

· 基础研究 ·

盐酸普萘洛尔单向灌注法大鼠在体肠吸收的研究

张小华¹, 陈力学², 贾毅敏^{1△}

(1 重庆市肿瘤研究所药剂科 400030; 2 重庆医科大学附属第一医院实验研究中心 400016)

摘要:目的 研究盐酸普萘洛尔(PNH)的肠吸收情况,为制剂合理选择处方和临床药代动力学与药效学的深入研究奠定基础。方法 采用大鼠单向灌注模型,引入了重量法来标示灌注液体积。考察药液浓度和 pH 值对肠吸收的影响。结果 PNH 在全肠道均有良好的吸收,且吸收不受药物浓度和 pH 值的影响。结论 可以考虑将 PNH 制成匀速释放的剂型。

关键词:大鼠;盐酸普萘洛尔;单向灌注法;在体肠吸收

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.028

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)36-3871-03

A study of rat in situ intestinal absorption of propranolol hydrochloride through single pass perfusion method

Zhang Xiaohua¹, Chen Lixue², Jia Yimin^{1△}

(1. Department of Pharmacy, Chongqing Institute of Tumor Research, Chongqing 400030, China; 2. Laboratory Research Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the intestinal absorption of propranolol hydrochloride for rational selection of formulation and further study of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Methods** Rat single pass perfusion method was used. Weight method was selected to indicate the volume of perfusion fluid. The effects of concentration and pH of drug solution on intestinal absorption were evaluated. **Results** Propranolol hydrochloride has good absorption in the entire intestinal tract. The absorption is not affected by concentration and pH of drug solution. **Conclusion** Propranolol hydrochloride could be prepared into dosage forms which release drug constantly.

Key words: rats; propranolol hydrochloride; single pass perfusion method; in situ intestinal absorption

在新药和口服药物制剂的处方前研究中,有必要对药物在口服后体内的吸收情况进行预测。小肠是口服药物被吸收的主要器官,探讨在小肠中药物的吸收过程,可以为药物新剂型的研发提供依据^[1]。本研究采用大鼠单向灌注模型,探讨盐酸普萘洛尔(propranolol hydrochloride, PNH)的肠吸收情况,为盐酸普萘洛尔制剂合理选择处方和临床药代动力学与药效学的深入研究奠定基础。为了避免单向灌注法“标示物”给测定带来的影响,本实验引入了一种相对简单的重量法(gravimetric method)来标示灌注液体积^[2]。

1 材料与方 法

1.1 材料 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠,体质量(250±20)g,重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2007-0001。PNH(纯度 99.9%,常州亚邦制药有限公司,批号 M060215),乌拉坦(上海化学试剂厂产品,批号 090612),甲醇(色谱纯,山东禹王试剂厂,批号 20090306052),其他试剂均为分析纯。Krebs-Ringer 缓冲液为灌注液^[3],其组成为:NaCl 133.5 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl₂ 3.3 mmol/L, NaH₂PO₄ 2.67 mmol/L, MgCl₂ 0.21 mmol/L, NaHCO₃ 16.3 mmol/L, D-Glucose 7.8 mmol/L。供试液中 PNH 浓度为 15 μg/mL。

1.2 仪器 蠕动泵 BT00-100M(保定兰格恒流泵有限公司);高效液相色谱仪(LC-10AT VP, SHIMADZU, 日本);紫外检测器(SPD-10A VP, SHIMADZU, 日本);色谱柱(C18 柱, 5 μm, 150.0×4.6 mm, Dikma, 日本);电子分析天平(上海分析仪器厂),HH-6 型数显恒温水浴锅(江苏省荣华仪器制造公司),JA-1003 型电子分析天平(中国上海精科天平厂)。

1.3 方法

1.3.1 色谱系统的适用性实验 色谱方法如下,流动相:甲醇 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液-三乙胺(48.0:52.0:0.5, V/V/

V);检测波长:290 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。按此色谱条件进行色谱分析,收集 6 h 后的空白肠灌注液,以此肠灌注液配制不同浓度的 PNH 标准溶液,经高效液相色谱法(HPLC)测定。

1.3.2 标准曲线的制备 精密称取 PNH 对照品 3.2 mg,纯水溶解,置于 25 mL 容量瓶中,用 K-R 缓冲液定容,得 PNH 对照品储备液。以储备液配制浓度为 1、2、4、6、8、10、15 μg/mL 的对照品溶液,经 HPLC 法测定。

1.3.3 管路的物理吸附性考察 配制含 PNH 约 15 μg/mL 的循环液 50 mL,连接好循环管路,考察 120 min 管路对 PNH 的吸附。于 0、30、60、90、120 min 取样,照“1.3.1”项下方法测定。

1.3.4 精密度 按“1.3.2”项下操作方法,制备 3 批浓度分别为 2、10、15 μg/mL(每个浓度 5 份)的对照循环液,依“1.3.1”项方法测定,分别计算批内、批间精密度。

1.3.5 稳定性考察 用空白肠灌注液配制 15 μg/mL 的 PNH 溶液 3 份,37 ℃水浴孵育 6 h,分别于 1、2、3、4、6 h 取样,进行 HPLC 分析,比较放置前后峰面积。

1.3.6 方法回收率的测定 精密称取干燥至恒重的 PNH 适量,用水溶解,定容至 100 mL,精密吸取 1.0 mL,用空白肠灌注液稀释,进行 HPLC 分析,经回归方程求得浓度,计算回收率。使用低、中、高 3 种浓度的 PNH 溶液,考察在空白肠灌注液存在下药物的回收率。

1.3.7 数据处理 (1)药物吸收速率常数(K_a)的计算:重量法计算 K_a 值: $K_a = (1 - \frac{C_{PNHout}}{C_{PNHin}} \times \frac{Q_{out}}{Q_m}) \times \frac{Q}{V}$; (2)药物表观吸收系数(P_{app})的计算:重量法计算 P_{app} 值: $P_{app} = \frac{Q \ln(\frac{C_{PNHout}}{C_{PNHin}} \times \frac{Q_{out}}{Q_m})}{2\pi r l}$ 。

以上公式中： Q_m 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积 (mL)，假定进出口灌流液密度为 1.0 g/mL； l 和 r 分别为被灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm)， Q 为灌流速度 (-0.25 mL/min)， t 为灌流时间 (~ 0.25 h)； V 为灌流肠段的体积，实验时间共 105 min。

1.3.8 大鼠在体肠单向灌流法^[4] 实验前先用供试液对管路进行循环饱和，以消除管路对药物的吸附影响。实验时取自由饮水禁食 12 h 的 SD 大鼠，腹腔注射 20% 乌拉坦注射液 (1.0 g/kg)。麻醉后，将大鼠固定，保持体温，沿腹中线打开腹腔，分别截取约 10 cm 待考察肠段，于两端剪切后插管，入口处的插管与蠕动泵连接，结扎。将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿，并置于红外灯下保温。用 37 ℃ 的生理盐水将小肠内容物冲洗干净后，即在进口处用已知质量小瓶内装有的供试液灌流，流速为 0.25 mL/min，每隔 15 min 在出口处用另一已知质量的小瓶收集灌流液，然后迅速更换下一组供试液小瓶和收集液小瓶，并称量置换出的供试液小瓶和收集液小瓶的质量，105 min 后实验结束。将大鼠处死，剪下被灌流肠段，测量其长度和内径。本研究分别选取十二指肠、空肠、回肠和结肠进行考察，根据公式 1 和 2 计算药物在不同肠段的吸收速率常数和表观吸收系数。(1) 浓度对肠吸收的影响：以十二指肠为例，分别配制了浓度为 5、10、15 μ g/mL 的 PNH 溶液，考察了不同浓度药液对 PNH 的肠吸收情况。(2) pH 值对药物吸收的影响：以十二指肠为例，分别配制了 pH 值为 5.4、6.8 和 7.4 的药液，考察了不同 pH 值药液对 PNH 的肠吸收情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件处理肠吸收数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并进行方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

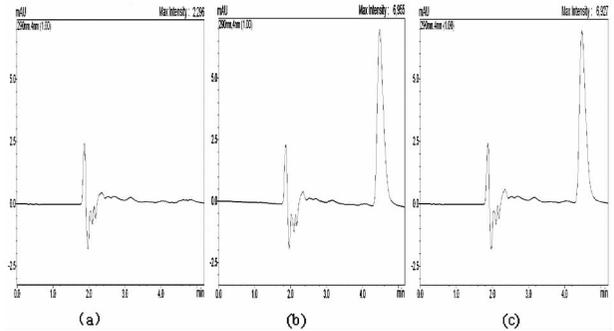
2 结 果

2.1 系统适用性实验 在本色谱条件下，空白肠灌流液不干扰 PNH 的测定，药物的保留时间约为 4.5 min，见图 1。

2.2 标准曲线的制备 在 1~15 μ g/mL 浓度范围 PNH 液的

浓度 (C) 与色谱峰面积 (A) 呈良好的线性关系，其线性回归方程为 $C = 25\ 960A + 8\ 735.1$ ($r = 0.999\ 4$, $n = 7$)，见图 2。

2.3 管路的物理吸附性考察 管路对 PNH 无吸附作用，见表 1。



a: 空白肠液; b: 药物在空白肠液中的色谱图; c: 药物在体肠吸收试验中的色谱图。

图 1 PNH 在灌流肠液中的色谱图

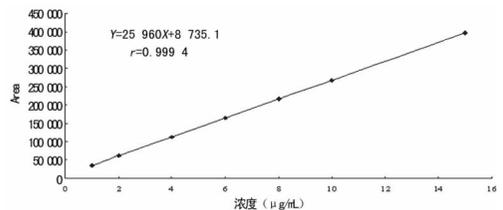


图 2 PNH 在肠灌流液中的标准曲线 (n=7)

表 1 器械物理吸附考察结果

时间 (min)	0	30	60	90	120
A(C=15 μ g/mL)	367 543	347 926	376 364	357 519	367 467

精密度 = 3.4%。

表 2 稳定性试验结果 (n=3)

时间 (h)	0	1	2	3	4	6	精密度 (%)
A(C=5 μ g/mL)	139 230	138 576	138 902	138 350	138 670	138 481	0.57
A(C=10 μ g/mL)	268 571	268 127	268 380	268 741	268 565	268 410	0.35
A(C=15 μ g/mL)	375 137	377 426	376 504	377 518	377 567	377 004	0.27

表 3 回收率试验结果 (n=15)

加入量 (μ g/mL)	测得值 (μ g/mL)	回收率 (%)	平均回收率 ($\bar{x} \pm s$, %)	精密度 (%)
1	0.995	99.52	98.4 \pm 1.24	1.27
1	0.963	96.30		
1	0.996	99.60		
1	0.998	99.80		
1	0.979	97.90		
10	9.874	98.74		
10	10.132	101.32		
10	10.029	100.29		
10	9.903	99.03		
10	10.031	100.31		
15	14.808	98.72		
15	14.634	97.56		
15	14.990	99.93		
15	15.210	101.40		
15	14.950	99.67		

2.4 精密度 低 (2 μ g/mL)、中 (10 μ g/mL)、高 (15 μ g/mL) 3 个浓度的批内精密度分别为 1.33%、1.46% 和 1.57% ($n = 5$)，批间精密度分别为 1.38%、1.79% 和 2.01% ($n = 3$)。

2.5 稳定性试验 PNH 在 Krebs-Ringer 液中稳定性良好，PNH 在灌流液中 6 h 内测定是稳定的，见表 2。

2.6 方法回收率的测定 方法回收率符合要求，见表 3。

2.7 大鼠在体肠单向灌流法 通过大鼠各肠段部位药物吸收的研究表明，各肠段对 PNH 均具有较大的表观吸收系数和药物吸收速率常数。各肠段与十二指肠段药物吸收速率常数之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；表观吸收系数各肠段间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 PNH 在全肠道吸收较好，见表 4。

2.7.1 浓度对肠吸收的影响 结果显示 PNH 的浓度在考察范围内对 K_a 和 P_{app} 无明显影响，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明 PNH 在十二指肠段的吸收无自身浓度抑制作用，表明 PNH 主要以被动扩散机制吸收入体循环^[5]，见表 5。

2.7.2 pH 值对药物吸收的影响 数据说明在考察范围内的不同 pH 值对 K_a 和 P_{app} 无明显影响，差异无统计学意义 ($P >$

表 4 PNH 肠道不同部位吸收结果 (n=5)

	十二指肠	空肠	回肠	结肠
长度(cm)	13.50	19.00	23.00	10.50
内径(cm)	0.08	0.08	0.10	0.11
Ka($\bar{x}\pm s, s^{-1}$)	0.009 50 \pm 0.000 82	0.004 20 \pm 0.000 39	0.002 70 \pm 0.000 18	0.003 20 \pm 0.000 49
Papp $\times 10^{-4}$ ($\bar{x}\pm s, cm/s$)	3.05 \pm 0.23	2.15 \pm 0.19	1.98 \pm 0.09	2.08 \pm 0.30

0.05), 见表 6。

表 5 不同浓度对 PNH 十二指肠吸收的影响
($\bar{x}\pm s, n=5, pH=5.4$)

浓度($\mu g/mL$)	Ka(s^{-1})	Papp $\times 10^{-4}$ (cm/s)
5	0.008 8 \pm 0.000 92	3.18 \pm 0.67
10	0.008 7 \pm 0.000 58	2.95 \pm 0.29
15	0.009 5 \pm 0.000 16	3.05 \pm 0.81

表 6 不同 pH 对 PNH 十二指肠吸收的影响
($n=5, c=10 \mu g/mL, \bar{x}\pm s$)

pH 值	Ka(s^{-1})	Papp $\times 10^{-4}$ (cm/s)
5.4	0.008 5 \pm 0.000 71	2.98 \pm 0.53
6.8	0.009 8 \pm 0.000 52	3.03 \pm 0.33
7.4	0.009 0 \pm 0.000 26	3.13 \pm 0.69

3 讨 论

3.1 药物试验模型的选择 目前,以动物试验模型评价药物肠吸收的方法有离体法、在体法和体内法等多种方法^[6-11],本研究采用在体法模拟口服给药后体内吸收的肠道环境,以“单向灌流”的方式考察药物在大鼠各个肠段的吸收情况。由于在体肠单向灌流实验中各肠段同时存在有水分吸收,因此引入重量法进行灌流液的体积校正。与传统的酚红法比较,重量法通过比较试验后收集瓶和试验前供试液瓶的重量差异,直接真实地反映肠道水分吸收情况,而且本法只需测定被检测药物浓度,没有灌流液“体积标示物”的测定干扰。有研究表明,灌流液“体积标示物”酚红存在一定程度的肠吸收,可能干扰某些化合物的肠道转运或分析测定^[12-13]。此外,本方法对分析检测仪器的要求相对较低,药物分析方法的建立相对简单易行,检测时间缩短,检测费用降低。重量法也有一定的局限性。本实验设定灌流液密度为 1 g/mL,由于在单向灌流试验中肠壁溶蚀或黏膜细胞脱落会增加灌流液黏度,改变其密度。因此在采用重量法研究大鼠单向灌流在体肠吸收情况时应注意修正灌流液密度,尽量减小误差。

3.2 药物吸收机制初步研究 本研究结果表明,PNH 的浓度和 pH 值在考察范围内对药物的肠吸收没有影响,在考察浓度范围内,Ka 值差异无统计学意义,PNH 的吸收机制为被动扩散。根据文献报道,大鼠的表观渗透系数 $Papp < 0.03 \times 10^{-4} cm/s$ 时,药物难以吸收; $Papp > 0.2 \times 10^{-4} cm/s$ 时,药物易于吸收^[6]。PNH 在十二指肠、空肠、回肠、结肠中的 Papp 分别为 $3.05 \times 10^{-4} cm/s, 2.15 \times 10^{-4} cm/s, 1.98 \times 10^{-4} cm/s, 2.08 \times 10^{-4} cm/s$,提示 PNH 在十二指肠和小肠全肠段的吸收良好。

3.3 对剂型设计的指导意义 本研究对大鼠在体肠吸收的研究结果,为 PNH 剂型设计提供了依据。该药在全肠道吸收良好,为被动吸收机制,根据高血压治疗中平稳降压的治疗原则,考虑可将 PNH 制成缓释制剂或以零级释放速率为特征的控释制剂,实现药物的缓慢恒速释放,可延长药物作用时间,提高药物治疗效果。

selenite on development and intestinal absorption in offspring rats[J]. Life Sciences, 2011, 88(3/4):150-155.

[2] 聂淑芳,潘卫三,杨星钢,等. 对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价[J]. 中国新药杂志, 2005, 9(10):1176-1179.

[3] 张莉,陈大为,李芳久,等. 法莫替丁大鼠在体小肠吸收动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(3):170-172.

[4] Sun MH, Zhai XZ, Xue K, et al. Intestinal absorption and intestinal lymphatic transport of sirolimus from self-microemulsifying drug delivery systems assessed using the single-pass intestinal perfusion (SPIP) technique and a chylomicron flow blocking approach: Linear correlation with oral bioavailabilities in rats[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 43(3):132-140.

[5] Linnankoski J, Ranta VP, Yliperttula M, et al. Passive oral drug absorption can be predicted more reliably by experimental than computational models-Fact or myth[J]. Eur J Pharm Sci, 2008, 34(2/3):129-139.

[6] Fagerholm M, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. Pharm Res, 1996, 13(9):1336-1342.

[7] Pascal LC, Gilles D, Francois C, et al. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and dimethyl- β -cyclodextrin on diphenhydramine intestinal absorption in a rat in situ model[J]. Int J Pharm, 1998, 169:221-228.

[8] Lennernas H, Fagerholm M, Raab Y, et al. Regional rectal perfusion, a new in vivo approach to study rectal drug absorption in man[J]. Pharm Res, 1995, 12(3):426-432.

[9] 刘璐,崔景斌,方洪壮. 替硝唑大鼠小肠吸收的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1):4-6.

[10] 张向荣,潘卫三. 丹参酚酸 A 在大鼠小肠的吸收动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1):14-17.

[11] Poelma FG, Tukker JJ. Evaluation of the chronically isolated intrajejunal loop in the rat for the study of drug absorption kinetics[J]. J Pharm Sci, 1987, 76(6):433-436.

[12] Pieter At, Joachim BS, Ann B, et al. Ex vivo permeability experiments in excised rat intestinal tissue and in vitro solubility measurements in aspirated human intestinal fluids support age-dependent oral drug absorption[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 39(1/3):15-22.

[13] Usach I, Peris J. Bioavailability of nevirapine in rats after oral and subcutaneous administration, in vivo absorption from gastrointestinal segments and effect of bile on its absorption from duodenum[J]. Int J Pharm, 2011, 419(1/2):186-191.

(收稿日期:2012-07-09 修回日期:2012-10-06)

参考文献:

[1] Delgado MJ, Nogales F, Ojeda ML, et al. Effect of dietary