

· 基础研究 ·

自制左炔诺孕酮片溶出度、生物利用度与国外制剂比较研究

余春梅¹, 陈 兰¹, 徐 洁¹, 杨秀丽¹, 周成林¹, 陈仲祥^{2△}

(1. 西南药业股份有限公司, 重庆 400038; 2. 重庆市工业学校 400043)

摘要:目的 通过溶出度、生物利用度与国外制剂比较研究, 仿制出达到国外制剂质量的左炔诺孕酮片。方法 采用浆法测定左炔诺孕酮片的溶出度; 采用开放、随机、自身对照双周期交叉设计方法, 将 20 名受试者随机等分为 A、B 两组, 参比制剂和受试制剂口服给药, HPLC-MS/MS 测定方法测定受试者给药后血浆中左炔诺孕酮的浓度。结果 左炔诺孕酮在 0~13.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系, 线性方程为: $A = -0.90 + 65.33C$; 回收率为 $(101.7 \pm 1.5)\%$; 自制左炔诺孕酮片与匈牙利 Gedeon Richter Plc 生产的参比制剂溶出曲线的相似因子 $f_2 = 83.0$; 相对生物利用度为 103.5 ± 30.1 。结论 参比制剂与参比制剂溶出行为相似、在健康人体内具有生物等效性。

关键词:左炔诺孕酮片; 溶出度; 生物利用度

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)12-1380-02

Comparative study on the dissolution and bioavailability between self-made levonorgestrel tablets and foreign preparationYu Chunmei¹, Chen Lan¹, Xu Jie¹, Yang Xiuli¹, Zhou Chenglin¹, Chen Zhongxiang^{2△}

(1. Institute of Southwest Pharmaceutical Company Ltd., Chongqing 400038, China;

2. Chongqing Industrial School, Chongqing 400043, China)

Abstract: Objective To compare the dissolution and bioavailability with foreign preparation, and to imitate better quality of levonorgestrel tablets with equal to foreign preparation. **Methods** The dissolution was investigated with paddle method. In an open randomized controlled crossover design, 20 healthy volunteers received reference and tested tablets. The plasma concentration of levonorgestrel was determined by HPLC-MS/MS detection. **Results** The peak areas and concentrations of levonorgestrel presented a good linear relationship within the range of 0~13.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; the linear equation was $A = -0.90 + 65.33C$, the average recovery rate of levonorgestrel was $(101.7 \pm 1.5)\%$, the similarity factor (f_2) of the dissolution curves for our levonorgestrel tablets and the reference preparations (made by Hungary Gedeon Richter Plc) was 83.0, the relative bioavailability of the test to the reference was 103.5 ± 30.1 . **Conclusion** The dissolution curves of the tested tablets (made by our company) and reference preparation (made in Hungary) were similar, and two preparations were bioequivalent in healthy volunteers.

Key words: levonorgestrel tablets; dissolution; bioavailability

左炔诺孕酮片作为速效、短效口服避孕非处方药(OTC 甲类), 其紧急避孕的效果和安全性已经多项临床试验证实^[1-2], 其质量标准载于《中国药典》2010 年版^[3]。左炔诺孕酮为白色或类白色结晶性粉末难溶于水, 《中国药典》未对该品的溶出度进行控制; 为更好地控制产品质量本研究建立了溶出度测定方法^[4-7], 并用建立的溶出度方法进行了自制制剂和参比制剂的溶出曲线对比研究; 采用了 HPLC-MS/MS 测定血药浓度对受试制剂和参比制剂进行了生物等效性研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 年龄 20~40 岁的中国女性健康志愿者 20 人, HBV 阴性, 妊娠试验阴性。

1.2 方法**1.2.1 仪器与试剂**

1.2.1.1 仪器 智能溶出度仪: ZRS-8C (天津大学仪器厂生产); 高效液相色谱仪: HP1200 (安捷伦公司生产); HPLC-MS: Agilent1100 HPLC 仪, 检测器 API3000 三重四级杆质谱仪 (Applied Biosystems, USA), 配有电喷雾离子源; 电子天平: Mettler-AB204 上海精密科学仪器有限公司; HITACHI CD6D 离心机; TGL-16G 台式离心机; YAMATO 涡旋混合器; 多功能微量样品处理仪 (长沙中迅电子工程研究所)。

1.2.1.2 药品与试剂 自制制剂: 左炔诺孕酮片, 规格: 0.75 mg, 批号: 20110301、20110302、20110303, 西南药业股份有限公司生产; 参比制剂: 左炔诺孕酮片, 规格: 0.75 mg, 批号: T94265A, 匈牙利 Gedeon Richter Plc 生产; 受试制剂: 左炔诺孕酮片, 规格: 0.75 mg, 批号: 20110301; 左炔诺孕酮对照品 0028-9907 (中检所); 乙腈 色谱纯 (TEBIA COMPANY, INC), 十二烷基硫酸钠 分析纯 (天津天泰), 蒸馏水 (自制), 其余均为分析纯。

1.2.2 实验方法

1.2.2.1 溶出度方法 取自制制剂, 按溶出度测定法 (《中国药典》2010 版二部附录 X C 第二法), 以含十二烷基硫酸钠 0.1% 的 0.1 mol \cdot mL⁻¹ 盐酸溶液 500 mL 为溶出介质, 转速为每分钟 75 转, 经 30 min 时, 取溶液 10 mL, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 另精密称取左炔诺孕酮对照品, 加乙醇溶液 (750 g \cdot L⁻¹) 适量使溶解后, 用溶出介质稀释并制成每 1 mL 中约含 6 μg 左炔诺孕酮的溶液, 作为对照品溶液。

色谱条件: 用十八烷基硅烷键和硅胶为填充剂 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 甲醇-乙腈-水 (15 : 35 : 50, v/v/v) 为流动相; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.2 mL \cdot min⁻¹; 检测波长为 240 nm。

1.2.2.1.1 线性及线性范围 精密称取左炔诺孕酮对照品

13.2 mg,置 100 mL 量瓶,乙醇(750g·L⁻¹)溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液;分别取贮备液适量用溶出介质稀释成 13.2、6.6、1.65、0.33、0.132、0 μg·mL⁻¹,依法测定。

1.2.2.1.2 回收率 分别精密称取左炔诺孕酮对照品 12、15 及 21 mg 各 3 份,分别置 100 mL 量瓶中,加溶出介质适量,超声使溶解,用溶剂稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 5 mL,置于 500 mL 量瓶中,按处方比例加入辅料,加溶出介质使溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,分别取 20 μL 进样,记录色谱图,计算回收率。

1.2.2.1.3 精密度 按照“1.2.2.1”测定 6 片样品的溶出量。

1.2.2.1.4 溶液的稳定性 取对照品溶液分别在 0、2、4、6 和 8 h 进样,记录色谱图,测定溶出量。

1.2.2.2 溶出曲线的测定 取自制样品三批和参比制剂一批按照“1.2.2.1”方法,分别在 5、15、30、45、60 和 120 min 取样,根据不同时间的溶出度绘制溶出曲线,计算 f₂ 值,计算公式为

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

1.2.2.3 生物等效性研究

1.2.2.3.1 分组方法与服药 将 20 名健康女性 20~40 岁的受试者随机分为 A、B 组。A 组服用西南药业股份有限公司仿制的左炔诺孕酮片(受试制剂 T) 1.5 mg, B 组服用 Gedeon Richter Plc., 匈牙利生产的左炔诺孕酮片(参比制剂 R) 1.5 mg。间隔 1 周后,交叉服药, A 组服用参比制剂 R 1.5 mg, B 组服用受试制剂 T 1.5 mg。

1.2.2.3.2 血浆中左炔诺孕酮的 HPLC-MS/MS 测定方法 色谱柱: Agilent Zorbax C18(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-3 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(70:30, v/v)。柱温 35 °C; 流速 1 mL·min⁻¹。

1.3 统计学处理 口服给药后血浆中左炔诺孕酮的峰浓度 C_{max}, 达峰时间 T_{max} 均由实验数据直接读出; AUC_{0-t} 采用 DAS 软件用梯形面积法计算; 其他药动学参数由药动学软件 DAS 拟合计算。采用 DAS2.1.1 软件和 SPSS16.0 统计评价受试制剂和参比制剂的生物等效性。受试制剂和参比制剂的 C_{max}、AUC_{0-t}、AUC_{0-∞} 经对数转换后进行方差分析、双单侧 t 检验; t_{max} 进行非参数检验(配对 Wilcoxon 法); t_{1/2} 进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 溶出度研究结果

2.1.1 线性及线性范围 左炔诺孕酮在 0~13.2 μg·mL⁻¹ 的浓度范围内, 线性关系良好, 相关系数 r=0.999, 线性方程为 A=-0.90+65.33C。

表 1 回收率试验结果(n=9)

称量值(mg)	测得值(mg)	回收率(%)
12.1	12.3747	102.27
12.0	12.3419	102.85
12.8	13.0794	102.18
15.1	14.9807	99.21
15.9	15.8002	99.37
15.3	15.4888	101.23
21.1	21.5696	102.23
21.6	22.3072	103.27
21.9	22.5858	103.13

2.1.2 回收率 平均回收率为 101.7%, 相对标准偏差(RSD)为 1.5%, 准确度高。回收率试验结果见表 1。

2.1.3 精密度 RSD 为 1.5%, 精密度良好。

2.1.4 溶液的稳定性 溶出溶液在 8 h 内稳定。

2.2 自制制剂和参比制剂的溶出曲线 自制制剂的 f₂ 值在 83.0~84.8 之间, 均大于 50 接近 100, 自制制剂和参比制剂的溶出行为相似。见表 2。

表 2 自制制剂和参比制剂累积溶出量测定结果(%)

时间(min)	0	5	15	30	45	60	120	f ₂
20110301	0	67.6	80.3	86.7	89.1	90.1	91.5	83.0
20110302	0	69.1	82.7	87	88.6	89.9	90.8	84.8
20110303	0	68.0	80.1	86.3	89.6	94.2	93.9	83.5
T94265A	0	70.5	80.4	88.4	89.2	91.8	91.5	-

-: 表示无数据。

2.3 生物等效性实验 血浆中左炔诺孕酮的药代动力学参数见表 3; 单剂量口服受试制参比制剂 R 后平均血药浓度-时间曲线见图 1。受试制剂和参比制剂生物等效。

表 3 受试制剂和参比制剂的药代动力学参数

药代参数	AUC _{0→t} (ng·h·mL ⁻¹)	AUC _{0→∞} (ng·h·mL ⁻¹)	C _{max} (ng·mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	Vz/F
T	(342.82±75.94)	375.90±83.41	20.93±2.89	1.79±0.17	20.84±4.06	103.5±30.1
R	(339.60±80.15)	388.30±107.65	19.74±3.13	1.83±0.16	22.73±4.58	-

-: 表示无数据。

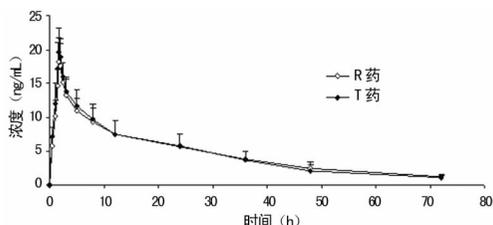


图 1 单剂量口服受试制剂 T 与参比制剂 R 后平均血药浓度-时间曲线

3 讨论

本品为难溶性药物, 根据生物药剂学分析为低溶解性高渗

透性的药物, 溶出过程是药物吸收的限速步骤, 生物利用度受溶出度的影响; 而中国药典未对其溶出度进行控制, 本研究通过筛选建立了溶出度测定方法, 并进行了方法学研究, 用自建的溶出度测定方法对自制制剂和参比制剂进行了溶出曲线对比研究, 溶出行为相似体内生物等效; 因此为保证生物利用度达到要求, 应先进行溶出度的测定, 建议增加溶出度检测项对已上市产品的监控, 充分保证药品的有效性。

由于左炔诺孕酮在体内 72 h 后代谢基本完全, 因此确定其清洗期为 1 周。受试制剂的 AUC_{0→t}、C_{max}、T_{max}、t_{1/2} 与参比制剂接近, 因此受试制剂和参比制剂生物等效。由于本品的规格小 0.75 mg, 临床剂量低, 血药浓度低(下转第 1384 页)

Gli1 蛋白表达有 1 例,其阳性表达率 10.0%(1/10),这说明在正常肝脏组织中 Hedgehog 信号通路有少量的激活,而在肝癌组织中 Hedgehog 信号通路大量激活,与肝癌的发生密切相关。但由于本实验样本量太少,并且只是通过蛋白方法检测,下一步从分子及基因水平探查肝癌 Hedgehog 信号通路发生机制更具有理论意义。

综上所述,Shh、Gli1 蛋白在 SD 大鼠肝细胞癌中呈现高表达,说明 Shh、Gli 蛋白作为 Hedgehog 信号通路两个重要因子的异常激活可能参与肝癌机制的发生,但这只是在蛋白水平的研究,还有待学者从分子及基因水平进一步去研究。

参考文献:

- [1] 车利,任军,袁艳华,等. Sonic hedgehog 信号传导通路基因在肝癌中的表达[J]. 北京大学学报:医学版,2008,40(6):615-623.
- [2] 朱艳志,孔宪炳,颜朗. 间歇给药 DEN 诱发大鼠肝癌模型建立及病理研究[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(12):1843-1846.
- [3] Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas. correlating with cell proliferation; It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis[J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 68-76.
- [4] Ruiz I, Altaba A. Therapeutic inhibition of hedgehog-Gli signaling in cancer: epithelial, stromal, or stem cell targets [J]. Cancer Cell, 2008, 14(4): 281-283.
- [5] Chen G, Goto Y, Sakamoto R, et al. Gli1, a crucial mediator of sonic hedgehog signaling in prostate cancer, functions as a negative modulator for androgen receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(3): 809-815.

- [6] Cheng WT, Xu K, Tian DY, et al. Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 829-836.
- [7] 戎祯祥,方驰华,朱达坚,等. Sonic hedgehog 信号通路 Smo 蛋白及其下游转录因子 Gli1 蛋白在胃癌组织的表达及其意义[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(12): 1728-1731.
- [8] Chen XL, Cheng QY, She MR, et al. Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cyclophosphamide-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation in vitro [J]. Arch Med Res, 2010, 41(5): 315-523.
- [9] Eichenmüller M, Gruner I, Haq B, et al. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth [J]. Hepatology, 2009, 49(2): 482-490.
- [10] Brüggemann LW, Queiroz KC, Zamani K, et al. Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(1): 78-88.
- [11] 张平,喻文人. Shh 和 Ptch 在结肠癌、腺瘤性息肉中的表达及意义[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(5): 600-603.
- [12] Kelleher FC. Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(4): 445-451.
- [13] Song Z, Yue W, Wei B, et al. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17687.

(收稿日期:2012-12-01 修回日期:2013-02-17)

(上接第 1381 页)

且易受内源性物质干扰,因此在样品处理过程要小心。

参考文献:

- [1] Ho PC, Kwan MSW. A prospective randomized comparison of levonorgestrel with the Yuzpe Regimen In post-coital contraception [J]. Human Reprod, 1993, 8(3): 389-392.
- [2] World Health Organization. Levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. a randomized controlled trial [J]. Lancet, 1998, 352(9126): 428-433.
- [3] 中国卫生部药典委员会. 中国药典二部 [M] 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [4] 李先红. 复方左炔诺孕酮片溶出度试验方法的研究 [J]. 襄樊学院学报, 2001, 22(5): 49-52.
- [5] 简淑娟,詹云丽,林暖丹,陈英. 左炔诺孕酮片溶出度测定方法考察 [J]. 中国药师, 2009, 12(9): 1442-1443.
- [6] 李芳,李瑛,刘建平,等. 复方左炔诺孕酮片的体外溶出度

比较 [J]. 药学服务与研究, 2006, 6(6): 417-420.

- [7] 谢沐风. 改善溶出度评价方法提高固体药物制剂水平 [J]. 中国医药工志, 2009, 36(7): 447-451.
- [8] 同丽萍,杨志福,刘渝,等. 左炔诺孕酮片人体生物等效性研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(42): 3978-3980.
- [9] Sambol NC, Harper CC, Kim L, et al. Pharmacokinetics of single-dose levonorgestrel in adolescents [J]. Contraception, 2006, 74(2): 104-109.
- [10] 田媛,梁嘉碧,张尊建,等. 人血浆中左炔诺孕酮的液相色谱质谱联用测定法及生物等效性应用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(6): 432-435.
- [11] 霍慧珍,何作民. 高效液相色谱法测定复方左炔诺孕酮片的含量 [J]. 中国药业, 2009, 18(7): 20-21.
- [12] 徐平声,戴智勇,秦群,等. 左炔诺孕酮片在健康中国女性志愿者体内药动学及生物等效性研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(22): 2143-2144, 2150.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-03-14)