空白人血浆由本院血库提供。

2 方法^[1-2]与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 2.9)-乙腈 (66:34); 流速: 1 ml/min; 柱

度的 LC-MS/MS 法, 该法血浆处理方法操作简便, 流动相采用乙腈-水系统梯度洗脱, 减少了配制流动相的烦琐, 并保证了灵敏度和重复性, 可满足临床药动学大样本分析的要求。

血药浓度数据经 DAS2.1.1 等软件统计分析显示, 受试制剂与参比制剂在健康人体内的过程基本相似, 血浆中的氟氯西林的主要药动学参数和文献^[1]所报道的结果基本一致, 而与文献^[2-4]所报道的结果不一致, 笔者认为可能与地区人群差异等因素有关。

对氟氯西林的主要药动学参数进行对数转换, 方差分析表明, 受试制剂与参比制剂间无显著性差异; 经双向单侧 *t* 检验和

[1-2α] 置信区间检验, 氟氯西林的 C_{max} 、 AUC_{0-24h} 均落在标准置信区间范围内, 表明两制剂在吸收程度上具有生物等效性。

参考文献

- [1] 毕悦, 胡艳玲, 孙璐, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中氟氯西林的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5): 384.
- [2] 郑恒, 李红梅, 方淑贤. 注射用氟氯西林钠的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(2): 208.
- [3] 董卫华, 董亚琳, 郑鑫, 等. 氟氯西林钠胶囊在健康人体的生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(1): 41.
- [4] 阮邹荣, 周权, 袁虹, 等. 氟氯西林钠胶囊在中国人体的药动学和生物等效性评价[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(9): 699.

(收稿日期: 2013-04-13 修回日期: 2013-05-13)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 天然药物研究。电话: 027-85332413。E-mail: huyaoshi@sina.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 新制剂研究。电话: 027-85332089。E-mail: zhanggen888@126.com