·重大新药创制专项巡礼·

结合雌激素肠道渗透性的在体与离体2种模型研究

刘晓航[1],张　亮[1],李欣荣[3],单　宇[1],高晓黎[1,2]

(1 新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011;2 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室,乌鲁木齐 830011;3 西安大兴医院制剂中心,西安 710016)

[摘要] **目的:**以结合雌激素(conjugated estrogen,CE)中主要活性成分马烯雌酮硫酸钠(sodium equilin sulfate,EqS)和雌酮硫酸钠(sodium estrone sulfate,ES)为代表研究CE在大鼠肠道的吸收特性,并评价2种肠道模型。**方法:**建立EqS,ES与阿替洛尔的HPLC方法,采用大鼠在体单向肠灌流(SPIP)与Ussing Chamber小肠模型,将阿替洛尔视为内标一同给药后收集EqS+ES与阿替洛尔不同时间点肠囊液及接收液,计算有效渗透系数(P_{eff})和表观渗透系数(P_{app})并与阿替洛尔比较。**结果:**2种肠道模型HPLC法的线性在一定浓度范围内相关性良好($r>0.999$),日内、间精密度均小于15%,准确度在85%~115%,提取回收率均大于70%。大鼠SPIP模型中,EqS+ES的P_{eff}[空肠:$(0.22\pm0.07)\times10^{-4}$ cm·s^{-1},回肠:$(0.24\pm0.08)\times10^{-4}$ cm·s^{-1})]与阿替洛尔[空肠:$(0.18\pm0.11)\times10^{-4}$ cm·s^{-1},回肠:$(0.32\pm0.15)\times10^{-4}$ cm·s^{-1})]在2个肠段无统计学差异($P_{空}=0.373$;$P_{回}=0.128$);Ussing Chamber大鼠小肠模型中,EqS+ES与阿替洛尔在4个肠段均有吸收[十二指肠:$(1.83\pm0.77)\times10^{-6}$ cm·s^{-1},$(5.46\pm0.80)\times10^{-6}$ cm·s^{-1};空肠:$(6.93\pm1.43)\times10^{-6}$ cm·s^{-1},$(10.04\pm1.16)\times10^{-6}$ cm·s^{-1};回肠:$(6.96\pm1.28)\times10^{-6}$ cm·s^{-1},$(6.28\pm0.82)\times10^{-6}$ cm·s^{-1};结肠:$(10.03\pm2.07)\times10^{-6}$ cm·s^{-1},$(11.09\pm1.08)\times10^{-6}$ cm·s^{-1})],其中EqS+ES在回肠和结肠中的P_{app}与阿替洛尔比较无统计学差异($P_{回}=0.251$,$P_{结}=0.263$);阿替洛尔是碱性化合物,理论上回肠的渗透性应高于空肠,离体模型与理论有差异。**结论:**CE可能为中等吸收药物,2种模型中大鼠SPIP模型似乎更加准确可靠。

[关键词] 肠道渗透性;单向肠灌流;尤斯池;高效液相色谱法

[中图分类号] R965.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)13-1176-08

Intestinal permeability of conjugated estrogen using *in vivo* and *in vitro* models

LIU Xiao-hang[1], ZHANG Liang[1], LI Xin-rong[3], SHAN Yu[1], GAO Xiao-li[1,2]

(1 *Xinjiang Medical University, Pharmacy College, Urumqi* 830011, *China*; 2 *Xinjiang Key Laboratory of Active Components and Drug Release Technology of Natural Drugs, Urumqi* 830011, *China*; 3 *Xi'an Daxing Hospital, Preparation Center, Xi'an* 710016, *China*)

[**Abstract**] **Objective:** Taking major components of conjugated estrogen (CE), sodium equilin sulfate (EqS) and sodium estrone sulfate (ES), as examples to investigate their absorption characteristics in the rat intestine, and to evaluate two intestinal models. **Methods:** Determination method of EqS and ES using atenolol as an internal standard by HPLC was delevloped. Models of *in situ* single-pass intestinal perfusions (SPIP) and Ussing Chamber rat intestine were applied for this study. The samples of intestinal sac fluid and receiving fluid at different time points after dosages of EqS+ES and atenolol. The parameters of effective permeability (P_{eff}) and apparent permeability (P_{app}) were calculated and compared with that of atenolol. **Results:** The linearity of the HPLC analysis methods for the two intestinal models is well correlated within a certain concentration range ($r>0.999$), the intra-day and inter-day precisions are both below 15%, the accuracy is between 85%~115%, and the recovery is greater than 70%.

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目:药物一致性评价关键技术与标准研究(2017ZX09101001)

[作者简介] 刘晓航,女,硕士,研究方向:药物传递系统与新药开发研究。E-mail:1365935498@qq.com。

[通讯作者] 高晓黎,女,教授,研究方向:药物传递系统与新药开发研究。E-mail:xli_g@sina.com。

In SPIP rat model, no statistical difference was found between the P_{eff} of EqS + ES (jejunum: $0.22 \pm 0.07 \times 10^{-4}$, $cm \cdot s^{-1}$; ileum: $0.24 \pm 0.08 \times 10^{-4}$, $cm \cdot s^{-1}$) and atenolol (jejunum: $0.18 \pm 0.11 \times 10^{-4}$, $cm \cdot s^{-1}$; ileum: $0.32 \pm 0.15 \times 10^{-4}$, $cm \cdot s^{-1}$) in jejunum and ileum ($P_{空} = 0.373$; $P_{回} = 0.128$). In Ussing Chamber rat intestine model, EqS + ES and atenolol were absorbed in all intestinal segments of rats (duodenum: $1.83 \pm 0.77 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$, $5.46 \pm 0.80 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$; jejunum: $6.93 \pm 1.43 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$, $10.04 \pm 1.16 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$; ileum: $6.96 \pm 1.28 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$, $6.28 \pm 0.82 \times 10^{-6}$; colon: $10.03 \pm 2.07 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$, $11.09 \pm 1.08 \times 10^{-6}$, $cm \cdot s^{-1}$). There was no statistical difference between P_{app} of EqS + ES and atenolol in the ileum and colon ($P_{ileum} = 0.251$; $P_{colon} = 0.263$). Atenolol is a alkaline compound, the permeability of which in ileum was higher than that in Jejunum theoretically. The *in vitro* model differs from the theory. **Conclusion**: CE can be considered as a drug with moderate permeability. SPIP rat model among the two models seems more accurate and reliable.

[**Key words**] intestinal permeability; *in situ* single-pass intestinal perfusions; Ussing Chamber; HPLC

结合雌激素(conjugated estrogens,CE)是一种从孕马尿中提取的天然类固醇类雌激素,口服结合雌激素是绝经后激素治疗中最常用的雌激素制剂,可单独使用或与孕激素联用,常用于治疗更年期早期症状,例如潮热、阴道炎、失眠和情绪障碍。天然结合雌激素是含有许多甾体和非甾体成分的混合物,美国药典(USP 38-NF33, 2015)和中国药品标准均要求控制 10 种组分的含量在一定比例,其中雌酮硫酸钠(sodium estrone sulfate,ES)和马烯雌酮硫酸钠(sodium equilin sulfate,EqS)是含量最高的活性成分[1]。但目前作者尚未见报道 CE 的肠吸收情况。

药物的肠道渗透性是指其透过肠壁细胞进入血液循环的能力[2],通常以单位时间或单位面积进入肠壁细胞的药量衡量,药物的肠道渗透性决定了其被人体吸收的速率和程度,各国法规中均被认可的用于预测药物肠道渗透性的模型有:动物体内或在体肠灌流模型、切除的动物肠道组织模型和单层培养上皮细胞模型[3],其中大鼠在体单向肠灌流(*in situ* single-pass intestinal perfusions,SPIP)与 Ussing Chamber 小肠模型多用于研究多成分环境下药物的渗透机制和药物在不同肠段的肠吸收特性[4-5]。

本实验以 CE 中 2 种主要成分为代表,将阿替洛尔作为内标物质[3]一同灌注,采用大鼠 SPIP 模型与 Ussing Chamber 大鼠小肠模型考察 CE 的渗透性,并对 2 种模型的优缺点进行评价。

材料与方法

1 药物与试剂

EqS 对照品溶液(TLC,批号:20190722,浓度:288.60 μg·mL^{-1};批号:20191220,浓度:247.44 μg·mL^{-1});ES 对照品溶液(TLC,批号:20190722,浓度:441.00 μg·mL^{-1};批号:20191220,浓度:395.00 μg·mL^{-1});阿替洛尔对照品(华迈科公司,批号:A99264,纯度 >99.9%);CE 原料药(新疆新姿源生物制药有限责任公司,批号:M20200401,标识含量 30.20 mg·g^{-1},含 EqS 30.1%,ES 54.2%);甲醇、乙腈(Sigma-aldrich 公司,色谱纯);其他试剂均为分析纯。

2 仪器

LC－2030 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB－135S 电子分析天平(德国梅特勒-托利多公司);MS3 basic 涡旋混匀仪(IKA 公司);MULTI-FUGEX－3R 离心机(Thermo Fisher 公司);PHSJ－3FpH 计(上海仪电科学仪器公司);HGC－12A 氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);HH－S4 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);KQ5200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器公司);EO－CVUC 尤斯灌流系统(北京金工鸿泰科技有限公司);BT100－1L 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

3 实验动物

Sprague Dawley 大鼠 12 只,雄性,体重 220 ~ 250 g,SPF 级,新疆医科大学动物实验中心提供,生产许可证:SCXK(新)2019-0004,动物使用许可证:2019-0001,本实验通过新疆医科大学动物实验中心动物伦理委员会审核。

4 溶液的配制

4.1 对照品溶液制备 取阿替洛尔对照品 35.00 和 10.82 mg 分别用甲醇溶解定容至 5 和 10 mL,得到 700.00 和 1 082.00 μg·mL^{-1}的对照品储备液,备用。

4.2 Krebs-Ringer's(K-R 液)的配制 称取 $MgCl_2$ 0.02 g,NaCl 7.8 g,KCl 0.35 g,$CaCl_2$ 0.37 g,$NaHCO_3$ 1.37 g,NaH_2PO_4 0.32 g,葡萄糖 1.40 g 加超纯水溶解后定容至 1 L。

4.3 SPIP 模型供试液的配制 分别取 CE 原料

药、阿替洛尔适量溶解于 K-R 液定容至 500 mL,得到(EqS + ES)为 85.00 μg·mL^{-1},阿替洛尔为 85.00 μg·mL^{-1}的肠灌流液,备用。

4.4 Ussing Chamber 模型供试液的配制 分别取 CE 原料药、阿替洛尔适量溶解于 K-R 液定容至 100 mL,得到(EqS + ES)为 853.00 μg·mL^{-1},阿替洛尔为 853.00 μg·mL^{-1}的肠营养液,备用。

4.5 空白肠灌流液及肠营养液的配制 取空白 K-R 液在 SPIP 模型中灌流,收集流出液,即得空白肠灌流液;取空白 K-R 液适量在 Ussing Chamber 小肠模型中循环温孵 1 h,即得空白肠营养液,用于方法学考察。

5 样品处理

SPIP 模型中,取一定量样品加入甲醇 1∶3除蛋白,3 000 r·min^{-1}涡旋 2 min,12 000 r·min^{-1}离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜进样分析;Ussing Chamber 小肠模型中,加入甲醇 1∶1除蛋白,3 000 r·min^{-1}涡旋 2 min,4 ℃,12 000 r·min^{-1}离心 10 min,取上清液 720 μL,水浴温度 50 ℃下氮吹,90 μL 甲醇复溶,4 ℃,12 000 r·min^{-1}离心 10 min 取上清液进样分析。

6 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C_{18}(2)(150 mm × 4.6 mm,5 μm),流速:1 mL·min^{-1},进样量 20 μL。EqS 和 ES 的流动相:乙腈-0.025 mol·L^{-1}磷酸二氢钾溶液为 1∶3,检测波长:205 nm,柱温:35 ℃。阿替洛尔的流动相:磷酸缓冲液(取磷酸二氢钾 6.80 g,1-庚烷磺酸钠 1.30 g,加水溶解并稀释至 1 L,用磷酸调节 pH 值至 2.85)-甲醇为 7∶3(Ussing Chamber 模型中,磷酸缓冲液-甲醇为 3∶1),检测波长:226 nm,柱温:35 ℃。

7 方法学验证

7.1 专属性考察 比较 2 个模型中空白肠灌流液/营养液、含对照品的肠灌流液/营养液以及实测样品的色谱图,判断内源性物质是否干扰目标物的测定。

7.2 标准曲线绘制 SPIP 模型中,精密移取对照品储备液适量,用甲醇稀释并定容,制备成一系列不同浓度的对照品溶液,分别精密吸取各系列对照品溶液 100 μL,再加入空白肠灌流液 230 μL,获得系列质量浓度的质控样品,按“**5**”项处理后用“**6**”项色谱条件检测,记录峰面积。

Ussing Chamber 小肠模型中,精密移取对照品储备液适量,用甲醇稀释并定容,制备成一系列不同浓度的对照品溶液,分别精密吸取各系列对照品溶液 20 μL,再加入空白肠营养液 380 μL 获得系列质量浓度的质控样品,按“**5**”项处理后用“**6**”项色谱条件检测,记录峰面积。

均以药物质量浓度 C(μg·mL^{-1})为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。

7.3 精密度、回收率 取高、中、低 3 个浓度的质控样品,每个浓度 6 样本分析,按“**5**”项处理后用“**6**”项色谱条件于 1 d 内测定考察日内精密度;分别在 3 d 内测定考察日间精密度。

同上制备高、中、低 3 个浓度的质控样品,按“**5**”项处理后用“**6**”项色谱条件检测,获得峰面积的平均值 A,空白肠灌流液/肠营养液按“**5**”项处理后,加入相应浓度的对照品溶液,用“**6**”项色谱条件检测,获得峰面积的平均值 B。以 A/B 计算方法回收率。

7.4 稳定性 考察高、低浓度样品在室温下放置 4 h、4 ℃放置 6 h 及 −20 ℃放置 3 d 的稳定性。

8 渗透性研究

8.1 SPIP 模型 实验前 SD 大鼠禁食 20 h(自由饮水),大鼠称定质量,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 μL·g^{-1})麻醉后沿腹中线打开腹腔分离出空肠、回肠各 10 cm,在每段肠道的开始与结尾端插入管子,结扎,将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿于红外灯下,首先用 0.9% NaCl 溶液清洗肠段的内容物,再换 37 ℃的 K-R 液冲洗 20 min,再以空气排出 K-R 液,更换为供试液,流速更改为 0.2 mL·min^{-1},平衡 45 min,每隔 15 min 迅速更换已知重量的供试小瓶和收集小瓶,称重,计算收集前后小瓶质量差,同时测定供试液和收集液的密度,校正灌流液和收集液体积,分别于计时后的 60,75,90,105,120 min 收集液体,按“**5**”项处理后用“**6**”项色谱条件测定。大鼠处死之后,将小肠取出,测定灌流肠段的长度(L)和内径(r)。

8.2 灌流液和收集液的体积校正 分别取灌流液、收集液倒入已知质量的容量瓶中,定容后称定总质量,计算出灌流液、收集液的质量(W),由 $\rho_{校正} = W/V$ 计算出校正密度,带入 $V_{in(out)} = W/\rho_{校正}$,即得灌流液、收集液的校正体积。

8.3 SPIP 模型相关计算方法 大鼠 SPIP 模型采用重量法校正水分吸收,药物吸收速率常数 K_a(s^{-1})和有效渗透系数 P_{eff}(cm·s^{-1})计算公式如下。

$$K_a = (1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \times \frac{V_{out}}{V_{in}}) \times \frac{Q}{\pi r^2 L}$$

$$P_{eff}=\frac{-Q\cdot\ln(\frac{C_{out}}{C_{in}}\cdot\frac{V_{out}}{V_{in}})}{2\pi rL}$$

式中 V_{in},V_{out} 分别是灌流进出口灌流液校正体积(mL),C_{in},C_{out} 分别表示进出口灌流液中药物质量浓度($\mu g\cdot mL^{-1}$),Q 为灌流液灌流速度,L 表示灌流肠段的长度,r 表示各肠段横截面半径(cm)。

8.4 Ussing Chamber 小肠模型 实验前 SD 大鼠禁食 20 h(自由饮水),大鼠称定质量,腹腔注射质量浓度 10% 水合氯醛(3 $\mu L\cdot g^{-1}$)麻醉后沿腹中线打开腹腔,分离十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段于 K-R 液中,剪 2 ~ 3 cm 长的 4 个肠段,分别剖开,平铺于样本夹并固定于扩散池上,在扩散池两室中均加入 3 mL 新鲜的 K-R 液,平衡 5 min,肠黏膜达稳态后分别在黏膜测(供给池)加 3 mL 供试液,浆膜侧(接收池)加入 3 mL K-R 液,分别于 60,75,90,105,120 min 于浆膜侧取样 400 μL,同时补充 400 μL 已预热的 K-R 液,维持漏槽条件。整个实验过程中,各室均持续通入混合气体(95% O_2∶5% CO_2),37 ℃恒温以保持肠黏膜活性。

8.5 肠黏膜组织的活性考察 肠黏膜的电位差(PD)反映了肠黏膜所产生的电压梯度,因此本实验采用 BL－420F 型号采集系统监测加药后 5 和 120 min Ussing Chamber 肠黏膜组织的 PD 值,有文献报道称 PD≥4 mV 时,认为肠黏膜是有活性的,本实验所含数据均符合此条件。

8.6 Ussing Chamber 法相关计算方法 Ussing Chamber 小肠模型中药物累积渗透量 Q(μg)、药物的吸收速率常数 K_a($\mu g\cdot s^{-1}\cdot cm^{-2}$)、表观渗透系数 P_{app}($cm\cdot s^{-1}$)的计算公式如下。

$$Q = V_1C_n + V_2\sum_{i=1}^{n-1}C_i$$

$$K_a=\frac{dQ}{dt}\times\frac{1}{A}$$

$$P_{app}=\frac{K_a}{C_0}$$

式中 Q 为各时间点的药物累积渗透量(μg),C_n 为 n 时间点的药物浓度($\mu g\cdot mL^{-1}$),V_1 和 V_2 分别为接收池体积和取样体积(mL),C_i 为之前各取样时间点的药物浓度($\mu g\cdot mL^{-1}$),以各时间点的药物累积吸收量 Q 作为纵坐标,以时间作为横坐标,进行线性回归,计算回归方程,方程斜率即为 dQ/dt,A 为肠段吸收面积(cm^2),C_0 为肠囊外初始药物浓度。

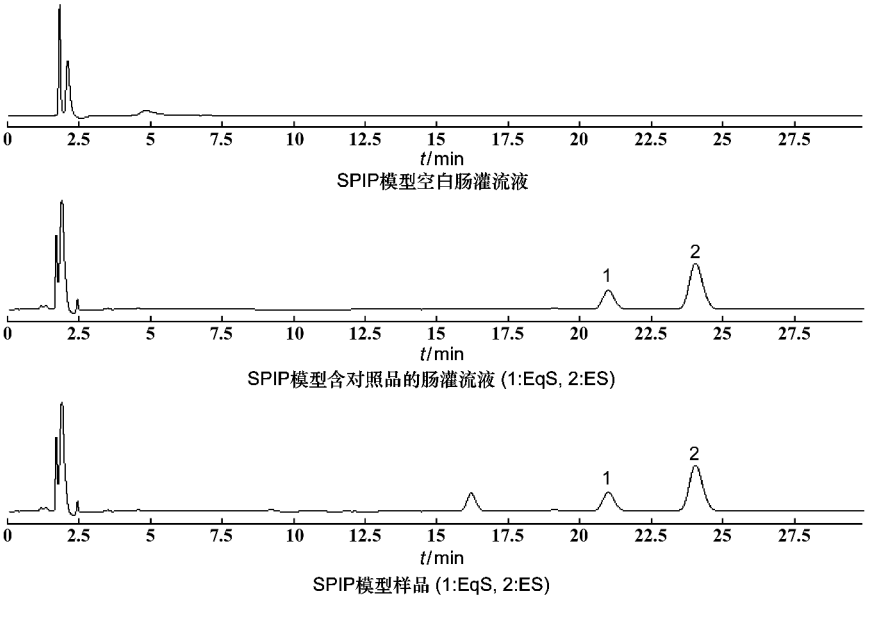
9 统计学分析

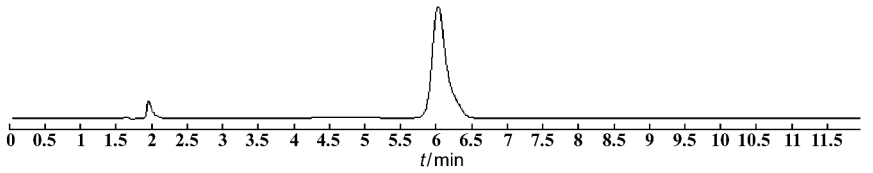
SD 大鼠 6 只为一组,数据表示为均值 ± 标准差,采用 SPSS 20.0 统计软件中独立 t 检验和单因素方差分析(One-way ANOVA)分别评估两组数据或多组数据间的差异,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结　果

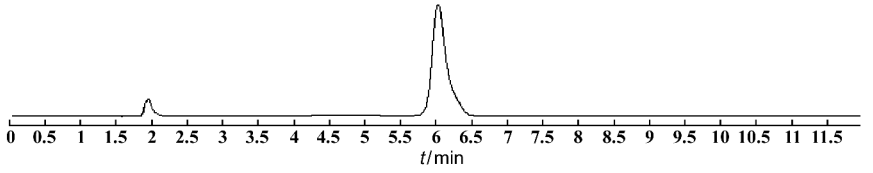
1 方法学评价

1.1 专属性 2 种模型得到的色谱图见图 1,空白肠灌流液/营养液在 EqS,ES,阿替洛尔的保留时间处无吸收峰,肠灌流/营养液中的内源性物质不干扰目标物的测定,专属性良好。

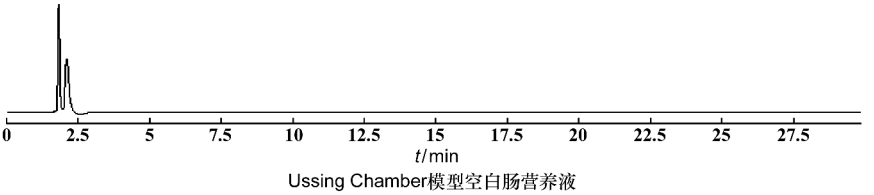




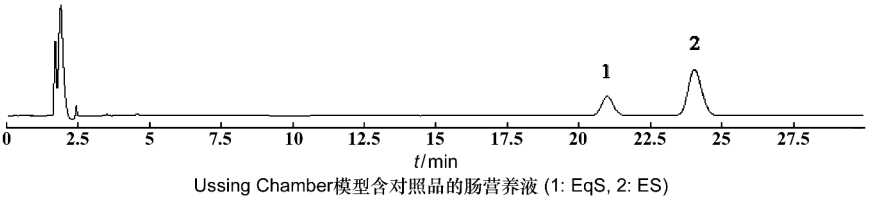
SPIP模型含对照品的肠灌流液 (阿替洛尔)



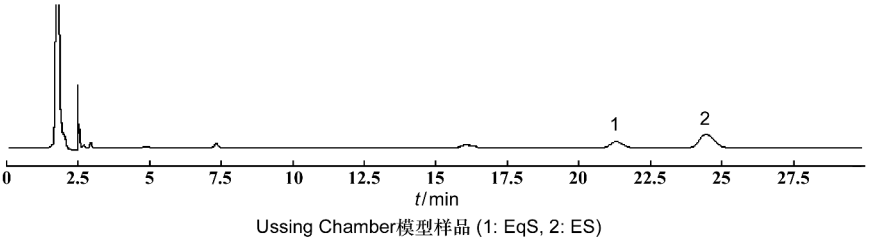
SPIP模型样品 (阿替洛尔)



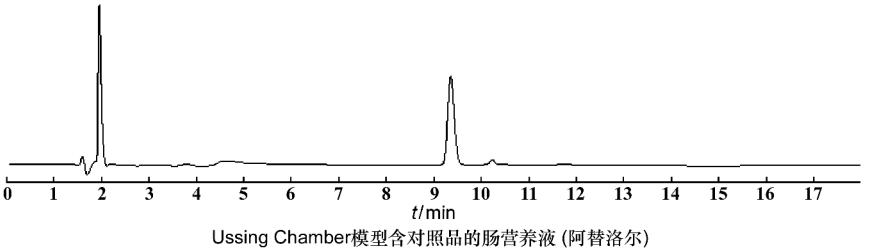
Ussing Chamber模型空白肠营养液



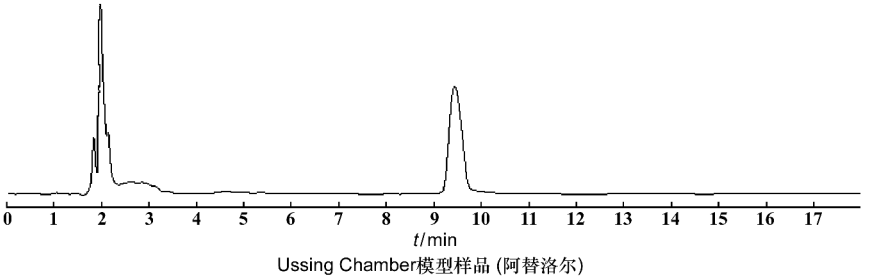
Ussing Chamber模型含对照品的肠营养液 (1: EqS, 2: ES)



Ussing Chamber模型样品 (1: EqS, 2: ES)



Ussing Chamber模型含对照品的肠营养液 (阿替洛尔)



Ussing Chamber模型样品 (阿替洛尔)

图 1　HPLC 图谱

1.2 标准曲线及回归方程 2 种模型均表明 EqS, ES,阿替洛尔在相应浓度范围内线性关系良好,见表 1。

表 1 EqS,ES,阿替洛尔在 2 种模型中的回归方程及线性范围

模型	化学成分	线范围性/μg·mL^{-1}	回归方程	R^2
SPIP 模型	EqS	5.20 ~ 80.00	C = 28 442.37A + 8 660.86	0.999 6
	ES	9.922 5 ~ 132.30	C = 31 242.70A + 38 233.14	0.999 4
	阿替洛尔	10.246 ~ 327.879	C = 14 079.81A + 18 360.93	0.999 6
Ussing Chamber 小肠模型	EqS	0.05 ~ 12.00	C = 322 010.76A − 6 107.22	0.999 1
	ES	0.005 ~ 20.00	C = 360 904.89A + 71 395.57	0.997 3
	阿替洛尔	0.025 ~ 35.00	C = 180 947.70A + 2 479.18	0.999 6

1.3 精密度及回收率 2 种模型中 EqS,ES,阿替洛尔日内、日间精密度 RSD 均 < 15%,低、中、高 3 个质量浓度的方法回收率均大于 70%,均符合生物样品检测的方法学要求。结果见表 2 和表 3。

表 2 EqS,ES,阿替洛尔在 SPIP 模型中日内和日间的精密度和回收率 $\bar{x} \pm s, n = 6$

化学成分	浓度 /μg·mL^{-1}	日内检测质量 /μg·mL^{-1}	日间检测质量 /μg·mL^{-1}	RSD/%		回收率/%
				日内	日间	
EqS	10.40	10.56 ± 0.26	10.52 ± 0.06	2.43	0.55	89.16 ± 3.90
	30.40	32.72 ± 0.48	32.80 ± 0.28	1.46	0.86	95.40 ± 3.65
	60.80	62.90 ± 0.98	62.76 ± 0.14	1.55	0.22	92.85 ± 3.51
ES	19.85	20.11 ± 0.50	19.96 ± 0.28	2.51	1.41	91.99 ± 3.12
	39.69	40.75 ± 0.51	40.92 ± 0.48	1.24	1.19	92.94 ± 0.81
	79.38	80.45 ± 1.45	80.26 ± 0.20	1.80	0.24	92.51 ± 3.89
阿替洛尔	20.49	22.15 ± 0.35	22.11 ± 0.07	1.59	0.32	93.35 ± 3.64
	81.97	90.58 ± 1.03	90.33 ± 0.61	1.14	0.68	95.18 ± 2.83
	163.94	180.54 ± 2.49	180.24 ± 1.15	1.38	0.64	92.49 ± 3.71

表 3 EqS,ES,阿替洛尔在 Ussing Chamber 小肠模型中日内和日间的精密度和回收率 $\bar{x} \pm s, n = 6$

化学成分	浓度 /μg·mL^{-1}	日内检测质量 /μg·mL^{-1}	日间检测质量 /μg·mL^{-1}	RSD/%		回收率/%
				日内	日间	
EqS	1.00	0.87 ± 0.03	0.98 ± 0.10	2.90	10.33	70.07 ± 1.15
	4.00	3.58 ± 0.12	4.19 ± 0.53	3.40	12.61	82.44 ± 3.36
	8.00	7.95 ± 0.43	8.43 ± 0.47	5.45	5.64	85.44 ± 6.68
ES	2.00	1.87 ± 0.12	1.89 ± 0.23	6.42	12.33	71.83 ± 2.38
	8.00	8.61 ± 0.36	8.40 ± 0.60	4.16	7.16	79.20 ± 4.14
	16.00	17.10 ± 0.45	17.34 ± 0.26	2.62	1.51	90.94 ± 5.88
阿替洛尔	0.50	0.45 ± 0.06	0.44 ± 0.01	2.72	1.40	80.27 ± 4.98
	5.00	4.82 ± 0.13	4.69 ± 0.12	2.61	2.56	82.89 ± 3.42
	17.50	17.82 ± 0.97	16.96 ± 0.91	5.43	5.34	87.01 ± 3.64

1.4 稳定性 EqS,ES,阿替洛尔低、高 2 个质量浓度的样品在室温下放置 4 h,4 ℃放置 6 h, −20 ℃放置 3 d 的浓度与 0 h 进行比较,回收率在 98% ~ 101%,表明 EqS,ES,阿替洛尔在所考察条件下稳定性良好。

2 SPIP 模型中 CE 主要成分与阿替洛尔的渗透性

配制阿替洛尔与 EqS + ES 都为 85 μg·mL^{-1} 灌流液,将阿替洛尔视为内标一同灌注大鼠空肠、回肠,考察同一浓度下,EqS + ES 在 2 个肠段的吸收情况,与阿替洛尔的吸收进行比较,其 P_{eff} 和 K_a 结果见

表 4。数据显示,EqS + ES 在空肠、回肠中吸收无差异($P > 0.05$),空肠、回肠中 EqS + ES 与阿替洛尔吸收均无统计学差异($P > 0.05$)。

表 4 CE 主要成分与阿替洛尔在 SPIP 模型中的 P_{eff} 与 K_a $\bar{x} \pm s, n = 6$

化学成分	C_0 /μg·mL^{-1}	P_{eff}/ ×10^{-4} cm·s^{-1}		K_a/ ×10^{-4} s^{-1}	
		十二指肠	空肠	回肠	结肠
EqS + ES	85.00	0.22 ± 0.07	0.24 ± 0.08	2.14 ± 0.65	2.22 ± 0.70
阿替洛尔	85.00	0.18 ± 0.11	0.32 ± 0.15	1.67 ± 1.01	2.91 ± 1.25

3 Ussing Chamber 小肠模型中 CE 主要成分与阿替洛尔的渗透性

配制阿替洛尔与 CE 中 EqS + ES 都为 853 μg·mL^{-1},考察同一浓度下 EqS + ES 与阿替洛尔在十二指肠、空肠、回肠及结肠的吸收情况并进行比较。EqS + ES 与阿替洛尔的累积吸收量 Q 见图 2,K_a 和 P_{app} 见表 5 和表 6。结果显示 EqS + ES 与阿替洛尔在 4 个肠段均有吸收,其回归相关系数(r)均达到 0.96 以上,符合一级吸收;EqS + ES 的 P_{app} 在结肠最大,十二指肠最小,空肠、回肠吸收情况相当($P > 0.05$);阿替洛尔的 P_{app} 在结肠最大,十二指肠与回肠吸收相当;阿替洛尔在回肠、结肠的 P_{app} 与 EqS + ES 无差异,在其他 2 个肠段有统计学差异($P < 0.05$),提示 EqS + ES 在特定肠段与阿替洛尔相当,可见 CE 和阿替洛尔的吸收程度接近。

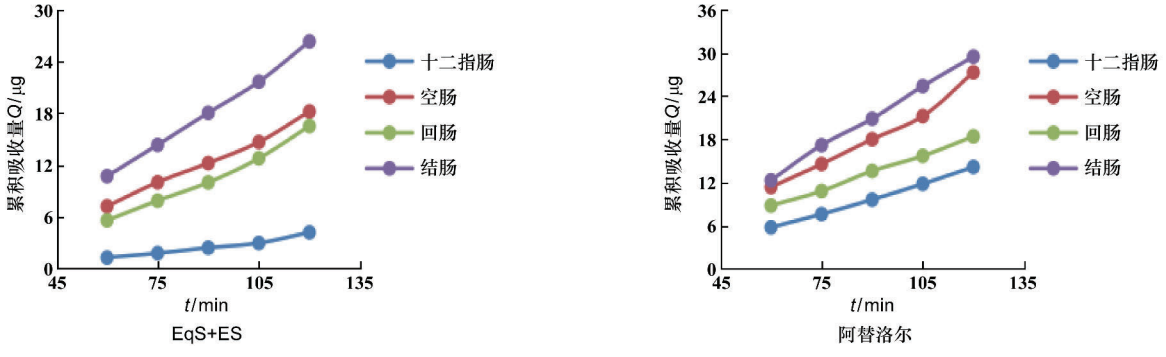


图 2 药物的累积吸收量 Q

表 5 CE 主要成分与阿替洛尔在各肠段的 K_a 和相关系数 r $\bar{x} \pm s, n = 6$

化学成分	C_0 /μg·mL^{-1}	K_a/ ×10^{-3} μg·s^{-1}·cm^{-2}				r			
		十二指肠	空肠	回肠	结肠	十二指肠	空肠	回肠	结肠
EqS + ES	853.00	1.56 ± 0.66	5.91 ± 1.22	5.94 ± 1.10	8.56 ± 1.77	0.971 4	0.984 2	0.990 3	0.987 8
阿替洛尔	853.00	4.66 ± 0.69[a]	8.56 ± 0.99[a]	5.35 ± 0.70	9.46 ± 0.92	0.992 9	0.966 7	0.995 6	0.986 4

a:与 EqS + ES 比较 $P < 0.05$

表 6 CE 主要成分与阿替洛尔在各肠段 P_{app} $\bar{x} \pm s, n = 6$

化学成分	C_0/μg·mL^{-1}	P_{app}/ ×10^{-6} cm·s^{-1}			
		十二指肠	空肠	回肠	结肠
EqS + ES	853.00	1.83 ± 0.77	6.93 ± 1.43	6.96 ± 1.28	10.03 ± 2.07
阿替洛尔	853.00	5.46 ± 0.80[a]	10.04 ± 1.16[a]	6.28 ± 0.82	11.09 ± 1.08

a:与 EqS + ES 比较 $P < 0.05$

讨　论

CE 是亲水性药物，Angel 等[6]报道对于亲水性化合物（log$P$ < 0.5），体外细胞方法（Caco-2，MDCK 和 PAMPA）低估了细胞旁路途径或载体介导的运输底物吸收药物的肠道渗透性，表征此类化合物的肠道渗透性最合适的方法可能是大鼠单向肠灌流模型与 Ussing Chamber 大鼠小肠模型，药物吸收性能按 P_{eff}，P_{app} 分为 3 类：$P_{app} < 1.0 \times 10^{-6}$ cm·s^{-1} 和 $P_{eff} < 0.03 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1} 吸收差，$P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm·s^{-1} 和 $P_{eff} > 2 \times 10^{-4}$ cm·s^{-1} 吸收完全，二者之间为中等吸收[7]。本实验结果显示 CE 在结肠 $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm·s^{-1}，其他 3 个肠段的 P_{eff}，P_{app} 介于两者之间；阿替洛尔是《人体生物等效性试验豁免指导原则》中规定的中渗模型药，本实验在特定肠段 CE 与阿替洛尔 P_{eff}，P_{app} 相当，表明 CE 在结肠吸收可能较好，在其他 3 个肠段为中等吸收。

大鼠 SPIP 模型中，常用校正水分的方法主要有重量法和酚红法，文献报道酚红在肠道是有一定吸收的[8]，对于难吸收的药物，酚红的吸收可能对实验结果产生影响[9]，CE 的亲水性使其在胃肠道中吸收较差，故采用重量法。Ussing Chamber 小肠模型中，本实验分离肠黏膜组织时未剥离肠段浆膜层，虽然肠道的浆膜层被认为是营养物质、氧气及药物扩散的屏障，Sjogren 等[10]报道指出在渗透性研究时可以不剥离，既可减少组织制备时间，也可最大限度减少组织处理来降低组织受伤的风险。

SPIP 模型相对 Ussing Chamber 小肠模型来说可提供完整的血液供应和功能屏障，具有与人的正常生理状态非常相似的优点，对于吸收较差的药物来说，SPIP 检测的是未被肠道渗透的药物量，样品处理方法较简单迅速且更容易被检测，但此模型实验操作难度较大，实验结果重复性相对较差；Ussing Chamber 小肠模型的成本相对较低，操作简单快速，实验的可控性较强，得到的实验数据较多且结果重现性较好，但对于吸收较差的药物来说，样品处理过程复杂、耗时长、对仪器的灵敏度有要求，离体条件下酶活力降低，也会影响部分药物的渗透性数值[11]。

本实验所得阿替洛尔的 P_{eff}，P_{app} 与文献[12-13]报道相近，说明 2 种模型建立成功。阿替洛尔是碱性化合物（pK_a 9.6），根据 pH 平衡分配理论，阿替洛尔在较高的 pH 下应该有较高的渗透性，回肠的 pH 高于空肠，因此理论上阿替洛尔在回肠的吸收应优于空肠，2 种模型进行比较，大鼠 SPIP 模型所得结果更符合理论；也有文献报道，Ussing Chamber 小肠模型已广泛用作制药行业的开发工具，但是具有较高 P_{app} 的化合物也具有较高 P_{eff} 的趋势并不明显[14]。综上 2 种模型均适合确定化合物的肠道区域渗透性，大鼠 SPIP 模型似乎更加准确可靠。

[参 考 文 献]

[1] 木拉塔力·克力木，高晓黎，肖健民，等. 孕马尿中雌激素成分的研究[J]. 新疆医科大学学报，2009，32(4)：403－405.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 人体生物等效性试验豁免指导原则[S]. 2016.

[3] 萧惠来. FDA《根据 BCS 豁免速释固体口服制剂体内生物利用度和生物等效性研究的指导原则》介绍[J]. 药物评价研究，2018，41(5)：753－760.

[4] 张燕，朱华旭，郭立玮. 在体单向肠灌流模型研究小檗碱及其在复方配伍环境中的大鼠肠吸收特性[J]. 药学学报，2012，47(2)：233－238.

[5] ZHAO XY，WANG Y，ZHENG L，*et al*. Comparative pharmacokinetics study of five alkaloids in rat plasma and related compound-herb interactions mechanism after oral administration of Shuanghua Baihe tablets[J]. *Nat Prod Res*，2018，32(17)：2031－2036.

[6] ÁNGEL CPM，HAI PT，MIRNA FC，*et al*. Integrating theoretical and experimental permeability estimations for provisional biopharmaceutical classification：application to the WHO essential medicines[J]. *Biopharm Drug Dispos*，2018，39(7)：354－368.

[7] 高旭，王亚静，皮佳鑫，等. 补骨脂酚大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中成药，2013，35(10)：2122－2125.

[8] 崔升淼，赵春顺，何仲贵. 大鼠肠管外翻模型对葛根素吸收机制的研究[J]. 时珍国医国药，2008，19(7)：1715－1716.

[9] 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.

[10] SJÖGREN E，ERIKSSON J，VEDIN C，*et al*. Excised segments of rat small intestine in Ussing chamber studies：a comparison of native and stripped tissue viability and permeability to drugs[J]. *Int J Pharm*，2016，505(1－2)：361－368.

[11] ALAM MA，AL-JENOOBI FI，AL-MOHIZEA AM. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research：limitations and applications[J]. *J Pharm Pharmacol*，2012，64(3)：326－336.

[12] DAVIT BM，KANFER I，TSANG YC，*et al*. BCS biowaivers：similarities and differences among EMA，FDA，and WHO requirements[J]. *AAPS*，2016，18(3)：612－618.

[13] LI H，JIN HE，SHIM WS，*et al*. An improved prediction of the human *in vivo* intestinal permeability and BCS class of drugs using the *in vitro* permeability ratio obtained for rat intestine using an Ussing chamber system[J]. *Drug Dev Ind Pharm*，2013，39(10)：1515－1522.

[14] ROOS C，DAHLGREN D，SJÖGREN E，*et al*. Regional intestinal permeability in rats：a comparison of methods[J]. *Mol Pharm*，2017，14(12)：4252－4261.

编辑：杨青/接受日期：2021－05－12