文章编号:1000-5404(2012)14-1411-03

论著

溴吡斯的明12 h缓释片的体外释放行为相关性研究

熊华蓉[1],谭群友[2],赵德璋[1],王 睿[2],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胸外科[2])

[摘要] **目的** 测定溴吡斯的明缓释片的体外释放和体内药代动力学,并研究其体内外相关性。**方法** 按《中国药典》2010版二部附录XD释放度测定第二法,以磷酸缓冲液为释放介质,采用紫外分光光度法测定溴吡斯的明的累积释放百分率。6只新西兰兔采用自身交叉给药方案,单剂量口服溴吡斯的明缓释片和普通片后,采用HPLC-紫外色谱法测定不同时间点的体内血药浓度。**结果** 溴吡斯的明缓释片12 h体外累积释放率达98.6%,其体内药动学参数如下:t_{max}为(4.001±0.004)h;C_{max}为(15.442±0.215)mg/L;$AUC_{0-\infty}$为200.557±3.357。Loo-Riegelman法计算溴吡斯的明缓释片体内外的相关性,其体内累积吸收百分率与体外累积释放百分数X建立的线性回归方程为:$f_a = 0.485\ 1\ f_r + 3.837\ 7$,$r = 0.986\ 5$,大于临界值$r_{6,0.01}$($P<0.01$)。**结论** 溴吡斯的明缓释片释放行为的体内外相关性显著,通过体外释放行为可预测其体内释放动力学。

[关键词] 溴吡斯的明;药代动力学;体内外相关性
[中图法分类号] R944.9;R969.1;R971.91 [文献标志码] A

Correlation between *in vitro* release of pyridostigmine bromide slow-release tablet and its *in vivo* pharmacokinetics

Xiong Huarong[1], Tan Qunyou[2], Zhao Dezhang[1], Wang Rui[2], Zhang Jingqing[1] ([1]Medicine Engineering Research Center, Key Laboratory of Biochemical&Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Center of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between *in vitro* release of pyridostigmine bromide slow-release tablet and its *in vivo* pharmacokinetics. **Methods** Accumulative release percentage of pyridostigmine bromide slow-release tablet was assayed by ultraviolet spectroscopy with phosphate buffer as a dissolution medium according to the XD release assay in 2010 edition of *Chinese Pharmacopeia*. After 6 New Zealand rabbits were given a single oral dose of pyridostigmine bromide slow-release or conventional tablet, their serum drug concentration was measured at different time points by HPLC-ultraviolet spectroscopy. **Results** The 12 h *in vitro* accumulative release rate of pyridostigmine bromide slow-release tablet was 98.6%. The main *in vivo* pharmacokinetic parameters for pyridostigmine bromide slow-release tablet were $t_{max} = 4.001 \pm 0.004$ h, $C_{max} = 15.442 \pm 0.215$ mg/L, and $AUC_{0-\infty} = 200.557 \pm 3.357$. The correlation between the *in vitro* release of pyridostigmine bromide slow-release tablet and its *in vivo* pharmacokinetics was assayed with the Loo-Riegelman method. The linear regression equation for the *in vivo* accumulative absorption percentage and the *in vitro* accumulative release percentage of pyridostigmine bromide slow-release tablets was $f_a = 0.485\ 1\ f_r + 3.837\ 7$, $r = 0.986\ 5$, higher than the critical value $r_{6,0.01}$ ($P<0.01$). **Conclusion** The *in vivo* release of pyridostigmine bromide slow-release tablet is significantly correlated with its *in vitro* release. The *in vitro* release of pyridostigmine bromide slow-release tablet can predict its *in vivo* pharmacokinetics.

[**Key words**] pyridostigmine bromide; pharmacokinetics; *in vitro-in vivo* correlation

Supported by the Fund for the Doctoral Program of Ministry of Education (20095503120008), and the Project of Chongqing Municipal Education Committee (the First Batch of Excellent Personnel From High Colleges and Universities, 2009). Corresponding author: Zhang Jingqing, E-mail: zjqrae01@163.com

[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(2009首批高等学校优秀人才资助)
[通信作者] 张景勋,E-mail:zjqrae01@163.com

溴吡斯的明(pyridostigmine bromide),溴化1-甲基-3-羟基吡啶翁二甲氨基甲酸酯,为拟胆碱药、抗胆碱酯酶药,广泛用于重症肌无力,手术后功能性肠胀气及尿潴留等的治疗。该药能提高胃肠道、支气管平滑肌和全身骨骼肌的肌张力,能缓减患者腹部外科手术后的疼痛,可促进胃收缩和增加胃酸分泌,对食道明显弛缓和扩张的患者能有效地提高其食道张力[1],目前也有与其他药物联合应用治疗长春新碱引起的小儿神经病和血小板聚集[2-3]。溴吡斯的明普通片口服吸收差、清除快,半衰期短,个体差异大。为了克服目前溴吡斯的明普通片的缺点,我们研制了溴吡斯的明12 h缓释片,本研究对其体内外释放特性的相关性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 LC-2010A HT高效液相色谱仪器(日本岛津公司);分析电子天秤(瑞士Mettler Toledo仪器公司);CX-250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);GL-88B旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);KA-1000型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);PHS-3C型pH测定仪(上海精科仪器有限公司);单道可调量程微量移液器(芬兰DRAGON公司)。

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,批号:20080710);溴新斯的明对照品(纯度>99%,武汉远城科技发展有限公司,批号:20080302);羟丙甲基纤维素(HPMC,山东聊城阿华制药有限公司);乙基纤维素(EC,山东聊城阿华制药有限公司);乳糖(山东聊城阿华制药有限公司);庚烷磺酸钠、甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 溴吡斯的明的含量测定 精密称取适量的溴吡斯的明对照品用蒸馏水配成一定浓度的溶液,在200~400 nm间进行紫外扫描,确定最大吸收波长。同时将所有辅料按处方用量称取,并用蒸馏水配成一定浓度的溶液,超声10 min后用0.45 μm的微孔滤膜滤过,滤液于200~400 nm间进行紫外扫描。精密量取不同体积储备液于10 ml容量瓶中,加蒸馏水定容后,在269 nm处测定吸收度,以浓度C对吸收度A进行线性回归,绘制标准曲线。

1.2.2 体外释放度的测定 按《中国药典》2010版附录XD释放度测定法进行测定。向溶出杯加入900 ml蒸馏水,调节温度为(37.0±0.5)℃,转速100 r/min,于不同时间点取样5 ml,微孔滤膜过滤后,取续滤液于269 nm处测定紫外吸收,计算药物累积释放百分率。

1.2.3 血样预处理 参考文献[4]取血浆样品200 μl,加入内标物溶液(溴新斯的明)20 μl,0.1 mol/L苦味酸氢氧化钠溶液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,旋涡混合5 min,3 000 r/min离心10 min,取出有机相,加入0.1 mol/L四丁基氯化铵溶液200 μl,涡旋混合30 s,3 000 r/min离心2 min,取上层水相进样分析。

1.2.4 兔体内血药浓度的测定方法[5] 用不同质量浓度的药物血浆样品,按照1.2.3操作后进样分析,得到溴吡斯的明血浆样品的标准曲线。并测定血浆样品的日内精密度、日间精密度、萃取回收率、血浆稳定性。

1.2.5 体内药代动力学实验 采用随机分组自身对照交叉实验设计方法,将6只新西兰兔用随机数字表分为受试药物组和参比药物组,单剂量口服给予溴吡斯的明缓释片或普通片,间隔1周后交叉给药。受试制剂与参比制剂给药前取空白血,给药后于不同时间点耳缘静脉取血,12 000 r/min离心5 min,取上层血浆于-20 ℃冰箱中保存待测[6-7]。

1.2.6 体内外相关性计算[8-9] 采用Loo-Riegelman法,计算公式如下:

$$F_a=\frac{(X_A)_t}{(X_A)_\infty}=\frac{C_t+K_{10}\int_0^t Cdt+\frac{(X_p)t}{V_c}}{K_{10}\int_0^\infty Cdt}$$

式中F_a表示体内吸收百分数,$(X_A)_t$是t时间吸收到体内的药物量,$(X_A)_\infty$是体内吸收的药物总量,C_t是t时间的血药浓度,K_{10}为药物从中央室消除的一级速率常数,X_p为周边室内药物量,V_c为中央室表观分布容积。

1.2.7 统计学分析 采用DAS 2.0软件对血药浓度-时间数据进行模型拟合,对t_{max}进行非参数检验,运用Loo-Riegelman法判断溴吡斯的明缓释片的体内外相关性。

2 结果

2.1 体外释放溴吡斯的明含量测定

溴吡斯的明水溶液在269 nm处有最大吸收,而辅料在此处无吸收,故选择269 nm作为检测波长。溴吡斯的明水溶液浓度在10~40 μg/ml范围内线性关系良好,其标准曲线的回归方程为A=0.015 8C+0.020 4,r=0.999 8(n=7)。

2.2 体外释药动力学

在本研究的释放条件下,溴吡斯的明缓释片前0.5 h释放速率小于5%,经过4 h,释放约为40%,在12 h内,缓释片中的药物逐渐释放,累积释放百分率逐渐增加,说明溴吡斯的明12 h缓释片可实现缓释(图1)。溴吡斯的明12 h缓释片的体外释放行为可用Higuchi方程拟合,Q为累积释放百分率,t为释放时间,得回归方程为:Q=0.378 8$t^{1/2}$-0.273 1,r=0.996 5。

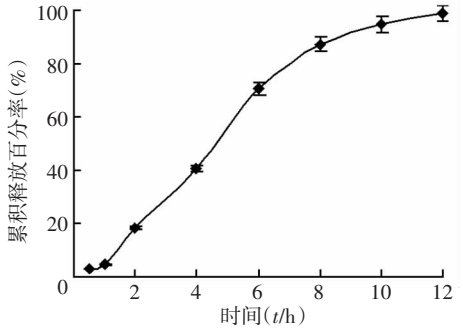


图1 溴吡斯的明缓释片的体外释放曲线 (n=3)

2.3 体内血药浓度测定

从血浆样品的HPLC图谱可见,药物的保留时间约4.99 min,内标的保留时间为8.32 min,血浆样品中药物和内标与血浆杂

质峰分离效果较好。以药物质量浓度 C 为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值 A 为纵坐标,得到血浆中溴吡斯的明标准曲线的回归方程为:$A = 0.025C - 0.006\ 6$($n = 7$),$r = 0.999\ 1$。结果表明,溴吡斯的明的血药浓度在 0.25 ~ 100 μg/ml 范围内线性关系良好。日内精密度、日间精密度、萃取回收率、血浆稳定性结果符合方法学要求。

2.4 体内药代动力学

6 只新西兰兔单剂量口服溴吡斯的明缓释片和普通片后,所得血浆样品处理后进行测定,以标准曲线计算各取样时间点样品中溴吡斯的明平均血药浓度,血药浓度-时间曲线见图 2。图 2 表明溴吡斯的明缓释片在兔体释药缓慢,4 h 血药浓度才达到最高,说明溴吡斯的明缓释片血药浓度达峰时间显著延迟,具有明显的缓释效果,克服了溴吡斯的明普通片口服吸收差、清除快,半衰期短等缺点。

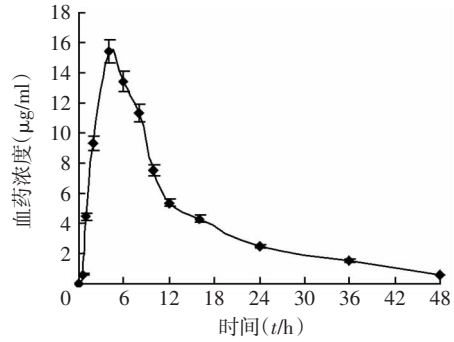


图 2 单剂量口服溴吡斯的明缓释片后平均血药浓度-时间曲线

2.5 体内外相关性分析

经 DAS 2.0 对经时血药浓度数据进行模型拟合可知,单剂量服用溴吡斯的明缓释片后,采用 Loo-Riegelman 法计算溴吡斯的明体内累积药物吸收百分数,并与相应时间点体外累积药物释放百分数进行线性回归,如果相关系数大于临界相关系数($P < 0.01$),则认为体内外存在相关性。将 t 时间体内吸收百分数与相应时间体外累积释放百分率进行线性回归,根据回归系数来判断体内外相关性是否显著。

体外释放与体内吸收相关性:以 t 时间体外累积释放百分率 f_r 为自变量,体内吸收百分数 f_a 为因变量,线性回归方程 $f_a = 0.485\ 1 f_r + 3.837\ 7$,$r = 0.986\ 5$。当自由度 $d_f = n - 2 = 6$ 时,临界值 $r_{6,0.01} = 0.083\ 4$,回归方程的相关系数 $r > r_{6,0.01}$,本实验结果表明溴吡斯的明缓释片体外释放和体内吸收相关性良好。对 f_a 和 f_r 作直线回归方差分析可得,$F_\alpha(7,8) = 3.50$,$F = 3.95 > 3.50$,$P = 0.036\ 3 < 0.05$,表明回归方程统计学差异显著,2 个变量间具有良好的直线回归关系。

3 讨论

体内外相关性研究的目的是寻找药物体外特性与体内行为之间的相关性,以体外实验预测体内行为,从而减少体内研究数量以降低新药研发成本。体外特性主要指药物的体外释放行为,体内主要指以药代动力学或药效学参数为表观指标反映的药物在体内的释放行为。两者之间的定量关系,对于药物制剂特别是缓控释制剂的研究开发具有重要的指导意义。

研究制剂的体内外相关性很有意义,当体外的释放模型能够用来预测体内的吸收过程时,可以通过控制体外释放来确保制剂批次间体内代谢情况的一致性[10]。然而,体外释放与体内吸收代谢之间存在非常复杂的关系。有些制剂,可以采用体外释放来预测其在体内的行为,另一些制剂,体内外相关性差,体外释放情况不能用来预测其在体内的行为[11]。

目前国内研究体内外相关性的最常用的方法为 Loo-Reieglman 模型法。本实验研制的溴吡斯的明缓释片在体内的药动学过程按 Loo-Reieglman 公式计算各时间点的药物体内吸收百分数 f_a,进行了体内外相关性评价,结果相关系数为 0.986 5,证明溴吡斯的明缓释片的体外释放和体内吸收具有良好的相关性。表明溴吡斯的明缓释片的研制及释放度测定方法切实可行,可以根据体外释放度来判断和预测药物在体内的吸收规律。

参考文献:

[1] Maggi L, Mantegazza R. Treatment of myasthenia gravis: focus on pyridostigmine[J]. Clin Drug Investig, 2011, 31(10): 691 - 701.
[2] Akbayram S, Akgun C, Dogan M, *et al*. Use of pyridoxine and pyridostigmine in children with vincristine-induced neuropathy[J]. Indian J Pediatr, 2010, 77(6): 681 - 683.
[3] Leong C F, Aini-Ardena M, Cheong S K, *et al*. Effect of pyridostigmine (Mestinon) on human platelet aggregation[J]. Malays J Pathol, 2009, 31(1): 45 - 52.
[4] Seng K Y, Loke W K, Moochhala S, *et al*. Retrospective population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of pyridostigmine, a cholinesterase inhibitor, in Chinese males[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(9): 1187 - 1196.
[5] 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.
[6] 沈腾, 郁韵秋, 翁伟宇, 等. 灯盏花素缓释片在兔体内的绝对生物利用度[J]. 中国临床药学杂志, 2008, 17(1): 25 - 28.
[7] 吕雄文, 李俊, 金涌, 等. 愈创木酚甘油醚缓释片在 Beagle 犬体内的药动学与生物利用度[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(24): 2071 - 2074.
[8] Mandal A S, Chatterjee S, Kundu S, *et al*. *In vitro-in vivo* correlation and bioavailability studies of captopril from novel controlled release donut shaped tablet[J]. Int J Pharm, 2011, 421(1): 145 - 150.
[9] United States Pharmacopeial Convention. *In vitro* and *in vivo* evaluation of dosage forms〈1088〉[M]// United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville: 21; United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2007.
[10] Welling P G, Tsee F L S, Dighe S V. Pharmaceutical bioequivalence [J]. Marcel Dekker, 2006, 48: 223 - 231.
[11] Ghosh A, Choudhury G K. *In vitro-in vivo* correlation (IVIVC): a review [J]. Journal of Pharmacy Research, 2009, 2(8): 1255 - 1260.

(**收稿**:2011-11-22;**修回**:2011-12-05)
(编辑 张 维)