

# ВЭЖХ определение, фармакокинетика и относительная биодоступность левофлоксацина производства ООО «ОЗОН», Россия

*Кондратенко С.Н., Стародубцев А.К., Сенник Е.А., Дралова О.В., Кудинова С.Н.*

Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней,  
отдел метаболического синдрома НИЦ ГБОУ ВПО

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, г. Москва

## Резюме

Описана простая, специфичная, чувствительная и хорошо воспроизводимая методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектированием. С помощью настоящей методики изучена фармакокинетика и относительная биодоступность отечественного воспроизведённого препарата левофлоксацин у 18 здоровых добровольцев после однократного перорального приёма в дозе 500 мг. Установлено, что тестируемый препарат левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) является биоэквивалентным препарату сравнения Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

**Ключевые слова:** левофлоксацин, ВЭЖХ, плазма крови, фармакокинетика, биодоступность, биоэквивалентность, воспроизведённые препараты, дженерик.

## HPLC determination, pharmacokinetics and relative bioavailability of levofloxacin produced by «OZONE», Russia

Kondratenko S.N., Starodubtcev A.K., Senik E.A., Dralova O.V., Kudinova S.N.

Department of Clinical Pharmacology and Internal Medicine propaedeutic department metabolic syndrome SIC Medical University

First Moscow State Medical University. IM Sechenov, Moscow

## Summary

A simple, specific, sensitive and reproducible good method for quantitative determination of Levofloxacin in plasma using HPLC with UV-spectrophotometric detection. With this technique the pharmacokinetics and relative bioavailability of domestic generic of levofloxacin in 18 healthy volunteers after a single oral dose of 500 mg. Found that the drug being tested, levofloxacin (OOO «Ozone», Russia) is bioequivalent to the reference drugs Tavanic® («Sanofi Winthrop Industry», France).

**Keywords:** levofloxacin, HPLC, blood plasma, pharmacokinetics, bioavailability, bioequivalence, generic drugs, generic

## Введение

Левофлоксацин — синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, содержащий в качестве активного вещества левовращающий изомер офлоксацина, широко применяемый в лечении инфекций лёгкой и средней тяжести у взрослых в виде таблеток под фирменным названием Таваник®.

Левофлоксацин (ООО «ОЗОН», Россия) — новый отечественный препарат-дженерик, содержащий в одной таблетке, покрытой плёночной оболочкой, 500 мг левофлоксацина. Создание воспроизведённых препаратов предполагает обязательное проведение

фармакокинетических исследований, а также оценку их биоэквивалентности оригинальному лекарственному препарату, которая является основным видом медико-биологического контроля качества дженериков [1].

## Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение фармакокинетики, относительной биодоступности и биоэквивалентности препарата левофлоксацин (ООО «ОЗОН», Россия) в сравнении с его утверждённым аналогом в России Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

## Материалы и методы

В фармакокинетическое исследование было включено 18 здоровых добровольцев: 11 мужчин и 7 женщин в возрасте от 18 до 40 лет (средний возраст  $24,6 \pm 1,6$  лет). Чтобы избежать периодических эффектов и исключить межвидовую вариабельность исследование проводили по открытой рандомизированной перекрёстной схеме. Рандомизация проводилась методом генерации случайных чисел с использованием статистической программы SAS v9.0. В процессе рандомизации каждому добровольцу, включённому в исследование, присваивался рандомизационный номер, который определял последовательность приёма исследуемого препарата и препарата сравнения (T/R или R/T) и в ходе исследования не изменялся.

В 8.30 — 9 ч утра добровольцам в локтевую вену вводился индивидуальный гепаринизированный катетер, отбиралась проба крови (исходная). Затем добровольцы принимали таблетку (500 мг) одного из исследуемых препаратов в соответствии с планом рандомизации в присутствии медицинского персонала, запивая 200 мл кипячёной воды комнатной температуры. Взятие проб крови на изучение содержания левофлоксацина осуществлялось в дискретные интервалы времени: через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 и 36 ч после приёма одного из сравниваемых препаратов в объёме примерно 5 мл каждый образец. На протяжении первых 12-ти ч пробы крови отбирались с помощью индивидуального гепаринизированного катетера, установленного в локтевую вену, затем катетер удалялся, и забор крови через 24 и 36 ч после приёма препаратов осуществлялся посредством разовой венопункции. Всего за 2 этапа исследования у 18 добровольцев было получено 576 образцов. Стандартный лёгкий завтрак допускался лишь через 3 ч после приёма препарата. Период вымывания препарата между этапами составил 7 дней.

Концентрацию левофлоксацина в плазме крови добровольцев определяли методом обращённофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектированием. За основу нами была выбрана методика *Flor S.C. с соавт.* [2], которая была модифицирована. Количественное определение левофлоксацина в плазме крови осуществляли следующим образом.

**Реактивы.** Субстанция левофлоксацина (ЗАО «Активный компонент» Россия) серия 40409, хлороформ для хроматографии («Химмед», Россия), ацетонитрил для хроматографии («Химмед», Россия), метанол для жидкостной хроматографии («Labscan», Ирландия), гексансульфоновый натрий, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия («Sigma», США), кислота ортофосфорная («Химмед», Россия), вода бидистиллированная. Стандартные растворы левофлоксацина готовили растворением в метаноле, хранили при 4°C.

**Обработка биопроб.** К 0,5 мл плазмы крови добавляли 250 мкл фосфатного буферного раствора (pH=7) и 5 мл хлороформа, экстрагировали 15 мин при интенсивном встряхивании в завинчивающихся пробирках. Затем водный и органический слой разделяли центрифугированием (10 мин при 4500 об/мин). После чего плазму крови отбрасывали с помощью «ловушки», а органическую фазу количественно переносили в коническую колбу и упаривали досуха под вакуумом с помощью роторного испарителя при температуре 37°C. Сухой остаток растворяли в 250 мкл элюента, перемешивали на Vortex-мешалке 60 секунд. Затем пробу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, аликвоту (25 мкл) наносили на колонку хроматографа.

**Хроматографический анализ.** Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Hewlett-Packard» (США) с УФ-спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны Series 1050 при длине волны 310 нм и аттенюации 4–5. Использовалась обращённофазная хроматографическая колонка  $\mu$ Bondapak™ C18, 10 мкм, 3,9×150 мм («Waters», США).

Элюирование проводили мобильной фазой, состоящей из ацетонитрила, метанола и раствора солевого буфера в объёмном соотношении 12:35:53, доведённой до pH=3 ортофосфорной кислотой. Солевой буфер готовили растворением в 1 л бидистиллированной воды 2,68 г дигидрофосфата натрия и 30,8 мг гексансульфонового натрия.

Полученный элюент перед анализом фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и дегазировали под вакуумом. Разделение проводили при комнатной температуре. Скорость элюирования составляла 1 мл/мин, время удерживания левофлоксацина —  $3,1 \pm 0,2$  мин. Хроматограмма стандартного раствора левофлоксацина представлены на рис. 1, а хроматограммы плазмы крови добровольца — на рис. 2.

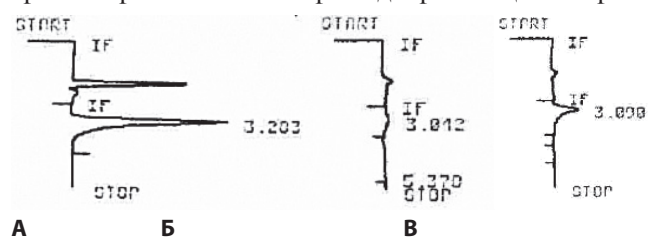


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора левофлоксацина (1 мкг/мл).

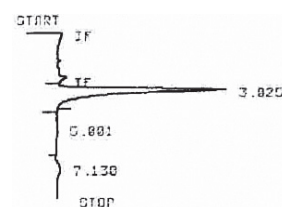


Рис. 2. Хроматограммы проб плазмы крови добровольца (А — до приёма препарата левофлоксацин; Б — через 0,25 ч; В — через 2,5 ч после приёма препарата левофлоксацин).

**Количественное определение** левофлоксацина в плазме крови проводили методом абсолютной калибровки. Калибровку проводили следующим образом. К 0,5 мл плазмы крови, не содержащей препарата, добавляли такие количества стандартного раствора левофлоксацина, чтобы его концентрация соответствовала диапазону концентрации в плазме крови пациентов при обычном режиме дозирования [3, 4] (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 и 13 мкг/мл). Далее поступали в соответствии с описанной методикой.

В указанном диапазоне концентраций калибровочная зависимость была линейной, коэффициент детерминации  $r^2 = 0,995644$ , уравнение регрессии имело вид:

$$y = -0,2135 + 0,0048 \times x$$

где  $y$  — концентрация левофлоксацина в плазме крови (мкг/мл);

$x$  — площадь хроматографического пика левофлоксацина.

**Метрологические характеристики** методики. Относительная погрешность среднего результата (точность методики) составляет 6,0; 14,4; 6,6 и 5,7%, а стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) составляет 0,02; 0,12; 0,16 и 0,31 мкг/мл (или 2,4; 6,0; 2,6 и 2,2%) соответственно для концентрации левофлоксацина 0,8; 2,0; 6,0 и 14,0 мкг/мл плазмы крови. Рассчитанные метрологические характеристики не превышают критических значений. Истинное содержание левофлоксацина в пробах находится в рассчитанных доверительных границах, а разработанная методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови свободна от систематических ошибок.

Проведённое исследование по валидации аналитической методики количественного определения левофлоксацина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с спектрофотометрическим детектированием показало, что эффективность экстракции левофлоксацина из плазмы крови составляет  $77,4 \pm 1,3\%$ , чувствительность метода анализа составляет 0,1 мкг/мл, воспроизводимость, точность и достоверность результатов анализа с учётом критериев приемлемости достигается во всём интервале концентрации (0,1 — 13,0 мкг/мл плазмы). Поэтому представленная методика количественного определения левофлоксацина в плазме крови была использована для проведения клинического фармакокинетического исследования препаратов левофлоксацина.

**Препараты.** Тестируемый препарат — левофлоксацин — таблетки, покрытые плёночной оболочкой, по 500 мг, производства ООО «Озон», Россия. Серия препарата 011210, срок годности до 01.2014 г.

Препарат сравнения — Таваник® — таблетки, покрытые оболочкой, по 500 мг, производства «Санофи Винтроп Индустрия», Франция. Серия препарата 0Н14F, срок годности до 01.2016.

**Фармакокинетические параметры** рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов с помощью программы «M-IND» для персонального компьютера [5]. Рассчитывали следующие внемоделльные параметры: максимальную концентрацию  $C_{max}$ , время её достижения  $T_{max}$ , площадь под фармакокинетической кривой в пределах от момента введения до момента отбора последней пробы крови  $AUC_{0-t}$  и в пределах от момента введения до бесконечности  $AUC_{0-\infty}$ , общий клиренс препарата  $Cl$ , период полуэлиминации  $T_{1/2}$ , среднее время удержания препарата в организме  $MRT$ , объём распределения препарата  $V_z$ . Рассчитывали также отношение максимальной концентрации к площади под фармакокинетической кривой  $C_{max}/AUC_{0-t}$ , разности между значениями  $T_{max}$  для тестируемого препарата и препарата сравнения (как характеристики скорости всасывания), относительную скорость всасывания (как отношение значений  $C_{max}/AUC_{0-t}$  тестируемого препарата и препарата сравнения), относительную биодоступность  $f$ , относительную степень всасывания  $f'$ , отношение максимальных концентраций  $f''$  препарата левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) по сравнению с препаратом Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «InStat» для персонального компьютера.

## Результаты и их обсуждение

Динамика усреднённых значений концентрации левофлоксацина (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего) в плазме крови здоровых добровольцев после однократного перорального приёма препаратов левофлоксацин и Таваник® представлена на рис. 3.

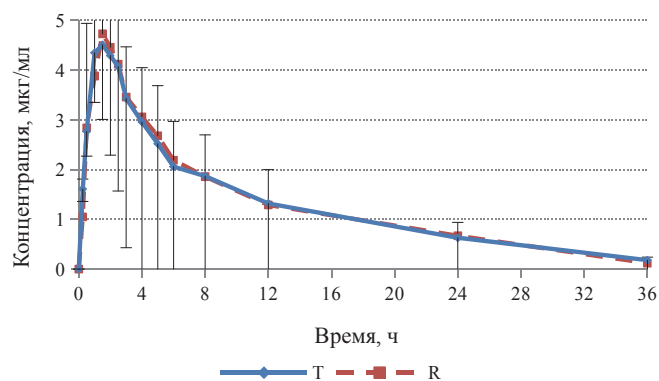


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические кривые препаратов левофлоксацин (Т) и Таваник® (R)

Значения концентрации левофлоксацина в плазме крови добровольцев для каждого момента времени статистически достоверно не различаются для исследуемых препаратов, а профили усреднённых фармакокинетических кривых практически совпадают. После приёма как тестируемого препарата, так и препарата

сравнения левофлоксацин быстро всасывался из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток, через 0,25 часа уже регистрировался в плазме крови добровольцев ( $1,61 \pm 0,29$  и  $1,05 \pm 0,18$  мкг/мл, соответственно), достигая максимального уровня к 1,5 ч ( $4,51 \pm 0,42$  и  $4,73 \pm 0,40$  мкг/мл, соответственно), затем препарат медленно выводился из организма, и через 36 ч после приёма ещё обнаруживался в плазме добровольцев в незначительном количестве ( $0,18 \pm 0,05$  и  $0,12 \pm 0,03$  мкг/мл, соответственно). Наблюдался умеренный разброс индивидуальных значений концентрации (C.V.=26–55%), за исключением стадии всасывания (0,25–0,5 ч), где коэффициент вариации несколько выше (65–77%).

В табл. 1 представлены результаты расчётов фармакокинетических параметров препаратов левофлоксацин и Таваник®. Результаты приведены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры препаратов Левофлоксацин и Таваник®

Параметры	Левофлоксацин	Таваник
$C_{max}$ , мкг/мл	$5,47 \pm 0,36$	$5,44 \pm 0,33$
$T_{max}$ , ч	$1,44 \pm 0,14$	$1,47 \pm 0,15$
$AUC_{0-t}$ , мкг·ч/мл	$46,03 \pm 3,51$	$46,07 \pm 3,87$
$AUC_{0-\infty}$ , мкг·ч/мл	$50,15 \pm 3,58$	$50,47 \pm 3,90$
$Cl_r$ , л/ч	$11,02 \pm 0,97$	$11,10 \pm 0,95$
$T_{1/2}$ , ч	$10,2 \pm 0,8$	$10,2 \pm 0,7$
$MR_r$ , ч	$14,1 \pm 1,0$	$13,8 \pm 0,9$
$V_z$ , л	$165,0 \pm 19,0$	$166,7 \pm 19,4$
$C_{max}/AUC_{0-t}$ , 1/ч	$0,123 \pm 0,007$	$0,124 \pm 0,006$

Как видно из представленных данных, значения всех фармакокинетических параметров изученных препаратов статистически достоверно не различаются, а разброс индивидуальных значений идентичен для двух препаратов. Полученные нами данные аналогичны литературным [3, 4].

Значения  $C_{max}/AUC_{0-t}$  для изученных препаратов статистически достоверно не различаются. Разности между значениями  $T_{max}$  для тестируемого препарата и препарата сравнения близки к 0, среднее значение составляет  $0,03 \pm 0,19$  ч. Приведённые данные свидетельствуют о том, что скорости всасывания препаратов левофлоксацин и Таваник® статистически достоверно не различаются.

#### Литература

1. Методические рекомендации по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». Москва, 2008. 32 с.
2. Flor S.C., Rogge M.C., Chow A.T. Bioequivalence of oral and intravenous ofloxacin after multiple-dose administration to healthy male volunteers. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993. vol. 37, № 7. P. 1468-1472.
3. Janssen-Ortho Inc. Product Monograph Levavin (levofloxacin). Antimicrobial Agent. Control №:105554. 2006. P. 44-46.
4. Падёйская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. Москва, Логата. 1998. 351 с.
5. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-IND оценки системных параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов. // Хим.-фарм. журнал. 1991. №10. С. 16 – 19.

Значения относительной биодоступности (f) препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех добровольцев находятся в диапазоне 85,6–118,6%, имеет место незначительный разброс индивидуальных значений относительной биодоступности (C.V.=10%). Среднее значение относительной биодоступности препарата левофлоксацин составляет  $100,40 \pm 2,32\%$ , среднее геометрическое — 99,95%.

Индивидуальные значения относительной степени всасывания (f') препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех добровольцев варьируют в диапазоне 80,4–130,2%, разброс индивидуальных значений относительной степени всасывания незначительный (C.V.=12%). Среднее значение относительной степени всасывания препарата левофлоксацин составляет  $101,56 \pm 2,95\%$ , среднее геометрическое значение — 100,83%.

Индивидуальные значения отношения максимальных концентраций (f'') препаратов левофлоксацин и Таваник® у всех добровольцев находятся в пределах 80,8–140,9%. Среднее значение отношений максимальных концентраций препаратов левофлоксацин и Таваник® составляет  $101,70 \pm 4,45\%$ , среднее геометрическое значение — 100,17%. Наблюдается незначительный индивидуальный разброс значений отношений максимальных концентраций, коэффициент вариации не превышает 19%.

Индивидуальные значения относительной скорости всасывания препарата левофлоксацин по сравнению с препаратом Таваник® у всех волонтеров находятся в пределах 79,7–136,4%, разброс индивидуальных значений относительной скорости всасывания незначительный (C.V.=16%). Среднее значение относительной скорости всасывания препарата левофлоксацин составляет  $100,45 \pm 3,81\%$ , среднее геометрическое значение — 99,29%.

Доверительные интервалы для  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-t}$  составляют соответственно 0,930–1,060; 0,958–1,062; 0,935–1,096, т.е. не выходят за допустимые границы [1].

Таким образом, не выявлено статистически достоверных различий в процессах всасывания, распределения и элиминации двух препаратов, а также в их относительной биологической доступности. В связи с этим может быть сделан вывод о том, что препараты левофлоксацин (ООО «Озон», Россия) и Таваник® («Санофи Винтроп Индустрия», Франция) биоэквивалентны по фармакокинетическим показателям.