

【综述】

药物肠道吸收研究方法概述

罗轶凡^{1,2}, 任利翔³, 李晓红^{1,2}, 孙耀庭⁴, 姜明燕^{1*}

1. 中国医科大学附属第一医院 药学部, 辽宁 沈阳 110001

2. 中国医科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110001

3. 沈阳化工研究院有限公司 安全评价中心, 辽宁 沈阳 110021

4. 大连医科大学 药学院, 辽宁 大连 116044

摘要: 口服药物肠道吸收的研究方法主要包括体外法、体内法和在体法, 对这3种研究方法进行简要介绍。鉴于在体肠灌注法操作简便、技术成熟、可控性强, 同时又保证了神经内分泌调节与淋巴液血液供应的完整性等特点, 更能反映药物吸收的真实情况, 因此重点介绍了在体肠灌注法, 并对在体肠灌注法中使用的循环灌注法和单向灌注法常用的几种灌注液体积校正方法等进行综述, 为研究口服药物肠道吸收试验设计提供借鉴和参考。为保证试验的可操作性和实验结果的准确性, 认为应根据所研究药品的性质、实验要求、试验条件等多方面因素综合考虑, 选择适宜的试验方法, 进而为药物剂型的开发和临床合理用药提供依据。

关键词: 肠道吸收; 药物评价; 在体法; 肠灌注法; 循环灌注法; 单向灌注法

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)05-0706-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.024

Summary of research methods for drug intestinal absorption

LUO Yi-fan^{1,2}, REN Li-xiang³, LI Xiao-hong^{1,2}, SUN Yao-ting⁴, JIANG Ming-yan¹

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

2. School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110001, China

3. Safety Evaluation Center, Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shenyang 110021, China

4. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: At present, the study of intestinal absorption of oral drugs mainly includes *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. In view of the advantages of *in situ* intestinal perfusion such as simple operation, mature technology, controllable, ensure the neuroendocrine regulation and blood supply, and so on, which could better reflect the true situation of drug absorption. In this study, the research methods and characteristics of intestinal absorption of oral drugs were systematically introduced. The recirculating perfusion method and single-pass perfusion method were compared, and several volume correction methods were also introduced. In order to ensure the operability and accuracy of experimental results, proper experiment method of intestinal absorption will be adopt according to the factors such as drug characters, experiment requirements, experimental conditions, and so on. The article provides a scientific basis for the development of pharmaceutical dosage and clinical rational drug use.

Key words: intestinal absorption; drug evaluation; *in situ*; intestinal perfusion; recirculating perfusion; single-pass perfusion

片剂、胶囊剂等口服给药方式由于剂量准确、服用方便、便于携带等特点仍是目前较为常用的给药方式。由于药物经口服给药后需要通过胃肠道吸收收入血, 再随血液循环系统分布到各个组织器官进

而发挥疗效, 因此口服给药的胃肠道吸收是药物产生疗效的重要前提。小肠因其黏膜表面具有褶皱结构和小肠绒毛使其具有较大的表面积, 同时小肠绒毛中有丰富的毛细血管和毛细淋巴管, 因此是药物

收稿日期: 2017-01-09

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2014226033)

作者简介: 罗轶凡, 女, 主管药师, 研究方向为药理学和药代动力学。Tel: 13998102689 E-mail: 13998102689@163.com

*通信作者 姜明燕, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为临床药理学与药物分析学。Tel: (024)83282052 E-mail: ydyxyxb@163.com

吸收的主要部位,也是药物转运的特异性部位^[1-2]。所以研究药物在肠道吸收的特征对口服药物剂型的研发、评价药物之间的相互作用、药物临床合理应用等方面具有重要意义。

本文对口服药物肠道吸收的研究方法及其特点进行了简要的介绍,着重叙述了在体法中的循环灌流法和单向灌流法两种试验方法,同时对在体肠灌流法中常用的灌流液体积校正方法进行了说明,为研究口服药物肠道吸收试验设计提供借鉴和参考。

1 药物肠道吸收的研究方法

目前研究药物在肠道吸收的方法主要分为体内法(*in vivo*)、体外法(*in vitro*)、在体法(*in situ*)^[3]。3种研究方法适用不同的研究对象,应根据不同的研究需要进行选择。

1.1 体内法

体内法是以整体动物机体为研究对象,进行药动学研究^[4]。口服给药后,在不同时间点采集生物样本如血液、尿液,再通过一定方法测定其药物浓度,计算达峰时间(T_{max})、达峰浓度(C_{max})、药时曲线下面积(AUC)等药动学参数,进而评价药物吸收的程度和速度。此法采用整体动物进行实验,能真实地反映药物口服后的体内吸收情况,但是它综合了物化、生理、剂型等众多因素的结果,不能特异性地反映肠道对药物的吸收作用。又由于实验周期长、操作相对繁琐、影响因素较多、动物个体差异较大等原因,故体内法很少应用于药物吸收机制的研究,一般用于研究药物体内药动学特征。

1.2 体外法

常用的体外法主要有外翻肠囊法、组织流动室法、刷状缘膜囊泡法、细胞培养模型法等^[5]。这些实验方法是基于分离部分肠黏膜或肠段,或是采用人肠细胞模拟肠环境评价药物吸收情况。总的来说体外法优点在于操作简单、试验周期短,可以用于药物早期高通量筛选^[6]。但肠道的不同节段以及缺乏血液、淋巴液的供应对细胞旁路通道和酶活性造成的影响均会影响实验结果,其组织活性与其在体内环境中会存在较大的差异,不能反映药物在肠道环境中的真实吸收情况。

1.3 在体法

常用的在体法包括在体肠灌流法、肠攀法、肠道血管插管法等^[4, 6]。在体法是建立在整体动物水平上的实验,与体内法不同的是其将干扰因素大大减少,同时保证了肠道神经与内分泌调节的完整

性,也保证了血液与淋巴液供应,使得待考察组织的生物活性大大提升,能够较为准确地反映药物在肠道的真实吸收情况,常用于研究药物的渗透和吸收动力学^[7-8]。在体法由于是建立在整体水平之上,因此个体差异较大,对实验动物的数量有一定要求,以保证最小的数据变异。

2 在体肠灌流法

在体法中的在体肠灌流法是目前用于研究口服药物肠吸收应用最为广泛的方法,国内倾向于使用循环灌流法,国外倾向于使用单向灌流法。随着对两种试验方法的深入研究,逐步优化了试验条件,并根据试验药物的特点进行合理的选择。

2.1 在体肠灌流法

肠灌流法的优点主要包括6点^[9]:(1)神经内分泌调节与淋巴液血液供应完整,大大增强了生物活性,更接近真实情况;(2)可以避免胃肠道内容物及胃肠运动的影响;(3)药物吸收后被血液带走形成漏槽条件;(4)操作简便、技术成熟、可控性强,便于在试验中控制药物的浓度、pH值以及灌流的速度,能够较为准确地反映药物在肠道的吸收情况;(5)从肠腔侧取样,可排除肝脏首过效应及药物在肠壁组织中的代谢等;(6)可用于药物吸收的研究,也可用于稳定性试验。在体肠灌流法可分为循环灌流法和单向灌流法两种,以下分别叙述。

2.1.1 循环灌流法 多数实验研究表明循环灌流因灌流时间较长(4~6 h)、速度较快(2~5 mL/min),因此对肠道的吸收环境损害大,致使药物的吸收结果与真实情况发生较大偏离。胡熙曦等^[10]认为药物从肠壁黏膜侧吸收进入血液循环需要通过不流动水层与肠黏膜这两个屏障。由于这两个屏障存在一定厚度,致使药物在不同层级的水平上各不相同,且浓度大小与肠道半径及药物流速有关,可以选择高流速的循环灌流使肠腔内各部位浓度相同。但这种方法一般只适用于透膜性差的药品。陈束叶等^[11]研究结果表明过低流速不能使肠道充盈,循环液不能与肠腔充分接触,而且难以形成漏槽效应;而过高的流速又会使肠腔过渡膨胀,导致吸收增加。最后试验证实,1 mL/min的流速较为符合生理状态。

2.1.2 单向灌流法 此法测得的吸收速率相对稳定,试验条件与药物口服后经肠道的生理环境相类似,有研究表明,在体法中的单向灌流法测得的相关指标与人体吸收指标具有较好的相关性^[12]。该法

建立的模型已成为美国食品药品监督管理局(FDA)认可的研究药物吸收的模型之一。

单向灌流法的流速多设定在 0.2 mL/min, 较为符合肠道的正常生理条件。根据文献^[9, 13]报道, 考察流速对吸收的影响, 结果显示吸收速率常数(K_a)与表观渗透系数(P_{app})值随着流速的增加而增加, 原因可能由于过高的流速对肠道的不搅动水层产生破坏或者对肠黏膜损伤, 导致吸收量增加。灌流的速度主要是模拟肠蠕动的速度, 当肠蠕动速度增加时, 吸收增加。同理, 灌流速度增加, 药物在肠道吸收增加, 理论结果与实验结果相一致, 因此建议选择低流速。

采用此模型还应考虑剂量的设计。口服给药时, 药物缓慢有序地通过胃肠道, 胃肠道的每一部分只在特定的时间内接触药物。而单相灌流有所不同, 在规定的时间内药物持续流经肠道的每一部分, 使得药物的吸收量大大增加。对于可能导致动物死亡的毒副作用较大的药物来说, 应慎重考虑剂量的选择^[14]。

2.2 灌流液体积的校正方法

肠道的吸收与分泌能力极强, 正常人每天约吸收 16 L 液体, 同时向肠腔分泌 1 L 液体^[15]。同理, 在灌流过程中, 肠道不仅吸收药物, 同时也吸收或分泌水分, 使得直接测得的药物浓度与实际药物浓度之间有偏差, 需进行校正。林旭升等^[16]实验研究证实, 即便是以 0.2 mL/min 低流速进行灌流, 也会或多或少地引起肠壁细胞溶蚀破裂、肠黏膜脱落等现象, 进而导致收集所得的灌流液密度发生变化。因此有必要对灌流液体积、密度进行校正, 以增加实验的可信度。校正方法主要有标示物法和重量法(包括酚红法等)。

2.2.1 标示物法 标示物法是通过加入肠道不吸收的物质(如酚红、 ^{14}C -PEG 等)作为标示物, 以标示物为参照量来进行药物浓度的校正。长时间灌流时(如循环灌流法)酚红在一定程度上也会被肠道吸收^[17]。张华等^[18]在实验中运用酚红法测定鞣花酸吸收情况时, K_a 与有效渗透系数(P_{eff})均出现负值情况, 药物通过肠道后, 浓度没有降低反而升高, 与实际情况不符合, 因此说明酚红法并非适用于所有药品的测定, 葛根中葛根素的测定也有类似情况^[19]。如果抑制酚红的吸收, 可以采用含有 Ca^{2+} 的 Krobs-Ringer 营养液缓冲液配制循环液, 主要是通过 Ca^{2+} 来抑制酚红的吸收^[10]。 ^{14}C -PEG 因其具有

放射性, 所需的检测方法特殊, 因此在普通实验室难以进行推广, 放射性物质对人体的健康存在潜在威胁, 故不作为常规试验选择。

一般来说标示物的选择需要满足以下条件^[20]:

(1) 标示物的测定不影响药物浓度的测定; (2) 标示物与药物不发生任何反应; (3) 在不能满足标示物完全不被肠道吸收时, 药物的溶解性不能过低, 否则标示物微弱的含量变化将对药物浓度校正产生较大影响; (4) 灌流速度不宜过大, 过大会损伤肠黏膜, 导致标示物被肠道吸收。

酚红法评价药物吸收的计算公式及相关参量^[21]

$$C_{out(correct)} = C_{out} \times \frac{PR_{in}}{PR_{out}}$$

$$K_a = (1 - \frac{C_{out(correct)}}{C_{in}}) \frac{Q}{V} = (1 - \frac{C_{out(correct)}}{C_{in}}) \frac{Q}{\pi r^2 l}$$

$$P_{eff} = \frac{-Q \ln(\frac{C_{in}}{C_{out(correct)}})}{A} = \frac{-Q \ln(\frac{C_{in}}{C_{out(correct)}})}{2\pi r l}$$

K_a 为吸收速率常数、 P_{eff} 为有效渗透系数; PR_{in} 、 PR_{out} 为出入口的酚红浓度; $C_{out(correct)}$ 为灌流液校正浓度 (mg/L); C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进出口灌流液的质量浓度 (mg/L); A 为小肠表面积; l 和 r 为被灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm); Q 为灌流速度 (mL/min); V 为灌流肠段的体积。

2.2.2 重量法 重量法是通过计算流入和流出肠道液体的质量比进行浓度的校正。Sutton 等^[22-23]运用单向灌流模型, 比较了重量法、酚红法、 ^{14}C -PEG-3350 法 3 种方法所测得的结果, 研究表明重量法与其他两种方法相比能显著降低实验误差, 能够更加真实地反映药物的吸收情况, 可以作为在体肠灌流时体积校正的有效方法。

重量法评价药物吸收的计算公式及相关参量^[24]

$$C_{out(correct)} = C_{out} \times \frac{Q_{out}}{Q_{in}}$$

$$Q_{out} = \frac{m_{out}}{\rho_{out}} = \frac{m_{2,1} - m_{2,0}}{\rho_{out}}$$

$$Q_{in} = \frac{m_{in}}{\rho_{in}} = \frac{m_{0,1} - m_{0,0}}{\rho_{in}}$$

$$\rho_{out/in} = \frac{m_{1,out/in}}{1 \text{ mL}}$$

$$K_a = (1 - \frac{C_{out(correct)}}{C_{in}}) \frac{Q}{V} = (1 - \frac{C_{out(correct)}}{C_{in}}) \frac{Q}{\pi r^2 l}$$

$$P_{eff} = \frac{-Q \ln(\frac{C_{in}}{C_{out(correct)}})}{A} = \frac{-Q \ln(\frac{C_{in}}{C_{out(correct)}})}{2\pi r l}$$

Q_{in} 和 Q_{out} 、 m_{in} 和 m_{out} 、 ρ_{in} 和 ρ_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积 (mL)、质量 (g)、密度 (g/mL); $m_{2,0}$ 和 $m_{2,1}$ 是肠道流出口处空收集管质量和灌流一定时间后出口处接收液体的收集管质量 (g); $m_{0,0}$ 和 $m_{0,1}$ 为肠道流入入口处灌流前装满灌流液时管的质量和灌流一定时间后剩余液体与管质量 (g); $m_{1,out/in}$ 为 1 mL 流出或流入的灌流液质量 (g); C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进出口灌流液的质量浓度 (mg/L); 其他参数与标示物法相同。

药物的吸收机制可通过计算所得的 K_a 与 P_{eff} 进行评价。药物转运主要分为主动转运、被动扩散、易化扩散、膜动转运,除了被动扩散外其他 3 种转运方式均存在饱和现象。若 K_a 与 P_{eff} 不随浓度的改变而改变,其吸收动力学为线性过程为被动扩散,否则即为非线性过程,可能有主动转运参与其中。

对于易于吸收的药物^[25],即 $P_{eff} > 0.2 \times 10^{-4}$ cm/min,灌流时溶液密度的变化对测量结果影响不大^[26],可以默认 $\rho_{in} = \rho_{out} = 1$ g/mL,即校正浓度 $C_{out(Correct)} = C_{out} \times m_{out}/m_{in}$ 。

3 结语

评价药物肠道吸收的方法众多,通过不同的研究方法可以全面地了解药物在肠道的吸收机制、吸收部位、吸收动力学、影响吸收的因素等情况。体内法主要用于研究机体整体对药物的综合作用结果;体外法一般适用于高通量筛选和药物吸收机制的研究;在体法与体外法、体内法相比,具有与体内的条件接近、实验设备简单、节省费用、测得的相关指标与人体吸收的指标具有较好的相关性^[6]等优点,目前应用较为广泛,主要用于药物吸收部位、吸收影响因素、吸收动力学方面的研究。其中循环灌流法主要适用于透膜性差的药物,而单向灌流法则适用于多数药物,试验过程中应注意选择适宜的灌流速度和药物的剂量。

在采用灌流法考察药物吸收时,需要对灌流液体积进行校正。校正方法主要有重量法和标示物法,如酚红法等。传统认为酚红作为一种离子型化合物在体内不被吸收,但在实际操作过程中发现这种观点是错误的^[18-19]。酚红作为标示物在肠道内存在一定量的吸收,进而对实验结果造成影响。胡一桥等^[20]曾系统研究了酚红在肠道的吸收情况,结果显示酚红在十二指肠、空肠、回肠均有一定量的吸收,其吸收速率具有显著差异,同时不同的 pH 条件和 Ca^{2+} 浓度对酚红在小肠吸收也会有一定的影响。因此酚红作为肠灌流试验的标示物不仅会有一

定程度的吸收,在某些情况下还可能与药物发生反应,基于以上原因,近年来的实验多以重量法进行校正。重量法只需检测药物浓度,节省了检测标示物浓度的过程,结果更加可靠、方法更为便捷。

综上所述在试验设计阶段应根据药物性质、实验要求、试验条件等多方面因素综合考虑,选择适宜的试验方法用于考察药物在肠道的吸收情况,以保证试验的可操作性和实验结果的准确性,为药物剂型的开发和临床合理用药提供更加科学的理论依据。

参考文献

- [1] 陈伟薇,李俊,宋珏. 药物肠吸收的研究方法进展 [J]. 安徽医药, 2009, 13(4): 349-352.
- [2] 徐术,刘忠良,胡晋红. 药物肠吸收的实验研究方法概述 [J]. 中国药房, 2009, 20 (16): 1266-1268.
- [3] 李高. 口服药物的吸收 [A]/梁文权. 生物药剂学与药物动力学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [4] 祝诚诚,何新. 药物肠道吸收研究方法 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 222-227.
- [5] 李高,方超. 药物肠道吸收的生物学研究方法 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(10): 726-729.
- [6] 刘志浩,刘克辛. 肠道药物转运体及其研究方法 [J]. 药理学学报, 2011, 46(4): 370-376.
- [7] 田莉,张慧慧,谢莉,等. 大鼠在体单向肠灌流模型研究石榴皮多酚中鞣花酸的肠吸收动力学 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(2): 131-134.
- [8] 王进荣. 在体单向灌流法评价大黄游离蒽醌肠吸收机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [9] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等. 大鼠在体单向肠灌注模型研究蝙蝠葛碱肠吸收机制和吸收动力学 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(11): 903-907.
- [10] 胡熙曦,金桂兰,陈进兵,等. 三七总皂苷中人参皂苷 R_{g1} 大鼠在体肠吸收特征 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(12): 998-1001, 1023.
- [11] 陈束叶,李铜铃,张洁,等. 盐酸帕罗西汀大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(8): 617-620.
- [12] 朱容慧,赵军宁,毕岳琦,等. 中药肠吸收动力学的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 25-29.
- [13] Zhang T, Chen J, Zhang Y, et al. Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide [J]. Eur J Pharm Sci. 2011, 43(3): 174-179.
- [14] 张英丰,李玉洁,杨庆,等. 大鼠在体单向肠灌流法

- 进行丹参素、丹酚酸 B 的肠吸收研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 96-100.
- [15] Victora C G, Bryce J, Fontaine O, et al. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy [J]. Bull World Health Organ, 2000, 78(10): 1246-1255.
- [16] 林旭升, 蒋海松, 周建平. 缬沙坦大鼠在体肠吸收动力学 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(2): 130-136.
- [17] 张海燕, 平其能. 药物转运蛋白对灯盏花素小肠吸收的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 60-64.
- [18] 张 华, 陈 虹, 杨 丹, 等. 鞣花酸大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(14): 1167-1170.
- [19] 黄嗣航, 龙晓英, 袁 飞, 等. 酚红法和改良重量法分别研究葛根素的大鼠在体肠吸收机制 [J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 603-607.
- [20] 胡一桥, 郑梁元, 钱陈钦, 等. 离子型药物酚红的小肠吸收研究 [J]. 中国药科大学学报, 1996(6): 355-359.
- [21] 吴 浩, 狄留庆, 单进军, 等. 在体单向肠灌流模型研究红景天苷的大鼠肠吸收特性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 23(7): 130-134.
- [22] Sutton S C, Rinaldi M T, Vukovinsky K E. Comparison of the gravimetric, phenol red and ^{14}C -PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model [J]. AAPS PharmSci. 2001, 3(3): E25.
- [23] 杨 阳, 樊春梅, 张金坤, 等. 新型小分子靶向药物 NCE 大鼠在体肠吸收特性及药动学研究 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(21): 2542-2546.
- [24] Issa C, Gupta P, Bansal A K. Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass intestinal perfusion technique: A technical note [J]. AAPS PharmSciTech. 2003, 4(2): E16.
- [25] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [26] 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, 14(10): 56-59.