

# 盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂的制备及其在动物体内的药代动力学和药效学

仝新勇\*, 李立民

(上海恒瑞医药有限公司, 上海 200245)

**摘要** 采用磷脂为基质的新型原位凝胶作为盐酸左布比卡因缓释注射剂的载体。通过筛选磷脂类型、磷脂/乙醇比例、水分比例确定稳定载药的处方。制备的处方进行了初步表征,符合原位凝胶的特点。进行了比格犬药代动力学考察,上述处方的  $t_{\max}$  滞后,  $t_{1/2}$  延长,缓释特征明显。在豚鼠中进行了药效学评价,上述处方局部麻醉效果显著,相对于市售注射液,可维持长达 48~72 h 的局麻效果。该新型原位凝胶具备良好的开发潜力。

**关键词** 盐酸左布比卡因;原位凝胶;缓释注射剂;局部麻醉

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0209-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150212

## Preparation of levobupivacaine hydrochloride sustained-release *in-situ* gel injection and its pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in animals

TONG Xinyong\*, LI Limin

Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200245, China

**Abstract** The purpose of this study was to develop a novel phospholipid-based *in-situ* gel sustained-release formulation of levobupivacaine hydrochloride injection. Appropriate formulation was screened based on the factors such as phospholipid type, ratio of phospholipid to ethanol, ratio of water to phospholipid-ethanol mixture, which indicated typical *in-situ* gel profiles. Pharmacokinetic study using beagles showed that there were delayed  $t_{\max}$  and prolonged  $t_{1/2}$  in levobupivacaine plasma-time profile after administration of the phospholipid-based *in-situ* gel formulation if compared to commercially available conventional levobupivacaine hydrochloride injection. Pharmacodynamic studies conducted on guinea-pig demonstrated that it maintained 48-72 hr regional anesthesia, much longer than that of the anesthesia in the group receiving conventional injection. Hence, this novel *in-situ* gel intended for injection is worthy of development.

**Key words** levobupivacaine hydrochloride; *in-situ* gel; sustained-release injection; regional anesthesia

局部麻醉药是一类能在用药局部可逆性地阻断感觉神经冲动发生与传导的药物。布比卡因是临床上常用的酰胺类局麻药,具有麻醉效能强、作用时间长、感觉及运动阻滞分离明显等特点,被广泛应用于术后麻醉镇痛、臂丛神经阻滞、硬膜外麻醉及腰麻和一些长期剧烈、癌症疼痛的治疗<sup>[1]</sup>。研究表明酰胺类局麻药的药代动力学和毒性存在镜像体选择性,布比卡因是左旋体和右旋体等量混合的消旋体型,美国 FDA 于 1972 年批准布比卡因用于麻醉镇痛,其旋光异构体左布比卡因于 1999

年被批准上市,具有心脏和神经系统毒性小的优势<sup>[2]</sup>。

尽管盐酸左布比卡因属于长效局麻药,但由于半衰期仍然较短,麻醉作用持续不长,镇痛时间仅可维持 5 h 左右。因此,盐酸左布比卡因的长效制剂是其剂型开发的热点。近年来,有关文献报道的有微丸、脂质体<sup>[3]</sup>、微球<sup>[4]</sup>等剂型研究。目前布比卡因药物发展较成熟的新剂型主要包括多囊脂质体和可注射原位凝胶两种剂型,前者已于 2011 年 10 月被 FDA 批准上市(商品名:Exparel™)<sup>[5]</sup>,后者在开

展Ⅲ期临床试验(POSIDUR™, SABER-bupivacaine)。虽然上述两种都是消旋体布比卡因药物,但对左旋体的开发具有良好的启示作用。

原位凝胶(*in-situ gel*)系指仅在到达给药部位后才凝胶化并发挥药物储库作用的一类缓释给药系统。其共性为:①注射前为相对低黏度的液体;②注射后其物理性质(主要是黏度)发生转变,成为药物储库。该系统的优势是容易注射,特别适于局部植入并释药<sup>[6]</sup>。国外开发中的盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂(POSIDUR™)采用的是蔗糖醋酸异丁酸酯和 *N*-甲基吡咯烷酮,注射前为普通溶液状态。在缝合伤口前的手术部位注入后,与局部体液接触黏度增大形成凝胶,于局部组织缓慢释放,力图达到 48~72 h 的局麻效果<sup>[7]</sup>。涉及的适应证有腹腔镜胆囊切除术、腹股沟疝、肩部手术、关节镜手术等的局麻镇痛。通过布比卡因凝胶的长效作用,有效减少了阿片类药物的补充给药。

由于 POSIDUR™采用的处方组分在国内没有获批的药用辅料,也未有产品批准使用的案例。本研究借鉴原位凝胶的形成机制,以安全度较高的磷脂、注射用水和乙醇为组分,进行了相关原位凝胶制剂以及其药代动力学、药效学的考察研究,为盐酸左布比卡因的缓释注射剂开发奠定基础。

1 材 料

1.1 药品和试剂

盐酸左布比卡因(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 27110810);氢化大豆磷脂(LIPOID, SPC-3, 批号 256268-1)、大豆磷脂(LIPOID, S100, 批号 579010-112006-10)、蛋黄卵磷脂(LIPOID, E80, 批号 1032881)、无水乙醇(南京化学试剂有限公司,批号 12052523202);注射用水(自制,上海恒瑞医药有限公司)、盐酸左布比卡因市售注射液(速卡®,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 12050536);生理盐水(上海长征富民金山制药有限公司,批号 12050601)。

1.2 仪 器

DF101 型集热式磁力搅拌器(河南巩义科瑞仪器有限公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪。

2 方法和结果

2.1 制剂处方的摸索

2.1.1 磷脂类型的考察 磷脂是本制剂处方中的

关键组分,承担了形成凝胶基质的作用。常用的注射用磷脂有氢化大豆磷脂、大豆磷脂以及蛋黄卵磷脂,因此主要以这 3 类磷脂作为比较和选择。依据其分别能形成原位凝胶注射前均相溶液所需的最低乙醇浓度以及外观稳定程度来初步筛选,见表 1。

Table 1 <i>In-situ gel</i> containing different type of phospholipids		
Type of phospholipid	Minimal content of ethanol ( <i>w/w</i> , %)	Appearance (ambient temp., 1 month)
Hydrogenated soy-bean phospholipids	94. 7	Transparent solution, no significant change
Soybean phospholipids	16. 7	Yellowish solution, no colour deepening
Egg yolk lecithin	14. 3	Yellowish solution, colour deepened to black brown

实验结果表明,氢化大豆磷脂由于氢键饱和度而相变温度高,因此达到均相溶液的乙醇浓度很高,刺激性可能会较大;蛋黄卵磷脂与乙醇配伍下容易发生颜色变化,提示辅料间相容性不够充分。上述两种磷脂都不适合作为原位凝胶的基质,因此优选大豆磷脂做为处方组分。

2.1.2 磷脂与乙醇比例的考察 大豆磷脂在常温下为固态,不能溶于水性介质,仅能分散其中形成类脂质体混悬液。但注射用溶剂无水乙醇可以溶解一定浓度的大豆磷脂形成均相溶液。因此,对不同比例的大豆磷脂和无水乙醇进行考察,并对其载药能力、遇水模拟凝胶形成的黏度变化、大豆磷用量和乙醇用量等因素进行综合考察。结果见表 2。

Table 2 Comparison on different ratio of phospholipid-ethanol		
Phospholipid-ethanol ( <i>w/w</i> )	Max. drug loaded/(mg/mL)	Increased viscosity (add equivalent weight water)/mPa·s
1:1	40	14 690
2:1	38	17 970
3:1	37	20 150
4:1	35	21 810
5:1	33	25 060

实验结果表明,不同比例的大豆磷脂和无水乙醇作为混合载体,其最大载药浓度之间差距不大,且都有遇水凝胶化的趋势。考虑到大豆磷脂的成本和乙醇的注射刺激性,综合比较后,选择大豆磷脂与无水乙醇质量比例为 2:1 (*w/w*, 下同)进一步研究。

2.1.3 水分比例和载药浓度的考察 进一步研究发现,处方中引入水分后可增加盐酸左布比卡因的溶解能力。水是磷脂乙醇均相溶液形成凝胶变化的关键因素。在与水接触的初期,由于水量较少,制剂仍然为均相状态,之后随着水量渗透增多逐渐凝胶化。因此考虑处方中引入少量的水,在保证制剂注射前的均相溶液状态下,一方面可以提高处方的载药浓度,另一方面也可以降低制剂的黏度,间接上还缩短了制剂在体内的凝胶化时间。对不同比例注射用水和磷脂乙醇混合物进行考察,同时确定长期状态时饱和平衡的载药浓度,见表 3。

Table 3 Comparison on different ratio of water: phospholipid-ethanol (phospholipid-ethanol = 2: 1)

Ratio of water phospholipid-ethanol (w/w)	Appearance (ambient temp., 1 month)	Max. drug loaded/ (mg/mL)	Viscosity (37 °C)/ mPa·s
0.05: 1	Uniform solution	32	50.3
0.10: 1	Uniform solution	45	36.5
0.15: 1	Uniform solution	50	28.8
0.20: 1	Delamination	NA	NA

NA: Not available

结果表明,随着水分的增加,载药浓度有所提高,黏度逐步降低。但水分的进一步增加会导致凝胶态出现并分层,打破制剂溶液的平衡状态。只有水分比例在 0.15: 1 (w/w) 以下,可确保注射前的均相溶液状态,因此确定注射用水与磷脂乙醇混合物的比例为 0.15: 1 (w/w)。

2.1.4 原位凝胶的制备与表征 将上述确定优化比例的处方量大豆磷脂、无水乙醇以及注射用水混合,在 50 °C 保温下搅拌至溶解均匀,加入处方量的盐酸左布比卡因,继续保温搅拌至完全溶解。凉至室温,0.22 μm PVDF 滤膜过滤后分装、封盖保存。

原位凝胶的表征研究主要针对黏度的变化以及体外模拟释放两方面进行。通过摸索,建立了以小杯小浆法为手段的体外释放模型。操作如下:将原位凝胶封装在一定截留相对分子质量的透析小管中,固定漂浮在小杯的释放介质里。开动转桨驱使释放介质动态进出透析小管,制剂逐步接触释放介质,黏度发生变化形成凝胶,但仍然相对固定在透析小管内(与注射后相对固定在局部组织部位类似),同时缓慢释放主药。分别以纯化水、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、pH 7.4 磷酸盐缓冲液 3 种与皮下组织 pH 相近的介质,考察最长 72 h 的体外释

放。测定透析小管内的样品的黏度变化。结果见表 4。同时通过定时取样释放介质,以紫外吸收度分析浓度并计算累积释放速率见图 1。

Table 4 Viscosity change in different release medium (mPa·s)

Release medium	0	2	6	24	48	72 h
Purified water	28.8	510	15 340	17 870	17 920	14 600
PBS 6.8	28.8	625	14 730	18 110	19 260	18 470
PBS 7.4	28.8	490	14 500	17 210	20 430	16 650

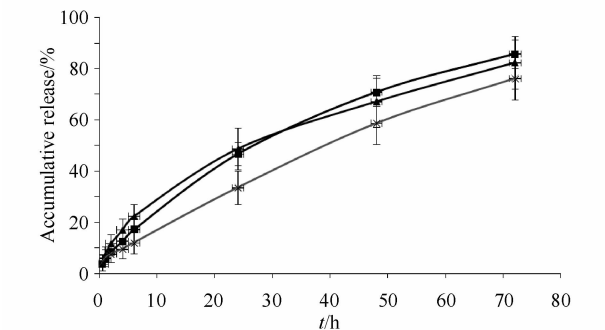


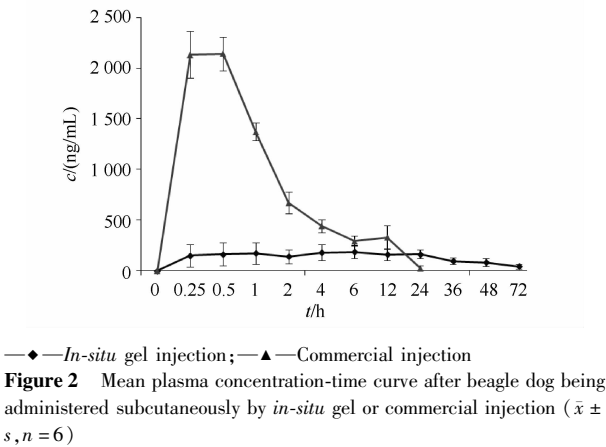
Figure 1 Accumulative release curves in different release medium ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

体外表征显示,在 3 种与皮下组织 pH 相近的介质中,所制备的原位凝胶注射液模拟在用药部位相对固定位置的状态下,其接触介质并被逐步渗透的过程中,会发生急剧的黏度增加,并缓慢释放药物,具备原位凝胶在释药部位的一般变化和释放特征。

2.2 药代动力学的考察

以 Beagle 犬为受试动物,研究自制盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂和市售注射液在体内的药代动力学行为,评价其药代动力学特征。每种制剂各为一组,每组 6 只受试犬,雌雄各半,禁食过夜后皮下注射相应制剂,给予剂量均为 10.0 mg/kg。于给药前及给药后 0.25,0.5,1,2,4,6,12,24,36,48,72 h 由前肢静脉采血 1.0 mL,置于肝素化试管中,3 500 r/min 离心 10 min 分离血浆,于 -20 °C 保存。给药后 3 h 进食。血浆样品经沉淀蛋白预处理后采用建立的 LC/MS/MS 法进行分析,分析方法的线性范围为 5.00 ~ 2 000 ng/mL,定量下限为 5.00 ng/mL。根据测定的不同时刻血浆中的药物浓度,绘制了血药浓度-时间曲线,见图 2。

采用 Phoenix™ WinNonlin® 6.1 软件计算主要药代动力学参数,其中  $c_{max}$ 、 $t_{max}$  采用实测值。比较结果见表 5。



**Table 5** Pharmacokinetic parameters for *in-situ* gel and commercial injection ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Group	$t_{\max}/\text{h}$	$c_{\max}/(\text{ng/mL})$	$\text{AUC}_{0-t}/(\text{ng/mL}\cdot\text{h})$	$t_{1/2}/\text{h}$
<i>In-situ</i> gel	$7.38 \pm 11.19$	$219 \pm 68$	$8\,696 \pm 2\,251$	$26.8 \pm 9.7$
Commercial injection	$0.375 \pm 0.144$	$2\,190 \pm 193$	$8\,723 \pm 1\,514$	$3.98 \pm 1.90$

将豚鼠背部皮肤 5 cm × 8 cm 的毛剃净。标记疱疹范围,每只豚鼠标记 6 个区域,每个测试药的各个剂量在 6 个标记区域轮流测试。每个标记区域皮下注射给药 0.1 mL,形成皮下疱疹,15 min 后测试豚鼠对针刺的反应。对每个疱疹内进行 6 次针刺,针刺间隔 3 ~ 5 s,测试时间点分别为:注射后 15、30 min 和 1、2、3、6、9、24、48、72 h 共 10 个时间

药代动力学实验的结果说明,两组制剂的相对生物利用度近似 100%,表明凝胶组药物释放完全,剂型的改变没有改变药物的总暴露量。达峰时间以及半衰期都显著延长,峰浓度显著降低,48 ~ 72 h 的缓释趋势明显。药物的峰-谷波动平缓,有利于药物的平稳释放。

2.3 药效学研究

通过豚鼠皮内疱疹的方法比较盐酸左布比卡因注射液和盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂两种药物的局部麻醉作用。

点。每只豚鼠接受的针刺总数为 60 次,对豚鼠不能做出反应的针刺进行计数。

累加 72 h 内 10 个时间点没有产生反应的针刺数,以总和为分子,以针刺总数 60 为分母形成的数值反映麻醉程度。计算每组豚鼠的无反应次数的平均百分比,数值越大,麻醉作用越强;计算数值越小,则反之。结果见表 6。

**Table 6** Pharmacodynamics comparison between *in-situ* gel and commercial injection ( $n = 6$ )

Group	Dose/(mg/mL)	Average percent of non-response times/%	SD
Normal saline		2.78	
Blank <i>in-situ</i> gel		2.71	
Commercial injection	0.28	5.14	6.87
	0.833	9.58 *	6.63
	2.5	25.00 ***	8.38
	7.5	27.78 ***	6.90
<i>In-situ</i> gel	1.85	44.86 *	16.26
	5.56	55.42 ***	10.30
	16.67	62.08 ***	14.88
	50	70.69 ***	9.68

\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$  vs normal saline/blank *in-situ* gel group

空白原位凝胶组的水平与生理盐水组相近,提示空白凝胶无明显的麻醉作用;盐酸左布比卡因注射液组,质量浓度在 0.28 mg/mL 时与生理盐水及空白凝胶无显著差异,麻醉作用不明显;质量浓度升至 0.833 mg/mL 及以上浓度开始有显著麻醉作用。盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂组的各浓度与生理盐水及空白凝胶组相比,均有统计学差异,表明盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂确有局部麻醉作用,并呈现浓度依赖性。

进一步分析各时间点的平均无反应次数,见表 7。皮下注射两种含药制剂各浓度 15 min 后,豚鼠对针刺开始出现无反应,提示起局部麻醉作用。盐酸左布比卡因注射液局部麻醉作用在注射后第 3 小时已明显下降,局部麻醉作用基本消失;盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂局部麻醉作用时间维持较长,麻醉作用强度呈缓慢通道下降,直至 72 h 还呈现出部分麻醉作用。

总体比较,盐酸左布比卡因注射液(凝胶型)

4 个剂量组与阳性对照药盐酸左布比卡因注射液相比,麻醉作用更强,经统计差异均有显著性意义。而在相近剂量的对比时,凝胶组的 1.85 mg/mL 对

比市售组的 2.5 mg/mL,凝胶组的 5.56 mg/mL 对比市售组的 7.5 mg/mL,均在剂量略低的情况下获得了更好而且更长的局麻效果。

Table 7 Average non-response times at every time point

Group	c/(mg/mL)	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	6 h	9 h	24 h	48 h	72 h
Normal		0.542	0.625	0.208	0.125	0.083	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
Blank <i>in-situ</i> gel	3.167	2.542	2.625	2.167	2.125	1.667	0.875	0.708	0.292	0.125	
Commercial injection	0.28	1.583	0.917	0.167	0.333	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.833	3.167	1.833	0.500	0.167	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000
	2.5	5.167	5.250	2.917	1.167	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000
	7.5	5.417	5.417	3.583	1.917	0.333	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>In-situ</i> gel	1.85	3.917	3.583	3.750	3.833	3.750	2.667	1.833	2.000	1.083	0.500
	5.56	4.833	4.417	4.750	4.833	4.083	3.667	2.583	2.083	1.583	0.417
	16.67	5.083	5.417	5.750	5.500	5.333	4.250	2.833	1.917	0.917	0.250
	50	5.583	5.917	5.583	5.917	5.833	5.333	3.667	2.500	1.417	0.667

3 讨 论

原位凝胶作为载体的上市制剂产品并不多,究其原因,主要是原位凝胶可供选择的药用辅料不多。即使国外处于临床试验阶段的盐酸左布比卡因原位凝胶剂,所用辅料仍面临是否可药用的评估。本研究选择磷脂作为凝胶基质,药用乙醇和注射用水作为注射溶剂,从相容性更好的角度,着手盐酸左布比卡因原位凝胶缓释注射剂的产品开发,为这一制剂载体的拓展提供了另一种可能的实现方案。

本研究通过磷脂类型、磷脂和乙醇比例、水分比例,确认较为优选的原位凝胶制剂处方,稳态载药浓度获得明显提升。该载药浓度适合作盐酸左布比卡因局部注射的药物储库,磷脂和乙醇的用量也较为安全。与盐酸左布比卡因市售注射液对比格犬药代动力学考察,自制原位凝胶制剂组达峰时间、半衰期明显延长,峰浓度明显降低且平稳,具备缓释 48~72 h 的药代动力学特征。相对生物利用度接近 100%,表明药物释放完全。

进一步对比研究了豚鼠的局部麻醉药效学模型,表明载药原位凝胶确有局部麻醉作用,并呈现浓度依赖性。4 个剂量组与阳性对照药盐酸左布比卡因注射液相比,麻醉作用更强,经统计差异均有显著性意义。

文献报道,磷脂在极高浓度分散于水性介质时易形成囊泡型磷脂凝胶<sup>[8-9]</sup>,可将包载的药物缓慢释放。因此,初步推测磷脂可作为原位凝胶基质的机制,是注射后乙醇溶剂的逐步扩散消除,磷脂分

散于局部组织少量渗透的水性体液中,形成极高磷脂浓度下的凝胶状态,从而具备形成磷脂凝胶的条件,实现体外到体内的原位凝胶化过程。

参 考 文 献

[1] Andrea C, Marta P. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different [J]? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2005, **19**(2): 247-268.

[2] Bajwa SJ, Kaur J. Clinical profile of levobupivacaine in regional anesthesia: a systematic review [J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2013, **29**(4): 530-539.

[3] Tong YC, Kaye AD, Urman RD. Liposomal bupivacaine and clinical outcomes [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2014, **28**(1): 15-27.

[4] McAlvin JB, Reznor G, Shankarappa SA, et al. Local toxicity from local anesthetic polymeric microparticles [J]. *Anesth Analg*, 2013, **116**(4): 794-803.

[5] Zeng HL, Shi Z, Fu XD. Progress in clinical application of the bupivacaine liposome injectable suspension Exparel [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2014, **23**(14): 1654-1658.

[6] Judy S, Michael R. *Sustained-Release Injectable Products* (可注射缓释制剂) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 136-137, 152.

[7] Skolnik A, Gan TJ. New formulations of bupivacaine for the treatment of postoperative pain: liposomal bupivacaine and SABER-Bupivacaine [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, **15**(11): 1535-1542.

[8] Qi N, Tang X, Lin X, et al. Sterilization stability of vesicular phospholipid gels loaded with cytarabine for brain implant [J]. *Int J Pharm*, 2012, **427**(2): 234-241.

[9] Zhang RZ, Deng YJ, Sun WP. Research progress in vesicular phospholipid gel [J]. *Chin J Pharm* (中国药理学杂志), 2008, **6**(4): 214-218.