

· 基础研究 ·

两种洛索洛芬钠凝胶对家兔透皮吸收的比较研究

苏媛淇¹, 龙 波^{2△}

(1. 重庆市医药高等专科学校, 重庆 400030; 2. 重庆市肿瘤研究所, 重庆 400030)

摘要:目的 通过比较洛索洛芬钠凝胶受试品与上市品在家兔经皮给药后的血浆药动学与给药部位皮下肌肉的药物分布特征, 对在研的凝胶制剂进行经皮给药后的全身和局部吸收评价。方法 单次给予受试或上市的参比凝胶制剂, 均匀涂于家兔背部及两侧裸露皮肤, 于给药前和给药后 0.00、0.08、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00 h 采用含肝素的真空采血管自耳缘静脉采血, 待末次血样采集结束后, 立即空气栓塞处死家兔, 取出其背部给药部位的皮下骨骼肌, 采用 LC/MS/MS 测定血浆样品中和肌肉样品中洛索洛芬钠浓度。结果 两组动物的药动学参数以及给药后 5 h 家兔背部骨骼肌洛索洛芬钠水平比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 受试制剂和参比制剂经皮给药后在家兔体内具有相似的药动学特性。

关键词: 兔; 皮肤吸收; 药代动力学; 洛索洛芬钠; LC/MS/MS

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1495-04

Comparative study on rabbit transdermal absorption between two kinds of loxoprofen sodium gel

Su Yuanqi¹, Long Bo^{2△}

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China;

2. Chongqing Tumor Research Institute, Chongqing 4000300, China)

Abstract: Objective To compare the characteristics of plasma pharmacokinetics and distribution in subcutaneous muscles at the administration site of test and market loxoprofen sodium gel in rabbit and to evaluate their systemic and local absorption. **Methods** The test and market reference loxoprofen gel were given by single time and evenly applied to the bilateral bare skin of rabbit, blood samples were collected by the vacuum blood collecting tube containing heparin sodium before administration and at 0.00, 0.08, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 h after administration via ear vein. After collecting blood sample last time, rabbit was killed by air embolism and the skeletal muscle samples below the application site in the rabbit back were removed. The LC/MS/MS method was adopted to determine the plasma and muscle concentration of loxoprofen. **Results** There was no statistical difference in systemic and local absorption between test and reference loxoprofen sodium gel in rabbit. **Conclusion** The test and reference loxoprofen sodium gel demonstrates similar pharmacokinetic characteristics by transdermal administration in rabbit.

Key words: rabbit; skin absorption; pharmacokinetics; loxoprofen sodium; LC/MS/MS

洛索洛芬钠是由日本第一三共株式会社开发的苯丙酸类非甾体抗炎药。以洛索洛芬钠作为有效成分的口服片剂(洛索洛芬钠片)于 1986 年在日本被批准上市, 用于风湿性关节炎、变形性关节炎、腰疼、肩周炎、颈、肩、腕等综合病症的消炎镇痛, 同时用于手术后、创伤后、拔牙后的消炎镇痛。洛索洛芬钠片剂在韩国、阿根廷、墨西哥等以亚洲、南美洲为中心的 20 多个国家被应用于炎症、疼痛的治疗^[1-3]。研究显示, 洛索洛芬钠的抗炎镇痛作用是酮洛芬、吲哚美辛及萘普生的 4~6 倍, 且不良反应少, 尤其是对胃肠道的耐受性较好, 应用广泛^[4-5]。洛索洛芬钠凝胶已于 2010 年 6 月在日本上市, 用于治疗局部肌肉疼痛, 其经皮给药制剂在日本之外还没有被开发。目前, 国内市场尚无该产品销售。本次试验选用国外已上市的洛索洛芬钠凝胶作为参比制剂, 以家兔为动物吸收模型, 进行了单次给药平行设计的药物动力学研究, 通过比较受试品与上市品的药物动力学特征, 对在研的凝胶制剂进行经皮给药后的全身和局部吸收评价。

1 材料与方法

1.1 材料 20 只新西兰白兔(雌雄各半), 由重庆市中药研究院实验动物研究所提供, 合格证号为: SCXK(渝)2007-0006, 体质量 1.8~2.2 kg, 在动物房饲养 1 周适应环境。洛索洛芬钠凝胶(重庆医药工业研究院有限责任公司药物制剂部提供, 批

号为 20110607; 规格为 25 g:250 mg), 国外上市洛索洛芬钠凝胶, 商品名为ロキソニン(日本第一三共株式会社, 批号为 NSN0057; 规格为 25 g:250 mg), 洛索洛芬钠对照品(中国药品生物制品检定所, 批号为 100638-200401), 酮洛芬对照品(国药集团化学试剂有限公司, 批号为 100337-200502), 乙腈(中国药品生物制品检定所, 色谱纯, 批号为 20110415), 醋酸铵[重庆川东化工(集团)有限公司, 批号为 20100617], 冰醋酸(美国 TEDIA 公司, 色谱纯, 批号为 501198)。液相色谱系统: 1200 型色谱仪。MS/MS 系统: Agilent 6410A 型三重四极杆串联质谱仪, 配备自动进样器、电喷雾电离离子源(ESI)。数据采集: Agilent MassHunter Workstation Software 数据处理系统。以上均由美国 Agilent 公司提供。

1.2 方法^[6]

1.2.1 色谱质谱条件 分析柱: Kinetex-C18 柱, 2.6 m 粒径, 4.6×100 mm I.D; 预柱: C18 保护柱, 5 m 粒径, 4.6×12.5 mm I.D; 流动相: 乙腈-0.1%醋酸铵水溶液(70:30, v/v); 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 10 L; 柱温: 室温。负离子检测模式; 洛索洛芬钠检测离子对: 245→83; 内标酮洛芬检测离子对: 253→209; 洛索洛芬钠参数: fragmentor 110, collision energy 1; 酮洛芬参数: fragmentor 40, collision energy 5; 雾化气压: 30 psi; 气流速度: 9 L/min; 温度: 200 ℃。

1.2.2 血浆样品的处理 取 200 μL 血浆样品,加入 10 μL 冰醋酸和 600 μL 内标工作液,涡旋混匀,于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL 至测试瓶中,于 LC/MS/MS 系统分析,进样量:10 μL 。

1.2.3 肌肉样品的处理 末次血样采集结束后,立即采用空气栓塞处死家兔,将其背部给药皮肤充分洗净,取出背部给药部位皮下骨骼肌肌肉样品 200 mg,加入 200 μL 生理盐水匀浆,得匀浆液。于匀浆液中加入 10 μL 冰醋酸和 600 μL 内标工作液,涡旋混匀,于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL 至测试瓶中,于 LC/MS/MS 系统分析,进样量:10 μL 。

1.2.4 标准曲线的制备 取空白血浆 180 μL ,分别加入洛索洛芬钠标准系列溶液 20 μL ,配制成相当于洛索洛芬钠浓度分别为 25、50、100、200、400、600、800、1 000 ng/mL 的血浆样品,将各样品按“血浆样品处理”步骤进行操作,记录色谱图。

1.2.5 回收率试验 取家兔空白血浆 180 μL ,按血浆标准曲线的配制方法配制低、中、高 3 个浓度(洛索洛芬钠的血浆浓度分别为 50、200、600 ng/mL)的样品,将各样品按“血浆样品处理”步骤进行操作,每一浓度进行 6 样品分析;另取去离子水 180 μL ,同上方法配制低、中、高 3 个浓度(洛索洛芬钠分别为 50、200、600 ng/mL)的样品,将各样品按“血浆样品处理”步骤进行操作,每一浓度进行 6 样品分析,获得相应峰面积,以每一浓度两种处理方法的峰面积均值比值计算提取回收率,并计算各浓度提取回收率的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.2.6 方法的准确度与精密度考察 取家兔血浆 180 μL ,按血浆标准曲线的配制方法配制低、中、高 3 个浓度(洛索洛芬钠的血浆浓度分别为 50、200、600 ng/mL)的质控(QC)样品,将各样品按“血浆样品处理”步骤进行操作。每一浓度进行 6 样

品分析,3 d 重复操作测定 3 批,根据当天的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度,根据 QC 样品测定结果计算本分析方法的准确度与精密度。

1.2.7 稳定性考察 对洛索洛芬钠加样的家兔血浆样品进行长期冷冻稳定性、冻融稳定性、处理后样品实验台稳定性、样品仪器内稳定性考察。

1.2.8 药动力学考察 将 20 只动物平均分为两组,每组 10 只,雌雄各半。在给药前 1 d 对家兔于背部及两侧采用电动剃刀脱毛洗净后备用。单次给予受试或参比的凝胶制剂 2 g(约含洛索洛芬钠 20 mg),以 7 cm $\times$ 7 cm 的面积均匀涂于家兔背部及两侧裸露皮肤,于给药前和给药后 0.00、0.08、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00 h 采用含肝素的真空采血管自耳缘静脉采血,每次约 1 mL,血样采集完成以后立即离心(3 000 r/min 离心 10 min),取上清血浆样本于一 40 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。末次血样采集结束后,立即采用空气栓塞处死家兔,将其背部给药皮肤充分洗净,取出背部给药部位皮下骨骼肌,一 40 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.3 统计学处理 采用 DAS2.0 软件,以非房室模型法拟合家兔给药后的药动力学参数。采用 SPSS15.0 软件对数据进行统计学分析。

2 结 果

2.1 血浆样品色谱图 空白血浆中的内源性物质不干扰洛索洛芬钠和内标酮洛芬的测定。空白血浆色谱图,见图 1;洛索洛芬钠和内标酮洛芬色谱图,见图 2、3。洛索洛芬钠和内标酮洛芬的平均保留时间均为 5.09 min。背部涂抹给药后 3 h 血浆中洛索洛芬钠色谱图和给药后血浆样品处理时所加内标酮洛芬色谱图,见图 4、5。

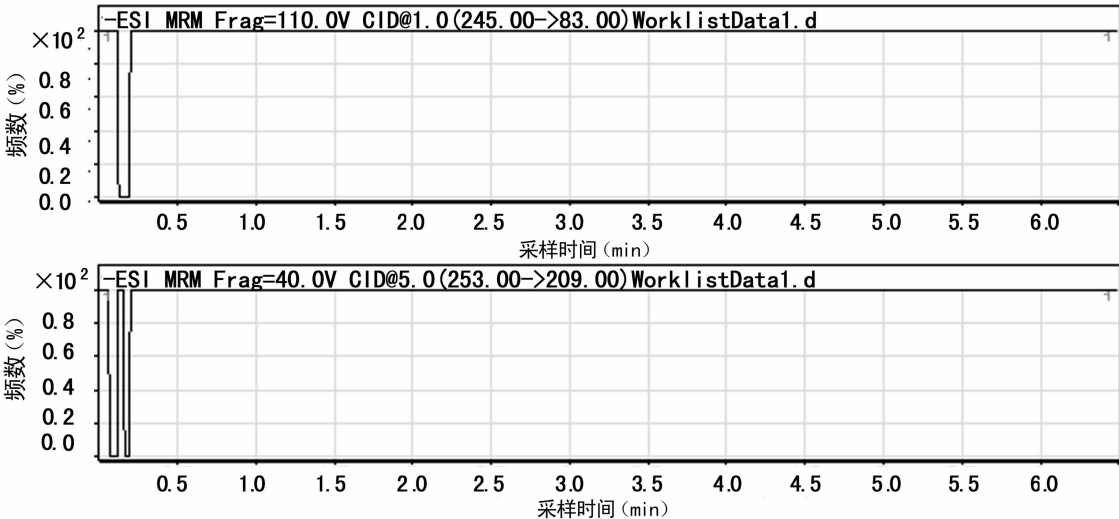


图 1 空白血浆色谱图

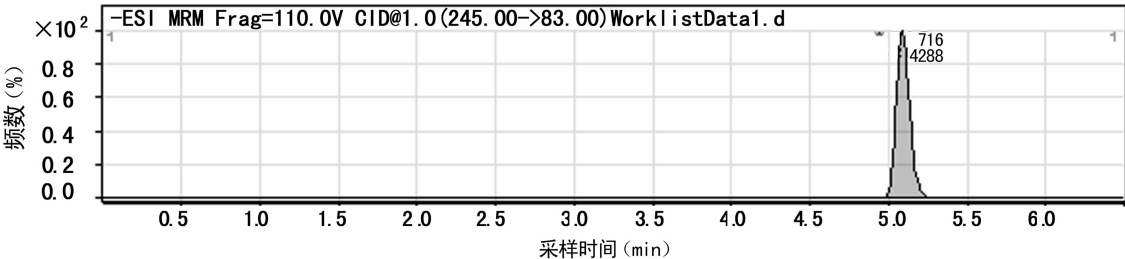


图 2 洛索洛芬钠加样血浆色谱图

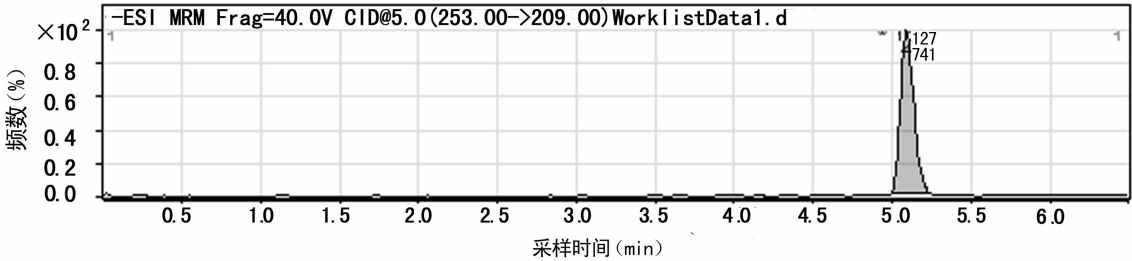


图 3 内标酮洛芬加样血浆色谱图

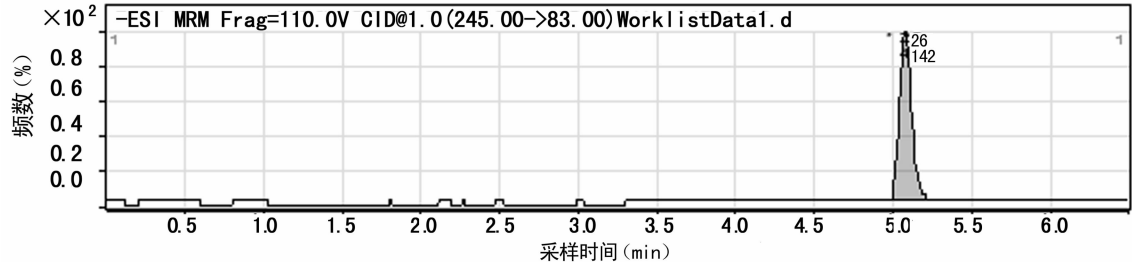


图 4 背部涂抹给药后 3 h 血浆中洛索洛芬钠色谱图

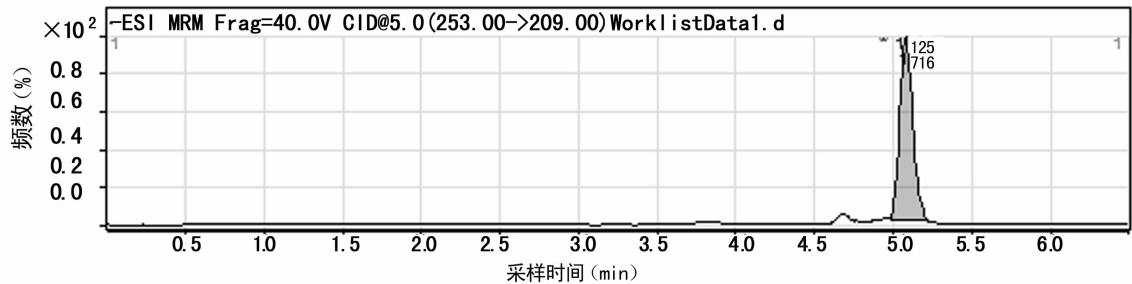


图 5 给药后血浆样品处理时所加内标酮洛芬色谱图

2.2 标准曲线 以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,进行 1/x 的权重分析,求得的直线回归方程为 $Y=0.252\ 8X-0.032\ 9$, $r=0.999$,根据标准曲线,洛索洛芬钠的线性范围为 25~1 000 ng/mL。

2.3 回收率 洛索洛芬钠和内标在血浆中不同浓度的平均沉淀回收率分别为 65.97%和 77.80%,RSD 分别为 6.06%和 7.30%,结果表明洛索洛芬钠及内标在各浓度血浆样本中的沉淀回收率稳定性良好。

2.4 准确度与精密度 准确度与精密度结果,见表 1。

表 1 家兔血浆中洛索洛芬钠浓度测定精密度和准确度 (n=6)				
洛索洛芬钠 (ng/mL)	日间		日内	
	实测值(ng/mL)	RSD(%)	实测值(ng/mL)	RSD(%)
50	50.07	4.34	51.14	2.31
200	193.77	4.72	191.56	5.80
600	588.73	5.91	594.33	0.78

2.5 稳定性 对洛索洛芬钠加样的家兔血浆样品进行了长期冷冻稳定性、冻融稳定性、处理后样品实验台稳定性、样品仪器内稳定性考察。结果表明在实验过程中各种样品稳定性良好。

2.6 药动学结果 采用 LC/MS/MS 法测定血浆样品中洛索洛芬钠浓度和肌肉样品中洛索洛芬钠浓度。受试制剂和参比制剂给药后的平均血药浓度时间曲线,见图 6。两给药组动物的药动学参数:血浆药物浓度-时间曲线下面积[AUC_(0-t)],平均驻留时间[MRT_(0-t)],半衰期(t_{1/2}),药峰时间(T_{max}),药峰浓

度(C_{max})以及给药后 5 h 家兔背部骨骼肌洛索洛芬钠浓度的差异均无统计学意义(P>0.05)。认为受试制剂和参比制剂经皮给药后在家兔体内具有相似的药动学特性。家兔单次经皮给予洛索洛芬钠凝胶受试制剂和参比制剂后的平均药动学参数及肌肉的药物浓度,见表 2。

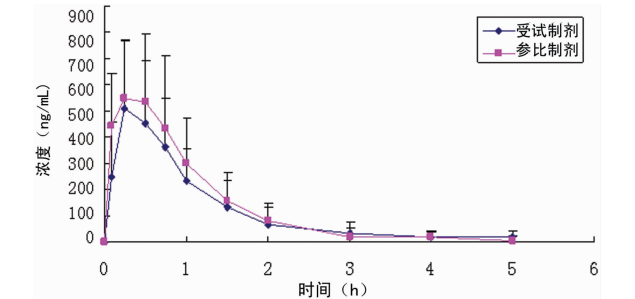


图 6 受试制剂和参比制剂家兔经皮给药后平均血药浓度时间曲线图

表 2 家兔平均药动学参数及肌肉的药物浓度 (n=10)		
参数	受试制剂组	参比制剂组
AUC _(0-t) (ng/mL · h)	619.67±311.14	699.79±313.54
MRT _(0-t) (h)	1.07±0.36	0.88±0.32
t _{1/2z} (h)	0.83±0.47	0.94±0.53
T _{max} (h)	0.46±0.21	0.43±0.17
C _{max} (ng/mL)	578.70±238.59	663.69±230.67
5 h 肌肉浓度(ng/mg)	0.18±0.07	0.21±0.09

3 讨 论

本研究采用 LC/MS/MS 法测定家兔血浆样品中洛索洛芬钠浓度及其在肌肉样品中的浓度,采用电喷雾离子源(ESI),以质谱多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)扫描方式进行定量分析,血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定。在文献[7-9]的基础上,采用乙腈对血浆样品进行蛋白沉淀处理,并同时采用了冰醋酸对样品溶液进行酸化,提高了目标化合物和内标的溶解度,简化了样品前处理过程,方法学考察结果表明实验中的体内药物分析方法具有快速、准确、灵敏度高的特点。

目前,国外上市的洛索洛芬钠经皮给药系统包括巴布剂和凝胶制剂^[10-11]。有文献报道采用¹⁴C 标记的方法并应用大鼠模型对洛索洛芬钠巴布剂进行了药动力学考察,未见对洛索洛芬钠凝胶制剂的相关在体动物的药动力学研究^[12]。在易得的实验条件下,本文成功地采用家兔模型首次对洛索洛芬钠凝胶制剂进行了初步的经皮系统吸收和局部肌肉蓄积研究,获得了完整的血浆药时曲线。通过对两种来源制剂的系统和局部暴露进行的差异性比较,证明了在研的洛索洛芬钠凝胶与相应上市产品在动物模型上表现出一致的内在质量,从药物安全性和有效性两方面为在研制剂的进一步临床研究提供了有益参考。

参考文献:

[1] 周淑琴. 新型非甾体抗炎药洛索洛芬钠的研究进展[J]. 上海医药, 2008, 29(10): 468-469.
[2] 冀满丰. HPLC 法测定洛索洛芬钠缓释片中主药的含量[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(12): 8-9.

(上接第 1494 页)
级不典型增生部分可逆转至Ⅰ级不典型增生,Ⅲ级不典型增生部分可逆转至Ⅱ级不典型增生,与对照组比较差异有统计学意义,病变组织细胞凋亡增加,增殖减弱,免疫组化及流式细胞检测结果均显示 p53 基因及 bcl-2 基因表达蛋白的相应变化,提示 ATRA 逆转治疗食管癌前病变可能是通过凋亡基因的调控而实现,其对于鳞状上皮癌前病变的治疗作用较为明确。

总之,ATRA 不仅对肿瘤细胞有明显的抑制作用,而且对鳞状上皮癌前病变也有一定的逆转作用,局部应用 ATRA 也是一种较理想的给药途径,有望成为鳞状上皮癌前病变局部治疗的新型有效药物。

参考文献:

[1] Parisotto M, Brodeur H, Bhat PV, et al. Retinoid metabolism and Cancer[J]. Med Sci(Paris), 2006, 22(12): 1101-1106.
[2] 许培权, 龚建平. 全反式维甲酸对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响[J]. 癌症, 2004, 23(2): 118-123.
[3] 赵纯全, 沈太敏. 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖, 侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(12): 1666-1669.
[4] 刘子文, 刘长征, 刘卫, 等. 全反式维甲酸抑制肝癌细胞增殖的作用机制研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2012, 18(5): 386-388.
[5] 高金波, 田元, 张景辉, 等. 全反式维甲酸对人胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(3): 301-303, 319.

[3] 杨甜, 王成永. HPLC 法测定洛索洛芬钠渗透泵型控释片的含量[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 293-294.
[4] 陈尧, 谭志荣, 周淦, 等. 洛索洛芬钠分散片在健康人体的相对生物利用度研究[J]. 中南药学, 2011, 9(10): 742-744.
[5] 王慧, 赵亮, 张国庆, 等. 洛索洛芬钠胶囊在健康人体内的药动力学和相对生物利用度研究[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(3): 194-197.
[6] 张爱琴. 洛索洛芬钠速释双层片药动力学及其体内外相关性研究[J]. 海峡医学, 2011, 23(7): 42-44.
[7] 李昊, 孙建国, 王广基, 等. HPLC-MS 法快速测定人血浆中洛索洛芬钠的浓度及其药代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 211-214.
[8] 余玲. 洛索洛芬钠片在健康志愿者体内的生物等效性[J]. 内蒙古中医药, 2008, 17(9): 12-14.
[9] 邓滢, 郭利民, 钟世华, 等. 紫外分光光度法测定洛索洛芬钠片的含量[J]. 中国当代医药, 2010, 17(14): 40-42.
[10] 罗静, 张涛, 黄华, 等. 洛索洛芬钠巴布剂的制备及质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(2): 107-111.
[11] 秦荣新, 韦曦. 洛索洛芬钠凝胶剂的制备与质量控制[J]. 山西医药杂志: 下半月, 2008, 37(11): 1038-1039.
[12] 王秀萍, 陈斌. 洛索洛芬钠缓释片体外释放特性研究[J]. 医药导报, 2007, 26(5): 490-492.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-22)

[6] 王安训, 曾融生, 丁学强, 等. 全反式维甲酸对舌癌细胞株抗增殖作用的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2000, 16(5): 372-374.
[7] 路太英, 樊青霞, 王留兴, 等. 全反式维甲酸诱导食管癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(11): 822-825.
[8] 师广勇. 全反式维甲酸对胃癌 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(5): 22-23.
[9] Yu KH, Weng LJ, Fu S, et al. Augmentation of phenylbutyrate-induced differentiation of myeloid leukemia cells using all-trans retinoic acid[J]. Leukemia, 1999, 13(8): 1258-1265.
[10] 崔建华, 李华, 范钰, 等. ATRA 对胃癌细胞株 MKN-45 的诱导分化及其相关酶活性的影响[J]. 复旦学报: 医学版, 2002, 29(5): 347-351.
[11] 杨成梁, 樊青霞, 路太英, 等. 全反式维甲酸对食管癌细胞系 EC109 作用的研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2007, 93(3): 190-192.
[12] 孙正, 沈胜利, 刘晓勇, 等. 维胺酸治疗口腔白斑的临床和实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(3): 185-187.
[13] 崔儒涛, 蔡淦. 全反式维甲酸对大鼠胃黏膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因(Bcl-2, Fas, ICE)蛋白表达的影响[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(2): 82-84.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-21)