

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001093

溴吡斯的明纳米乳的体外释放及体内动力学研究

陈学梁, 赵 静, 赵 华, 张 馨, 张景劼

(重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:对溴吡斯的明纳米乳(pyridostigmine bromide nanoemulsion, PBNE)在体外的释放行为和体内的药动学行为进行初步研究。**方法:**建立高效液相色谱法考察体外释放行为和体内药动学行为。**结果:**PNBE 与溴吡斯的明(pyridostigmine bromide, PB)在 4 种释放介质(pH1.2 的盐酸溶液, pH6.8、pH7.4、pH7.8 的磷酸缓冲溶液)中的体外释放行为相似, PBNE 的 $MRT_{(0-24h)}$ 值较 PB 增加 0.98 h, PBNE 的 C_{max} 值是 PB 的 1.55 倍, PBNE 的口服生物利用度是 PB 的 1.82 倍。**结论:**PBNE 在不同介质中的体外释药行为相似, PBNE 可改变体内的药动学行为, 其口服生物利用度比 PB 好, PBNE 具有一定的缓释作用。

【关键词】溴吡斯的明; 纳米乳; 体外释放; 药代动力学

【中图分类号】R944.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-04-29

Preliminary research on drug release *in vitro* and pharmacokinetics *in vivo* of pyridostigmine bromide nanoemulsion

Chen Xueliang, Zhao Jing, Zhao Hua, Zhang Xin, Zhang Jingqing

(Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, College of Pharmacy,
Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the drug release behaviors *in vitro* and pharmacokinetics *in vivo* of pyridostigmine bromide nanoemulsion (PBNE). **Methods:** The high performance liquid chromatography was established to investigate the release behaviors *in vitro* and pharmacokinetic behaviors *in vivo*. **Results:** The release behaviors of PBNE in 4 media (pH1.2 HCl, pH6.8 PBS, pH7.4 PBS, pH7.8 PBS) was similar to those of pyridostigmine bromide (PB). The $MRT_{(0-24h)}$ of PBNE increased by 0.98 h than PB; the C_{max} of PBNE was 1.55 times that of PB; the oral bioavailability of PBNE was 1.82 times that of PB. **Conclusion:** The release behaviors of PBNE in different release medium are similar *in vitro*. PBNE can change the pharmacokinetic behaviors *in vivo*; the oral bioavailability of PBNE is higher than PB and PBNE has a sustained-release effect *in vivo*.

【Key words】pyridostigmine bromide; nanoemulsion; *in vitro* release; pharmacokinetics

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide, PB)是一种可逆的胆碱酯酶抑制剂, 为高溶解性低渗透性的BCSⅢ类药物^[1-2], 在军事上用于沙林毒气的预防。目前, 在重症肌无力、尿潴留和外科手术术后腹部胀气的治疗中使用频率较高^[3-4]。PB普通片剂于1982年在美国上市, 服用后吸收差且不规则, 生物利用度仅为11.5%~18.9%^[5], 使其临床应用受到限制。

纳米乳(nanoemulsion, NE)是由水相、油相、表

面活性剂和助表面活性剂等自发形成, 粒径为1~100 nm的热力学稳定、各向同性、透明或半透明的均相分散体系^[6-7]。NE作为口服药物载体通过增加药物在胃肠壁的穿透性、促进药物的淋巴系统转运等方式改善药物的体内吸收、分布行为^[8]。本研究初步考察了溴吡斯的明纳米乳(pyridostigmine bromide nanoemulsion, PBNE)的体外释药和体内药动学行为, 以期提高PB的口服生物利用度。

作者简介: 陈学梁, Email: exilecxl@163.com,

研究方向: 药物新剂型与新技术研究。

通信作者: 张景劼, Email: zjqrae01@163.com。

基金项目: 重庆市委资助项目(编号: cstc2015jcyjBX0027)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161215.1156.052.html>
(2016-12-15)

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

分析天秤(瑞士梅特勒-托利多仪器公司); DF-101S 恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器公司); SHZ-82A 型台式水

浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Nano-ZS90 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司)。

PB(武汉远城科技发展有限公司,纯度>99%,分子式: $C_9H_{13}BrN_2O_2$,分子量:261.12,白色结晶粉末,批号:00940);PB 制剂(实验室自制,混悬液,批号:20130926);PBNE(实验室自制^[6-7],平均粒径 39 nm,批号:20130926);新斯的明(武汉远城科技发展有限公司,纯度>99%,分子式: $C_{12}H_{15}BrN_2O_2$,分子量:303,白色结晶粉末,批号:00810);油酸乙酯、聚氧乙烯蓖麻油等试剂均为色谱纯,实验用水为超纯水。

1.2 实验动物

雄性 SD 大鼠,体质量为 (250 ± 20) g,均为重庆医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(渝)2013-0001。

1.3 PBNE 的体外释放行为考察

1.3.1 样品处理方法 将样品与甲醇以适当的体积比混合,涡旋 3 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样。

1.3.2 样品测定方法的建立 PBNE 体外释放样品采用高效液相色谱法进行测定。设定波长为 269 nm;流动相为乙腈:水=20:80,其中水相为 0.5%三乙胺,0.01 mol/L 磷酸二氢钠,0.01 mol/L 庚烷磺酸钠,磷酸调 pH 至 3.0;流动相速度为 1 mL/min;使用大连伊利特 C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量 100 μ L。精密称取 10 mg PB,用超纯水溶解并定容至 10 mL。分别精密移取上述溶液适量于 10 mL 容量瓶,甲醇定容,得浓度为 5、25、45、65、85、105、125 μ g/mL 的 PB 溶液。各取 100 μ L 进样,记录峰面积。

1.3.3 体外释放行为考察^[9] PBNE 与 PB 在不同介质中的释放行为采用动态膜透析法考察。精密移取浓度为 5 mol/L 的 PB 溶液和 PBNE 各 1 mL 至透析袋中,将透析袋放入 100 mL 释放介质(pH1.2 的盐酸溶液,pH6.8、pH7.4、pH7.8 的 PBS)中,同时操作 3 份。释放介质温度设为 37 $^{\circ}$ C,转速设为 100 r/min,取样点分别为 0.08、0.17、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h,同时补加同温等量的释放介质。

1.4 PBNE 的药代动力学行为考察^[10]

1.4.1 样品处理方法 新斯的明作为内标,精密移取血浆样品 100 μ L,加入内标溶液,加入 0.1 mol/L 苦味酸-氢氧化钠溶液,涡旋混匀,再加入适量二氯甲烷,涡旋后 12 000 r/min 离心,取下层,加入 200 μ L 四丁基溴化铵溶液(浓度为 1 mmol/L),涡旋后 12 000 r/min 离心,取上层溶液进行测定。

1.4.2 样品测定方法的建立 PBNE 血浆样品采用高效液相色谱法进行测定。检测波长为 269 nm;流动相为乙腈:水相=45:55(1 000 mL 流动相中含有十二烷基磺酸钠 5 g,三乙胺 1.375 mL,醋酸 1.65 mL);流速为 1 mL/min;色谱柱为大连伊利特 C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);柱温为 40 $^{\circ}$ C。精密称取干燥至恒重的 PB,用适量超纯水溶解,定容至 10 mL,精密移取 50 μ L 于 10 mL 容量瓶中,定容。上述溶液经适当稀释后,得浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.5、5.0 μ g/mL 的溶液,分别移取上述溶液 100 μ L,减压干燥后加入 100 μ L 空白血浆,

之后按照 1.4.1 项下的方法进行处理。

1.4.3 给药方案及样品测定 取体质量为 (250 ± 20) g 的健康 SD 大鼠,雌雄各半,随机分成 2 组,禁食 12 h,不禁水。一组给予 PB,另一组给予 PBNE,灌胃给药 1 mL,给药剂量为 20 mg/kg。分别于给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 进行取血至被肝素浸润处理过的离心管中,6 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆按 1.4.1 项下方法处理后进样测定,所得结果代入线性方程,计算血药浓度,绘制药时曲线。

1.4.4 药代动力学参数计算 将 1.4.3 项下所得数据用 DAS 软件(2.1.1 版)进行非室模型(统计矩)拟合。

2 结果

2.1 体外释放行为

2.1.1 样品测定方法的建立 对峰面积、PB 浓度进行线性回归,线性方程为 $A=69.18C-6.94$, $r=0.999\ 3$,线性范围:5~25 μ g/mL。方法的日内、日间精密度分别为 0.70%、1.02%,回收率为 99.56%,RSD 为 0.85%,满足测定要求。

2.1.2 体外释放曲线 按照建立的方法对体外释放样品进行测定,计算累积释放百分率并绘制释药曲线。结果显示 PBNE 在 4 种介质中的累积释放率均超过 90%,PBNE 在体外的释药率非常高,从而推测其在体内的释药情况也较好,PBNE 和 PB 在 4 种介质中的释放行为相似(图 1)。

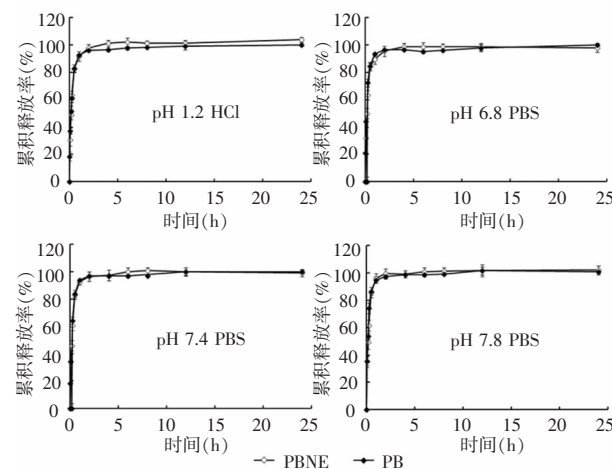


图 1 PBNE 和 PB 在 4 种介质中的释放曲线

Fig.1 Drug release curve of PBNE and PB in four dissolution media

2.2 口服药代动力学行为

2.2.1 样品测定方法的建立 对浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 与 $A(A_s/A_i)$ (待测物与内标物的峰面积比值)进行线性回归,得到方程: $A=1.018\ 8C-0.039\ 3$, $r=0.998\ 7$ 。由回归方程可知,在 0.2~5.0 μ g/mL 范围内,PB 浓度与峰面积比呈良好的线性关系。PB 的绝对回收率、RSD 分别为 80.29%、3.63%;方法回收率 RSD 分别为 98.15%、2.52%;日内和日间精密度 RSD 分别为 2.23%、

3.50%。

2.2.2 药动学参数 由测定结果所绘制的药时曲线如图 2 所示,主要药动学参数见表 1。由图 2 可知,PBNE 在约 4 h 时达到最大血药浓度,较 PB 延后 2 h 左右,表明 PBNE 具有一定的缓释作用。由表 1 可知,PBNE 增加了在体内的作用时间,提高了血药浓度,PBNE 的 $MRT_{(0-24h)}$ 值较 PB 增加 0.98 h,其 C_{max} 值是 PB 的 1.55 倍。由图 2 可以看出,PBNE 的曲线下面积明显大于 PB,与表 1 中 PBNE 的 $AUC_{(0-24h)}$ 值大于 PB 的 $AUC_{(0-24h)}$ 值结果相符,表明 PBNE 在体内的吸收程度更好,生物利用度更高,从 $AUC_{(0-\infty)}$ 的比较可以看出,PBNE 的生物利用度是 PB 的 1.82 倍。

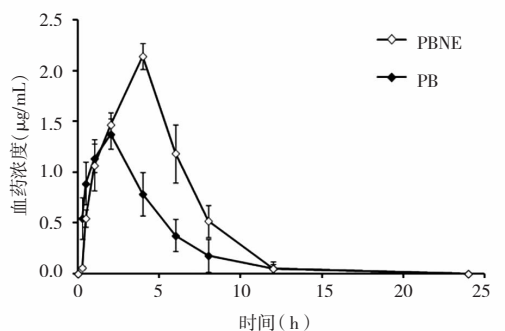


图 2 大鼠口服给予 PBNE 和 PB 后的药时曲线 ($n=6$)

Fig.2 Concentration-time curve of PBNE and PB in rats after oral administration ($n=6$)

表 1 大鼠口服给予 PBNE 和 PB 非室模型的主要药动学参数 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Main pharmacokinetic data after oral administration of PBNE and PB with non-compartment model analysis ($n=6, \bar{x} \pm s$)

参数	PBNE	PB
$AUC_{(0-24h)}$ (mg·h/L)	11.53 ± 1.46	6.34 ± 0.63
$AUC_{(0-\infty)}$ (mg·h/L)	11.78 ± 1.50	6.50 ± 0.72
$MRT_{(0-24h)}$ (h)	4.35 ± 0.22	3.37 ± 0.21
$MRT_{(0-\infty)}$ (h)	4.57 ± 0.37	3.65 ± 0.41
T_{max} (h)	4.00 ± 0.00	1.83 ± 0.41
C_{max} (mg/L)	2.14 ± 0.13	1.38 ± 0.13

3 讨论

已有文献报道^[10],NE 能大幅增加难溶性药物的

肠道吸收,但对增加高水溶性低渗透性药物口服生物利用度的报道较少,本研究对 PBNE 进行了初步的体内外评价,体外结果表明 PBNE 的体外释放行为与 PB 相似,两者在不同介质中的释药率均很高,药动学研究结果显示 PBNE 的口服生物利用度比 PB 显著提高,PBNE 的达峰时间大幅延后,延长了药物在体内的平均驻留时间,说明 PBNE 显著改变了体内的动力学行为,具有一定的缓释作用。本研究结果表明水包油型 NE 能在一定程度上提高低渗透性药物的口服生物利用度,为进一步研究溴吡斯的明纳米乳的口服给药提供了一定的科学基础。

参 考 文 献

- [1] 胡霓霓,谭群友,柳 珊,等. 溴吡斯的明磷脂复合物制备工艺[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(9):712-716.
- [2] 袁誉铭,孙 全,陈学梁,等. 溴吡斯的明磷脂复合物纳米乳体外溶出度与体内吸收的相关性[J]. 第二军医大学学报,2016,37(5):650-653.
- [3] Sieb JP, Köhler W. Benefits from sustained-release pyridostigmine bromide in myasthenia gravis; results of a prospective multicenter open-label trial[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2010, 112(9): 781-784.
- [4] 任爱民,杨 丹,韩立敏,等. 联合应用坦索罗辛与溴吡斯的明治疗宫颈癌术后尿潴留[J]. 复旦学报(医学版),2008,35(3):373-375.
- [5] Breyer-Pfaff U, Maier U, Brinkmann AM, et al. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis[J]. Clin Pharmacol Ther, 1985, 37(5): 495-501.
- [6] Singh KK, Vengkar SK. Formulation, antimalarial activity and bio-distribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine[J]. Int J Pharm, 2008, 347(1-2): 136-143.
- [7] 张友智,赵 瑛. 水杨酸微乳的制备及质量评价[J]. 中南药学, 2013, 11(4): 248-251.
- [8] Ragelle H, Crauste-Manciet S, Seguin J, et al. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice[J]. Int J Pharm, 2012, 427(2): 452-459.
- [9] 尹华峰,谭群友,陈学梁,等. 溴吡斯的明磷脂复合物纳米粒的体外释放行为评价[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(7):501-504.
- [10] 冯耀荣,程巧鹭,李范珠. 自乳化药物传递系统的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2007,34(4):280-284.

(责任编辑:冉明会)