

司帕沙星片剂在健康人体的药动学和相对生物利用度

隋 淼¹, 王晓波¹, 袁荣刚¹, 孙佳丹² (1. 解放军第 210 医院, 国家药物临床试验机构, 辽宁 大连 116021; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116015)

[摘要] 目的 建立测定血浆中司帕沙星的 HPLC 内标法并研究司帕沙星片的相对生物利用度及生物等效性。方法 20 名健康志愿者分两组, 随机、交叉口服受试制剂与参比制剂的司帕沙星片 0.4 g, HPLC 法测定血药浓度, 计算药动学参数及生物等效性评价。结果 受试制剂与参比制剂血浆中司帕沙星的 t_{max} 为 (4.68 ± 0.44) 和 (4.55 ± 0.51) h; C_{max} 为 (1 560.4 ± 243.9) 和 (1 584.1 ± 273.9) ng/ml; $t_{1/2}$ 为 (20.92 ± 4.85) 和 (19.81 ± 3.75) h; 用梯形法计算 AUC_{0-1} 为 (43 325 ± 12 174) 和 (44 139 ± 11 815) ng · h/ml; $AUC_{0-∞}$ 为 (45 452 ± 12 884) 和 (45 999 ± 12 629) ng · h/ml。以 AUC_{0-1} 计算, 受试制剂的平均相对生物利用度为 (97.9 ± 5.8) %。结论 两制剂具有生物等效性。

[关键词] 司帕沙星; 生物利用度; 生物等效性; 高效液相色谱法

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)05-0372-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.05.015

Pharmacokinetics and relative bioavailability of Sparfloxacin in healthy volunteer

SUI Miao¹, WANG Xiao-bo¹, XI Rong-gang¹, SUN Jia-dan² (1. The 210th Hospital of P. L. A., State Institution for Drug Clinical Trials, Dalian 116021, China; 2. Dalian Medical University, Dalian 116015, China)

[Abstract] **Objective** To determine Sparfloxacin concentrations in human plasma and study the pharmacokinetics and relative bioavailability of Sparfloxacin for Suspension. **Methods** A single dose reference and test was given to 20 healthy volunteers in a randomized 2-way cross-over study. The plasma Sparfloxacin concentrations were determined by HPLC. The pharmacokinetics as well as relative bioavailability was measured. **Results** The main pharmacokinetic parameters of two formulations, Sparfloxacin in test and reference drug were as follows: t_{max} were (4.68 ± 0.44) and (4.55 ± 0.51) h; C_{max} were (1 560.4 ± 243.9) and (1 584.1 ± 273.9) ng/ml; $t_{1/2}$ were (20.92 ± 4.85) and (19.81 ± 3.75) h; AUC_{0-1} were (43 325 ± 12 174) and (44 139 ± 11 815) ng · h/ml; $AUC_{0-∞}$ were (45 452 ± 12 884) and (45 999 ± 12 629) ng · h/ml respectively. Using DASS program, the results of variance and two one-sided t-test statistical analyses for Ln C_{max} . Two formulations were bioequivalent. **Conclusion** The reference and test Sparfloxacin were bioequivalent.

[Key words] Sparfloxacin; bioavailability; bioequivalence; HPLC

司帕沙星是第 3 代喹诺酮类药物。其作用机制是抑制细菌 DNA 合成过程中的 DNA 旋转酶的作用而起杀菌作用。健康成人空腹单次口服本品 0.4 g, 服药后 4 h 左右达血药峰浓度 (C_{max}), 血消除半衰期约 16 h 左右, 口服后主要在小肠吸收, 在胃内几乎不吸收。血浆蛋白结合率为 42% ~ 44%。临床上用于呼吸系统、泌尿系统、肠道、胆道、皮肤软组织等感染的治疗。目前, 司帕沙星的含量测定方法有分光光度法、非水滴定法、高效液相色谱法和流动注射化学发光法等。在血药浓度的研究中, 多采用 HPLC 法。本试验优化了传统 HPLC 测司帕沙星片人体的药代动力学和生物利用度, 采用有机溶剂提取法提高回收率。建立了一种灵敏、准确的高效液相色谱法测定司帕沙星片在人体内的代谢过程的方

法, 为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 试药与仪器 受试制剂: 司帕沙星片, 规格: 0.1 g/片, 批号: 060708, 由北京四环科宝制药有限公司提供。参比制剂: 司帕沙星片 (海正立特), 规格: 0.1 g/片, 批号: 060301, 由浙江海正药业股份有限公司提供。对照品: 司帕沙星标准品, 批号: 130461-200501, 由中国药品生物制品检定所提供; 内标: 洛美沙星对照品, 批号: 0452-200001, 由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈均为色谱纯; 二氯甲烷、磷酸氢二钾、磷酸、磷酸二氢钾、三乙胺均为分析纯; 试验用水为纯净水; 空白血浆由大连解放军第 210 医院提供。

LC-40ATvp 高效液相色谱仪, SPD-10Avp 紫外检测器, 均为日本岛津公司生产; N2000 色谱数据工作站软件, 浙江大学智达信息工程有限公司生产;

[作者简介] 隋 淼 (1977-), 女, 主管药师. Tel: (0411) 85841067, E-mail: s_m_210@sina.com.

TG328A 型分析天平,上海精密科学仪器有限公司生产; TGL-16G 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂生产; KS 康氏振荡器,江苏金坛市荣华仪器制造有限公司生产; XW-80A 微型旋涡混和仪,上海沪西分析仪器有限公司生产; MTN-2800W 氮吹浓缩装置,天津奥特塞恩斯仪器有限公司生产。

1.2 受试者选择 20 例男性健康志愿者,年龄 (23.9 ± 1.37) 岁,体重 (65.9 ± 6.74) kg,身高 (175.45 ± 4.52) cm。受试者均通过健康体检检查,心电图、心率、血压、肝肾功能等结果均为正常; 试验前 2 周及试验期间禁服其他任何药物,并禁烟酒及咖啡类饮料。所有受试者均被告知试验过程及相关不良反应并签署知情同意书。

1.3 试验设计 本试验采用随机分组、双周期双交叉试验的设计。受试者随机等分为 2 组,试验前禁食 10 h,试验日晨空腹用 200 ml 温开水吞服 0.4 g 试验制剂或参比制剂。服药后 2 h 内禁水,给药 4 h 和 10 h 后给予统一低脂肪、低蛋白标准餐。20 名受试者服药 2 周后交叉给药,重复上述试验。

1.4 血浆样品收集 受试者于服药前(0 h)和服药后 1.0、2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、8.0、12.0、24.0、48.0、72.0、96.0 h 由前臂静脉采血 5.0 ml 置于肝素管中;离心 10 min(3 500 rpm)分离血浆;置 -70°C 冰箱保存待测。

1.5 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C_{18} (200 mm \times 4.6 mm 5 μm);柱温:室温;流动相:乙腈-磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾 6.8 g,加适量水溶解,加入三乙胺 3 ml,再加水稀释至 1 000 ml,摇匀)(20:80, V/V),用磷酸调 pH 值至 2.5 ± 0.1 ;流速:1.2 ml/min;进样量:20 μl ;检测波长:298 nm。

1.6 内标溶液的配制 精密称取洛美沙星对照品 10 mg,置于 100 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的洛美沙星储备液;取取储备液 10 ml 置于 100 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,获得浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的洛美沙星内标液,置 4°C 冰箱内保存备用。

1.7 血浆样品的处理 精密量取空白血浆 500 μl ,分别精密加入内标溶液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 洛美沙星溶液) 25 μl 、1 mol/L 磷酸氢二钾溶液 100 μl ,漩涡混合 30 s,加入二氯甲烷 3 ml,震荡混合 5 min,取有机层置另一离心管中,于 40°C 水浴中空气吹干,残留物用流动相 150 μl 复溶。复溶后将样品转移至 1.5 ml 离心管中,离心(1 000 r/min) 5 min,取上清 20 μl 进样分析。

1.8 标准曲线制备 精密量取空白血浆 500 μl ,加司帕沙星标准系列溶液 50 μl ,配制成相当于司帕沙星血浆浓度为 20、50、100、250、500、1 000、1 500、2 000 ng/ml 的标准溶液,按“血浆样品处理”同法操作,每一浓度进行双样本分析,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,用加权最小二乘法^[3]进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线, $Y = 0.00273X - 0.00843$, $r = 0.9922$ 。由试验结果可知司帕沙星血浆浓度测定的线性范围为 20~2 000 ng/ml,血浆中司帕沙星定量下限是 20 ng/ml,结果表明,司帕沙星在测定范围内线性关系良好。

1.9 色谱行为 上述色谱条件下测得的标准品、服药前空白血浆和受试者样品的色谱图见图 1。司帕沙星、内标的保留时间分别为 12.6 min。结果表明,血浆中内源性物质不干扰司帕沙星和内标的测定。

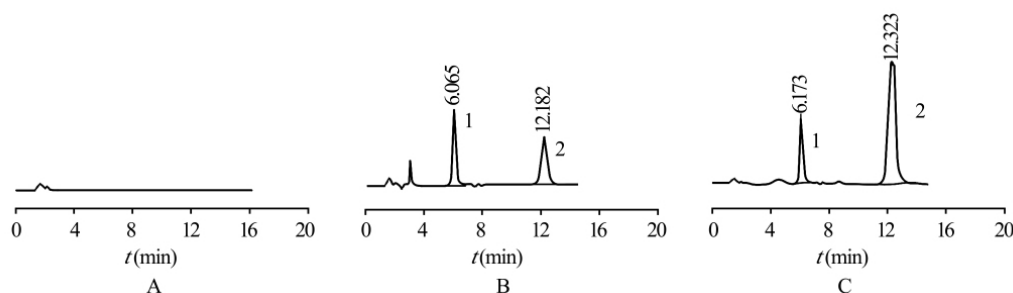


图 1 司帕沙星 HPLC 色谱图

A-空白血浆; B-司帕沙星、内标物与空白血浆; C-血浆样品; 1-洛美沙星; 2-司帕沙星

1.10 精密度与回收率 取空白离心管分别加入不同浓度的司帕沙星标准溶液 50 μl ,再加入空白血浆 500 μl ,配制成低、中、高(50、500、1 500 ng/ml) 3 个浓度的血浆样品,按“血浆样品处理方法”

项下方法试验,在不同天的时间内连续制备并测定 3 个分析批,每批样品分为低、中、高 3 个浓度水平,每个浓度进行 6 样本分析。计算日内和日间精密度,数据见表 1。

表 1 司帕沙星精密与回收率试验结果

| 药物浓度 (ng/ml) | 日内精密度 | | 日间精密度 | | 提取回收率 (%) | 方法回收率 ($\bar{x} \pm s$) % |
|-----------------|----------------------|--------|----------------------|--------|---------------|--------------------------------|
| | 测得量(ng/ml) | RSD(%) | 测得量(ng/ml) | RSD(%) | | |
| 50 | 47.033 3 ± 5.603 5 | 9.07 | 47.990 ± 4.327 3 | 9.02 | 88.20 ± 10.72 | 94.07 ± 11.21 |
| 500 | 494.366 7 ± 23.043 0 | 4.84 | 496.610 ± 22.867 3 | 4.61 | 93.50 ± 1.25 | 98.87 ± 4.61 |
| 1 500 | 1 442.95 ± 58.453 6 | 5.01 | 1 514.540 ± 89.494 5 | 5.91 | 92.20 ± 1.35 | 96.20 ± 3.90 |

1.11 回收率 取空白血浆 500 μl,制备低、中、高(50、500、1 500 ng/ml) 3 个浓度的血浆样品,每一浓度进行 6 样本分析。同时另取空白血浆 500 μl,除不加标准系列溶液和内标外,按“血浆样品处理方法”项下操作,向获得的上清液中加入相应浓度的标准溶液 50 μl 和内标溶液 25 μl,涡流混合,取样 20 μl 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回收率,数据见表 1。

1.12 稳定性 取空白血浆 500 μl 分别加入不同浓度司帕沙星标准溶液 50 μl,配制成血浆中药物浓度分别为 50、500、1 500 ng/ml 的血浆样品若干份,一份按“血浆样品处理方法”项下同法试验,在室温放置 24 h 后进样分析,考察预处理后血浆样品在室温条件下的稳定性;一份加入标准溶液在室温放置 24 h 后,按“血浆样品处理方法”项下操作,进样分析,考察血浆样品在室温条件下的稳定性;另一份于 -20℃ 冰箱冷冻,反复冻融 3 次后,按“血浆样品处理方法”项下操作,进样分析,考察血浆样品经 3 次反复冻融稳定性;一份于 -20℃ 冷冻保存 13、30 d 后,按“血浆样品处理方法”项下操作,进样分析,考察血浆样品在长期冷冻条件下的稳定性。结果血浆中司帕沙星 -20℃ 保存条件下浓度无明显变化(RSD 均小于 15%)。

2 结果

2.1 血药浓度-时间曲线 20 名健康受试者口服司帕沙星片试验制剂和参比制剂 0.4 g 后平均血药浓度-时间曲线见图 2。

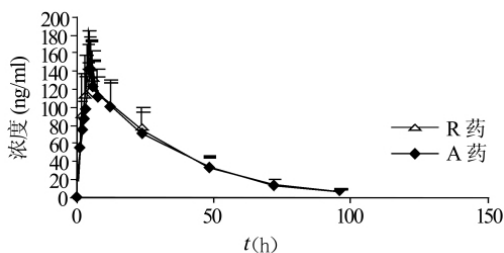


图 2 20 名健康受试者口服司帕沙星片后平均血药浓度-时间曲线图

2.2 药动学参数 司帕沙星试验制剂与参比制剂在人体中的药动学参数见表 2。

表 2 两制剂动力学参数(n=20 $\bar{x} \pm s$)

| 参数 | 试验制剂 | 参比制剂 |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| t_{max} (h) | 4.68 ± 0.44 | 4.55 ± 0.51 |
| C_{max} (ng/ml) | 1 560.4 ± 243.9 | 1584.1 ± 273.9 |
| AUC_{0-1} (ng/ml · h) | 43 325 ± 12 174 | 44 139 ± 11 815 |
| $AUC_{0-\infty}$ (ng/ml · h) | 45 452 ± 12 884 | 45 999 ± 12 629 |
| $t_{1/2}$ (h) | 20.92 ± 4.85 | 19.81 ± 3.75 |

2.3 生物等效性检验 经主要药动学参数对数转换后进行方差分析,并进一步采用双单侧 t 检验和(1-2α) 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。结果表明:司帕沙星片的 AUC_{0-1} 和 C_{max} 均拒绝生物不等效假设。受试制剂中,司帕沙星片的 AUC_{0-1} 的 90% 置信区间为参比制剂的 95.5% ~ 100%, $AUC_{0-\infty}$ 的 90% 置信区间为参比制剂的 95.6% ~ 101.5%, C_{max} 的 90% 置信区间为参比制剂的 95.3% ~ 102.4%, t_{max} 无统计学意义。根据以上结果,判定两制剂具有生物等效性。

3 讨论

本试验参照司帕沙星质量标准^[2]中所用流动相:甲醇-磷酸盐溶液(磷酸二氢钾 6.8 g,三乙胺 3 ml,加水溶解并稀释至 1 000 ml,摇匀)(57:43, V/V)用磷酸调 pH 值至 2.5 进行试验,结果主成分出峰时间短,内源性物质峰干扰主成分测定;之后选用分离度效果好的乙腈代替甲醇,重新调整流动相:乙腈-磷酸盐溶液(磷酸二氢钾 6.8 g,三乙胺 3 ml,加水溶解并稀释至 1 000 ml,摇匀)(20:80, V/V)用磷酸调 pH 至 2.5 时,内标和待测物色谱峰保留时间理想,内源性物质峰不干扰测定峰。本次试验中使用的流动相为:乙腈-磷酸盐溶液(磷酸二氢钾 6.8 g,三乙胺 3 ml,加水溶解并稀释至 1 000 ml,摇匀)(20:80, V/V),用磷酸调 pH 值至 2.5 ± 0.1。

在提取方法筛选过程中,曾选用沉淀法(以甲醇为沉淀剂)进行提取,结果血浆中内源性物质无干扰,回收率较低。之后选用有机溶剂提取法,分

别使用氯仿-异丙醇(4:1, V/V)、氯仿-异丙醇(9:1, V/V)和二氯甲烷作为提取溶剂,经试验选用二氯甲烷作为提取溶剂,血浆中内源性物质不干扰测定,且提取回收率较高,故最终采用二氯甲烷作为提取溶剂。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2005 版. 二部[S]. 2005, 附录 173.
- [2] 中国药典 2005 版. 二部[S]. 2005, 161.

- [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, 2006, 16(5): 343.
- [4] 梁竹, 潘茵清, 袁成等. 高效液相色谱法测定血清和尿中司帕沙星的药物浓度[J]. 解放军药学学报, 2005, 15(3): 40.
- [5] 张毕奎, 杨宇, 李焕德等. 国产司帕沙星片在老年人体内的药动学研究[J]. 临床药学, 2008, 37(2): 120.

[收稿日期]2012-02-27

[修回日期]2012-05-02

(上接第 371 页)

性或弱酸性、弱碱性条件下释放速度在后期略微降低。释放度-时间-pH 值三维图能为制剂的质量控制提供更全面、更广泛的释药行为方面的依据,帮助评价、判断产品质量并为体内生物利用度的预测提供依据。

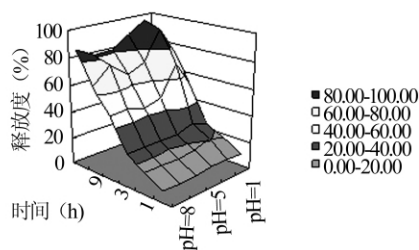


图 8 pH 值对药物体外释放的影响

3 讨论

根据文献报道,HPMC 在高黏度范围内,黏度对难溶性药物释放有显著的影响,而对水溶性药物的释放影响不大。本实验研究结果表明,随 HPMC 黏度的增加,药物的释放变缓,药物的释放随着 HPMC 黏度的不同而表现出不同的释药特征。骨架材料的用量是影响释药速率的重要因素,理论上讲,HPMC 用量增加,凝胶层厚度和强度增大,释药速率减慢^[4],本试验结果也证实了这一点。微晶纤维素为水不溶性物质,但遇水易膨

胀,在片剂中具有促进和阻滞药物释放的双重作用,对能抵制其膨胀性的骨架,它主要表现为阻塞水通道的阻滞释放作用。由本研究的结果可以看出,微晶纤维素对药物的释放有较大的影响,导致药物释放缓慢,表明在此处方中,微晶纤维素作用是阻止水分渗入药片、阻滞药物释放,因而药物释放速度减慢。

当制片压力很小时,可能会使片剂的骨架疏松,空隙率增大,水会迅速地进入缓释片,在片剂的表面形成很厚的水凝胶层,不利于药物的释放。藤甲酰苷在 0.5% (w/v) 十二烷基硫酸钠水溶液中的溶解度相对较小,当压片压力过小时,凝胶溶胀时藤甲酰苷停留在了凝胶层,从而阻碍了药物的释放;而压力增加至一定值后,骨架紧密、孔隙率随压力改变变化不大,由于片厚降低,药物在水凝胶层停留的时间减少,故释放速度加快

【参考文献】

- [1] 徐利锋. 藤黄酸苷衍生物和类似物及其制备方法和用途[P]. 中国专利, 101289482A, 2008-10-22.
- [2] Zong L, Chen LL, Zhang Y. Studies on nitrendipine sustained-release tablets and in vitro release characteristics[J]. J China Pharm Univ, 2004, 35(6): 503.
- [3] 中国药典 2010 版. 二部[S]. 2010: 附录 87.
- [4] 颜耀东. 缓释控释制剂的设计与开发[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 68.

[收稿日期]2012-02-06

[修回日期]2012-05-22

欢迎订阅 2013 年《药学实践杂志》
本刊网址: www.yxsjzz.cn; yxsj.smmu.edu.cn