文章编号:1000-5404(2011)18-1917-03

论著

溴吡斯的明脂质体体外释放和大鼠离体肠吸收的研究

张 梨[1],谭群友[2],尹华峰[1],陶绍霖[2],刘 雨[1],张景勋[1] (400016 重庆,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[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心[2])

[摘要] **目的** 制备溴吡斯的明脂质体,考察其体外释药性质及各肠段的吸收情况。**方法** 采用逆向蒸发法制备溴吡斯的明脂质体,测定其包封率,考察脂质体体外释放情况;运用大鼠离体外翻肠囊模型,采用RP-HPLC法测定肠囊液中溴吡斯的明浓度,考察脂质体肠道吸收行为。**结果** 脂质体包封率为(51.81±2.15)%,72 h累积释放率(95.08±4.02)%;脂质体能显著增加溴吡斯的明在十二指肠、空肠、回肠和结肠段的吸收($P<0.05$);溴吡斯的明溶液和脂质体在各肠段表观渗透系数分别为$(1.41\pm0.73)\times10^{-5}$、$(2.21\pm0.62)\times10^{-5}$、$(2.13\pm0.27)\times10^{-5}$、$(1.30\pm0.79)\times10^{-5}$ cm/s和$(1.53\pm0.38)\times10^{-5}$、$(2.67\pm0.55)\times10^{-5}$、$(2.39\pm0.42)\times10^{-5}$、$(2.59\pm0.70)\times10^{-5}$ cm/s,其中两者结肠段表观渗透系数值差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 脂质体在体外介质中具有一定缓释作用。通过增加渗透性有望提高溴吡斯的明在体内生物利用度。

[关键词] 溴吡斯的明脂质体;体外释放;外翻肠囊法;肠吸收
[中图法分类号] R971.92;R944.9;R961 [文献标志码] A

In vitro release and intestinal absorption of pyridostigmine bromide liposome

Zhang Li[1], Tan Qunyou[2], Yin Huafeng[1], Tao Shaolin[2], Liu Yu[1], Zhang Jingqing[1] ([1] Drug Engineering Research Center, Key Laboratory of Biochemical&Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2] Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the *in vitro* release and intestinal absorption of pyridostigmine bromide liposome. **Methods** Pyridostigmine bromide liposome was prepared by reverse phase evaporation to detect its encapsulation and *in vitro* liposome release. An *in vitro* everted intestinal sac model was used to observe the intestinal absorption of liposome and measure the concentration of pyridostigmine bromide in intestine by RP-HPLC. **Results** The capsulation rate of liposome was 95.08% ±4.02% and its 72 h cumulative release rate was 51.81% ±2.15%, indicating that liposome could significantly increase the absorption of pyridostigmine bromide in duodenum, jejunum, ileum and colon ($P<0.05$). The apparent permeability coefficient (Papp) of pyridostigmine bromide solution and liposome in different intestinal segments was $(1.41\pm0.73)\times10^{-5}$ cm/s, $(2.21\pm0.62)\times10^{-5}$ cm/s, $(2.13\pm0.27)\times10^{-5}$ cm/s, $(1.30\pm0.79)\times10^{-5}$ cm/s and $(1.53\pm0.38)\times10^{-5}$ cm/s, $(2.67\pm0.55)\times10^{-5}$ cm/s, $(2.39\pm0.42)\times10^{-5}$ cm/s, and $(2.59\pm0.70)\times10^{-5}$ cm/s, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Liposome release is delayed in *in vitro* medium, thus increasing the bioavailability of pyridostigmine bromide *in vivo* by its enhancing its permeability.

[**Key words**] pyridostigmine bromide liposome; drug release *in vitro*; everted intestinal sac; intestinal absorption

Supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Ministry of Education (20095503120008) and the Project of Chongqing Municipal Education Committee (the First Funds for Excellent Personnel of High Colleges and Universities, KJ090308). Corresponding author: Zhang Jingqing, E-mail: zjqrae01@163.com

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide)为季铵类化合物,是可逆性胆碱酯酶抑制剂。溴吡斯的明作用与新斯的明相似,作用稍弱,但维持时间较久,不良反应少,主要用于治疗重症肌无力,手术后功能性肠胀气和尿潴留[1-2]。据报道,99%胆碱酯酶抑制剂(包括溴吡斯的明)主要口服给药[3]。该药水溶性好,胃肠道中吸收较差,生物利用度低[4]。脂质体(liposome)作为药物载体,可增加药物稳定性[5],提高药物生物利用度[6-7]等。本研究以溴吡斯的明作为模型药物制备成脂质体,

[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,KJ090308)
[通信作者] 张景勋,E-mail: zjqrae01@163.com

采用大鼠外翻肠囊法考察其在各肠段的吸收情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),THZ-82A水浴恒温振荡器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司),KQ2200B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),电子恒温不锈钢水浴锅(上海康路仪器设备有限公司),Zetasizer Nano纳米粒度仪/Zeta电位检测仪(英国Malvern公司),SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(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),PHS-25型数显pH计(上海智光仪器仪表有限公司),UV-3150紫外分光光度仪(日本岛津公司),肠吸收装置(自制)。

1.1.2 试药 溴吡斯的明(纯度99.6%,武汉远城科技发展有限公司),溴吡斯的明脂质体(自制),庚烷磺酸钠(色谱级,山东省禹城市中美色谱产品厂),透析袋(USA,截留相对分子质量8 000~14 400),卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司),胆固醇(广州天马精细化工厂),葡聚糖凝胶(SephadexG-50,Pharmacia进口分装),K-R小肠营养液:NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、$CaCl_2$ 0.37g、NaH_2PO_4 0.32 g、$NaHCO_3$ 1.37 g、$MgCl_2$ 0.02 g、葡萄糖1.4 g溶解并稀释至1 000 ml,调节pH 7.2~7.4。乙腈和甲醇均为色谱级,其他试剂为分析纯。

1.1.3 动物 SD大鼠,雄性,质量230~250 g,重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(渝)2007-0001,实验前未使用过其他药物。

1.2 方法

1.2.1 脂质体的制备 采用逆相蒸发法制备溴吡斯的明脂质体。称取处方量卵磷脂和胆固醇于圆底烧瓶中,加入氯仿适量溶解完全,旋蒸仪上减压挥干氯仿,瓶壁形成一层薄膜,再加入混合溶剂(氯仿和乙醚)静置使其溶解完全,加入pH 7.4药物缓冲液,超声8~10 min(水浴温度保持10 ℃以下),至形成稳定W/O型初乳。将此混悬液于旋转蒸发仪上减压除有机溶剂至在瓶壁上形成凝胶,继续旋蒸至凝胶完全脱落得到均匀乳白色混悬液。挤压过膜(0.22 μm),4 ℃放置。

1.2.2 包封率的测定 取葡聚糖凝胶G-50干胶颗粒适量,蒸馏水充分溶胀过夜,倾去上层漂浮的极细的颗粒,超声脱气,装于层析柱(1.5 cm×40 cm)中,空白脂质体饱和凝胶床。移取脂质体0.5 ml上样,以0.01 mol/L PBS为洗脱液,流速0.25 ml/min,收集含脂质体部分的洗脱液,定容,取样1 ml。另取未过柱的脂质体混悬液0.5 ml,定容,各加乙醚破乳,涡旋3 min,离心,取下层液测定光密度值,计算包封率。药物在0.01 mol/L PBS中标准曲线方程为A = 0.018 1C + 0.008 8(r=0.999 9,n=7),A为紫外光密度值,C为浓度(μg/ml)。溴吡斯的明浓度在16.64~41.60 μg/ml线性良好。高、中、低浓度日内RSD分别为0.88%、0.99%、0.40%,日间RSD分别为1.96%、1.08%、0.60%。加样回收率试验测得总平均回收率为98.49%,RSD为1.17%。

1.2.3 体外释放动力学 将处理好的透析袋结扎一端,精密取脂质体1.0 ml放入袋中,结扎另一端。把透析袋浸没到PBS(pH 7.4)透析液中,水浴恒温振荡(37 ℃,75 r/min)分别于不同时间点取样,测定透析外液溴吡斯的明含量,计算累积释放率。

1.2.4 外翻肠囊法实验 实验前将大鼠禁食18 h(不禁水),用3.5%的水合氯醛(0.1 ml/g)腹腔注射麻醉。沿腹中线打开腹腔后小心分离小肠,去除肠系膜和脂肪。分别取十二指肠、空肠、回肠、结肠10 cm置于4 ℃的K-R液中清洗至无血色。肠段一端结扎并轻柔翻转使小肠黏膜面向外,浆膜侧向内,用4 ℃ K-R液清洗小肠内容物。将小肠的另一端固定于取样口上。各肠段区间如下:十二指肠段自幽门1 cm处开始,空肠段离幽门15 cm开始,回肠段距离盲肠上行处20 cm开始,结肠段从盲肠后段开始,以考察供试液是否呈特定部位吸收[8]。用注射器从取样口处向肠内注2 ml空白K-R液作为受药体系,然后分别将其垂直放入含有已知浓度药物溶液或脂质体(25 μg/ml)的试管中,在试管中通入O_2,整个装置放入37 ℃恒温水浴中。分别于15、30、45、60、75、90 min用取样针从肠囊内取样0.5 ml,同时补充同体积的37 ℃空白K-R液。样品于-80 ℃下保存至测定。

1.2.5 样品处理 精密量取样品200 μl于1.5 ml EP管中,加入色谱级甲醇400 μl,涡旋混匀3 min,10 000 r/min离心5 min,取上清液检测。

1.2.6 肠囊样液浓度测定 采用RP-HPLC法测定肠囊样液浓度。色谱条件:色谱柱:Hypersil ODS2柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:水相:乙腈:三乙氨=90:10:0.5(体积比,含庚烷磺酸钠1.0 g,磷酸调pH值至3.0);流速:1.0 ml/min;检测波长:270 nm;柱温:25 ℃,进样量:100 μl。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对各肠段累积吸收量和表观渗透系数(Papp)行t检验。

2 结果

2.1 脂质体粒径、电位及包封率

脂质体用去离子水稀释适量倍数,用激光粒径分析仪和Zeta电位分析仪分别测定脂质体的平均粒径和Zeta电位。测得脂质体呈电中性;平均粒径为141.9 nm,多分散系数为0.265;包封率为(51.81±2.15)%。

2.2 体外释药动力学

在释放条件下,脂质体前12 h释放速率较快,可能药物水溶性强,一部分未包被的游离药物首先较快的释放;经过72 h,脂质体累积释放百分率达到(95.08±4.02)%,制备的脂质体有一定缓释效果(图1)。

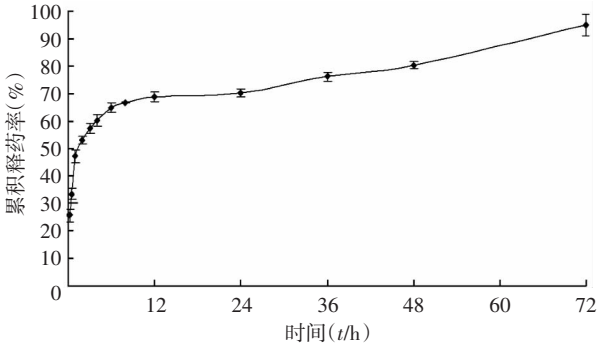
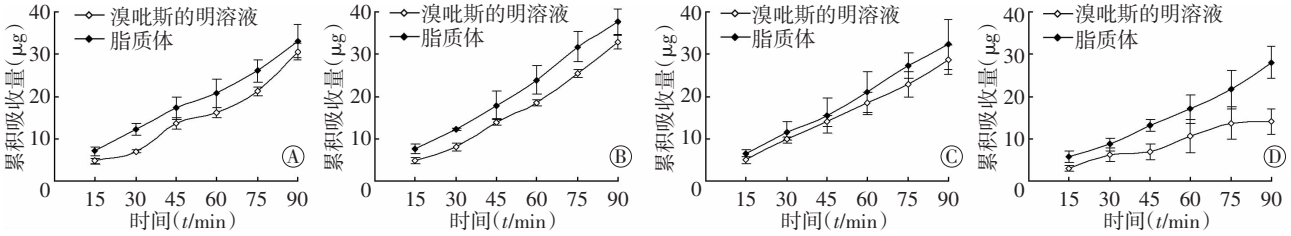


图1 药物累积释放率曲线



A:十二指肠;B:空肠;C:回肠;D:结肠

图2 原料药和脂质体在不同肠段累积吸收

2.3 溴吡斯的明溶液和脂质体在各肠段吸收

经甲醇沉淀后,脂质体辅料和肠囊内源性杂质对药物测定无干扰,溴吡斯的明保留时间为6.67 min。峰面积A和浓度C进行线性回归,其回归方程A=33.805C+8.190(r=0.999 8)。溴吡斯的明浓度在0.5~25 μg/ml线性良好。精密度考察结果:日内RSD分别为0.89%、0.77%、0.97%,日间RSD分别为1.02%、0.99%、1.10%,稳定性良好。加样回收率实验测得总平均回收率为96.61%,RSD为1.21%。

以溴吡斯的明溶液为对照,脂质体在肠各段累积吸收量见图2:药物在肠道基本按线性吸收;在90 min内,药物吸收量按空肠、十二指肠、回肠、结肠降低;与溴吡斯的明溶液比较,制备成脂质体后,外翻肠囊模型中药物在各个肠段的吸收都显著增加。

药物不同肠段的表观渗透系数有差异,表观渗透系数值按空肠、回肠、十二指肠、结肠递减;脂质体与溴吡斯的明溶液相比,表观渗透系数在4个肠段都增加,经t检验,结肠表观渗透系数值有统计学意义(P<0.05),其他肠段无显著性差异(表1)。

表1 原料药和脂质体在各肠段的表观渗透系数($\times10^{-5}$,cm/s,$\bar{x}\pm s$)

样品	十二指肠	空肠	回肠	结肠
溴吡斯的明溶液	1.41±0.73	2.21±0.62	2.13±0.27	1.30±0.79
脂质体	1.53±0.38	2.67±0.55	2.39±0.42	2.59±0.70[a]

a:P<0.05,与溴吡斯的明溶液比较

3 讨论

脂质体有较好组织亲和性,是提高药物口服生物利用度的优良载体[9]。对于高水溶性药物,脂质体包封率是关键问题。本研究采用逆向蒸发法制备得到的溴吡斯的明脂质体包封率达(51.81±2.15)%,但仍有待提高。

测定脂质体包封率,采用乙醚萃取法测定脂质体中药物量,萃取处理后卵磷脂对测定无干扰。由于药物不溶于乙醚,萃取后药物溶于PBS在下层,上层则为乙醚和脂质辅料。与HPLC法相比,该法更经济、简单实用。

溴吡斯的明是生物药剂学分类系统(biopharmaceutical classification system, BCS)Ⅲ类药物,即高溶解性、低渗透性,生物膜是其吸收的屏障,药物的跨膜转运是吸收的限速过程[10]。从研究结果来看,在外翻肠囊模型中,溴吡斯的明制备成脂质体后药物在小肠和结肠的累积吸收量及表观渗透系数增加,说明脂质体载体能够提高药物的渗透性,但能否提高口服生物利用度,尚需通过体内生物利用度研究进行确证。

参考文献:

[1] 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.

[2] Zhao B, Moochhala S M, Lu J, *et al*. Determination of pyridostigmine bromide and its metabolites in biological samples [J]. J Pharm Sci, 2006, 9(1): 71-81.

[3] Sghirlanzoni A, Pareyson D, Benvenuti C, *et al*. Efficacy of intranasal administration of neostigmine in myasthenic patients[J]. J Neurol, 1992, 239(3): 165-169.

[4] Kluwe W M, Page J G, Toft J D, *et al*. Pharmacological and toxicological evaluation of orally administered pyridostigmine in dogs[J]. Fundam Appl Toxicol, 1990, 14(1): 40-53.

[5] Slabbert C, Plessis L H, Kotze A F. Evaluation of the physical properties and stability of two lipid drug delivery systems containing mefloquine[J]. Int J Pharm, 2011, 409(1/2): 209-215.

[6] Song Y K, Hyun S Y, Kim H T, *et al*. Transdermal delivery of low molecular weight heparin loaded in flexible liposomes with bioavailability enhancement: comparison with ethosomes[J]. J Microencapsul, 2011, 28(3): 151-158.

[7] Date A A, Joshi M D, Patravale V B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(6): 505-521.

[8] Carreno-Gomez B, Duncan R. Everted rat intestinal sacs: a new model for the quantitation of P-glycoprotein mediated-efflux of anticancer agents[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5A): 3157-3161.

[9] Takahashi M, Uechi S, Takara K, *et al*. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(19): 9141-9146.

[10] Cheng C L, Yu L X, Lee H L, *et al*. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet[J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 22(4): 297-304.

(**收稿**:2011-04-28;**修回**:2011-05-23)

(编辑 张 维)