

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001813

溴吡斯的明新型复合物纳米乳在大鼠体内药代动力学及生物等效性研究

袁誉铭¹, 郭 琦², 陈学梁³, 曾 梅¹, 向晓燕¹, 张景勃¹

(1. 重庆医科大学药学院、重庆药物高校工程研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆市药品技术审评认证中心, 重庆 401120; 3. 成都市青白江区人民医院药剂科, 成都 610300)

【摘要】目的:研究溴吡斯的明(pyridostigmine bromide, PB)和水包油的溴吡斯的明新型复合物纳米乳(pyridostigmine bromide novel phospholipids complex nanoemulsion, PPCN)在大鼠体内的药代动力学, 比较两者相对生物利用度和生物等效性。**方法:**本试验将 12 只大鼠随机分为 2 组, 给药量相同, 于预先设定不同的时间点采取血样, 用 HPLC 法测定药物的血药浓度, DAS(2.1.1 版)软件计算主要的药动学参数及生物等效性。**结果:**PB 和水包油新型纳米乳 PPCN 的 C_{max} 分别为 1.49 mg/L 和 2.23 mg/L, $AUC_{(0-72h)}$ 分别为 7.06 mg·h/L 和 14.12 mg·h/L。PB 的 T_{max} 为 1.5 h, 而 PPCN 的 T_{max} 为 4 h。PB 的 C_{max} 是 PPCN 的 1.50 倍, PPCN 的 $AUC_{(0-72h)}$ 是 PB 的 2 倍。经双单侧 t 检验, 方差分析和非参数秩和检验 $AUC_{(0-72h)}$, C_{max} 和 T_{max} 具有统计学差异(P 分别为 0.000, 0.000, 0.001)。**结论:**PPCN 延长了 PB 在大鼠体内的作用时间, 提高了 PB 在大鼠体内的口服生物利用度, PPCN 与 PB 不具有生物等效性, 且 PPCN 较 PB 更好。

【关键词】溴吡斯的明; 纳米乳; 药代动力学; 生物利用度; 生物等效性**【中图分类号】**R943**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-10-20

Pharmacokinetics and bioequivalence of pyridostigmine bromide novel phospholipids complex nanoemulsion in rats

Yuan Yuming¹, Guo Qi², Chen Xueliang³, Zeng Mei¹, Xiang Xiaoyan¹, Zhang Jingbo¹

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering; 2. Center for Certification and Evaluation, Chongqing Food and Drug Administration; 3. Department of Pharmacy, People's Hospital of Qingbaijiang District)

【Abstract】Objective: To study the pharmacokinetics of pyridostigmine bromide and oil-in-water pyridostigmine bromide novel phospholipids complex nanoemulsion (PPCN) in rats, and to compare their relative bioavailability and bioequivalence. **Methods:** In this study, twelve rats were randomly divided into two groups and the same dose was administered. Blood samples were taken at different time points, and the plasma concentrations of the drugs were determined by HPLC. The DAS(2.1.1) software was used to calculate the main pharmacokinetic parameters and bioequivalence. **Results:** The C_{max} of PB and PPCN were 1.49 mg/L and 2.23 mg/L, respectively. The $AUC_{(0-72h)}$ of PB and PPCN were 7.06 mg·h/L and 14.12 mg·h/L respectively. The T_{max} of PB was 1.5 h, and the T_{max} of PPCN was 4 h. The C_{max} of PPCN was 1.50 times that of PB, and the $AUC_{(0-72h)}$ of PB was 2 times that of PPCN. The results of $AUC_{(0-72h)}$, C_{max} and T_{max} were statistically different (P values were 0.000, 0.000, 0.001, respectively) by student's t test, analysis of variance and wilcoxon rank sum test. **Conclusion:** PPCN can not only prolong the action time of PB in rats, but also improve oral bioavailability of PB in rats, and PPCN and PB are not bioequivalent, and PPCN is better than PB.

【Key words】pyridostigmine bromide; nanoemulsion; pharmacokinetics; bioavailability; bioequivalence

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide, PB)是季铵类生物碱, 分子式是 $C_9H_{13}BrN_2O_2$, 属于可逆性抗

胆碱酯酶药物^[1]。对运动终板上的烟碱样胆碱受体(N_2 受体)有直接兴奋作用, 并能促进运动神经末梢释放乙酰胆碱, 从而提高胃肠道的肌张力^[2]。临床上主治重症肌无力, 尿潴留以及糖尿病神经源性膀胱炎等^[3-5]。PB 在生物药剂学分类系统(biopharmaceutical classification system, BCS)属于Ⅲ类药物, 即高溶解性、低渗透性药物。口服胃肠吸收差, 生物利用

作者介绍: 袁誉铭, Email: 469859028@qq.com,

研究方向: 药物新剂型与新技术研究。

通信作者: 张景勃, Email: zjqrae01@163.com。

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

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1050.022.html>

(2018-07-05)

度低^[6]。在临床治疗过程中大都需要长期服用 PB,且剂量较大,易产生毒蕈碱样反应^[7]。

磷脂是生物膜的成分之一,药物与磷脂结合可以增加药物的脂溶性,提高其口服生物利用度^[8-9]。纳米乳是指粒径为 10~100 nm 的乳液,具有促进水溶性药物在体内的吸收、提高药物在体内的生物利用度、缓释和靶向等作用^[10]。本课题目的在于提高其口服生物利用度为主,因此将 PB 与磷脂(phospholipids,PC)结合,形成复合物(pyridostigmine bromide novel phospholipids complex,PPC),继而进一步制备成水包油新型复合物纳米乳(pyridostigmine bromide novel phospholipids complex nanoemulsion,PPCN)。采用高效液相色谱法测定 PB 在大鼠体内血浆中药物浓度,研究单剂量口服 PB 和 PPCN 在体内的药代动力学,评价游离药和制剂的主要药动学参数上是否存在统计学差异和其生物等效性。

1 材料与方法

1.1 仪器

AB204S 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);DF-101S 型集热式磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂与动物

溴吡斯的明(武汉远城科技发展有限公司,纯度 99.6%,批号 20160518);蛋黄卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司);油酸乙酯(成都科龙试剂化工试剂厂);聚氧乙烯蓖麻油 EL-35(德国 BASF 公司);PEG-400(成都科龙试剂化工试剂厂)。雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,重庆医科大学动物实验中心所提供[许可证号:SCXK(渝)2016-0001]。

1.3 方法

1.3.1 PPCN 的制备 精密称取 PPC 适量,将油酸乙酯,聚氧乙烯蓖麻油,PEG400 按照处方量加入。在 40 °C 恒温水浴中搅拌,使 PPC 完全溶解,再滴加处方量的水相,即得 PPCN。

1.3.2 给药方案及样品处理^[11-14] 取体质量为(250±20) g 的健康雄性 SD 大鼠,随机分成 2 组,禁食 12 h(可进水)。一组口服 PB,另一组口服给药 PPCN,给药量相同。分别于给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 进行眼底采血至肝素浸润过的离心管中,6 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆,加溴新斯的明为内标,再加 0.1 mol/L 苦味酸-氢氧化钠溶液和二氯甲烷,涡旋离心 10 min,取下层。最后加四丁基溴化铵溶液,涡旋混合 3 min,离心 5 min,取上层液按“2.2.2 项”色谱条件进行测定。

1.3.3 样品测定 大连伊利特 Lichrospher C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测波长:269 nm;流动相为乙腈:水=45:55(流动相中含有 0.5% 十二烷基硫酸钠,0.1% 三乙胺和 0.1% 醋酸);流速:1 mL/min;柱温:40 °C。

1.3.4 数据处理 采用 DAS(2.1.1 版)对 PB 和 PPCN 进行药代动力学数据处理,得到房室模型和非房室模型分析的主要药代动力学参数,并采用 SPSS 19.0 对 PB 和 PPCN 的药代动力学参数进行双侧 *t* 检验统计学分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.5 生物等效性评价 对 $AUC_{(0-t)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 和 C_{max} 这 3 个参数经对数转化后进行与双单侧 *t* 检验及方差分析,对 T_{max} 进行非参数秩和检验。评价 PB 和 PPCN 的是否具有生物等效性,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.6 方法学考察 对 PB 的体内含量测定方法进行考察,其回收率、精密度、稳定性等方法学结果符合要求。

2 结果

2.1 药代动力学研究

血浆样品处理后,所得到的数据经分析得到平均血药浓度-时间曲线图(图 1)。由图 1 可知,PB 的 T_{max} 为 1.5 h,PPCN 的 T_{max} 为 4 h,可知 PB 在体内更快地达到峰浓度,PPCN 可以延长达到峰浓度的时间。PPCN 的 C_{max} 是 PB 的 1.49 倍,说明 PPCN 在体内的血药浓度更高。

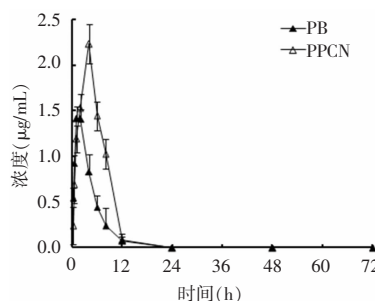


图 1 大鼠口服后 PB 和 PPCN 的平均血浆浓度-时间曲线

房室模型中主要的药动学参数见表 1。可得,PPCN 的 $AUC_{(0-72 h)}$ 是 PB 的 1.99 倍, K_a 为 PPCN 的 4.54 倍。表明游离药和制剂比较,PPCN 较 PB 的吸收速率更大,口服生物利用度更大,吸收更好。PB 的 Cl 是 PPCN 的 2.07 倍,说明 PB 的清除更快。

表 1 大鼠口服给药 PB 和 PPCN 的室模型的主要药代动力学参数

参数	PB	PPCN	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
$AUC_{(0-72 h)}$ (mg·h/L)	7.29 ± 1.26	14.50 ± 0.90	-13.510	0.000
$AUC_{(0-\infty)}$ (mg·h/L)	7.84 ± 1.67	15.79 ± 0.97	-12.150	0.000
K_a (h)	1.56 ± 0.65	7.10 ± 15.67	-0.860	0.430
Cl [L/(h·kg)]	2.63 ± 0.47	1.27 ± 0.08	7.440	0.000

非房室模型结果见表 2。PPCN 的 $AUC_{(0-72 h)}$ 较 PB 更高,为 2 倍,说明 PPCN 的口服生物利用度更好,增加口服吸收。从 $MRT_{(0-72 h)}$ 和 Cl 中可以看出,PPCN 的 $MRT_{(0-72 h)}$ 为 PB 的 1.37 倍。PB 的 Cl 为 PPCN 的 2.17 倍。说明 PPCN 与 PB 相比在体内滞留时间更长,清除速率更慢。综上所述,PPCN 在体内提高生物利用度较 PB 效果更好,最大血药浓度也更大,清除速率更慢。统计结果分析显示, $AUC_{(0-72 h)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 、 $MRT_{(0-72 h)}$ 、 Cl 都具有统计学差异。

表 2 大鼠口服给药 PB 和 PPCN 的非室模型的主要药代动力学参数

参数	PB	PPCN	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
AUC _(0-72 h) (mg·h/L)	7.06 ± 1.30	14.12 ± 0.96	-11.890	0.000
AUC _(0-∞) (mg·h/L)	7.47 ± 1.90	15.61 ± 1.66	-9.000	0.000
<i>C</i> _{max} (mg/L)	1.49 ± 0.10	2.23 ± 0.19	-13.690	0.000
<i>MRT</i> _(0-72 h) (h)	3.47 ± 0.51	4.77 ± 0.18	-5.550	0.003
<i>Cl</i> [L/(h·kg)]	2.80 ± 0.58	1.29 ± 0.14	6.500	0.001

2.2 生物等效性评价

经 DAS2.1.1 软件处理后,得到 PB 和 PPCN 生物等效性评价结果见表 3。3 个主要药动学参数 AUC_(0-72 h)、AUC_(0-∞)和 *C*_{max} 经对数转换后的[1-2α]90%可置信区间分别为 69.1%~79.3%、66.6%~79.9%及 50.4%~85.7%,与等效标准比较后,得到 3 个参数的 90%可置信区间范围均不在标准的区间范围内,因此 PB 和 PPCN 不具有生物等效性。对 *T*_{max} 进行非参数秩和检验,表明 PB 和 PPCN 差异有统计学意义(*P*=0.001)。方差分析结果表明,AUC_(0-72 h)、AUC_(0-∞)和 *C*_{max} 具有统计学差异(*P*值均为 0.000)。

表 3 口服大鼠中 PB 和 PPCN 的生物等效性评价

参数	90%CI	生物等效性 标准	生物等效性 结果
AUC _(0-72 h) (mg·h/L)	69.1% ~ 79.3%	80% ~ 125%	不具备
AUC _(0-∞) (mg·h/L)	66.6% ~ 79.9%	80% ~ 125%	不具备
<i>C</i> _{max} (mg/L)	50.4% ~ 85.7%	70% ~ 143%	不具备

3 讨论

据文献报道 PB 的口服吸收差,生物利用度低^[6]。临床上大多患者需要长期服用,且剂量较大,易出现不良反应^[15]。针对 PB 的缺点,目前国内外已经进行以下研究,将 PB 制备成口腔崩解片、缓释微球、脂质体、纳米粒等剂型^[7],但是并没有将 PB 制备成 PPC 后,再进一步装载于纳米乳中形成 PPCN 的报道。

本试验首次将 PB 和 PC 复合形成磷脂复合物再制备成 PPCN,不仅提高 PB 的脂溶性,而且提高其口服生物利用度。有文献报道,将水溶性药物制备成磷脂复合物后,可提高药物的脂溶性^[16]。研究结果表明 PPCN 较 PB 在大鼠体内口服生物利用度更高,所达到的最大血药浓度也更大,延长其在大鼠体内的作用时间。通过生物等效性评价,PB 和 PPCN 不具有生物等效性。本试验主要研究 PB 和 PPCN 药代动力学行为并对其进行评价,为药物新剂型的研究提供一定的参考依据,也为进一步的临床应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 王丙建. 胆碱酯酶抑制剂的药物分析[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(66):250,254.
- [2] Cooper BY,Johnson RD,Nutter TJ. Exposure to gulf war illness chemicals induces functional muscarinic receptor maladaptations in muscle nociceptors[J]. Neurotoxicology,2016,54:99-110.
- [3] Lee HE,Kim YH,Kim SM,et al. Clinical significance of repetitive compound muscle action potentials in patients with myasthenia gravis;a predictor for cholinergic side effects of acetylcholinesterase inhibitors[J]. J Clin Neuro,2016,12(4):482-488.
- [4] 夏雨果,陈 秋,梅雪峰,等. 坦索罗辛联合溴吡斯的明治疗前列腺增生伴尿潴留临床疗效观察[J]. 中国当代医药,2017,24(9):116-118.
- [5] 向文霞,童凤华,王心平. 溴吡斯的明治疗糖尿病神经源性膀胱的疗效分析[J]. 当代医学,2015,21(21):133-134.
- [6] Tan QY,Hu NN,Liu GD,et al. Role of a novel pyridostigmine bromide-phospholipid nanocomplex in improving oral bioavailability[J]. Arch Pharm Res,2012,35(3):499-508.
- [7] 高建华,高秀蓉,许小红. 溴吡斯的明剂型研究进展[J]. 中国药房,2016,27(4):545-547.
- [8] Zhou Y,Dong W,Ye J,et al. A novel matrix dispersion based on phospholipid complex for improving oral bioavailability of baicalin: preparation, in vitro and in vivo evaluations[J]. Drug Deliv,2017,24(1):720-728.
- [9] Khurana RK,Bansal AK,Beg S,et al. Enhancing biopharmaceutical attributes of phospholipid complex-loaded nanostructured lipidic carriers of mangiferin: systematic development, characterization and evaluation[J]. Int J Pharm,2017,518(1-2):289-306.
- [10] 杨雪峰,赵 坤,姜金庆. 纳米乳给药系统的应用[J]. 广东农业科学,2011,38(7):125-127.
- [11] 刘 跃,黄 勇,董永喜,等. 野黄芩素及其葡萄糖醛酸结合物在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(5):711-715.
- [12] Wang Z,You L,Chen Y,et al. Investigation on pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of Schisandrin B in rats by HPLC-MS/MS[J]. Biomed Chromatog,2018,32(2):e4069.
- [13] Gharibi S,Kimble B,Vogelnest L,et al. Pharmacokinetics of posaconazole in koalas(Phascolarctos cinereus) after intravenous and oral administration[J]. J Vet Pharmacol Ther,2017,40(6):675-681.
- [14] Radicioni M,Castiglioni C,Giori A,et al. Bioequivalence study of a new sildenafil 100 mg orodispersible film compared to the conventional film-coated 100 mg tablet administered to healthy male volunteers[J]. Drug Des Devel Ther,2017,11:1183-1192.
- [15] 谭群友,熊华蓉,王 睿,等. 溴吡斯的明缓释片的药代动力学和相对生物利用度研究[J]. 第三军医大学学报,2011,33(5):511-514.
- [16] 林密真,张美敬,房盛楠,等. 磷脂复合物技术与制剂新技术在中药中联合应用的研究进展[J]. 中国药房,2016,27(34):4864-4867.

(责任编辑:冉明会)