

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00459

• 短篇论著 •

溴新斯的明多囊脂质体在大鼠体内的药动学研究

雷婷婷¹, 罗文², 赵华¹, 何丹¹, 张景勍^{1*}

1. 重庆医科大学药物高校工程研究中心, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第二医院药剂科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 研究溴新斯的明多囊脂质体(neostigmine bromide multivesicular liposomes, NB-MVLs)与溴新斯的明(neostigmine bromide, NB)注射剂在大鼠体内的药物代谢动力学。**方法** 12只健康大鼠, 雌雄各半, 随机分为2组, 分别单次皮下注射给予SD大鼠NB-MVLs或NB注射剂(0.15 mg/kg)。采用反相高效液相色谱法测定不同时间点大鼠血浆中NB的浓度, 计算药动学参数并进行生物等效性分析。**结果** NB-MVLs与NB注射剂给药后, 测得药时曲线下面积分别为(35.56±4.62) mg·h·L⁻¹和(15.97±5.22) mg·h·L⁻¹, 峰浓度(C_{max})分别为(2.49±0.31) mg/L和(4.61±0.91) mg/L, 达峰时间(T_{max})分别为(2.40±0.89) h和(0.45±0.11) h, 半衰期分别为(15.14±6.81) h和(1.79±0.27) h, AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}及C_{max}采用DAS 2.1.1软件进行双单侧t检验和[1-2α] 90%可信区间考察, T_{max}采用Wilcoxon非参数检验, 生物等效性分析结果表明NB-MVLs与NB具有生物不等效性。**结论** 将NB制成多囊脂质体后, 生物利用度明显提高, 释放药物平稳缓慢, NB-MVLs与NB具有生物不等效性。

[关键词] 溴新斯的明; 多囊脂质体; 药代动力学; 生物利用度

[中图分类号] R 943.41

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2015)04-0459-04

Pharmacokinetics of neostigmine bromide multivesicular liposomes in rats

LEI Ting-ting¹, LUO Wen², ZHAO Hua¹, HE Dan¹, ZHANG Jing-qing^{1*}

1. Medicine Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To study the pharmacokinetics of neostigmine bromide multivesicular liposomes (NB-MVLs) and conventional neostigmine bromide (NB) injection in rats. **Methods** Twelve healthy rats, half male and half female, were randomly divided into two groups. One group was injected with NB-MVLs and the other with reference NB (0.15 mg/kg). RP-HPLC was used to examine neostigmine concentrations in rat plasma at different time points, and the pharmacokinetic parameters and relative bio-availability were calculated. **Results** Pharmacokinetic parameters of NB-MVLs and NB were as follows: AUC_{0-t} (35.56±4.62) mg·h·L⁻¹ vs (15.97±5.22) mg·h·L⁻¹; T_{max} (2.40±0.89) h vs (0.45±0.11) h; C_{max} (2.49±0.31) mg/L vs (4.61±0.91) mg/L; and t_{1/2} (15.14±6.81) h vs (1.79±0.27) h, respectively. AUC_{0-t}, AUC_{0-∞} and C_{max} were studied by DAS 2.1.1 software for double unilateral t test and [1-2α] 90% confidence interval, and T_{max} was precessed by Wilcoxon nonparametric test to evaluate the bioequivalence of NB-MVLs and NB. The result showed that NB-MVLs and NB were not bioequivalent. **Conclusion** Neostigmine in the form of multivesicular liposomes has improved bioavailability and stable drug release; NB-MVLs and NB are not bioequivalent.

[Key words] neostigmine bromide; multivesicular liposomes; pharmacokinetics; biological availability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(4): 459-462]

溴新斯的明(neostigmine bromide, NB)是一种可逆性的抗胆碱酯酶药, 可抑制乙酰胆碱酯酶

(AChE)的活性而发挥完全拟胆碱作用, 对骨骼肌及胃肠道平滑肌兴奋作用较强^[1], NB还可用于对抗竞

[收稿日期] 2014-09-29 **[接受日期]** 2014-12-09

[作者简介] 雷婷婷, 硕士. E-mail: 352289080@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

争性神经肌肉阻滞药过量时的毒性反应^[2]。临床主要用于治疗重症肌无力、手术后功能性肠胀气及尿潴留等,但 NB 生物利用度低、半衰期短,长期频繁给药导致体内血药浓度波动大,容易发生不良反应。

多囊脂质体(multivesicular liposomes, MVLs)是英国 Skyepharma PLC 公司于 1983 年研制的一种新型脂质体,采用 Depofoam 技术(Depofoam™)主要将亲水性药物包封于多个不连续的囊泡中,药物从其中一个囊泡破裂释放而其他囊泡仍维持完整结构包封药物,从而使药物具有缓释长效的作用,同时能够克服药物生物利用度低、半衰期短等缺点^[3-4],多用于注射给药。我们前期将 NB 制备成溴新斯的明多囊脂质体(neostigmine bromide multivesicular liposomes, NB-MVLs)^[5],使药物具有缓释长效的作用,以延长药物半衰期,减少给药次数,提高药物生物利用度,减少不良反应的发生,提高患者顺应性。目前尚无对 NB-MVLs 药代动力学的相关报道,本研究考察其在大鼠体内的药代动力学特征,为 NB-MVLs 的进一步研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 NB-MVLs(自制^[5],含量为 22.98 mg/L);NB 注射剂(自制,含量为 22.98 mg/L);NB 对照品(武汉远城科技发展有限公司,纯度 $\geq 99.6\%$);溴吡斯的明(武汉远城科技发展有限公司,纯度 $\geq 99.6\%$);乙腈、庚烷磺酸钠为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备 LC-2010A HT 液相色谱仪(日本岛津公司);PHS-3C 型 PH 测定仪(上海精科仪器有限公司);TGL-16B 高速台式离心机(江苏省金坛市大地自动化仪器厂);TDL80-2B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.1.3 动物 12 只健康 SD 大鼠,雌雄各半,体重(220 \pm 20)g,购自重庆医科大学实验动物管理中心[许可证号:SYXK(渝)2012-0001]。

1.2 给药方法 将 12 只健康 SD 大鼠随机平均分成受试组和参比组,2 组均于实验前禁食 12 h,并在给药前取空白血样,受试组大鼠经皮下注射 NB-MVLs 受试制剂,参比组大鼠经皮下注射等量的 NB 参比制剂,给药剂量均为 0.15 mg/kg。

1.3 样品的收集 受试组和参比组于给药后 5 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 从大鼠眼底取血 0.3 mL,将收集的血液样品分别置于事先装有适量肝素的 2 mL 离心管内,(2 390.6 \times g)离心 10 min,离心结束后收集上层血浆备用。

1.4 样品的处理和制备 精密吸取 100 μ L 血浆样品,依次加入苦味酸氢氧化钠溶液(0.1 mol/L, pH 7.0) 50 μ L、水饱和二氯甲烷适量、磷酸二氢钠溶液(0.1 mol/L) 40 μ L、溴吡斯的明溶液(320 mg/L) 10 μ L,混匀,离心 10 min (597.7 \times g),取有机相置离心管中,加入三丁基氯化铵溶液(0.1 mol/L) 100 μ L 混匀后离心 2 min (597.7 \times g),取水相挥干,加 50 μ L 流动相再次溶解,溶解完全后取 20 μ L 于高效液相色谱仪分析。

1.5 RP-HPLC 色谱条件^[6] 溴吡斯的明为内标;色谱柱选用 Lichrospher C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);庚烷磺酸钠缓冲液(磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(77:23)为流动相;柱温为 30 $^{\circ}$ C;进样量为 20 μ L;流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 260 nm。

1.6 数据处理和统计学方法 根据所测得的 NB 血药浓度-时间数据,绘制血药浓度-时间曲线。分别采用药动学软件 DAS 2.1.1 和统计矩法将实验数据进行拟合,计算房室模型和非房室模型时 NB-MVLs 和 NB 的主要药动学参数,根据公式 F(相对生物利用度) = AUC(test)/AUC(reference) \times 100% 计算 NB-MVLs 的生物利用度。达峰时间(peak time, T_{max})和峰浓度(peak concentration, C_{max})采用实测值。

2 结果

2.1 方法学考察 分别精密吸取空白血浆 100 μ L,精密量取 NB 对照品适量,分别配制成 NB 浓度为 0.05、0.1、0.5、1、2、5、8 mg/L 的系列标准溶液。按 1.4 项下条件操作,记录色谱图。以标准溶液浓度 C 为横坐标,以待测药物与内标溶液峰面积的比值 A (A_x/A_s)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 A = 0.033 2C + 0.076 3, r = 0.999 2 (n = 5),结果表明, NB 在血浆中的浓度在 0.05~8 mg/L 范围内峰面积比 A (A_x/A_s)与浓度 C 呈良好的线性关系。

低(0.05 mg/L)、中(2.08 mg/L)、高(7.96

mg/L)3个浓度样品溶液的日内精密度(RSD)分别为3.65%、2.26%、1.19%,日间RSD分别为2.55%、1.69%、1.33%,RSD均小于5%,符合含量测定要求。

低(0.05 mg/L)、中(2 mg/L)、高(8 mg/L)3个浓度的方法回收率分别为(89.73±2.29)%、(96.57±2.47)%、(97.67±0.80)%,提取回收率分别为(88.73±2.49)%、(90.57±1.58)%、(93.67±1.87)%,方法回收率与提取回收率均大于85%,表明该方法精密度高、准确度高,能满足分析要求。

血浆样品在室温下放置2 h、6 h及-20℃下放置3 d、7 d内测定NB含量的RSD均小于5%,表明样品在室温下放置6 h和-20℃放置7 d均稳定。

2.2 大鼠体内药动学结果

2.2.1 平均血药浓度-时间曲线的绘制 SD大鼠单剂量注射NB注射剂和NB-MVLs后,以药物浓度相对时间作图,即得血药浓度-时间曲线,见图1。

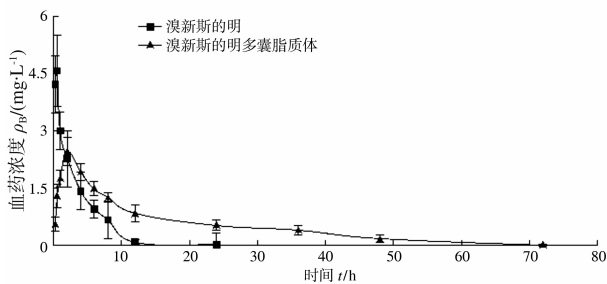


图1 溴新斯的明多囊脂质体及溴新斯的明注射后药时曲线图
 $n=6, \bar{x} \pm s$

由图1看出,SD大鼠分别注射NB和NB-MVLs后,参比制剂NB在大鼠体内无吸收过程,只有分布和消除过程,在药物快速分布达平衡后消除开始,药物经时过程中血药浓度波动大且呈下降趋势,在约12 h后大鼠体内的血药浓度接近于0。受试制剂NB-MVLs在大鼠体内平稳缓慢地释放药物,在约2 h内药物完成分布过程,血药浓度上升至峰值(约2.5 mg/L),在此后NB-MVLs仍在持续缓慢地释放药物,药物浓度波动较小,在12 h左右药物浓度约为0.8 mg/L。

2.2.2 主要药动学参数 首先计算非房室模型参数,药代数据采用统计矩法计算非房室模型,非房室模型主要药动学参数见表1。NB-MVLs非房室模型的 T_{max} 、 C_{max} 与房室模型的 T_{max} 、 C_{max} 一致, MRT_{0-t} 是NB的6.18倍,NB-MVLs和NB的 $AUC_{0-\infty}$ 分别为(40.62±8.96) mg·h/L和(16.01±5.21) mg·h/L,计算得到NB-MVLs的相对生物利用度是NB的253.72%。

根据Akaike's information criterion(AIC)最小原则和 R^2 拟合度结果判断最优房室模型,以AIC最小和 R^2 拟合度越接近1的拟合模型为优。拟合结果显示NB-MVLs与NB均符合二室模型,房室模型主要药动学参数见表1。NB-MVLs和NB经注射给药后,NB-MVLs的 T_{max} 是NB的5.33倍, C_{max} 是NB的一半左右, $t_{1/2}$ 是NB的8.46倍, $AUC_{0-\infty}$ 分别为(41.21±7.82) mg·h·L⁻¹和(18.11±5.72) mg·h·L⁻¹,计算得到NB-MVLs的相对生物利用度是NB的227.55%。表1结果表明,采用房室模型和非房室模型分析药动学主要参数所得结果基本一致。

表1 溴新斯的明多囊脂质体及溴新斯的明的药动学参数

$n=6, \bar{x} \pm s$

药动学参数	非房室模型		房室模型	
	溴新斯的明多囊脂质体	溴新斯的明	溴新斯的明多囊脂质体	溴新斯的明
达峰时间 t/h	2.40±0.89	0.45±0.11	2.40±0.89	0.45±0.11
峰浓度 $\rho_B/(mg \cdot L^{-1})$	2.49±0.31	4.61±0.91	2.49±0.31	4.61±0.91
$t_{1/2} t/h$	—	—	15.14±6.81	1.79±0.27
$MRT_{0-t} t/h$	15.48±1.56	3.56±0.65	—	—
$MRT_{0-\infty} t/h$	22.32±7.50	3.61±0.65	—	—
$AUC_{0-t} (mg \cdot h \cdot L^{-1})$	35.56±4.62	15.97±5.22	35.71±4.34	17.43±5.66
$AUC_{0-\infty} (mg \cdot h \cdot L^{-1})$	40.62±8.96	16.01±5.21	41.21±7.82	18.11±5.72

$t_{1/2}$:半衰期;AUC:药时曲线下面积;MRT:平均保留时间

2.2.3 生物等效性分析 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 C_{max} 采用 DAS 2.1.1 软件拟合经对数转换后进行双单侧 t 检验和 $[1-2\alpha]$ 90% 可信区间考察。结果 NB-MVLs 的 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 经对数转换后 $[1-2\alpha]$ 90% 可信区间不在等效标准 80%~125% 范围内; 的 C_{max} 对数转换后 $[1-2\alpha]$ 90% 可信区间不在等效标准 70%~143% 范围内; T_{max} 采用实测值, 对 T_{max} 进行 Wilcoxon 非参数检验, 结果表明 NB-MVLs 和 NB 有统计学差异 ($P < 0.05$), 但受试周期和受试个体之间的差异无统计学意义。按照生物等效性标准判定, NB-MVLs 与 NB 不具有生物等效性。

3 讨论

MVLs 是新型的脂质体, 它的结构为非同心囊结构, 有较大粒径, 给药途径多为局部注射给药, 而普通脂质体多为血管内给药。NB 为亲水性药物, 但普通脂质体对亲水性药物包封率低, 而 MVLs 内部含有大量的水相能够克服 NB 包封率低的缺点。与普通脂质体相比, MVLs 有更高的包封率、更好的稳定性及更长的缓释时间, 更能提高药物的生物利用度, 具有长效缓释作用^[7-8]。因此将 NB 制成 NB-MVLs 可以克服 NB 包封率低、生物利用度低、半衰期短的缺点。

NB-MVLs 注射给药后在大鼠体内的 T_{max} 约为 2.40 h, 是 NB 的 5.33 倍, C_{max} 约为 2.49 mg/L, 是 NB 的一半左右, $t_{1/2}$ 约 15.14 h, 约是 NB 的 8.46 倍, 说明 NB-MVLs 延长了 T_{max} 、延长了 $t_{1/2}$ 、降低了 C_{max} 。NB 只有分布和消除过程, 在药物快速分布达平衡后消除开始, 药物血药浓度波动大, 药物浓度维持时间短, 而 NB-MVLs 约 2 h 完成分布过程, 达到峰浓度后能够以高浓度长时间维持并缓慢释放药物, NB-MVLs 的包封率高, 在大鼠体内处置慢, 清除率低, 使得 NB-MVLs 具有明显的长效缓释作用, 能够平稳缓慢地释放药物, 从而可以减少给药次数, 有利于提高患者顺应性, 体内血药浓度波动较小可以避免因 C_{max} 过高引起的不良反应。

本研究采用房室模型与非房室模型两种拟合方法计算药动学参数, 结果表明, NB 与 NB-MVLs 采用房室模型和非房室模型计算得到的主要药动学参数基本一致。经生物等效性分析, NB-MVLs 与 NB 不具有生物等效性, NB-MVLs 的生物利用度高于

NB。本研究由房室模型和非房室模型的药动学参数计算 NB-MVLs 的相对生物利用度分别为 227.55% 和 253.72%, 熊华蓉等^[9]研究发现, NB 缓释片在家兔体内的相对生物利用度为 115.4%, 结果表明 NB-MVLs 比 NB 缓释片的相对生物利用度提高得更多。文献报道多囊脂质体可使盐酸纳曲酮和胸腺五肽具有长效缓释作用和提高生物利用度^[10-11]。本实验对 NB-MVLs 的药动学进行了初步研究, 为 NB-MVLs 的体内研究提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] 李 荣. 药理学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 233-236.
- [2] Lorenzutti A M, Martin-Flores M, Baldivieso J M, Himelfarb M A, Litterio N J. Evaluation of neostigmine antagonism at different levels of vecuronium-induced neuromuscular blockade in isoflurane anesthetized dogs[J]. Can Vet J, 2014, 55: 156-160.
- [3] Angst M S, Drover D R. Pharmacology of drugs formulated with Depofoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology[J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45: 1153-1176.
- [4] Davidson E M, Barenholz Y, Cohen R, Haroutiunian S, Kagan L, Ginosar Y. High-dose bupivacaine remotely loaded into multivesicular liposomes demonstrates slow drug release without systemic toxic plasma concentrations after subcutaneous administration in humans[J]. Anesth Analg, 2010, 110: 1018-1023.
- [5] 罗 文, 赵春景, 熊华蓉, 李 艺, 张景劼. 紫外分光光度法测定溴新斯的明多囊脂质体的包封率[J]. 激光杂志, 2013, 34: 52-53.
- [6] 罗 文, 谭群友, 熊华蓉, 赵春景, 张景劼. 溴新斯的明缓释片的药动学和相对生物利用度研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46: 1349-1352.
- [7] 王晓梅, 唐 星, 何海冰. 多囊脂质体的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15: 1243-1246.
- [8] Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery[J]. Prog Lipid Res, 2002, 41: 392-406.
- [9] 熊华蓉, 谭群友, 刘碧林, 罗 文, 张景劼. 溴新斯的明缓释片的药动学及相对生物利用度[J]. 四川大学学报: 医学版, 2011, 42: 657-660.
- [10] Sun L, Wang T, Gao L, Quan D, Feng D. Multivesicular liposomes for sustained release of naltrexone hydrochloride: design, characterization and *in vitro/in vivo* evaluation[J]. Pharm Dev Technol, 2013, 18: 828-833.
- [11] Zuo J, Gong T, Sun X, Huang Y, Peng Q, Zhang Z. Multivesicular liposomes for the sustained release of thymopentin: stability, pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. Pharmazie, 2012, 67: 507-512.