

美斯地浓磷脂复合物大鼠体内药代动力学研究*

胡霓霓¹, 谭群友², 张 梨¹, 尹华峰¹, 张景勍^{1△}

1. 重庆医科大学 药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室(重庆 400016);

2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所 胸外科(重庆 400042)

【摘要】 目的 研究美斯地浓磷脂复合物在大鼠体内药代动力学特征。**方法** 健康 SD 雄性大鼠 12 只,分为 2 组,采用双周期交叉随机实验,分别灌胃给予美斯地浓磷脂复合物混悬液(含美斯地浓 1.5 mg/kg)和美斯地浓原料药(含美斯地浓 1.5 mg/kg),于不同时间点眼底静脉丛取血,采用高效液相色谱法测定各时间点血药浓度。采用 DAS 2.1.1 药动学程序对有关参数进行分析。**结果** 美斯地浓磷脂复合物的药代动力学参数为:达峰时间($T_{\max}$) 2 h,峰浓度($C_{\max}$) 22.79 $\mu\text{g/mL}$,药时曲线下面积($\text{AUC}_{0-\infty}$) 7128.21 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$,而美斯地浓原料药为: $T_{\max}$ 2 h, $C_{\max}$ 6.00 $\mu\text{g/mL}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 1772.36 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$,美斯地浓磷脂复合物相对生物利用度是原料药的 410.98%。**结论** 美斯地浓磷脂化后能明显提高其口服生物利用度。

【关键词】 美斯地浓 磷脂复合物 药代动力学

Pharmacokinetics of Mestison-phospholipid Complex in Rats HU Ni-ni¹, TAN Qun-you², ZHANG Li¹, YIN Hua-feng¹, ZHANG Jing-qing^{1△}. 1. Medicine Engineering Research Center in University, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

△ Corresponding author, E-mail: zjqrae01@163.com

【Abstract】 Objective To determine the pharmacokinetics characteristics of mestison-phospholipid complex (PBPLC) in rats. **Methods** This study adopted a single-dose, randomized, open-label, two-period crossover trial design. Twelve healthy rats were randomly divided into two groups. One group was orally administered with mestison-phospholipid complex, and the other group was orally administered with reference mestison solution (1.5 mg/kg of mestison). The plasma concentrations of the drugs in ophthalmic vein bloods were determined using HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated with the aid of DAS2.1.1 software. **Results** Pharmacokinetic parameters of mestison-phospholipid complex were $T_{\max}$ 2 h, $C_{\max}$ 22.79 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ and $\text{AUC}_{0-\infty}$ 7128.21 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$, which were different from those of free mestison— $T_{\max}$ 2 h, $C_{\max}$ 6.00 $\mu\text{g/mL}$ and $\text{AUC}_{0-\infty}$ 1772.36 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$. The relative bioavailability of mestison-phospholipid complex was 410.98 % of free mestison. **Conclusion** The oral bioavailability of mestison increases remarkably when administered as mestison-phospholipid complex.

【Key words】 Mestison Phospholipid complex Pharmacokinetics

美斯地浓(mestison, PB)是一种胆碱酯酶抑制剂类药,临床主要用于治疗重症肌无力,也可用于手术后腹部胀气和尿潴留^[1,2]。由于 PB 是高溶解性、低渗透性药物,其亲水性较强,脂溶性较低,生物利用度不高。鉴于此,本实验室为提高其生物利用度,自制了美斯地浓磷脂复合物(PBPLC),采用双周期交叉随机实验设计,采用反相高效液相色谱法,考察 PBPLC 在 SD 大鼠体内的药动学性质,对其吸收进行较为系统地研究,计算并比较两者的相对生物利用度,了解 PB 磷脂化后在体内的吸收变化。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器 TGL-16B 高速台式离心机(江苏省金坛市大地自动化仪器厂),1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),PHS-3C 型 pH 测定仪(上海精科仪器有限公司),XW-80A Vortex 旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.1.2 试剂 美斯地浓(武汉远城科技发展有限公司),美斯地浓对照品(中国药品生物制品鉴定所),美斯地浓磷脂复合物(自制),溴新斯的明(NB)对照品(中国药品生物制品鉴定所),庚烷磺酸钠(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司),磷酸、三乙胺(分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司化学试剂

* 教育部博士点基金资助项目(No. 20095503120008)和重庆市教育委员会资助项目(首批高等学校优秀人才资助, No. KJ090308)资助

△ 通讯作者, E-mail: zjqrae01@163.com

厂),磷酸二氢钠、氢氧化钠、氯化钠(分析纯,重庆北培化学试剂厂),双蒸水(自制),乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),甲醇(色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司),苦味酸、肝素钠(分析纯,广东台山粤侨试剂有限公司),二氯甲烷、浓盐酸(分析纯,重庆川东化学集团有限公司),三丁基硫酸氢胺(分析纯,上海化学试剂一厂)。

1.1.3 实验动物 健康 SD 大鼠 12 只,雄性,体重(300±20) g,重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 检测器:全紫外波长检测器;检测波长:269 nm;色谱柱:Lichrospher C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈:水相(0.01 mol/L 庚烷磺酸钠,0.01 mol/L 磷酸二氢钠,0.5% 三乙胺,磷酸调 pH 至 3.0)=20:80;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;流动相经抽滤脱气后使用。

1.2.2 溶液配制 水饱和二氯甲烷:取二氯甲烷 200 mL,加蒸馏水至出现分层,振摇 2 min,静置,取下层即为水饱和二氯甲烷;0.1 mol/L 盐酸溶液:精密量取 9.0 mL 浓盐酸至 1000 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,即得;0.1 mol/L 苦味酸-氢氧化钠溶液(0.1 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 7.0):精密称取 4.00 g 氢氧化钠和 0.299 g 苦味酸于 200 mL 烧杯中,加入约 80 mL 蒸馏水,加 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.0,转移至 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,即得;1 mmol/L 四丁基溴化铵溶液:精密称取四丁基溴化铵 1.1043 g 于烧杯中,蒸馏水溶解后,定溶于 100 mL 容量瓶中,即得;0.1 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:精密称取 1.56 g 磷酸二氢钠于烧杯中,蒸馏水溶解后,定溶于 100 mL 容量瓶中,即得;0.1%肝素钠生理盐水溶液:精密称取肝素钠 0.10 g、氯化钠 0.9 g 于烧杯中,蒸馏水溶解后,定溶于 100 mL 容量瓶中,即得,4℃保存备用;流动相水相溶液的配制:精密称取庚烷磺酸钠 2.0224 g、磷酸二氢钠 1.56 g 于 1000 mL 烧杯中,加蒸馏水至约 800 mL,用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 3.0,转移至 1000 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,经 0.45 μm 水相滤膜于真空循环水泵过滤,弃初滤液,即得。

1.2.3 给药方案及样品采集^[3,4] 12 只 SD 大鼠,分为 2 组,每组 6 只,给药前禁食 12 h,全程不禁水。给药前分别取空白血浆作空白对照。第一组灌胃给药 PBPLC 混悬液(含 PB 1.5 mg/kg),第二组灌胃给药 PB 原料药组(含 PB 1.5 mg/kg),两组都采用

双周期交叉随机实验设计。分别于给药后 10 min、20 min、40 min、60 min、120 min、240 min、360 min、480 min、600 min、720 min 于眼底静脉丛取血,置于预先肝素化的离心管中,8000 r/min 离心 10 min,分离上层血浆,保存于-20℃冰箱中,待测。一周后交叉给药,取血。

1.2.4 血浆样品处理方法 精密量取血浆样品 0.1 mL,加入 NB 0.1 mL(640 μg/mL)作为内标,加 0.1 mol/L 苦味酸-氢氧化钠溶液(pH 调至 7.0) 0.2 mL,加水饱和二氯甲烷 1 mL,于旋涡混合仪上混合 3 min,12000 r/min 离心 10 min,取下层有机相,加入 1 mmol/L 四丁基溴化铵溶液 200 μL,旋涡混合 1 min,12000 r/min 离心 5 min,取上层水相注入高效液相色谱仪进行测定。

1.2.5 标准曲线制备方法 精密吸取空白血浆 50 μL,加入不同浓度的美斯地浓标准溶液配制成系列浓度的血浆样品,按“1.2.4”项下操作。以相应的标准血浆质量浓度 C(μg/mL)为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值 A(A_s/A_i)为纵坐标,进行线性回归。

1.2.6 方法回收率实验 取标准曲线项下储备液,分别制备低、中和高浓度(0.25、12.5、100 μg/mL)的血浆药物溶液,按“1.2.4”项下方法操作处理,以测定的药物浓度与加入的药物浓度之比表示方法回收率,每个浓度平行制备 5 份。

1.2.7 精密度实验 分别制备低、中、高 3 种浓度(0.25、12.5、100 μg/mL)美斯地浓血浆样品,按“1.2.4”项下方法操作处理,在同一日内每个浓度连续进样 5 次,计算日内精密度,并连续 5 d 测定浓度,计算日间精密度。

1.2.8 稳定性考察 分别制备低、中、高 3 种浓度(0.25、12.5、100 μg/mL)美斯地浓血浆样品,25℃下放置 6 h 和-80℃放置 3 个月后,按“1.2.4”项下方法操作处理分别测定浓度,考察稳定性。

1.3 数据处理

血浆样品的血药浓度测定后,将所得数据用 DAS 2.1.1 药动学程序计算 PBPLC 及 PB 原料药药代动力学参数。

2 结果

2.1 方法学结果

2.1.1 方法专属性 在选定的色谱条件下,取空白血浆及血浆样品溶液,参照“1.2.4”项下方法处理,进样,记录色谱图谱。见图 1 及图 2。

从以上图谱可知,药物和内标在该色谱条件下

药药代动力学参数见表 4。

表 1 方法回收率结果

Table 1 Recovery of mestinon

Added amount ($\mu\text{g/mL}$)	Determined amount ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%, $\bar{x} \pm s$)	RSD (%)
0.246	0.217	89.96 $\pm$ 1.06	1.18
0.248	0.223		
0.252	0.228		
0.256	0.233		
0.254	0.229		
12.44	12.08	97.42 $\pm$ 0.30	0.30
12.48	12.12		
12.52	12.23		
12.55	12.26		
12.53	12.22		
99.72	97.24	97.24 $\pm$ 0.19	0.20
99.36	96.52		
99.57	96.58		
100.76	97.96		
100.32	97.62		

表 2 日内、日间精密度的结果

Table 2 Within-day and inter-day precision of the test

Mestinon ($\mu\text{g/mL}$)	Within-day precision		Inter-day precision	
	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
0.25	0.227 $\pm$ 0.002	0.88	0.223 $\pm$ 0.024	10.76
12.5	12.278 $\pm$ 0.027	0.22	12.220 $\pm$ 0.768	6.28
100	97.480 $\pm$ 0.046	0.05	97.50 $\pm$ 1.133	1.16

表 3 稳定性实验结果

Table 3 Stability of the test

Mestinon ($\mu\text{g/mL}$)	Placed under 25 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h		Placed under -80 $^{\circ}\text{C}$ for 3 months	
	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
0.25	0.231 $\pm$ 0.011	4.76	0.23 $\pm$ 0.75	3.28
12.5	12.37 $\pm$ 0.680	3.03	12.29 $\pm$ 0.32	2.57
100	98.56 $\pm$ 1.164	1.18	97.50 $\pm$ 1.33	1.36

图 1 空白血浆色谱图 图 2 血浆样品溶液色谱图
Fig 1 Chromatogram of blank plasma Fig 2 Chromatogram
of plasma sample (1: Mestinon; 2: Neostigmine bromid)

保留时间分别是 5.6 min 和 7.1 min,能达到有效的分离,且空白血浆在该色谱条件下对药物的测定无干扰,表明该方法能够用于 PB 血药浓度的测定。

2.1.2 标准曲线线性范围 美斯地浓标准曲线的回归方程为: $A=0.025C-0.0066$, $r=0.9991$, $n=3$,线性范围为 0.25~100 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明,美斯地浓血药浓度在 0.25~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,峰面积比与浓度呈良好的线性关系。

2.1.3 方法回收率 如表 1 所示,该方法在药物浓度为 0.252、12.52、99.57 $\mu\text{g/mL}$ 时的方法回收率分别是 89.96 % $\pm$ 1.06 %, 97.42 % $\pm$ 0.30 %, 97.24 % $\pm$ 0.19 %。

2.1.4 精密度实验 如表 2 所示,该方法在药物浓度为 0.25、12.5、100 $\mu\text{g/mL}$ 时的日内精密度(RSD)分别为 0.88%、0.22%、0.05%,日间 RSD 分别为 10.76%、6.28%、1.16%,符合方法学要求。

2.1.5 稳定性考察 如表 3 所示,血浆样品浓度为 0.25、12.5、100 $\mu\text{g/mL}$ 时在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 6 h 后测定 RSD 分别为 4.76%、3.03%、1.18%;在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 个月后测定样品的 RSD 分别为 3.28%、2.57%、1.36%。实验结果表明样品在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 6 h 和 -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 个月均稳定。

2.2 大鼠体内药代动力学测定结果

2.2.1 大鼠体内血清样品中美斯地浓含量的测定结果 取 SD 大鼠给药后所得的血浆样品,按照 1.2.4 项下方法处理,进样。药-时曲线见图 3。

2.2.2 药动学参数计算结果 PBPLC 及 PB 原料

图 3 PB 及 PBPLC 口服后药-时曲线图($n=6$)

Fig 3 The concentration-time curves of orally administered PBPLC and free PB ($n=6$)

以上数据表明,PBPLC 口服血药浓度峰值为 22.79 $\mu\text{g/mL}$,是 PB 原料药的 3.80 倍;达峰时间均为 120 min;PBPLC 和 PB 原料药 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 7128.21 和 1734.45 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$,PBPLC 的相对生物利用度是 PB 原料药的 410.98%。

表 4 PBPLC 及 PB 原料药药代动力学参数

Table 4 The pharmacokinetic parameters of PBPLC and free PB	PB	PBPLC
$C_{\max}(\mu\text{g/mL})$	6.00	22.79
$T_{\max}(\text{min})$	120.00	120.00
$\text{AUC}_{0-t}(\mu\text{g} \cdot \text{min/mL})$	1619.7	6315.55
$\text{AUC}_{0-\infty}(\mu\text{g} \cdot \text{min/mL})$	1734.45	7128.21
$\text{MRT}_{0-t}(\text{min})$	220.80	233.85
$\text{MRT}_{0-\infty}(\text{min})$	259.36	328.03

MRT: Mean residence time

3 讨论

由于生物样品中内源性物质较多,本实验采用 HPLC 色谱法测定 PB 血药浓度,经过预实验,最终选择流动相为乙腈:水相=20:80。结果样品的保留时间合适,分离效果较好。

内标法是将一定量的纯物质作内标物,加入到准确称量的试样中,根据被测试样和内标物的质量比及其相应的色谱峰面积之比,来计算被测组分的含量。选择内标物有 3 个要求:第一,内标物应是该试样中不存在的纯物质,且是被测物质的同系物或者结构类似的物质;第二,内标物必须能与试样中各组分的色谱峰完全分离;第三,加入内标物的量应接近于被测组分,使峰面积应和标准曲线中被测物质中浓度时产生的峰面积相近,消除由于浓度差别过大造成的峰面积之比变化不大,提高标准曲线的测定灵敏度。内标法通过测量内标物及被测组分的峰面积的相对值,计算被测组分的浓度,在一定程度上消除了操作条件等的变化所引起的误差。本实验选择美斯地浓的同系物溴新斯的明作为内标物质,能够达到以上要求。

本实验采用 0.1 mol/L 苦味酸-氢氧化钠溶液(pH 调至 7.0)沉淀蛋白,用水饱和二氯甲烷萃取药物,用 1 mmol/L 四丁基溴化铵溶液将药物从二氯甲烷中复萃取,药物在整个过程中无损失。

本实验发现,PBPLC 和 PB 原料药 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分

别为 7128.21 和 1734.45 $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$,PBPLC 的相对生物利用度是 PB 原料药的 410.98 %。该结果说明 PB 磷脂化后,提高其口服生物利用度,这可能是由于增加了其脂溶性和细胞膜亲和性,有利于药物跨膜转运。与文献报道的磷脂复合物可增加药物口服生物利用度相符^[5-9]。目前临床所用 PB 普通片口服后胃肠道吸收差,生物利用度约 11.5%~18.9%。PBPLC 较 PB 可明显提高生物利用度,可望开发为新一代 PB 制剂。

参 考 文 献

1 Zhao B, Moochhala SM, Lu J, *et al.* Determination of mestinon and its metabolites in biological samples. J Pharm Sci,2006;9 (1):71-81.

2 Barak D, Ordentlich A, Steind D, *et al.* Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. Biochem J, 2009; 417 (1):213-222.

3 Husain MA, Roberts JB, Thomas BH, *et al.* The excretion and metabolism of oral ^{14}C -pyridostigmine in the rat. Br J Pharmacol,1968;34(2):445-450.

4 Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, *et al.* Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: *in vitro* and *in vivo* studies. Pharm Res,2005;22(4):573-583.

5 Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, *et al.* Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. Int J Pharm,2007;330(1-2):155-163.

6 Peng Q, Zhang ZR, Sun X, *et al.* Mechanisms of phospholipid complex loaded nanoparticles enhancing the oral bioavailability. Mol Pharm,2010;7(2):565-575.

7 Yue PF, Zhang WJ, Yuan HL, *et al.* Process optimization, characterization and pharmacokinetic evaluation in rats of ursodeoxycholic acid-phospholipid complex. AAPS Pharm Sci Tech,2008;9(1):322-329.

8 Yue PF, Yuan HL, Li XY, *et al.* Process optimization, characterization and evaluation *in vivo* of oxymatrine-phospholipid complex. Int J Pharm,2010;387(1-2):139-146.

9 Qin X, Yang Y, Fan TT, *et al.* Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergenin-phospholipid complex. Acta Pharmacol Sin,2010;31(1):127-136.

(2012-04-20 收稿,2012-07-25 修回)

编辑 汤洁