

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00053

美斯地浓磷脂复合物的制备及其对大鼠在体肠吸收的促进作用

胡霓霓¹, 杨林², 滕永真¹, 黄开顺¹, 张景劼^{1*}

1. 重庆医科大学药物高校工程研究中心, 重庆 400016
2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

[摘要] **目的** 研究美斯地浓磷脂复合物(MSPLC)对美斯地浓在大鼠体内肠吸收的促进作用。**方法** 制备 MSPLC, 并测定其复合率、理化性质及表观油/水分配系数。选择健康 SD 雄性大鼠 6 只, 分为 2 组, 利用大鼠在体肠吸收模型, 研究 MSPLC 及美斯地浓的吸收速率常数和有效渗透率。**结果** MSPLC 复合率为 $(84.02 \pm 1.68)\%$; MSPLC 的 DSC 图谱中, 美斯地浓的吸收峰消失, 且相变温度比磷脂低; 紫外光谱与美斯地浓的紫外光谱相似; 傅里叶-红外扫描图谱与美斯地浓和磷脂的物理混合物有明显的不同。MSPLC 平均粒径为 (204.6 ± 0.3) nm, zeta 电位为 (-25.12 ± 0.16) mV, 粒径分布基本符合正态分布; 肠循环中美斯地浓回收率与精密度符合要求; MSPLC 表观油/水分配系数约为美斯地浓原料药的 17 倍; MSPLC 的吸收速率常数和有效渗透率分别是美斯地浓的 2.32 倍和 2.52 倍。**结论** MSPLC 能明显改善美斯地浓在大鼠小肠的吸收。

[关键词] 美斯地浓; 磷脂类; 磷脂复合物; 肠吸收

[中图分类号] R 943.44

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)01-0053-05

Preparation of mestinon-phospholipid complex and its promoting effect on intestinal absorption in rats

HU Ni-ni¹, YANG Lin², TENG Yong-zhen¹, HUANG Kai-shun¹, ZHANG Jing-qing^{1*}

1. Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

[Abstract] **Objective** To study the role of mestinon-phospholipid complex in promoting the intestinal absorption of mestinon in rats. **Methods** The mestinon-phospholipid complex was prepared and its composition rate, physico-chemical property and N-octanol/water partition coefficient were examined. Six healthy male rats were randomly divided into two groups. Using the rat model of intestinal absorption, we studied the intestinal absorption rate constant and effective permeability of mestinon-phospholipid complex and free mestinon. **Results** The composition rate of mestinon-phospholipid complex was $(84.02 \pm 1.68)\%$. The characteristic endothermal peak of mestinon disappeared in the DSC curve of mestinon-phospholipid complex. The phase transition temperature of the complex was lower than that of phospholipids, the ultraviolet spectrum profile of the complex was similar to that of mestinon, and the infrared spectrum of the complex was significantly different from that of the physical mixture of mestinon and phospholipid. The particle size of mestinon-phospholipid complex was about (204.6 ± 0.3) nm, and its zeta-potential was (-25.12 ± 0.16) mV. The particle size was largely in a normal distribution. Both the coefficient of recovery and precision of mestinon in intestinal circulating fluid met the requirement. The N-octanol/water partition coefficient of mestinon-phospholipid complex was about 17 folds that of mestinon. The absorption rate constant and the effective permeability of mestinon-phospholipid complex were 2.32 and 2.52 folds those of free mestinon, respectively. **Conclusion** The mestinon-phospholipid complex can greatly improve the intestinal absorption of mestinon in rats.

[Key words] mestinon; phospholipids; phospholipid complex; intestinal absorption

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 53-57]

[收稿日期] 2012-09-10 **[接受日期]** 2012-11-28

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20095503120008). Supported by Specialized Research Fund for Doctoral Program of Ministry of Education(20095503120008).

[作者简介] 胡霓霓, 硕士生。现在重庆市妇幼保健院药剂科工作, 重庆 400013。

* 通信作者(Corresponding author). E-mail: zjqrae01@163.com

美斯地浓(mestinson,MS)作为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]。但由于MS是高溶解性、低渗透性药物,其亲水性较强,脂溶性较低,生物利用度较低。鉴于此,本研究制备了美斯地浓磷脂复合物(mestinson-phospholipid complex,MSPLC),并利用大鼠在体肠吸收生物模型,对MSPLC的在体肠吸收情况进行初步研究,以推断磷脂复合物改善吸收的机制。

1 材料

1.1 仪器 HL-1恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);HHS-4S电子恒温不锈钢水浴锅(上海康路仪器设备有限公司);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂 MS(武汉远城科技发展有限公司,纯度99.6%);磷脂(国药化学试剂公司,含60%的磷脂酰胆碱);MSPLC(自制);甲醇(色谱纯,美国新天地科技有限公司);其余试剂为分析纯。

1.3 实验动物 清洁级SD大鼠6只,雄性,体质量(300±20)g,实验前未使用过其他药物(重庆医科大学实验动物中心提供)。

2 方法和结果

2.1 MSPLC的制备方法^[3] 取MS与磷脂(质量比8:1),加入适量乙醇溶解稀释至MS浓度为4mg/mL,置40℃水浴搅拌2h,减压除去反应溶剂,然后加入适量的乙醚,充分溶解其中的磷脂及磷脂复合物,过滤,再用少量的乙醚洗涤。合并滤液及洗液,回收乙醚,剩余物减压干燥得MSPLC。

2.2 MSPLC复合率的计算 MS的初始投药量(X_0)与沉淀量(X_1)的差值即为与磷脂结合的MS量,从而计算出MS与磷脂的复合率,计算公式如下:

$$\text{复合率} = \frac{X_0 - X_1}{X_0} \times 100\%$$

结果MSPLC复合率为(84.02±1.68)%,证明MS与磷脂形成了磷脂复合物,且复合率较高。

2.3 MSPLC的理化性质

2.3.1 差示扫描量热分析法(DSC) 分别取MS、磷脂、MS与磷脂物理混合物以及MSPLC适量,置于铝质样品坩埚中,采用DSC法进行热分析^[4-5]。测定条件:温度0~300℃,升温速度10℃/min,气氛

为氮气。DSC图谱见图1。

由图1可知,MS在160.8℃及256.4℃两处有吸收峰,第一个峰非常尖锐,可能是MS的熔点峰,而第二个峰可能是MS的裂解峰。MS与磷脂物理混合物的DSC图谱几乎是MS与磷脂的叠加,而MSPLC的DSC图谱中,MS的吸收峰消失,且相变温度比磷脂低,表明MS和磷脂间存在分子间相互作用。

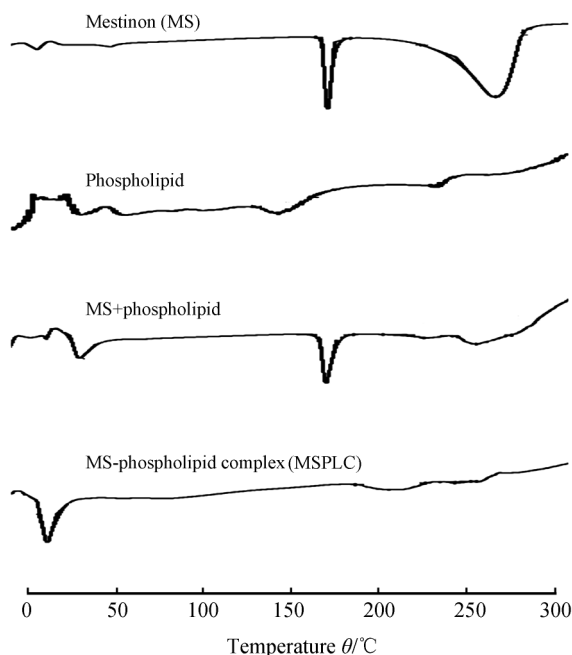


图1 差示扫描量热图谱

Fig 1 The DSC thermograms

2.3.2 紫外光谱分析法(UV) 将MS及MSPLC溶于乙醇,在200~400nm波长范围内进行紫外扫描^[6]。紫外扫描图谱如图2。

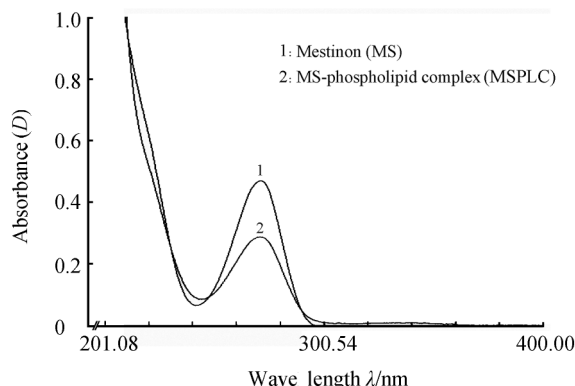


图2 美斯地浓(MS)和美斯地浓磷脂复合物(MSPLC)的紫外光谱图

Fig 2 Ultraviolet spectra of mestinson (MS) and mestinson-phospholipid complex (MSPLC)

实验结果表明, MSPLC 与 MS 的紫外光谱相似,表明 MS 与磷脂之间作用很微弱,且 MSPLC 的发色基团结构没有发生改变。

2.3.3 傅里叶-红外光谱分析法(FT-IR) 采用 KBr 压片法分别对 MS、磷脂、MS 与磷脂物理混合物以及 MSPLC 在 400~4 000/cm 频数范围内进行扫描^[7],结果如图 3 所示。

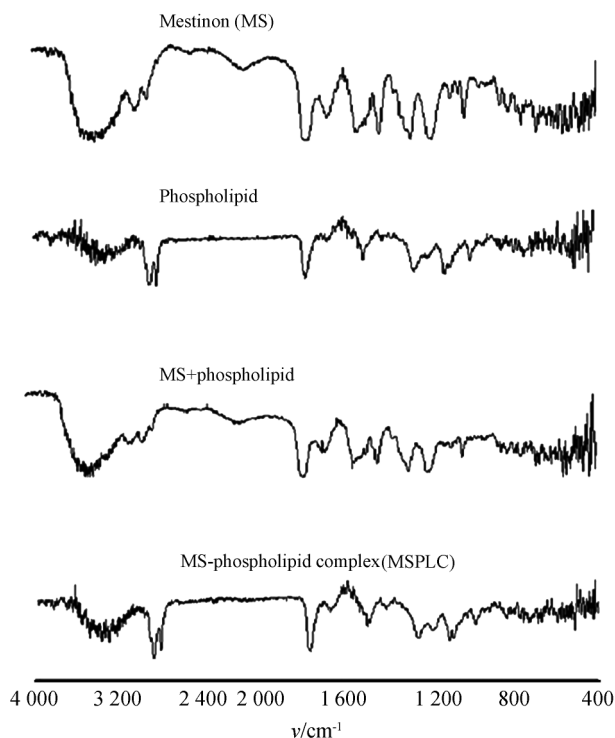


图 3 傅里叶-红外光谱分析

Fig 3 FT-IR spectrum analysis

实验结果表明, MS 与磷脂的物理混合物与 MSPLC 的傅里叶-红外扫描图谱有明显的不同,前者基本上是 MS 与磷脂图谱的叠加,而 MSPLC 图谱中,MS 的一些吸收特征峰消失,但并没有新的吸收峰产生,这说明 MS 与磷脂形成的复合物是通过微弱的氢键或范德华力结合,并未形成新的化合物。

2.3.4 粒径及 zeta 电位测定 将 MSPLC 混悬于 5 ml 双蒸水中,应用激光粒度仪(英国 Malvern 公司)测定其粒径及 zeta 电位^[8-9],实验结果表明,按照最佳优化处方制备的 MSPLC 平均粒径为(204.6 ± 0.3) nm (n=3),zeta 电位为(-25.12 ± 0.16) mV (n=3),粒径分布基本符合正态分布。

2.4 溶液配制 MS 循环液:精密称取干燥至恒质量的 MS 25 mg,用 20 μg/mL 的酚红 Krebs-Ringer 小肠营养液溶解后,定容,配制成质量浓度为 50 μg/

mL 的 MS 循环液。

MSPLC 循环液:取含 25 mg MS 的 MSPLC 于烧杯中,用 20 μg/mL 的酚红 Krebs-Ringer 液溶解后,定容,配制成质量浓度为 50 μg/mL 的 MSPLC 循环液。

2.5 含量测定方法的建立

2.5.1 酚红测定方法的建立 按大鼠小肠吸收常规实验方法^[10],在肠循环液中加入定量酚红,用紫外-可见分光光度法在 558 nm 波长处测定酚红浓度。酚红不被小肠吸收,可用来测定小肠吸收的水分量,以准确计算小肠吸收的药物量。光密度(D)与酚红(C)的标准曲线方程为: $D=0.0191C-0.0894$ ($r=0.9998, n=3$),线性范围为 21.2~47.7 μg/mL。

2.5.2 双波长等吸收法测定肠循环液中 MS 含量^[11] MS 和酚红混合溶液的紫外扫描图如图 4 所示。为了消除酚红对测定的影响,本实验采用双波长等吸收法。由于 269 nm 与 298 nm、481 nm 为酚红的等吸收波长,而 MS 在 481 nm 处无吸收,故选择 481 nm 为等吸收波长。

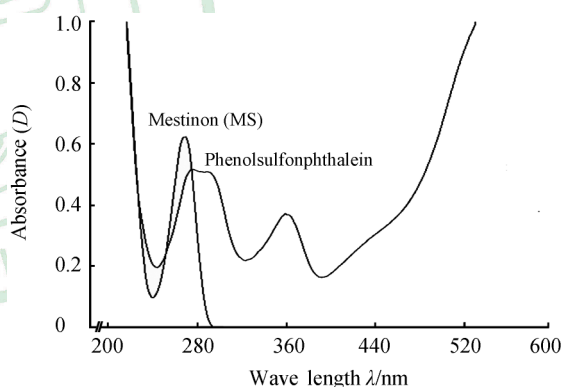


图 4 美斯地浓 (MS) 和酚红的紫外扫描图

Fig 4 Ultraviolet scanning spectrogram of mestinin (MS) and phenolsulfonphthalein

2.5.3 MS 的酚红 Krebs-Ringer 液标准曲线的制备 精密称取 45.5 mg MS 于烧杯中,用 Krebs-Ringer 液溶解,定容,制成质量浓度为 455 μg/mL 的储备液。量取储备液,加入酚红储备液,加 Krebs-Ringer 液稀释得到系列浓度的 MS 酚红 Krebs-Ringer 液,分别在 269 nm 及 481 nm 处测定 D_1 与 D_2 值,计算 $\Delta D=D_1-D_2$,以 ΔD 对 MS 浓度(C)进行线性回归,得到 MS 的酚红 Krebs-Ringer 液标准曲线方程为: $\Delta D=0.0178C-0.0431$ ($r=0.9998, n=3$),线性范围为 13.65~45.5 μg/mL。

2.5.4 回收率及精密度实验 取标准曲线项下储备液,分别制备低、中和高浓度的 MS 酚红 Krebs-Ringer 液,分别在 269 nm 及 481 nm 处测定 D_1 与 D_2 值,计算 $\Delta D = D_1 - D_2$,得到 MS 的浓度。每个浓度平行制备 5 份,计算回收率;在同 1 d 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,结果见表 1。MS 的平均回收率为 $(99.01 \pm 0.59)\%$ 。

表 1 回收率及日内精密度、日间精密度结果

Tab 1 Results of recovery and intra-day and inter-day relative standard derivation(RSD)

Theoretic concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery (%)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
13.5	97.64 ± 0.57	1.07	1.79
29.5	99.73 ± 0.62	0.23	0.63
45.5	99.66 ± 0.56	0.05	0.12

2.6 MSPLC 的表观油/水分配系数 取过量的 MS、MS 与磷脂物理混合物以及 MSPLC,分别溶于 5 mL 蒸馏水中,加入 5 mL 水饱和正辛醇,封口,25 °C 恒温振摇 24 h,加入 10 mL 离心管中,4 000 r/min 离心 15 min,移取水相,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,取 1 mL 加入乙醚 1 mL 萃取,涡旋 30 s,然后 12 000 r/min 离心 10 min,轻轻移去上层(乙醚层),取下层(水层)稀释 10 倍,在 269 nm 处测定光密度值,并计算其含量。表观油/水分配系数(P)计算公式:

$$P = \frac{C_0}{C_w} = \frac{W - C_w \times V_w}{C_w \times V_0}$$

式中, W 代表 MS 总加入量, C_w 代表水中 MS 含量, C_0 代表正辛醇中 MS 含量, V_w 代表水相体积, V_0 代表正辛醇相体积。结果见表 2。

表 2 美斯地浓(MS)、物理混合物以及

美斯地浓磷脂复合物(MSPLC)表观油/水分配系数(P)

Tab 2 N-octanol/water apparent partition coefficient (P) of mestinon (MS), physical mixture of MS+phospholipid and mestinon-phospholipid complex (MSPLC)

$n=3, \bar{x} \pm s$

Sample	Drug concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		P
	Water phrase	Oil phrase	
MS	377.46 ± 11.19	30.54 ± 11.19	0.08
MS+phospholipid	283.76 ± 9.45	124.24 ± 9.45	0.44
MSPLC	170.80 ± 12.50	237.20 ± 12.50	1.39

实验显示 MSPLC 和物理混合物的表观油/水

分配系数分别约为 MS 的 17 倍和 5 倍,说明 MSPLC 的亲脂性较 MS 明显提高。

2.7 大鼠在体肠灌注实验 将 SD 大鼠随机分成 2 组,实验前禁食 12 h,全程不禁水,分别用 MSPLC 及原料药进行在体肠灌注实验。腹腔注射水合氯醛(350 mg/kg),麻醉并固定。沿腹中线打开腹腔约 3 cm,在十二指肠上端和回肠下端分别剪开一个小口,插管结扎,用 37 °C 生理盐水将肠内容物冲洗干净,再用空气排出生理盐水,并将大鼠串联到循环装置中,水浴恒温至 37 °C 的 100 mL 循环液先以 5 mL/min 流速循环 10 min,取样 2 mL 并补充等量等温循环液,计为 0 时,再将流速调至 2.5 mL/min,于 15、30、45、60、90、120 min 取样,同时补加等量等温循环液,测定各时间点 MS 和酚红的浓度。实验后处死大鼠,剪下肠段,测量其长度(l)和内径(r),计算药物吸收速率常数(K_a)和有效渗透率(P_{eff}),公式^[11]如下:

$$K_a = (C_0 - C_t) / C_0 t$$

$$P_{eff} = Q \times \ln(C_{in} / C_{out}) / 2\pi r l$$

上式中, C_0 表示 0 时药物浓度, C_t 表示灌流液中剩余药物浓度, t 表示灌注时间, Q 代表流速, C_{in} 和 C_{out} 分别表示流入和流出的药物浓度。

大鼠在体肠吸收实验经双波长等吸收法测定 MS 含量,计算得到 MSPLC 和 MS 的 K_a 分别为 $(6.74 \pm 0.73) \times 10^{-5} / \text{s}$ 和 $(2.91 \pm 0.28) \times 10^{-5} / \text{s}$ ($P < 0.01$),MSPLC 和 MS 的 P_{eff} 分别为 $(13.80 \pm 0.22) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 和 $(5.47 \pm 0.07) \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ ($P < 0.01$)。

结果可知,将 MS 制成磷脂复合物后其 K_a 和 P_{eff} 均明显提高。MSPLC 的 K_a 和 P_{eff} 均为 MS 的 2 倍以上,说明 MSPLC 能明显改善大鼠对药物的小肠吸收。

3 讨论

研究药物的肠道吸收的生物学方法大体上可分为 3 种:离体实验模型、原位实验模型和细胞培养模型^[12],本研究采用原位实验模型——大鼠在体肠灌注对大鼠小肠吸收进行研究。

MS 与磷脂形成复合物后,表观油/水分配系数约为 MS 的 17 倍,而物理混合物的表观油/水分配系数约为 MS 的 5 倍,说明与 MS 相比,磷脂复合物亲脂性有了明显的提高,且远大于物理混合物。这可能是由于药物与磷脂形成的复合物是一个整体,活性成分通过与磷脂的极性基团相互作用而被固

定,磷脂的2个长脂肪酸链不参与复合反应,可自由移动,包裹了磷脂的极性部位,形成一个亲脂性的表面,多个磷脂复合物分子有序排列,形成球状体。

本研究采用双波长等吸收法测定MS含量,并比较了MSPLC及MS的 K_a 和 P_{eff} ,结果显示MSPLC的 K_a 和 P_{eff} 值均为MS的2倍以上,说明MS磷脂化后能明显改善大鼠小肠吸收。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Leong C F, Aini-Ardena M, Cheong S K, Norris N. Effect of pyridostigmine (mestinin) on human platelet aggregation[J]. *Malays J Pathol*, 2009, 31: 45-52.
- [2] Zhao B, Moochhala S M, Lu J, Tan D, Lai M H. Determination of mestinin and its metabolites in biological samples[J]. *J Pharm Sci*, 2006, 9: 71-81.
- [3] Xiao Y Y, Song Y M, Chen Z P, Ping Q N. Preparation of silybin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats[J]. *Int J Pharm*, 2006, 307: 77-82.
- [4] Zhang J Q, Liu J, Li X L, Jasti B R. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing silibinin[J]. *Drug Deliver*, 2007, 14: 381-387.
- [5] Xu K, Liu B, Ma Y, Du J, Li G, Gao H, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex[J]. *Molecules*, 2009, 14: 3486-3493.
- [6] Banerjee T, Mitra S, Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2002, 243: 93-105.
- [7] Peng Q, Zhang Z R, Sun X, Zuo J, Zhao D, Gong T. Mechanisms of phospholipid complex loaded nanoparticles enhancing the oral bioavailability[J]. *Mol Pharm*, 2010, 7: 565-575.
- [8] Qin X, Yang Y, Fan T T, Gong T, Zhang X N, Huang Y. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of berberine-phospholipid complex[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 127-136.
- [9] Fortuna A, Alves G, Soares-da-Silva P, Falcão A. Optimization of a parallel artificial membrane permeability assay for the fast and simultaneous prediction of human intestinal absorption and plasma protein binding of drug candidates: application to dibenz [b, f]azepine-5-carboxamide derivatives[J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101: 530-540.
- [10] Felice F, Zambito Y, Di Colo G, D'Onofrio C, Fausto C, Balbarini A, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80: 176-184.
- [11] Shen Q, Li X, Li W, Zhao X. Enhanced intestinal absorption of daidzein by borneol/menthol eutectic mixture and microemulsion[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2011, 12: 1044-1049.
- [12] Derakhshandeh K, Hosseinalizadeh A, Nikmohammadi M. The effects of PLGA microparticles on intestinal absorption of p-glycoprotein substrate using the everted rat intestinal sac model[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34: 1989-1997.

[本文编辑] 尹 茶