文章编号：1001-8689(2020)05-0513-06

不同处方头孢克肟胶囊在比格犬体内的药动学

闫晓霞[1] 李源远[2] 李建伟[1,3,*]
(1 长治医学院药学系，长治 046000；2 中国药科大学，南京 211198，3 北京振东生物科技有限公司，北京 100080)

摘要：目的 研究两种不同处方头孢克肟胶囊受试制剂与参比制剂在比格犬体内的生物等效性。**方法** 8只比格犬采用3周期给药方法，单次灌胃50mg头孢克肟胶囊受试制剂或参比制剂，LC-MS/MS法测定比格犬体内头孢克肟血药浓度，计算药动学参数并进行生物等效性评价。**结果** 单次灌胃自制制剂和参比制剂后，参比制剂、受试制剂A和B的主要药动学参数C_{max}分别为(11.24±26.39)、(14.33±8.29)和(10.24±5.36)ng/mL，T_{max}分别为(2.69±1.31)、(3.52±1.58)和(2.75±1.76)h，$AUC_{0\text{-}48h}$分别为(0.11±0.19)、(0.14±0.06)和(0.11±0.32)ng·h/mL，$AUC_{0\text{-}\infty}$分别为(0.13±0.20)、(0.16±0.09)和(0.12±0.04)ng·h/mL。**结论** 受试制剂A与参比制剂生物不等效，受试制剂B与参比制剂生物等效，两种受试制剂生物不等效。

关键词：头孢克肟；高效液相色谱-质谱联用法；药动学；生物等效性
中图分类号：R945 **文献标志码**：A

Pharmacokinetics of cefixime capsules made by different prescriptions in beagle dogs

Yan Xiao-Xia[1], Li Yuan-yuan[2] and Li Jian-wei[1,3]
(1 Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi 046000; 2 China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;
3 Beijing Zhendong Biotechnology Co. Ltd, Beijing 100080)

Abstract **Objective** To investigate the pharmacokinetics and bioequivalence of cefixime capsules made by different prescriptions and the reference product in beagle dogs. **Methods** Eight beagles received test cefixime capsules or reference capsules of 50 mg in three cycles. Plasma samples were collected at different time points. Plasma concentrations of cefixime were determined by LC-MS/MS and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The pharmacokinetic parameters of tests A, B, and reference capsules were as follow: C_{max} (11.24±26.39), (14.33±8.29) and (10.24±5.36)ng/mL, T_{max} (2.69±1.31), (3.52±1.58), and (2.75±1.76)h, $AUC_{0\text{-}48h}$ (0.11±0.19), (0.14±0.06), and (0.11±0.32)ng·h/mL, $AUC_{0\text{-}\infty}$ (0.13±0.20), (0.16±0.09), and (0.12±0.04)ng·h/mL. **Conclusion** Test A preparations were not bioequivalent with the reference preparations, and test B preparations were bioequivalent with the reference preparations. The two test preparations were not bioequivalent.

Key word Cefixime; LC-MS/MS; Pharmacokinetics; Bioequivalence

头孢克肟(图1)为第三代口服头孢菌素，通过抑制细菌细胞壁合成而起杀菌作用，对阴性杆菌β-内酰胺酶高度耐受，有强大的抗阴性杆菌作用，与其它口服头孢菌素相比，具有抗菌作用强，有效浓度持续时间长的特点[1]。在临床上适用于治疗敏感菌所致的咽炎、扁桃体炎、急性支气管炎和慢性支气管

收稿日期：2019-05-08
基金项目：山西省重点研发计划(社会发展领域)项目(No. 201803D31017)
作者简介：闫晓霞，女，生于1968年，学士，高级实验师，研究方向：体内药物分析，E-mail: xiaoxiayan@126.com
*通讯作者，E-mail: lyy7273@163.com

炎急性发作等。头孢克肟胶囊最早由日本藤泽制药工业株式会社开发，1987年在日本上市，2012年由日本长生堂制药株式会社生产。

本实验采用LC-MS/MS法测定比格犬血浆中的头孢克肟，对头孢克肟在比格犬体内的药动学进行研究。通过对不同处方的自制制剂与原研制剂进行比格犬体内的生物等效性研究，确定放大生产的处方，为后期临床试验研究提供样品。

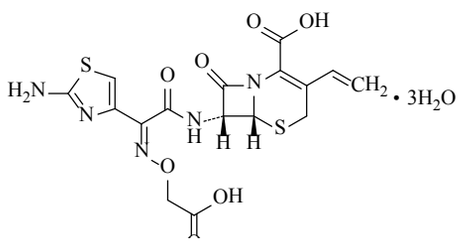


图1　头孢克肟的结构式
Fig 1　Chemical structure of cefixime

1　仪器与试剂

TSQ Endura 质谱仪(Thermo Scientific公司)；UltiMate 3000高效液相色谱仪(Thermo Scientific公司)；Vortex-Geniez旋涡混合仪(美国 Scientific Industries公司)；XSE-205，CAB-001分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)；Allegra X-30R 高速离心机(美国Beckman Coulter公司)；-40℃低温冰箱(长虹美菱股份有限公司)。

受试制剂(A)：头孢克肟胶囊(批号1702101，规格：50mg/粒，北京振东生物科技有限公司)；受试制剂(B)：头孢克肟胶囊(批号1705262，规格：50mg/粒，北京振东生物科技有限公司)；参比制剂(R)：头孢克肟胶囊(批号AL051，规格：50mg/粒，日本长生堂制药株式会社)；头孢克肟对照品(含量：89.2%，批号：130503-201205)，中国食品药品检定研究院；甲氧苄啶对照品(含量：99.6%，批号：100031-201606，中国食品药品检定研究院)；甲醇、甲酸、乙腈为色谱纯，其它试剂为分析纯，试验用水为双蒸去离子水。

健康BeagLe犬(普通级)12只，雌雄各半，体质量为(8.0±0.5)kg，购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司，许可证SCXK(京)2015-0005。

2　方法

2.1　体外溶出试验

按照国家食品药品监督管理总局发布的《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》[2]，在4种不同介质中，分别测定参比制剂和自制制剂不同取样时间点的溶出度，计算相似因子f_2，f_2＞50认为两种制剂体外溶出一致。

2.1.1　体外溶出方法

参考日本药典[3]收载溶出方法，采用转篮法，以水，pH1.2盐酸溶液，pH6.8磷酸盐缓冲液，pH7.5柠檬酸盐缓冲液1000mL为溶出介质，转速为50r/min，温度为(37±0.5)℃。

2.1.2　溶液的制备

供试品溶液：取自制样品或原研样品12粒，按照“2.1.1”项下溶出方法，分别于不同时间取样，同时向溶出杯中补充同温同体积的相同介质，溶出液用0.45μm微孔滤膜过滤，弃去初滤液，取续滤液适量用溶出介质稀释成5μg/mL的溶液作为供试品溶液。

对照品溶液：取头孢克肟对照品约10mg，精密称量，置200mL容量瓶中，加入溶出介质超声溶解后加至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

2.1.3　检测方法[4]

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(4.6mm×150mm，5μm)，流动相：四丁基氢氧化铵溶液(取40%四丁基氢氧化铵溶液12.5mL，加水2000mL，摇匀，用1.5mol/L磷酸溶液调节pH值至6.5)-乙腈(70:30)；柱温：40℃；检测波长：254nm；流速：1.5mL/min；进样体积：10μL。

2.2　体内生物等效性试验

2.2.1　检测方法及方法考察

(1)色谱条件　色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C_{18}色谱柱(2.1mm×100mm，3.5μm)，流动相A为0.1%甲酸，流动相B为甲醇，梯度洗脱：0~1min，80%A；1~4min，80%→10%A；4~5min，10%→80%A；5~6min，80%A。流速：0.3mL/min，柱温：30℃，进样量：5μL。

(2)质谱条件　电喷雾离子源(ESI)，喷射电压为3500V，鞘气为30psi，辅助气为10psi，离子传输管温度为250℃，雾化器温度为50℃，透镜电压：头孢克肟210V，内标156V。离子化方式为气动辅助

电喷雾离子化(H-ESI)，碰撞能量头孢克肟为20V，甲氧苄啶为24V。正离子化方式检测，扫描方式为反应监测(SRM)，用于定量分析的离子对分别为*m/z* 454.3→*m/z* 285.2([M+H]$^+$，头孢克肟)，*m/z* 291→*m/z* 274([M+H]$^+$，甲氧苄啶)。

(3)溶液的配制　头孢克肟标准溶液的制备：精密称取头孢克肟标准品约25.0mg，置25mL容量瓶中，用乙腈溶解并定容至刻度，得浓度为1.0mg/mL的头孢克肟储备液。于4℃冷藏备用。临用前精密量取储备液若干份，用乙腈-水(50/50，*V/V*)分别稀释成质量浓度为50，200，500，5000，20000和40000ng/mL的标准溶液。

甲氧苄啶内标溶液的配制：精密称取甲氧苄啶标准品25.0mg，置25mL容量瓶中，用乙腈溶解并定容至刻度，得浓度约为1000μg/mL 的内标储备液。于4℃冷藏备用。临用前用乙腈-水(50/50，*V/V*)稀释为质量浓度200ng/mL 的内标工作液。

(4)血浆样品处理　精密吸取100μL比格犬血浆至2.0mL EP管中，加入100μL甲氧苄啶内标溶液(200ng/mL)和200μL乙腈，涡旋30s。11000r/min离心5min，取上清液100μL，加入0.5%的甲酸溶液100μL，涡旋30s，11000r/min离心5min，取上清液5μL进样。

(5)专属性考察　分别取比格犬的空白血浆、空白血浆添加头孢克肟500ng/mL和内标甲氧苄啶200ng/mL以及受试比格犬第一周期灌胃给药后1.5h的血浆样品100μL，按照“2.2.1(4)”项下处理，考察方法的专属性。

(6)标准曲线和定量范围　取空白血浆100μL，加入头孢克肟系列标准溶液各100μL，配制成相当于头孢克肟血药浓度分别为25，100，250，2500，10000和20000ng/mL的血浆样品，加入100μL甲氧苄啶内标溶液(200ng/mL)，200μL乙腈，置旋涡仪上涡旋30s。11000r/min离心5min，取上清液100μL，加入0.5%的甲酸溶液200μL，涡旋30s，取上清液进样。以头孢克肟血浆样品的浓度为横坐标，以头孢克肟与甲氧苄啶的峰面积比值为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归，求得标准曲线和线性范围。

(7) 精密度与回收率的测定　配制浓度分别为50，200和5000ng/mL的低、中和高浓度的头孢克肟对照品溶液各100μL，浓缩离心仪挥干，分别加入比格犬空白血浆100μL，按“2.2.1(4)”项下方法操作，测定日内变异和日间(连续考察3d)变异，并计算出各浓度的RSD%值。根据测定结果的峰面积与相同浓度对照品溶液的峰面积比，计算头孢克肟的绝对回收率。

(8) 基质效应　按“2.2.1(4)”项下方法处理空白血浆，得到空白血浆基质，分别加入浓度为50，200和5000ng/mL头孢克肟对照品溶液100μL和200ng/mL内标溶液100μL，各制备5份样品，进样得到的峰面积比值除以用流动相配制的相应浓度标准溶液及内标溶液直接进样得到的峰面积比值，计算血浆中内源性物质对头孢克肟的基质效应。

(9) 稳定性　取头孢克肟低、中、高3个浓度的标准溶液各100μL于空白离心管中，加入100μL空白血浆样品，配置成浓度为200，5000和20000ng/mL头孢克肟稳定性样品，每一浓度各配制5份。分别考察室温放置8h、7d内反复3次冻融循环，以及-40℃下条件下放置20d的稳定性，然后按“2.2.1(4)”项下方法操作，将测定结果的峰面积比代入标准曲线进行计算，所得结果与初始浓度比较，其偏差应在±15%范围内，以此评估样品的稳定性。

2.2.2　试验方案与血样采集

采用8只比格犬3周期重复给药方法，洗脱期为7d。禁食12h后，分别灌胃给予头孢克肟胶囊受试制剂或参比制剂1粒，于给药前0h、给药后0.17，0.33，0.5，0.75，1，1.25，1.5，2，2.5，3，4，5，6，8，10，12，24，48h，从四肢静脉取血约2.0mL，取血后离心(离心温度：4℃，离心时间：10min，离心转速：3000r/min)分离血浆。血浆样本置-40℃冰箱保存待测。

2.2.3　生物等效性比较

以LC-MS/MS法测定血浆中头孢克肟浓度，计算相应药动学参数，对3种制剂的药动学参数进行比较。

3　结果

3.1　体外溶出度

头孢克肟胶囊的不同受试制剂与原研制剂的体外累积溶出度-时间曲线见图2。在4种溶出介质中，两种受试制剂与参比制剂溶出曲线相似因子f_2均大于50，体外溶出行为与参比制剂相似。

3.2　方法专属性

本试验条件下，内标甲氧苄啶和头孢克肟的保留时间分别为2.8和4.1min，血浆中的内源性物质不

干扰头孢克肟与内标的测定，见图3。

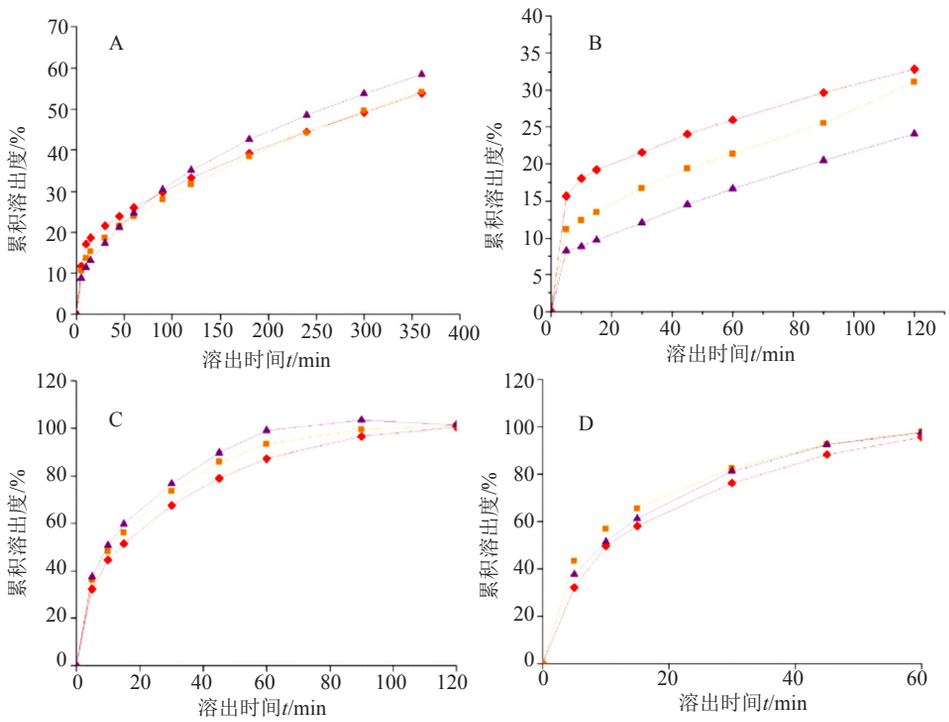
3.3　标准曲线

以头孢克肟与甲氧苄啶的峰面积比值为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归，得标准曲线Y=0.029X+0.002(r=0.9961)，头孢克肟的浓度在47.29~39105.97ng/mL范围内，线性关系良好。

3.4　精密度与回收率

如表2所示，日内和日间精密度均在15%以内，绝对回收率符合生物样品分析要求。

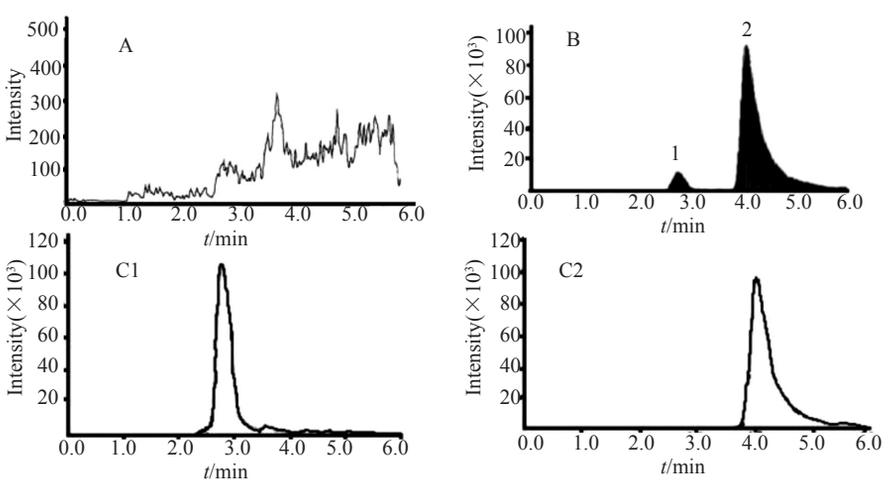
3.5　稳定性考察



A：水，B：pH1.2盐酸溶液，C：pH6.8磷酸盐缓冲液，D：pH7.5柠檬酸缓冲液(■：自制A制剂，▲：自制B 制剂，◆：参比制剂)

图2　3种制剂在不同介质中的溶出曲线

Fig. 2　The dissolution profiles of cefixime capsules in different dissolution medium



A：空白血浆；　B：空白血浆加入头孢克肟50ng/mL和内标甲氧苄啶200ng/mL；C：第一周期灌胃受试制剂1.0h后血浆样品；1：内标甲氧苄啶；2：头孢克肟

图3　犬血浆中头孢克肟和内标甲氧苄啶的LC-MS/MS图

Fig. 3　Representative LC-MS/MS chromatograms for cefixime and trimethoprim in beagle plasma

结果表明，各样品浓度的RSD＜±10%，血浆中头孢克肟室温放置8h、7d内反复3次冻融循环，以及-40℃下条件下放置20d稳定性良好，能够满足测定要求。

3.6 基质效应

头孢克肟低、中、高3个浓度(50，200和5000ng/mL)的血浆样品基质效应分别为(88.63±10.64)%、(91.19±5.46)%和(95.61±3.73)%，RSD分别为10.82% 、6.87%和7.12%，内标(浓度为200ng/mL)的基质效应为(95.38±6.82)%，RSD为5.78%，结果表明基质效应不影响测定准确性。

3.7 血药浓度结果

12只比格犬单剂量灌胃给予头孢克肟胶囊参比制剂(R)和受试制剂(A，B)后所测得的血药浓度(图4)。

3.8 药动学参数计算结果及数据处理结论

使用DAS ver 2.1.1程序，计算药动学参数，对3种制剂的药动学参数进行比较，结果见表4。

3.9 生物等效性

对参数AUC_{0-t}、C_{max}进行方差分析和双单侧t检验，对T_{max} 进行非参数检验。结果表明：受试制剂A头孢克肟AUC_{0-t}和C_{max}的90%置信区间分别为参比制剂相参数的131.4%~155.2%、118.7%~181.3%，T_{max}无显著性差异。受试制剂B头孢克肟AUC_{0-t}和C_{max}的90%置信区间分别为参比制剂相应参数的94.1%~108.3%、93.9%~121.5%，T_{max}无显著性差异；以AUC_{0-t}、C_{max}为评价指标，在比格犬体内受试制剂A与参比制剂生物不等效，受试制剂B与参比制剂生物等效。

表 2 犬血浆中头孢克肟精密度与回收率

Tab. 2 Precision and recovery results of cefixime in beagle plasma

浓度(ng/mL)	测定平均值(ng/mL)	RSD/%		回收率/%
		日间精密度	日内精密度	
50	47.67	6.18	1.12	91.54
200	195.41	7.42	3.89	93.80
5000	4754.69	9.34	3.54	91.29
20000	19105.92	11.53	6.70	91.71

表3 不同条件下血浆中头孢克肟的稳定性(n=5)

Tab. 3 Stability results of cefixime in plasma in different conditions (n=5)

条件	200ng/mL		5000ng/mL		20000ng/mL	
	RSD/%	RE%	RSD/%	RE%	RSD/%	RE%
室温8h	6.54	3.48	4.67	-3.49	4.09	-5.47
7d冻融3次	5.08	-4.73	5.01	-4.36	6.20	-5.16
-40℃放置20d	4.59	-3.64	7.16	-3.41	2.18	-3.62

4 讨论

测定生物样品中头孢克肟的方法有HPLC[5-6]，HPLC-MS[7-8]，GC-MS[9]等，样品前处理方法不同，头孢克肟极性较大，常用的有机溶剂不易提取，本实验血浆样品处理方法采用乙腈提取后，加入0.5%的甲酸进一步沉淀蛋白，可以消除内源性杂质对检测的影响。

参比制剂头孢克肟胶囊处方由羧甲基纤维素钙、胶态二氧化硅、聚氧乙烯40硬脂酸酯和硬脂酸镁组成。胶囊内容物重量为60mg，填充量小，对设备要求较高，因此，自制制剂A在原研处方的基础上，每粒胶囊增加40mg乳糖作为填充剂，内容物重量增加至100mg，以降低填充工艺对设备的要求。自制制剂B处方成分及内容物重量与参比制剂一致。乳

表4 比格犬灌胃受试制剂和参比制剂后药动学参数比较

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters of dexlansoprazole after oral administration of test and reference preparations

药动学参数	参比制剂	受试制剂A	受试制剂B
C_{max}(ng/mL)	11.24±26.39	14.33±8.29	10.24±5.36
T_{max} (h)	2.69±1.31	3.52±1.58	2.75±1.76
AUC_{0-t}(ng·h/mL)	0.11±0.19	0.14±0.06	0.11±0.32
$AUC_{0-\infty}$(ng·h/mL)	0.13±0.20	0.16±0.09	0.12±0.04

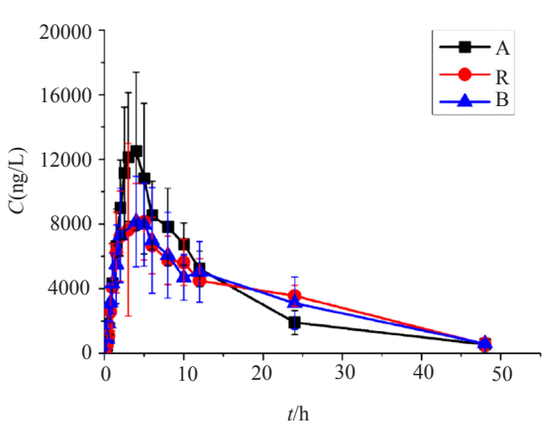


图4 比格犬灌胃头孢克肟受试制剂和参比制剂后的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Mean concentration-time curves of cefixime after oral administration of test and reference capsules

糖作为一种水溶性填充剂，在体外的溶出试验中，对溶出曲线影响不大。2种不同处方的自制制剂虽然与原研制剂在4种介质中的相似因子f_2＞50，但是在比格犬体内的药代试验结果显示，增加乳糖用量后，会显著增加头孢克肟的吸收，头孢克肟AUC_{0-t}和C_{max}增高，导致生物不等效。后续采用与自制制剂B一致的处方生产放大批，进行人体内生物等效性试验，结果显示与参比制剂等效。

在一致性评价研究过程中，从经济学角度考虑，可以采用比格犬进行药动学试验，探索不同处方在动物体内的差异，为进一步确定处方，提供合理的依据。为了保证体内试验的生物等效性，应尽量采用与原研处方一致的辅料(包括种类和数量)，尤其对于可能促进药物吸收的辅料，使用要格外慎重。

参 考 文 献

[1] 闫志刚, 白树华, 陈振阳, 等. 头孢克肟的临床抗感染研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(2): 150-153.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 关于发布普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则和化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则的通告[EB/OL]. (2015-2-5) http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/300001.html

[3] Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. Japanese Pharmacopeia XVII[S]. Tokyo, 2016: 624-625.

[4] The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeial 39-The National Formulary34[S]. Rockville, 2015: 3003-3004.

[5] 蔡爽, 冯婉玉, 李发美. HPLC法测定人血浆中头孢克肟血药浓度[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(4): 286-289.

[6] 林建阳，阚周密，冯婉玉. 头孢克肟胶囊的药物动力学及生物等效性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(7): 480-482.

[7] 李海霞, 任进民, 闫随朝, 等. LC/MS/MS法测定人血浆中头孢克肟含量[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(9): 680-684.

[8] 王雨萍, 鲁卓林, 尹永强, 等. 人血浆中头孢克肟的LC-MS/MS法测定及生物等效性研究[J]. 天津药学, 2013, 25(2): 1-3.

[9] 杨瑞霞. 色谱-质谱联用法测定人体内血浆中头孢克肟含量[J]. 医学综述, 2013, 19(6): 3059-3060.