

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01388

普朗尼克 F68 对地西洋在小鼠血浆和脑组织中浓度的影响

焦凯, 马莉, 魏玉辉, 张建强, 武新安*

兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000

[关键词] 普朗尼克 F68; 地西洋; 血浆浓度; 脑组织浓度

[中图分类号] R 969.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)12-1388-03

Effect of Pluronic F68 on plasma and brain diazepam concentrations in mice

JIAO Kai, MA Li, WEI Yu-hui, ZHANG Jian-qiang, WU Xin-an*

Department of Pharmacy, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

[Key words] Pluronic F68; diazepam; plasma concentration; brain concentration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1388-1390]

药用辅料作为药物制剂中不可缺少的组分,通常被认为是惰性物质。非离子型表面活性剂普朗尼克(pluronic)常用来增加难溶性药物在水中的溶解度和改善难溶性药物在体内生物利用度差等问题,但有研究表明,普朗尼克对某些药物的转运与吸收具有一定的影响^[1-3]。因此,研究普朗尼克对药物在体内的吸收与分布的影响具有重要意义。

本实验选用抗癫痫药物地西洋为实验药物,研究非离子型表面活性剂 Pluronic F68 对地西洋在小鼠血浆和脑组织中浓度及分布的影响,为地西洋相关制剂的制备提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 仪器、药品及试剂 日本岛津高效液相色谱系统,包括 LC-Solution 色谱工作站、LC-20AT 二元梯度泵、SIL-20A 自动进样系统、SPD-M20A 二极管阵列检测器、DGU-20A 在线脱气系统以及 CTO-20A 柱温箱。SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚容生化仪器厂),高速离心机(深圳国华仪器厂),XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂),电子天平(梅特勒-托利多国际贸易有限公司)。

地西洋对照品(中国药品生物制品检定所,批号:1230-960,纯度为 99.5%),卡马西平(江苏恒瑞医药股份有限公司),Pluronic® F68(德国 BASF 公司),地西洋(天津金耀氨基酸有限公司,批号:1006113),乙腈(山东禹王实业有限公司禹城化工厂),去离子水(兰州大学第一医院自制,电阻率 17MΩ·cm),甲醇(色谱纯;美国迪马科技有限公司)。

1.2 实验动物 昆明种雄性小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,购于甘肃省中医学院实验动物中心[合格证号:SYXK(甘 2004-0006)]。于兰州大学第一医院药剂科动物实验室饲养,

饲养温度为 18~22℃,自由摄取饮水。

1.3 色谱条件 色谱柱:VP-ODS C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm;日本岛津公司);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(55:45, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:229 nm;柱温:40℃;进样量:20 μl。

1.4 血浆与脑组织样品处理 精密吸取小鼠血浆 0.1 ml,置于 1.5 ml 具塞离心管中,加入 0.2 ml 的内标溶液,涡旋震荡 30 s,12 000×g 离心 5 min 除去蛋白质后取上清液,加入少许 NaCl 盐析,12 000×g 离心,取 20 μl 上清液进样分析。

脑组织用生理盐水漂洗,除去残留的血液,滤纸吸干水分后,1 g 脑组织中加入 2 ml 冷冻生理盐水匀浆,12 000×g 离心 5 min。精密吸取小鼠脑组织匀浆上清液 0.2 ml,加入 0.4 ml 的内标溶液,涡旋震荡 30 s,12 000×g 离心 5 min 除去蛋白质,取上清液,加入少许 NaCl 盐析,12 000×g 离心,吸取乙腈层,用 N₂ 吹干后加入 0.1 ml 内标溶液,12 000×g 离心后取 20 μl 上清液进样分析。

1.5 标准曲线的绘制 血浆:精密称取卡马西平适量,用乙腈溶解并稀释成 6 μg/ml 的内标溶液。精密称取地西洋标准品适量,用内标溶液溶解并定容于 10 ml 容量瓶中,得到 280 μg/ml 的地西洋标准品溶液。精密吸取地西洋标准品溶液适量,加内标溶液配制得到质量浓度为 28、14、7、3.5、1.75、0.87、0.43、0.21 μg/ml 的系列标准品溶液,加入 0.1 ml 空白血浆,按 1.4 项下条件处理后取 20 μl 进样,按 1.3 项色谱条件测定,以地西洋的浓度为横坐标,所测得的地西洋与内标的峰面积比为纵坐标,进行线性回归,得到地西洋在小鼠血浆中的标准曲线方程。

脑组织:精密吸取地西洋标准品溶液适量,加内标溶液

[收稿日期] 2012-08-15 [接受日期] 2012-10-23

[作者简介] 焦凯,主管药师. E-mail: lzjiaokai@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0931-8356511, E-mail: xinanwu6511@163.com

配制得到质量浓度为 5.6、2.8、1.4、0.7、0.35、0.17、0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准品溶液,加入 0.2 ml 空白脑组织上清液,按 1.4 项下条件处理后取 20 μl 进样,按 1.3 项色谱条件测定,以地西洋的浓度为横坐标,所测得的地西洋与内标的峰面积比为纵坐标,进行线性回归,得到地西洋在小鼠脑组织中的标准曲线方程。

1.6 方法专属性 取小鼠空白血浆或空白脑组织上清液,按 1.4 项下血浆样品和脑组织样品处理方法操作,记录色谱图。将含有内标的地西洋溶液加入空白血浆或空白脑组织上清液中,同法操作,记录色谱图。取给予小鼠地西洋灌胃后所采集的血浆样品和脑组织样品,同法操作,记录色谱图。

1.7 精密度考察 血浆:取小鼠空白血浆 0.1 ml,加入配制的高、中、低(14、1.75、0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$)浓度的含有内标的地西洋标准溶液,按 1.4 项下条件处理。于 1 d 内不同时间点进样 5 次,将所测得的峰面积比代入标准曲线方程中,计算出实际浓度,并算得日内精密度;连续 5 d 配制高、中、低浓度地西洋标准溶液各 1 份,经处理后进行测定,算得日间精密度。

脑组织:取小鼠空白脑组织上清液 0.2 ml,加入配制的高、中、低(2.8、0.7、0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$)浓度的含有内标的地西洋标准溶液,按 1.4 项下条件处理。于 1 d 内不同时间点进样 5 次,连续 5 d 进样各 1 次,将所测得的峰面积比代入标准曲线方程中,计算出实际浓度,并算得日内精密度和日间精密度。

1.8 回收率计算 血浆:配制高、中、低(14、1.75、0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 3 个质量浓度的地西洋标准品溶液各 5 份,加入空白血浆 0.1 ml,按 1.4 项下条件处理后进样分析,记录峰面积比,代入标准曲线计算地西洋的实际浓度,并算得回收率。

脑组织:配制高、中、低(2.8、0.7、0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 3 个质量浓度的地西洋标准品溶液各 5 份,加入空白脑组织上清液 0.2 ml,按 1.4 项下条件处理后进样分析,计算地西洋的实际浓度,并算得回收率。

1.9 给药方法及样品采集 将 24 只健康雄性昆明种小鼠随机分成 4 组,实验前禁食 12 h,可自由饮水。4 组小鼠经灌胃分别给予地西洋(10 mg/kg)、地西洋(10 mg/kg) + Pluronic F68(600 mg/kg)、地西洋(10 mg/kg) + Pluronic F68(400 mg/kg) 溶液、地西洋(10 mg/kg) + Pluronic F68(250 mg/kg)。每只小鼠的灌胃容积为 0.1 ml/10 g 体质量。灌胃给予相应药物后的第 40 分钟,摘除小鼠眼球采集全血,断颈处死后采集脑组织。将采集到的血样置于经肝素钠处理过的离心管中,于 $12\ 000 \times g$ 离心 5 min 得到血浆。将脑组织按 1.4 项下条件处理后,取 20 μl 进样测定,记录峰面积,代入标准曲线算得地西洋的血药浓度和在脑组织中浓度。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 Student-*t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HPLC 测定小鼠血浆和脑组织中地西洋的方法学考察

2.1.1 色谱行为和方法专属性 在 1.3 项色谱条件下,检

测小鼠血浆与脑组织样品色谱图,结果显示地西洋的保留时间为 8.37 min,卡马西平的保留时间为 16.68 min。小鼠血浆或脑组织样品中的内源性物质与地西洋、内标卡马西平分离良好,对地西洋检测无干扰,因此本血药浓度测定方法的专属性符合测定要求。

2.1.2 标准曲线 血浆/脑组织:以地西洋的浓度为横坐标(x),地西洋与内标的峰面积比为纵坐标(y),进行线性回归并绘制标准曲线,回归方程分别为 $y = 0.304x - 0.069$, $r = 0.999\ 5$ (血浆); $y = 0.220x + 0.011$, $r = 0.999\ 1$ (脑组织)。结果表明,地西洋血浆样品在 0.21~28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好,脑组织样品在 0.08~5.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度 地西洋血浆样品和脑组织样品的精密度实验结果表明,该方法所测定的地西洋在血浆样品中的高、中、低浓度的日内精密度的 RSD 值均小于 2.89%,脑组织样品日内精密度的 RSD 值小于 4.24%;血浆样品日间精密度 RSD 值小于 4.06%,脑组织样品 RSD 值小于 4.92%。均符合体内样品含量测定方法的要求。

2.1.4 回收率 地西洋血浆样品和脑组织样品方法回收率实验结果表明,地西洋在血浆样品高、中、低 3 个浓度的回收率为 88.19%~109.68%,RSD 值小于 4.31%;脑组织样品为 86.30%~110.64%,RSD 值小于 3.73%。该结果表明此方法符合生物样品测定要求。

2.2 Pluronic F68 对地西洋在小鼠血浆和脑组织中药物浓度的影响 4 组小鼠给药 40 min 后采集的血样和脑组织经处理后进行 HPLC 分析,算得血浆和脑组织中地西洋的浓度,结果表明地西洋在小鼠血浆和脑组织中的浓度随 Pluronic F68 剂量的增大而升高,中、高剂量(400、600 mg/kg) Pluronic F68 组小鼠血浆中的药物浓度和高剂量(600 mg/kg)脑组织中的药物浓度高于单用地西洋组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 Pluronic F68 对地西洋血药浓度和脑组织浓度的影响

$n = 6, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$

组别	血药浓度	脑组织中药物浓度
地西洋	2.988 ± 0.898	0.138 ± 0.058
地西洋 + Pluronic F68		
低剂量(250 mg/kg)	3.650 ± 0.686	0.140 ± 0.066
中剂量(400 mg/kg)	4.797 ± 1.291*	0.188 ± 0.098
高剂量(600 mg/kg)	4.827 ± 1.271*	0.215 ± 0.049*

* $P < 0.05$ 与单用地西洋组比较

3 讨论

本实验结果表明,地西洋在小鼠血浆和脑组织中的浓度随 Pluronic F68 剂量的增大而升高,中剂量和高剂量的 Pluronic F68 增加了小鼠血浆中地西洋的浓度,高剂量的 Pluronic F68 增加了小鼠脑组织中地西洋的浓度。

地西洋在小鼠血浆中药物浓度和脑组织中药物浓度的

升高可能主要源于以下两个方面:(1)对 P-gp 功能的抑制。Batrakova 等^[4]研究发现,在 Pluronic 系列药用辅料中,聚氧丙烯基团数量为 30~60 的辅料都具有抑制 P-gp 的功能。Ma 等^[5]研究表明,Pluronic F68 可改善利福平小肠吸收,并增加其生物利用度。同样,地西洋作为 P-gp 的底物^[6],其在动物体内的吸收和分布也可能受到 P-gp 功能变化的影响。Pluronic F68 对 P-gp 的功能的抑制,可能增加了地西洋在小鼠血浆中的药物浓度和脑组织中的分布。(2)地西洋溶解度的增加。Pluronic F68 作为非离子型表面活性剂,具有一定增溶作用,Pluronic F68 可增加地西洋在水中的溶解度,从而增加地西洋的吸收,导致小鼠血液中药物浓度的增加。

本研究结果表明,一定浓度的 Pluronic F68 可影响地西洋在血浆和脑组织中的分布,因此,当选用 Pluronic F68 相关药物制剂的辅料时,必须评价 Pluronic F68 对药物在血浆与脑组织分布的影响,以确保安全性。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 黄建耿,斯陆勤,左克源,吴祥根,裘军,李高.普朗尼克抑制 P-糖蛋白药泵的作用[J].药学学报,2007,42:989-994.

- [2] Johnson B M, Charman W N, Porter C J. An *in vitro* examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine[J]. AAPS Pharm Sci, 2002, 4: 193-205.
- [3] Föger F, Hoyer H, Kafedjiiski K, Thaurer M, Bernkop-Schnürch A. *In vivo* comparison of various polymeric and low molecular mass inhibitors of intestinal P-glycoprotein[J]. Biomaterials, 2006, 27: 5855-5860.
- [4] Batrakova E V, Li S, Alakhov V Y, Miller D W, Kabanov A V. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304: 845-854.
- [5] Ma L, Wei Y, Zhou Y, Ma X, Wu X. Effects of Pluronic F68 and Labrasol on the intestinal absorption and pharmacokinetics of rifampicin in rats[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34: 1939-1943.
- [6] Yamazaki M, Neway W E, Ohe T, Chen I, Rowe J F, Hochman J H, et al. *In vitro* substrate identification studies for p-glycoprotein-mediated transport: species difference and predictability of *in vivo* results[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296: 723-735.

[本文编辑] 商素芳