

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00109

家兔多剂量口服溴吡斯的明缓释片的药动学和生物利用度评价

熊华蓉¹, 谭群友², 廖红¹, 滕永真¹, 王睿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** 以溴吡斯的明普通片为对照, 通过多剂量口服给药后, 评价溴吡斯的明缓释片在兔体内的药动学和生物利用度。 **方法** 6只新西兰兔随机分成两组, 采用自身交叉对照实验, 多剂量口服溴吡斯的明缓释片(90 mg/次, 2次/d)或普通片(60 mg/次, 3次/d)后, 采用高效液相色谱法测定血浆中溴吡斯的明浓度。计算药动学参数和相对生物利用度。 **结果** 家兔体内血浆中药物浓度随时间的变化符合血管外给药二室模型。溴吡斯的明普通片与缓释片给药药动学参数如下: t_{max} 分别为(2.00±0) h和(4.00±0) h; C_{max} 分别为(25.48±0.18) mg/L和(19.24±0.45) mg/L; $AUC_{0-\infty}$ 分别为(321.42±5.00) mg·h·L⁻¹和(370.08±12.23) mg·h·L⁻¹。与普通片相比, 缓释片的相对生物利用度为119.15%。 **结论** 溴吡斯的明缓释片具有缓释动力学特征, 与普通片生物等效。

[关键词] 溴吡斯的明; 迟效制剂; 药动学; 生物利用度

[中图分类号] R 971.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0109-03

Pharmacokinetics and relative bioavailability study of multiple oral doses of pyridostigmine bromide sustained-release tablets in rabbits

XIONG Hua-rong¹, TAN Qun-you², LIAO Hong¹, TENG Yong-zhen¹, WANG Rui¹, ZHANG Jing-qing^{1*}

1. Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical and 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

[Abstract] **Objective** To evaluate the pharmacokinetics and the relative bioavailability of pyridostigmine bromide sustained-release tablets (PBSTs) by comparing with the conventional tablets using a multiple-dose design. **Methods** Six rabbits were randomly divided into 2 groups and were assigned to a self crossover design. The plasma pyridostigmine bromide concentration was determined by high-performance liquid chromatography as multiple oral dose of PBSTs (90 mg each time, and twice a day) or conventional tablets (60 mg each time, three times a day). The pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated. **Results** A two-compartment model was used to describe the *in vivo* behavior of PBSTs after oral administration. The main pharmacokinetic parameters for conventional tablets and multiple oral dose of PBSTs were calculated as the follows: t_{max} (2.00±0) and (4.00±0) h; C_{max} (25.48±0.18) mg/L and (19.24±0.45) mg/L; $AUC_{0-\infty}$ (321.42±5.00) mg·h·L⁻¹ and (370.08±12.23) mg·h·L⁻¹. The relative bioavailability of the sustained-release tablets was 119.15% compared with the conventional tablets. **Conclusion** PBSTs has the property of sustained-release and is bioequivalent to the conventional tablets.

[Key words] pyridostigmine bromide; delayed-action preparations; pharmacokinetics; biological availability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):109-111]

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide)为可逆性抗胆碱酯酶药,能抑制胆碱酯酶的活性,使胆碱能神经末梢释放的乙酰胆碱破坏减少,突触间隙中乙酰胆碱积聚,出现毒蕈碱样和烟碱

样胆碱受体兴奋作用。临床主要用于治疗重症肌无力、手术后功能性肠胀气及尿潴留等^[1],对长期血流不畅造成的神经肌肉衰弱也有良好的疗效^[2]。服用过量时表现为腹泻、恶心、

[收稿日期] 2011-11-23 **[接受日期]** 2011-12-22

[基金项目] 教育部博士点基金(20095503120008),重庆市教育委员会资助项目(首批高等学校优秀人才资助, KJ 090308). Supported by Research Fund for the Doctoral Program of Education Ministry (20095503120008) and Fund of Chongqing Education Committee (the First Round of Fund for Excellent Talent of Higher Education, KJ 090308).

[作者简介] 熊华蓉, 博士生. E-mail: xhr77@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

呕吐、胃痉挛、汗及唾液增多等不良反应,溴吡斯的明普通片(60 mg/片),每天需服用3次,而且胃肠道吸收差,生物利用度低^[3]。研制溴吡斯的明缓释片旨在减少患者服药次数和不良反应,提高患者顺应性,更好地发挥药效,本品90 mg/片,12 h给药一次。本实验采用高效液相色谱法测定溴吡斯的明在血浆中的浓度,用普通市售片作为参比制剂,研究多剂量口服溴吡斯的明缓释片和参比制剂在体内的药代动力学,评价缓释片的生物利用度。

1 材料

1.1 仪器 分析电子天秤(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司);LC-2010A HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);TGL-16B 高速台式离心机(江苏省金坛市大地自动化仪器厂);PHS-3C 型 pH 测定仪(上海精密科学仪器有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2 药品、试剂和动物 溴吡斯的明缓释片(90 mg/片,实验室自制);溴吡斯的明市售片(60 mg/片,上海三维制药有限公司,批号 200904c03);溴吡斯的明对照品(纯度 99.6%,武汉远城科技发展有限公司);溴新斯的明(纯度 99.6%,武汉远城科技发展有限公司);甲醇、乙腈、庚烷磺酸钠均为色谱纯。清洁级新西兰大耳白兔由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(渝)2007-0001。

2 方法和结果

2.1 血浆中溴吡斯的明含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Lichrospher C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:庚烷磺酸钠(0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与磷酸二氢钠,用磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(76:24);流速:1 ml/min;检测波长:269 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。

2.1.2 血浆样品处理^[4] 精密取血浆样品 0.2 ml,加入内标溶液 20 μl、0.1 mol/L 苦味酸溶液(pH 7.0)100 μl、0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 80 μl、水饱和二氯甲烷 2.5 ml,混合 5 min,600×g 离心 10 min,水相中加入 0.1 mol/L 四丁基氯化铵溶液 200 μl,混合 30 s,600×g 离心后取 20 μl 上清液进样分析。色谱图见图 1。溴吡斯的明和内标的保留时间分别为 5.27 min 和 8.32 min,峰形良好,无杂质峰干扰,说明在 2.1.1 色谱条件下,高效液相色谱的方法专属性好。

2.1.3 标准曲线和检测限 配制质量浓度分别为 0.25、2.5、5、12.5、25、50、100 mg/L 的溴吡斯的明血浆样品,按照 2.1.2 项下的方法处理后进样分析。以标准血浆质量浓度 C(mg/L)为横坐标,待测物与内标的峰面积比值 A(A_s/A_i)为纵坐标,线性回归方程为:A=0.025C-0.006 6(n=7),r=0.999 1,结果表明,溴吡斯的明血药浓度在 0.25~100 mg/L 峰面积比与浓度呈良好的线性关系。在选定的色谱条件下,信噪比为 3 时,血浆中溴吡斯的明浓度的最低检测限为 0.03 mg/L。

2.1.4 精密度和回收率 配制成高、中、低(100、12.5、0.25 mg/L)3 种浓度的溴吡斯的明血浆样品,按 2.1.2 项下操作方法处理后进样分析。连续测定 5 d,所测得日内 RSD 分别为 1.1%、0.2%、0.5%(n=5);日间 RSD 分别为 1.8%、0.6%、0.1%(n=5)。以测定值与实际值之比计算回收率,3 个浓度

的平均相对回收率分别为 90.0%、97.6%、97.4%,RSD 分别为 1.2%、0.18%、0.35%。将血浆样品峰面积比与相应浓度的标准溶液的峰面积相比,得提萃取回收率分别为 95.2%、92.0%、96.4%,RSD 分别为 1.7%、0.3%、1.3%,精密度和回收率均符合含量测定要求。

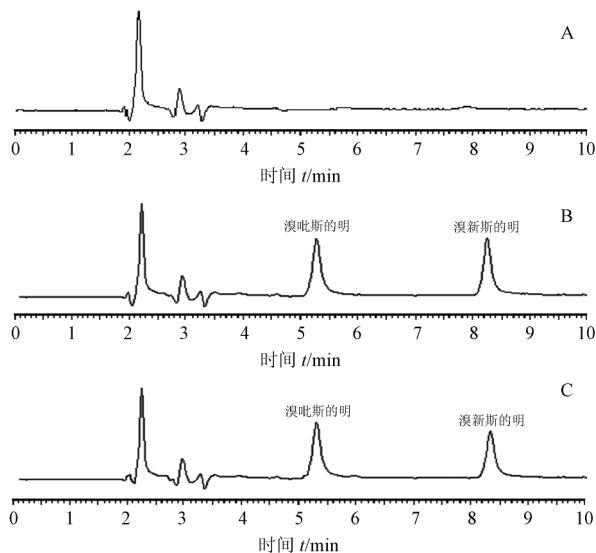


图 1 高效液相色谱图

A: 空白血浆; B: 空白血浆加溴吡斯的明及内标; C: 血浆样品

2.1.5 稳定性考察 将高、中、低 3 种质量浓度的溴吡斯的明血浆样品分别置于室温和 4℃ 条件下存放不同时间,按照血浆样品的处理后进样分析,以药物峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)之比为指标考察样品放置的稳定性。结果表明血浆样品在室温条件下至少能稳定 4 h,在 4℃ 条件下至少能稳定 48 h。

2.2 药代动力学研究

2.2.1 给药方法^[5] 6 只家兔随机分为两组,第 1 组给予缓释片(90 mg/片),第 2 组给予参比制剂(60 mg/片),采用多剂量双周期交叉口服溴吡斯的明缓释片或参比制剂。受试制剂为 90 mg/次,于每日早 7:00 和晚 19:00 各服药一次;参比制剂为 60 mg/次,早 7:00、下午 15:00 和晚 23:00 各服药一次,连续 7 d。两组分别于第 5 天晨给药前、第 6 天晨给药前、第 7 天晨给药前于耳缘静脉取血,作为稳态浓度。第 7 日晨空腹给药后,分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、24、36、48 h 耳缘静脉取血,取血量约 1 ml,置于肝素化塑料离心管中,离心分离血浆,置 -20℃ 低温保存待测。经 1 周洗脱期后,两组进行交叉试验,给药、采血方案相同。

2.2.2 血药浓度-时间曲线 通过口服给药后,均在预定时间点采血,血浆样品处理后检测浓度,血药浓度-时间关系见图 2。

2.2.3 药动学参数 将测得的血药浓度-时间数据用 DAS 2.11 软件拟合处理,分别选用一室模型、二室模型及统计矩参数对溴吡斯的明普通片和缓释片的血药浓度数据进行处理,并对结果进行分析。结果见表 1。

结果表明家兔体内血浆中药物浓度随时间的变化符合血管外给药二室模型,权重为 1/C²。以相应的模型为基础,计算其主要药代动力学参数,两种制剂的主要参数见表 2。

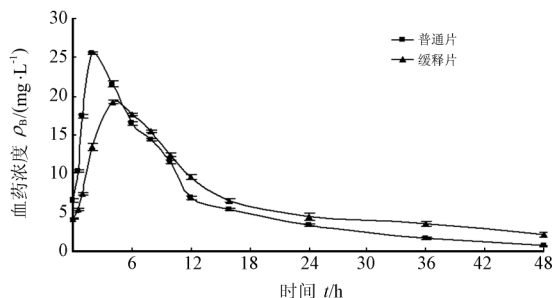


图2 多剂量口服溴吡斯的明缓释片和普通片后平均血药浓度-时间曲线

$n=6, \bar{x} \pm s$

表1 溴吡斯的明普通片和缓释片的药代动力学房室模型拟合

模型	权重	普通片		缓释片	
		AIC	R ²	AIC	R ²
一室模型	1	51.83	0.96	52.77	0.92
	1/C	24.69	0.995	27.20	0.989
	1/C ²	-2.31	0.999	-0.07	0.999
二室模型	1	58.84	0.965	49.85	0.952
	1/C	18.63	0.998	21.72	0.994
	1/C ²	-11.66	1	-5.37	0.999

AIC: 阿凯克准则

表2 多剂量口服溴吡斯的明普通片和缓释片后的主要药动学参数

参数	$n=6, \bar{x} \pm s$	
	普通片	缓释片
t_{max} t/h	2.00±0	4.00±0
C_{max} ρ_B /(mg·L ⁻¹)	25.48±0.18	19.24±0.45
$t_{1/2}$ t/h	11.05±0.75	17.57±2.45
K_a	0.41±0.01	0.24±0.01
K_{10}	0.18±0.01	0.15±0.01
K_{12}	0.06±0.06	0.01±0.02
K_{21}	0.17±0.01	0.10±0.01
CL (L·h ⁻¹)	0.07±0.01	0.05±0.01
$AUC_{0-\infty}$ (mg·h·L ⁻¹)	321.42±5.00	370.08±12.23
$MRT_{0-\infty}$ t/h	14.00±0.48	24.03±1.83

CL: 药物清除率; MRT: 平均滞留时间

根据以下公式用药-时曲线下面积 $AUC_{0-\infty}$ 计算溴吡斯的明缓释片的相对生物利用度: $F = AUC_{(T)} / AUC_{(R)} \times 100\%$, 式中 T、R 分别为溴吡斯的缓释片和普通片。计算得到溴吡斯的明缓释片的相对生物利用度为 119.15%。

将主要药动学参数 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 经对数转化后进行生物等效性分析与方差分析,行双单侧 t 检验和 90% 置信区间检验,结果见表 3。

表3 多剂量口服给药后溴吡斯的明普通片和缓释片的生物等效性评价

评价方法		$\lg AUC_{0-t}$	$\lg AUC_{0-\infty}$	$\lg C_{max}$	T_{max}
F 检验	制剂间	0.039	0.198	0.356	
	个体间	0.041	0.206	0.361	
双单侧 t 检验	90% 置信区间	88%~111%	89%~110%	93%~164%	
	许可范围	80%~125%	80%~125%	70%~143%	
秩和检验					$T_1=45, T_2=10$
结论		生物等效	生物等效	生物等效	有统计学差异

临界值: $F_{0.05(1,16)} = 4.49, T_{0.05(9,9)} = 3 \sim 25$

3 讨论

本实验建立了用反相离子对高效液相色谱法测定溴吡斯的明的方法,血样处理方法的萃取回收率较高,且杂质干扰较少。因为溴吡斯的明在色谱柱上的保留较弱,采用离子对色谱法可增加其保留时间,减少杂质峰的干扰,与文献^[6]报道的高比例水相洗脱药物后再用梯度洗脱杂质峰的液相方法相比,节省了分析时间,提高了色谱柱的耐用性和重现性。

溴吡斯的明普通制剂每天需服药 3 次,本实验制备的缓释片每天服药 2 次,给药频率有所减少,而且溴吡斯的明缓释片药物浓度较普通片平稳,能降低不良反应发生的可能。实验结果表明,缓释片与普通片比较,达峰时间与平均保留时间延长,达峰浓度有所下降,表现出明显的缓释效果。本实验建立的多剂量溴吡斯的明缓释片的药动学模型,为临床安全用药提供了依据。

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] Frick C G, Helming M, Martyn J A, Blobner M, Fink H. Continuous administration of pyridostigmine improves immobilization-induced neuromuscular weakness[J]. Crit Care Med, 2010, 38:922-927.
- [2] Maselli R A, Henderson J D, Ng J, Follette D, Graves G, Wilson B W. Protection of human muscle acetylcholinesterase from soman by pyridostigmine bromide [J]. Muscle Nerve, 2011, 43:591-595.
- [3] Huang Y T, Tsai T R, Cheng C J, Cham T M, Lai T F, Chuo W H. Formulation design of a highly hygroscopic drug (pyridostigmine bromide) for its hygroscopic character improvement and investigation of *in vitro/in vivo* dissolution properties[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2007, 33:403-416.
- [4] De Ruyter M G, Cronnelly R. Reversed-phase, ion-pair liquid chromatography of quaternary ammonium compounds; determination of pyridostigmine, neostigmine and edrophonium in biological fluids [J]. J Chromatogr, 1980, 183:193-201.
- [5] 郭扬波,温预关,马 崔.安非他酮缓释片多剂量给药生物等效性研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17:1160-1163.
- [6] 付文焕,施孝金,李中东.人血浆中溴吡斯的明浓度的 RP-HPLC 测定法[J]. 中国药理学杂志, 2007, 6:924-926.

【本文编辑】尹 茶