

5-Fu 大鼠在体肠道吸收动力学和结肠吸收促进剂的研究

孙洁胤,周芝芳,刘放(浙江省医学科学院,浙江 杭州 310013)

摘要:目的 研究氟脲嘧啶(5-Fu)在大鼠肠道的吸收动力学,选择合适的结肠吸收促进剂。方法 进行大鼠在体灌流肠吸收实验,研究 5-Fu 在小肠和结肠的吸收情况,并分别考察枸橼酸钠和聚山梨酯(吐温 80)对结肠吸收的促进作用。结果 5-Fu 在小肠和结肠的吸收速率分别为 $10.66 \pm 4.38 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, $0.72 \pm 0.53 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;含 1%枸橼酸钠或吐温 80 的溶液结肠灌流后测得吸收速率分别为 $2.23 \pm 1.03 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, $1.70 \pm 0.55 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,经统计学检验,二者能显著提高结肠吸收速率。结论 5-Fu 在结肠段吸收速率较小肠小,枸橼酸钠和吐温 80 对 5-Fu 在结肠的吸收有显著促进作用,枸橼酸钠的促进作用优于吐温 80。

关键词:氟脲嘧啶;在体肠吸收动力学;结肠吸收促进剂

中图分类号:R979.14;R969.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)05-0386-04

Studies on the absorption kinetics of fluorouracil and effect of colon penetration enhancers using perfusion method in rats

SUN Jie-yin, ZHOU Zhi-fang, LIU Fang (Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To explore the absorption kinetics of fluorouracil in various intestinal segments, and select apposite colon penetration enhancers. **METHOD** The absorption kinetics was investigated using perfusion method in rats. Effect of 1% sodium citrate or 1% tween 80 were investigated by way of perfused in colon. **RESULTS** It was showed that fluorouracil could be absorbed absorption in small intestine and colon, and the permeability rate constants were $10.66 \pm 4.38 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ and $0.72 \pm 0.53 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. With 1% sodium citrate or 1% tween 80 and in colon, the permeability rate constants were $2.23 \pm 1.03 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ and $1.70 \pm 0.55 \times 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** Fluorouracil is absorbed more in small intestine than in colon. Sodium citrate and tween 80 can remarkably increase the absorption of fluorouracil in colon. The enhancement of sodium citrate is better than tween 80.

KEY WORDS:

5-Fu 是治疗消化道癌的首选药。但由于消除半衰期很短,临床常用静脉给药方法,给药后,血药浓度迅速达峰,其高峰浓度仅维持数分钟,但癌组织药物浓度并不高,且易造成骨髓抑制和正常组织的损伤。有人研究了口服给药方法,发现给药后血药浓度虽很低,但癌组织中药物浓度却很高,与静脉给药无明显差别,且能不断吸收,维持较长时间,能满足小剂量长时间杀灭癌细胞的要求,造成的骨髓抑制和全身影响也小得多^[1,2]。但口服给药生物利用度低,因此为提高 5-Fu 的口服生物利用度,减少胃肠道反应,研制更适宜的制剂是必要的。口服结肠给药是近年来研究较多的热点。本实验采用大鼠在体动物模型^[3,4],研究 5-Fu 在小肠和结肠的吸收动力学,并考察结肠吸收促进剂对结肠吸收速率的影

响,为 5-Fu 口服结肠给药制剂的研制提供生物药剂学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SD 大鼠,雌雄各半,体重约 200g。

1.2 仪器与试剂

HL-2 型恒流泵(上海精科实业有限公司);TU1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司);Shimadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津);ubondapak ODS C₁₈ 柱(4.6mm × 250mm,10μm);0.45μm 微孔滤膜。

氟脲嘧啶(5-Fu,山东济南药厂);氟胞嘧啶(5-Fc,上海华联药厂);酚红(上海试剂三厂);2%戊巴比妥钠;小肠 Kerbs-Ringer 试剂(pH = 6.7);结肠 Kerbs-Ringer 试剂(pH = 7.4);

基金项目:本课题得到浙江省医学科学院 1999 年院科研基金的资助。作者简介:孙洁胤:(1976~)女,1999 年毕业于浙江大学药学院。现任浙江省医学科学院药物研究所制剂研究室研究实习生,从事药物制剂研究工作。Tel:0571-88215628

0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 3.0)。

2 实验方法

2.1 供试液的配制

精密称取酚红约 40 mg, 5-Fu 约 400 mg, 用 Kerbs-Ringer 溶解并定容至 100 mL, 作为供试贮备液。精密吸取 5.0 mL, 用 Kerbs-Ringer 试剂稀释至约 100 mL 作为供试液。

2.2 大鼠在体灌流肠吸收实验

调节恒温水浴温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 将 Kerbs-Ringer 试剂、供试液置恒温水浴槽中预热至 37°C 。取实验前禁食 24 h 的 SD 大鼠, 称重, ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg, 保持体温在 37°C 。沿腹中线打开约 3 cm, 在考察部分(分为两部分: 小肠部分从十二指肠上端到回肠下端; 结肠部分从盲肠的下端到直肠)的两端插管, 结扎, 分别用相应 pH 的 Kerbs-Ringer 试剂洗涤肠管, 与蠕动泵连成回路。用 Kerbs-Ringer 试剂平衡 30 min (小肠: 2 mL/min, 结肠: 1.2 mL/min)。排尽 Kerbs-Ringer 试剂, 改用 100 mL 供试液回流。小肠实验每隔 20 min 取样, 结肠实验每隔 1 h 取样。每次取出 2 mL, 并立即补充 Kerbs-Ringer 试剂 2 mL。所取回流液经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 进行测定。见图 1

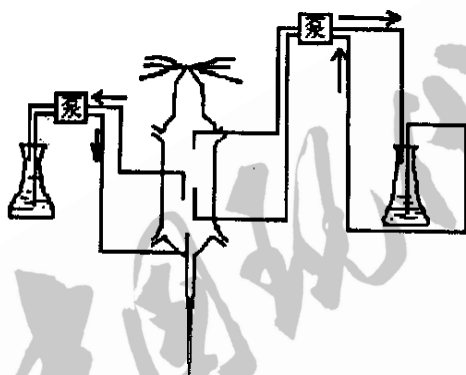


图 1 大鼠在体灌流肠吸收

Fig 1 Perfusion Method in Rat

2.3 酚红浓度的测定及体积计算

吸取 0.5 mL 续滤液, 置 5 mL 容量瓶中, 加 0.2 mol/L NaOH 至刻度。显色 10 min, 在 555 nm 处测吸收度。用 0.2 mol/L NaOH 作为空白对照。代入酚红标准曲线, 计算酚红浓度及回流液的体积:

公式: $V_1 = X / C_1$

$$V_n = \frac{[(V_{n-1} - 2) \times C_{n-1} + 2 \times C_0]}{C_0} \quad (n \geq 2)$$

其中: X 为供试液中酚红的总量, 单位: μg ; V_1 为 0 时间时回流液体积, V_n 为取样点时回流液体积, V_{n-1} 为前一次取样点时回流液体积, 单位: mL; C_1 为 0 时间时回流液中酚红浓度, C_n 为取样点时回流液中酚红浓度, C_{n-1} 为前一次取样点时回流液中酚红浓度, 单位: $\mu\text{g} / \text{mL}$; C_0 为补加液中酚红的浓度, 单位: $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

2.4 回流液中药物的 HPLC 测定和剩余药量计算

色谱系统: Shimadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津); $\mu\text{bondapak ODS } C_{18}$ 柱($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}, 10\mu\text{m}$); 流动

相: 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 3.0); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL ; UV 检测: 268 nm。

精密称取 5-Fc 约 20 mg, 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 作为内标液。取 0.5 mL 续滤液, 加入 5-Fc 内标液 0.5 mL, 用流动相定容至 5 mL, 作为样品溶液。另精密称取 5-Fu 约 20 mg, 用 Kerbs-Ringer 试剂定容至 100 mL, 吸取 0.5 mL, 置 5 mL 量瓶中, 精密加入 0.5 mL 5-Fc 内标液, 用流动相定容至 5 mL, 作为对照品溶液。吸取 20 μL 样品溶液和对照品溶液, 注入液相色谱仪, 记录图谱。用内标法计算样品溶液中 5-Fu 的浓度。并根据回流液体积计算 5-Fu 的剩余药量和吸收的药量。

公式: $X_1 = V_1 \times C_1$

$$X_n = C_n V_n + 2.0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i - 2.0 \times C_0$$

其中: X_1 为 0 时间时 5-Fu 药量, X_n 为取样点时 5-Fu 剩余药量, 单位: μg ; V_1 为 0 时间时回流液体积, V_n 为取样点时回流液体积, 单位: mL; C_1 为 0 时间时回流液中 5-Fu 浓度, C_n 为取样点时回流液中 5-Fu 浓度, 单位: $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

3 结果

3.1 酚红标准曲线

精密称取酚红约 40 mg, 用 Kerbs-Ringer 试剂溶解并定容至 100 mL。精密吸取 5.0 mL, 用 Kerbs-Ringer 试剂定容至 50 mL。精密吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL, 用 Kerbs-Ringer 试剂定容至 10 mL, 配成系列浓度的酚红标准溶液。各取上述溶液 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 0.2 mol/L NaOH 至刻度, 显色 10 min, 在 555 nm 处测吸收度。标准曲线为: $C(\mu\text{g} / \text{mL}) = -0.35177 + 51.72149 A$, $r = 0.9998$, ($n = 7$)

3.2 HPLC 法方法学试验结果

HPLC 法测定回流液中 5-Fu 浓度, 计算方法为加校正因子的内标法。色谱图见图 2。

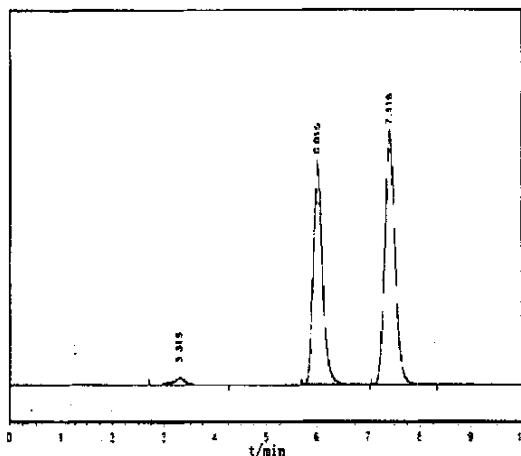


图 2 样品溶液的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of sample solution

3.2.1 线性与范围 精密称取 5-Fu 约 100 mg, 用 Kerbs-Ringer 试剂定容至 50 mL, 精密吸取 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 mL, 分别用 Kerbs-Ringer 试剂定容至 10 mL, 配成系列浓度的 5-Fu 标准溶液。各精密吸取 0.5 mL, 加入 5-Fc 内

标液 0.5 mL,用流动相定容至 5 mL。取 20 μ L 注入液相色谱仪中。以 $A_5\text{-Fu}/A_5\text{-Fc}$ 对 5-Fu 浓度回归,得回归方程: $y = -0.04327 + 0.006968x$ $r = 0.99978$ 。5-Fu 浓度在 40 ~ 400 % 范围内,线性良好。

3.2.2 最低检测限:按信噪比(S/N) = 3 计,最低检测限为 5 ng。

3.2.3 回收率 精密称取 5-Fu 约 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加适量蒸馏水,超声震荡使溶,用蒸馏水定容。为标准加入液。取大鼠肠吸收实验结束后剩余回流液,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液。精密吸取该续滤液 7 份,每份 0.5 mL,其中第 1 份加入 5-Fc 内标液 0.5 mL,用流动相定容至 5 mL。第 2 ~ 7 份每份各精密加入 0.2 mL 5-Fu 标准加入液和 0.5 mL 5-Fc 内标液,用流动相定容至 5 mL。吸取 20 μ L 样品溶液和对照品溶液,注入液相色谱仪,记录图谱。用内标法计算样品溶液中 5-Fu 的浓度。小肠吸收的回收率结果为 (100.67 $\pm$ 1.07) %;结肠吸收的回收率结果为 (99.91 $\pm$ 1.73) %。

3.3 大鼠在体灌流肠吸收实验结果

分别以 5-Fu 累积吸收药量对时间作图,结果见图 3。通过线性拟合,5-Fu 的吸收方程用 $\ln X = \ln X_0 - K_{at}$ 表示。求出吸收速率常数(K_a),结果见表 1。

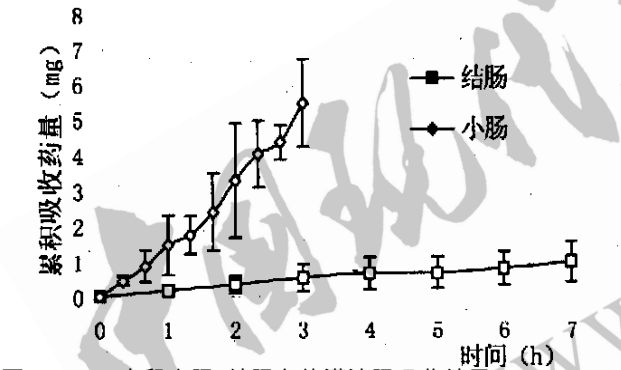


图 3 5-Fu 大鼠小肠、结肠在体灌流肠吸收结果
Fig 3 Absorption curves of fluorouracil in rat small intestine and colon

表 1 5-Fu 在大鼠小肠和结肠吸收速率常数 K_a ($\times 10^{-2} \cdot h^{-1}$)

Tab 1 The fluorouracil absorption rate constants in rat small intestine and colon ($K_a, \times 10^{-2} \cdot h^{-1}$)							
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$
小肠	15.52	6.39	16.77	8.79	7.30	9.21	10.66 $\pm$ 4.38
结肠	1.54	0.57	0.24	0.18	1.16	0.64	0.72 $\pm$ 0.53

对小肠与结肠吸收的 K_a 进行 T 检验,结果为: $T = 5.513 > 2.228, P < 0.05$ 。

实验证明 5-Fu 可在全肠道被吸收,在小肠和结肠的吸收有非常显著的差别,在结肠吸收的量和吸收速率均比小肠小得多。

3.4 结肠吸收促进剂对结肠吸收速率的影响

回流液中分别加 1 % 枸橼酸钠或加 1 % 吐温 80,在结肠段进行灌流,同法实验,计算 5-Fu 在结肠被吸收的量。分别

以 5-Fu 累积吸收药量对时间作图,结果见图 4。通过线性拟合,5-Fu 的吸收方程用 $\ln X = \ln X_0 - K_{at}$ 表示。求出吸收速率常数(K_a),结果见表 2。

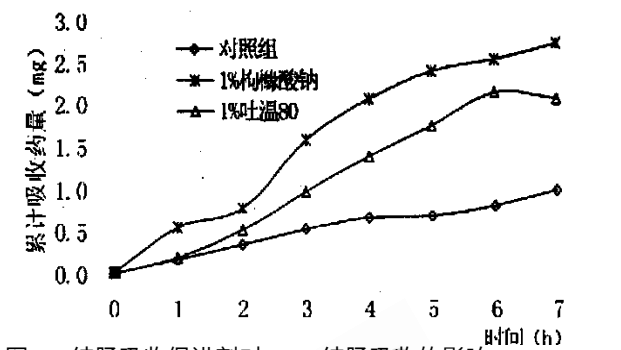


图 4 结肠吸收促进剂对 5-Fu 结肠吸收的影响
Fig 4 The effect of absorption enhancers on absorption of fluorouracil in rat colon.

表 2 枸橼酸钠组、吐温 80 组、对照组的 5Fu 结肠吸收速率常数 K_a ($\times 10^{-2} / h$)

Tab 2 The fluorouracil absorption rate constants of 3 groups							
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$
枸橼酸钠组	1.54	2.27	4.10	1.87	2.42	1.17	2.23 1.03
吐温 80 组	2.06	1.03	1.34	1.24	2.29	2.21	1.70 0.55
对照组	1.54	0.57	0.24	0.18	1.16	0.64	0.72 0.53

对枸橼酸钠组、吐温 80 组、对照组的 5Fu 结肠吸收速率常数 K_a 进行方差分析和多重比较,结果见表 3 ~ 表 4。

表 3 枸橼酸钠组、吐温 80 组、对照组的 5Fu 结肠吸收速率常数的方差分析

Tab 3 Analysis of variance of the fluorouracil absorption rate constants					
差异源	离差平方和	自由度	均方	F	P
组间	7.03×10^{-4}	2	3.52×10^{-4}	6.403	$P = 0.010$
组内	8.24×10^{-4}	15	5.49×10^{-5}	有非常显著差异	
总计	15.27×10^{-4}	17			

表 4 枸橼酸钠组、吐温 80 组、对照组 5Fu 结肠吸收速率常数的多重比较

Tab 4 Multiple comparison of the fluorouracil absorption rate constants			
	$ K_{a1} - K_{a2} $	P	显著性检验
枸橼酸钠-吐温	0.00533	$P > 0.10$	无显著差异
枸橼酸钠-对照	0.01510	$P < 0.05$	有显著差异
吐温-对照	0.00977	$0.05 < P < 0.10$	有差异

注: $T_{0.10(3,15)} = 0.00950$; $T_{0.05(3,15)} = 0.01110$

由上可见,枸橼酸钠组与对照组相比,可显著提高 5-Fu 在结肠的吸收速率;吐温 80 组与对照组相比,具一定促进吸收作用;枸橼酸钠组与吐温 80 组相比,无明显差异;由此可见,枸橼酸钠和吐温 80 均能提高 5-Fu 在结肠的吸收速率。枸橼酸钠对 5-Fu 在结肠的吸收促进作用优于吐温 80。

4 讨论

4.1 根据 Carabro Jones^[5]的研究,5-Fu 在试管内对人类癌细胞冲击给药(作用 1 h),达到半数致死量,需相当高的浓度,

而当作用时间超过细胞周期(72h),则仅需 $1 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。静脉冲击给药峰浓度维持时间短,因此不能达到长时间接触癌细胞的效果,反而会造成较强的骨髓抑制和损伤正常组织等不良反应。设想如果将5-Fu制成结肠靶向给药制剂后,5-Fu在结肠部位缓慢释放,并在长时间内维持一定浓度。这样不仅能达到小剂量长时间杀灭癌细胞的效果,对全身不良反应也小。至于存在的吸收不规则、消化道对药物的作用及药物刺激性等问题可通过制剂学手段、调整给药方式等方法加以解决。

4.2 实验中采用RP-HPLC进行5-Fu的测定。选择5-Fc为内标^[6],用内标法测定。曾采用不同比例的水-甲醇^[7]和不同pH的磷酸缓冲液^[8]为流动相,发现以磷酸缓冲液的效果最好,且pH对其影响很大。pH越小,与内标物5-Fc的分离效果越好,保留时间越小。因此,选择pH=3.0的磷酸缓冲液为流动相。

4.3 实验中,由于肠道对水分有吸收,导致回流液体积改变,故采用离子型化合物酚红进行体积标定^[9]。一般认为酚红不被吸收,常用作体积标记物。有文献报道^[10],酚红也能被小肠吸收,平均吸收速率为 $6\% \cdot \text{h}^{-1}$,在结肠则几乎不被吸收。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子能抑制酚红的吸收。本实验考虑到用酚红标示体积将产生的误差,故采用含有一定浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的Kerbs-Ringer试剂配制回流液。

4.4 在选择结肠吸收促进剂时,考虑了多种促进剂,但由于实验条件限制,加入至回流液中的促进剂必须能溶解。Azone等水溶性不好,故选择枸橼酸钠和吐温进行实验,且两者对HPLC测定无干扰。由于吐温存在口感差等问题,认为枸橼酸钠作为促进剂更有前途。

4.5 由实验结果可得,5-Fu在结肠吸收量和吸收速率比小肠小得多,两者有非常显著差异。当加入1%枸橼酸钠或1%吐温80后,均能使结肠吸收的速度明显加快,但仍比小

肠吸收慢。由于药物在结肠停留时间比在小肠停留时间长得多,且结肠部位各种酶少,故提示可通过加入促进剂方法使结肠吸收增加,从而有望制成口服结肠靶向制剂。

参考文献

- [1] 张同琳,张慧芬,张自顺等.5-氟脲嘧啶合理给药途径的初步探讨[J].北京医科大学学报,1993,25(5):349.
- [2] 秦星,张自顺,陈守经.5-Fu术中瘤段肠腔灌注作为大肠癌化疗途径的评价[J].北京医科大学学报,1993,25(4):287.
- [3] 陆彬.药剂学实验[M].北京:人民卫生出版社,1994.131.
- [4] 杨正管,朱家璧,岗艳云.盐酸地尔硫卓大鼠肠吸收动力学及在口服缓释制剂设计中的意义[J].中国药科大学学报,1998,29(3):179.
- [5] Carabro Jones P.M. Time-Dose Relationships for 5-Fluorouracil cytotoxicity against human epithelial cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Res, 1982, 42: 4413.
- [6] Joyce. A. Smith-Rogers, William Tone, Mary E duafala. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous measurement of floxuridine and fluorouracil in human body fluids [J]. J Chromatogr, 1991, 566: 147.
- [7] M. Barberi-Heyob, J. L. Merlin, B. Weber. Analysis of 5-fluorouracil in plasma and urine by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1992, 581: 281.
- [8] Del MJ. Nozal. Determination of 5-fluorouracil in vitreous gel and liquid by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1992, 607: 183.
- [9] Tamotsu Koizumi, Takaichi Arita, Klichiro Kake ml. Absorption and excretion of drugs: Some pharmacokinetic aspects of absorption and excretion from rat small intestine. Chem Pharm Bull [J], 12(4): 421.
- [10] 胡一桥,郑梁元,钱陈钦.离子型药物酚红的小肠吸收研究[J].中国药科大学学报,1996,27(6):355.