

【药效学评价】

美洛昔康咀嚼片的生物等效性研究

白润¹, 王阳^{1*}, 尚海花^{2*}, 廖茂梁³, 黄日¹, 李甜¹

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市海文普宁科技发展有限公司, 天津 300111

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 研究美洛昔康咀嚼片在比格犬体内的药动学和生物等效性。**方法** 12只健康成年比格犬随机分为2组, 采用双周期交叉实验设计, 分别口服测试片剂和参比片剂2 mg, 用RP-HPLC方法测定血浆中美洛昔康的浓度, 应用3P97软件计算药动学参数, 并进行两种制剂的生物等效性评价。**结果** 测试片剂和参比片剂的 AUC_{0-96h} 分别为 (2.85 ± 0.64) 和 (2.79 ± 0.48) $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$, $T_{\max}$ 分别为 (4.33 ± 0.65) 和 (4.16 ± 0.71) h, $C_{\max}$ 分别为 (0.091 ± 0.017) 和 (0.086 ± 0.021) $\mu\text{g/mL}$, $t_{1/2}$ 分别为 (26.08 ± 3.64) 和 (26.94 ± 4.21) h, 两者的 $\ln AUC$ 和 $\ln C_{\max}$ 经双单侧 t 检验证明差异无统计意义。**结论** 测试片剂与国外上市的参比片剂具有生物等效性, 其平均相对生物利用度为 $(98.0 \pm 9.76)\%$ 。

关键词: 美洛昔康; 生物等效性; 反相高效液相色谱**中图分类号:** R945.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)04-1254-05**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.011

Study on bioequivalence of Meloxicam Chewable Tablets

BAI Run¹, WANG Yang¹, SHANG Hai-hua², LIAO Mao-liang³, HUANG Ri¹, LI Tian¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Haiwenpuning Technology Co., Ltd, Tianjin 300111, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To investigate *in vivo* pharmacokinetics and bioequivalence of Meloxicam Chewable Tablets in healthy Beagle's dogs. **Method** Twelve healthy adult Beagle's dogs were randomized into two groups. Using the double-preparation, double-cycle, cross-over method and administering orally of testing and reference tablet (2 mg) respectively. The plasma concentration of meloxicam was determined by RP-HPLC. The 3P97 software was adopted to calculate the pharmacokinetic parameters and evaluate the bioequivalence of two preparations. **Results** The area under the curves (AUC_{0-96h}) of the testing tablets and innovator tablets were (2.85 ± 0.64) and (2.79 ± 0.48) $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$. The peak time ($T_{\max}$) was (4.33 ± 0.65) and (4.16 ± 0.71) h. The peak concentration ($C_{\max}$) was (0.091 ± 0.017) and (0.086 ± 0.021) $\mu\text{g/mL}$. The half time ($t_{1/2}$) was (26.08 ± 3.64) and (26.94 ± 4.21) h. After the double unilateral t test, there was no statistical significance in the difference of $\ln AUC$ and $\ln C_{\max}$ between the testing tablets and innovator tablets. **Conclusion** The testing tablets and innovator tablets are bioequivalent. The relative bioavailability of generic tablet is $(98.0 \pm 9.76)\%$.

Key words: meloxicam; bioequivalence; RP-HPLC

美洛昔康属于非甾体类抗炎药, 通过抑制前列腺素的合成来发挥抗炎、止痛和解热的作用。在体内外研究中表明, 美洛昔康对环氧合酶-2的抑制作

用比环氧合酶-1要强^[1-2], 所以美洛昔康相比其他非甾体抗炎药具有胃肠道不良反应小和肾脏毒性小等特点, 临床上广泛用于类风湿性关节炎和骨关节炎

收稿日期: 2017-04-17

作者简介: 白润(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析学。E-mail: bairun1218@163.com

*通信作者 王阳, 女, 教授。E-mail: wangy9902@163.com

尚海花, 女, 研究员。E-mail: shanghaihua2006@163.com

的治疗。美洛昔康已经研究的剂型有片剂、颗粒剂、凝胶剂、滴眼剂、栓剂、乳剂和注射剂等,其中片剂包括普通片、口腔崩解片、分散片和肠溶片等^[3]。本实验研究剂型为咀嚼片,具有服用方便、促进药物吸收等优点^[4]。本实验所用美洛昔康咀嚼片参比制剂是由德国勃林格殷格翰动物保健有限公司(Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH)于1998年初开发研制成功并上市销售的,其用途是缓解急性和慢性骨骼肌失调所引起的炎症和疼痛^[5]。本实验建立了 RP-HPLC 法测定比格犬体内的血药浓度,通过双周期交叉实验设计研究自制的美洛昔康咀嚼片和参比片剂之间的比格犬体内药动学特征,判断两种制剂是否生物等效。

1 材料

1.1 实验动物

12只成年比格犬,雌雄各半,体质量12~14 kg,购自北京沙河通力试验动物养殖场,许可证号为SYXK(京)2013-0021。实验犬身体均健康,实验前2周内未服用任何药物。

1.2 实验仪器

FA2004 万分之一电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); BT1250 十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); Mltimate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司); L600 台式低速离心机(长沙湘仪离心机有限公司); TGL-16MC 台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机有限公司)。

1.3 实验药物

肝素钠(北京梦怡美生物科技有限公司,批号20150324); 美洛昔康参比制剂(德国勃林格殷格翰动物保健有限公司,规格1 mg,批号355798); 美洛昔康自制片(规格1 mg,批号20150514); 美洛昔康对照品(中国食品药品检定研究院,批号100679-201102); 吡罗昔康对照品(中国食品药品检定研究院,批号100177-200603)。

2 方法与结果

2.1 样品采集

12只健康成年比格犬,采用双周期交叉实验设计^[6],12只随机分成两组,一组先口服受试制剂,后服参比制剂2 mg;另一组先口服参比制剂,后服受试制剂2 mg。2次服药间隔10 d为清洗期。清晨8点空腹口服给药,服药2 h后统一给水和4 h后统一进食。于给药前取空白血,给药后于1、2、3、4、

5、6、8、12、24、36、48、72、96 h 取样,每次分别采血2 mL于肝素化试管中,4 000 r/min 离心10 min,取出上层血浆,于-20℃保存待测。

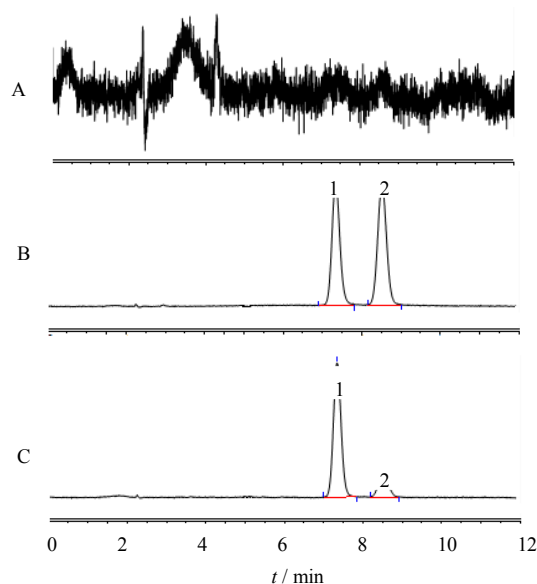
2.2 血样处理

精密移取血浆样品0.2 mL,加入内标吡罗昔康(10 µg/mL)20 µL,再加入1 mol/L 盐酸0.1 mL,涡旋5 min,加入正己烷-二氯甲烷(2:1)1 mL 涡旋15 min,10 000 r/min 离心5 min,取上层有机相,40℃下氮气吹干,加入50%的甲醇100 µL 复溶,涡旋5 min,15 000 r/min 离心5 min,取上清液进行HPLC分析。

2.3 样品分析

2.3.1 HPLC 条件 采用 DiKMA Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 µm) 色谱柱;流动相为甲醇-磷酸二氢钾缓冲液(pH=3)(35:65);体积流量0.8 mL/min;柱温30℃;检测波长362 nm;进样量10 µL。

2.3.2 专属性 精密移取空白血浆样品0.2 mL,不加入内标,按“1.5”项下方法制备样品,测定;精密移取空白血浆样品0.2 mL,共3份,分别加入美洛昔康标准溶液(0.1、2、20 µg/mL)10 µL,按“1.5”项下方法制备样品,测定;取给药后48 h时间点的血浆样品0.2 mL,按“1.5”项下方法制备样品,测定。色谱图见图1,结果表明在上述色谱条件下血



A-空白血浆样品; B-中浓度质控样品; C-给药48 h 血浆样品; 1-吡罗昔康; 2-美洛昔康

A-blank plasma samples; B-quality control samples of middle concentration; C- plasma samples after administration 48 h; 1 - piroxicam; 2 - meloxicam

图1 美洛昔康的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC of meloxicam

中内源性物质不干扰美洛昔康的测定。

2.3.3 标准曲线 精密称取美洛昔康对照品 20.00 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液稀释定容至刻度, 制成 200 µg/mL 的对照品储备液。再精密移取不同体积的对照品储备液稀释制成质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、12、20 µg/mL 的对照品溶液, 分别精密吸取上述对照品溶液 10 µL 加入到 0.2 mL 空白血浆溶液中, 配制成美洛昔康质量浓度分别为 0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、1 µg/mL 的含药血浆, 按“1.5”项下方法制备样品, 测定。以美洛昔康和吡罗昔康的峰面积比值 (Y) 对美洛昔康的血药浓度 (C) 进行线性回归, 得标准曲线 $Y=16.937\ 6\ C+0.014\ 0$, $r=0.999\ 7$ 。美洛昔康的线性范围为 0.005~1 µg/mL。定量下限为 0.005 µg/mL。

2.3.4 准确度与精密度 精密移取空白血浆样品 0.2 mL, 共 15 份, 分为 3 组, 分别加入 0.1、2、20 µg/mL 的美洛昔康对照品溶液 10 µL, 配制成美洛昔康质量浓度分别为 0.005、0.1、1 µg/mL 的含药血

浆, 按“1.5”项下方法制备样品, 作为低、中、高 3 个浓度的质控样品, 测定, 按照相同方法连续制备 3 d, 测定。根据当日的标准曲线计算出每个样品的实测浓度, 用样品的实测浓度除以加入浓度即得准确度。并根据每个浓度每天测定数据的 RSD 平均值和连续 3 d 的定的所有数据 RSD 计算出每个浓度样品的日内精密度和日间精密度。美洛昔康质控样品的准确度和精密度均符合测定要求, 结果见表 1。

2.3.5 提取回收率 精密移取空白血浆样品 0.2 mL, 共 15 份, 分为 3 组, 分别加入 0.1、2、20 µg/mL 的美洛昔康对照品溶液 10 µL, 配制成美洛昔康质量浓度分别为 0.005、0.1、1 µg/mL 的含药血浆, 按“1.5”项下方法制备样品, 作为低、中、高 3 个浓度的质控样品, 测定, 记录美洛昔康峰面积值 A_1 ; 同时精密吸取 0.1、2、20 µg/mL 的美洛昔康对照品溶液 10 µL 注入高效液相色谱仪测定, 记录峰面积值 A_2 。将峰面积值 A_1 除以峰面积值 A_2 即得提取回收率。低、中、高 3 个浓度的平均提取回收率分别为 97.31%、95.91%、92.08%, 结果见表 1。

表 1 精密度、准确度和回收率实验结果 ($n=5$)

Table 1 Results of precision, accuracy and recovery tests ($n=5$)

加入量/ (µg·mL ⁻¹)	日内		日间		回收率/%
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	
0.1	92.59±4.466	4.82	92.59±4.302	4.64	97.31±1.91
2	94.82±3.397	3.54	94.82±4.556	4.80	95.91±2.78
20	96.15±5.155	5.33	96.15±5.388	5.60	92.08±3.47

2.3.6 定量下限 精密移取空白血浆样品 0.2 mL, 共 5 份, 加入 0.1 µg/mL 的美洛昔康对照品溶液 10 µL, 配制成美洛昔康质量浓度为 0.005 µg/mL 的含药血浆, 按“1.5”项下方法制备样品, 测定。根据当日标准曲线求得每个样品的实测浓度, 并计算准确度和精密度。结果其平均准确度为 (92.92±2.79) %, RSD 为 3.00%。表明本方法定量下限可达到 0.005 µg/mL。

2.3.7 稳定性实验 精密移取空白血浆样品 0.2 mL, 共 54 份, 分为 3 组, 分别加入 0.1、2、20 µg/mL 的美洛昔康对照品溶液 10 µL, 配制成美洛昔康质量浓度分别为 0.005、0.1、1 µg/mL 的含药血浆, 按“1.5”项下方法制备样品, 作为低、中、高 3 个质量浓度的质控样品, 分别再将每个质量浓度的 18 份样品分为 3 组, 考察药物在血浆介质中的室温稳定性, 长期冷冻稳定性和反复冻融稳定性。室温稳

定性: 每个浓度样品各取出配制好的 3 份, 立即处理测定。同时, 再取出 3 份于室温放置 4 h 后, 处理测定。冰冻稳定性: 将剩余的质控样品放入 -20 °C 冷存, 于第 20 天和第 32 天取出每个浓度样品各 3 份化冻处理测定。反复冻融稳定性: 取出放入 -20 °C 冷存的每个浓度样品各 6 份, 全部化冻, 每个浓度样品各取 3 份处理测定, 每个浓度样品剩余 3 份再放入 -20 °C 冷冻, 之后再化冻处理测定。结果所有稳定性实验的测定值和理论值间的偏差均小于 15%, 表明血浆样品在室温放置 4 h, -20 °C 冷冻保存 32 天和反复冻融 2 次条件下稳定, 可以保证分析过程中结果的准确性和重复性, 见表 2。

2.4 数据处理

血药浓度时间曲线见图 2。将实验数据通过 3P97 软件分析, 得到 $t_{1/2}$ 和 $AUC_{0-96\ h}$ 等主要药动学参数, 结果见表 3。采用 SPSS 将 C_{max} 和 $AUC_{0-96\ h}$

表 2 稳定性实验结果 ($n=6$)
Table 2 results of stability tests ($n=6$)

浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	处理方法	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.005	室温稳定性	92.08 ± 4.19	4.55
	冰冻稳定性	92.30 ± 2.38	2.58
	冻融稳定性	89.59 ± 2.54	2.83
0.1	室温稳定性	95.60 ± 1.88	1.97
	冰冻稳定性	94.65 ± 5.47	5.77
	冻融稳定性	95.91 ± 6.53	6.81
1	室温稳定性	94.77 ± 1.23	1.30
	冰冻稳定性	91.75 ± 3.87	4.22
	冻融稳定性	94.21 ± 2.51	2.67

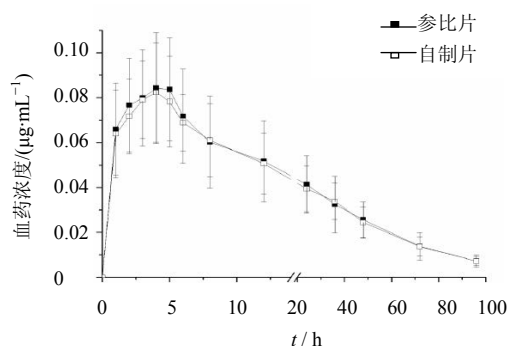


图 2 血浆中美洛昔康的平均浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of meloxicam in serum

表 3 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 3 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n=12$)

参数	单位	仿制片	参比片
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
$T_{\max}$	h	4.33 ± 0.65	4.16 ± 0.71
$t_{1/2}$	h	26.08 ± 3.64	26.94 ± 4.21
$\text{AUC}_{0-96\text{h}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	2.85 ± 0.64	2.79 ± 0.48
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	3.14 ± 0.78	3.07 ± 0.65
MRT	h	40.79 ± 5.45	42.08 ± 4.95

等数据进行多因素方差分析方法。采用双单侧 t 检验法进行等效性判断^[7-8]。相对生物利用度采用公式 $F=\text{AUC} / \text{AUCR}$ 计算。

主要药动学参数 $C_{\max}$ 和 AUC 对数转换后进行统计分析, 方差分析结果表明两制剂间、周期间差异无统计学意义, 个体间差异有统计学意义, $T_{\max}$ 经非参数检验差异无统计学差异, 双单侧 t 检验显示生物等效, $C_{\max}$ 的 90% 置信区间为 (81.7~

97.5) %, $\text{AUC}_{0-96\text{h}}$ 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 置信区间分别为 (93.3~103.6) % 和 (94.6~106.9) %, 自制美洛昔康咀嚼片的平均相对生物利用度为 (98.0±9.76) %。

3 讨论

本实验采用 RP-HPLC 方法测定和分析美洛昔康的血药浓度, 以含有相同母核结构的吡罗昔康作为本试验测定的内标物质^[9], 美洛昔康在 270 nm 和 362 nm 处有最大吸收^[10], 笔者采用 362 nm 检测波长, 样品峰和内标峰位置无杂质干扰, 二者均具有较好的检测灵敏度, 美洛昔康检测限浓度可以达到 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。直接用甲醇和磷酸盐作为流动相, 色谱峰会出现拖尾现象, 而在磷酸盐溶液中加入磷酸使拖尾现象明显改善, 笔者对 pH2.50、pH3.00、pH3.60、pH4.50 进行考察, 结果在调整磷酸二氢钾溶液 pH 至 3 可以保证美洛昔康的拖尾因子达到 1.05, 峰形好, 美洛昔康和吡罗昔康保留时间分别约为 7.3 和 8.5 min。

本试验对正己烷-二氯甲烷、正己烷-乙醚、正己烷-醋酸乙酯、醋酸乙酯-异丙醇及正己烷-二氯甲烷-异丙醇等常用萃取系统进行血样处理考察, 正己烷-二氯甲烷系统杂峰最少且提取率较高。对正己烷-二氯甲烷的体积比 (3:1、2:1、3:2) 进行考察, 以 3:1 配比药物提取率相对偏低, 以 3:2 配比萃取时血浆杂质明显干扰药物测定, 故最后选取正己烷-二氯甲烷 (2:1) 系统作为本试验萃取剂。通过方法学考察证明本方法灵敏度高且操作简单, 可用于体内美洛昔康血药浓度的测定和生物利用度的考察。

统计结果发现个体间的生物利用度有所差异, 但没有影响药物的等效性, 推测是个体间的生理状态有所差异导致。笔者对美洛昔康咀嚼片研制品与相应的国外上市产品进行了比格犬的药动学比较研究^[11], 原生产企业公布的参比制剂药动学研究报告中 $T_{\max}$ 和 $t_{1/2}$ 分别约为 4.5 h 和 24 h, 与本实验的数据相近, 所得实验结果能够在一定程度上支持两制剂的一致性, 在实验期间没有中途退出实验的受试动物, 未见有明显不良反应发生。

参考文献

- [1] Daniel E Furst. Meloxicam: Selective COX-2 Inhibition in Clinical Practice [J]. Sem Arthr Rheum, 1997, 26(6): 21-27.
- [2] Vane J R, Botting R M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. Am J Med, 1998,

- 104(3A): 3S-8S.
- [3] 李健和, 胡 焰, 易利丹, 等. 美洛昔康制剂的研究开发及临床应用进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(2): 163-167.
- [4] 刘 霜. 咀嚼片临床应用的研究进展 [J]. 继续医学教育, 2011, 25(8): 51-53.
- [5] Martin A. Novel Low Concentration Meloxicam Tablets [P]. Mnited States: MS2011275618A1. 2011-10.
- [6] 姚 晨, 陈 峰. 交叉实验设计资料的等效性实验[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(4): 294-297.
- [7] 沈卓之, 杨 珉. 生物等效性研究中的统计学问题[J]. 中国卫生统计, 2015, 32(4): 716-720.
- [8] 韩可勤, 黄圣凯. 生物等效性评价中数据对数变换后的一些统计问题 [J]. 中国临床药理学杂志, 1994, 10(2): 124-128.
- [9] Kimble B, Li K M, Govendir M. Quantitation of meloxicam in the plasma of koalas (Phascolarctos cinereus) by improved high performance liquid chromatography [J]. J Veter Sci, 2013, 14(1): 7-14.
- [10] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 正文: 610.
- [11] EPAR. Find medicine, Veterinary medicines, Metacam: EPAR-Product Information [EB/OL]. (2015-07-15)/[2016-03-15].http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000033/WC500065777.pdf