

月桂酸对瑞巴派特经大鼠结肠黏膜透过性的影响

李国锋¹, 任非¹, 山本昌², 侯连兵¹ (1. 南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515; 2. 京都药科大学药剂学, 京都 607-8414, 日本)

摘要:目的 研究吸收促进剂月桂酸对瑞巴派特经结肠黏膜的透过特性。方法 使用体外扩散池系统评价 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 瑞巴派特经空肠、回肠和结肠黏膜的经时经吸收方向和分泌方向的透过量 and 透过系数 (Papp) 并观测不同浓度月桂酸对药物经结肠黏膜透过性的影响。瑞巴派特在接受室中的浓度用 HPLC 测定。结果 瑞巴派特经空肠和回肠的透过性较结肠要高。在回肠部分, 瑞巴派特从浆膜侧到黏膜侧的透过性略高于其从黏膜侧到浆膜侧的透过性。月桂酸可以显著地增加瑞巴派特经结肠黏膜的透过性, 并存在浓度依赖性关系。结论 瑞巴派特经大鼠胃肠道的透过性存在区段差。月桂酸是一种具有潜在应用价值的增加药物经胃肠道吸收的促进剂。

关键词: 瑞巴派特; 扩散室; 透过性; 月桂酸

中图分类号: R975.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)06-0475-04

The Effect of Sodium Laurate on the Permeability of Rebamipide across the Colonic Tissue

LI Guo-feng¹, REN Fei¹, YAMAMOTO Akira², HOU Lian-bin¹ (1. Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Pharmaceutical Department of Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607-8411, Japan)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of sodium laurate on the permeability characteristics of rebamipide across the colonic membranes. **METHODS** The permeability (Papp) of rebamipide via rat intestinal membranes at concentration of $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was evaluated by an *in vitro* diffusion chamber system after the membranes were isolated from the intestine in rat, with or without the co-administration of sodium laurate at different concentration. And the concentration of rebamipide in the receptor was determined by HPLC. **RESULTS** The permeability of rebamipide across the jejunal or ileal membranes was higher than that across the colonic membranes, and the transport of rebamipide in the ileal tissue from the mucosal to serosal direction was slightly greater than that from serosal to mucosal direction. Sodium laurate significantly increased the *in vitro* permeability of rebamipide across the colon membranes. And there exists a concentration-dependent effect of sodium laurate on the absorptive transport of rebamipide via colon. **CONCLUSION** There was a regional difference in the permeability of rebamipide across the jejunum, ileum and the colon in rat. Also, sodium laurate may be a useful absorption enhancer for the oral dosage forms.

KEY WORDS: rebamipide; diffusion chamber; permeability; sodium laurate

瑞巴派特 (2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2-(1H)-quinolinon-4-yl] propionic acid), 一种新的抗溃疡药物, 具有抑制各种急性实验性损伤, 加速慢性胃溃疡的愈合作用^[1]。1990年作为胃溃疡和急性慢性胃炎的药物首先在日本上市。至今为止, 在临床和基础两个方面已经做了许多研究来了解瑞巴派特的特性, 但系统地研究瑞巴派特在不同胃肠组织的透过性尚未见报告。而这些研究数据对于早期开发合适的口服制剂是非常有意义的, 是关键的因素之一。因此, 本实验中笔者评价了瑞巴派特经过不同胃肠黏膜的透过特性。并选择结肠黏膜作为模型区段, 进一步探讨了吸收促进剂月桂酸对瑞巴派特经结肠组织渗透的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

扩散 Chamber 仪器购于美国 Harvard。HPLC 仪器为

Shimadzu LC-10A。pH 测量仪器为日本 DKK TOA 公司生产。

1.2 药品与试剂

瑞巴派特 (分析纯) 购于 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO)。HEPES (分析纯) (2-[4-(2-hydroxyethyl) 羧基]-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) 购于光和纯药 (日本)。TRIZMA BASE (Tris(hydroxymethyl) aminomethane), 纯度 $\geq 99.9\%$ 购于 Sigma 公司, 月桂酸 (分析纯) 来自 Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd, labrasol (分析纯) 来自法国 Saint-Priest。其余所用的化学品均为分析纯。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠, 雄性, 260 ~ 280 g, 日本京都清水材料公司提供。

2 方法与结果

2.1 HEPES 溶液的制备

基金项目: 本文的部分实验在日本完成, 并得到日本日中医学会科研经费的资助。

作者简介: 李国锋, 男, 博士, 主任药师, 教授, 博士生导师

Tel: (020) 62787236

E-mail: lgfnf@fimmu.com

取 HEPES 0.6 g,溶于 80 mL 蒸馏水中,使之完全溶解。通入混合气体 (95% O₂:5% CO₂) 10 min 后,加入 0.18 mL KCl (3 mol·L⁻¹), 0.18 mL CaCl₂ (1 mol·L⁻¹), 0.08 mL MgSO₄ (1 mmol·L⁻¹), 0.818 g NaCl 完全溶解后用 Tris 溶液 (1 mmol·L⁻¹) 调节 pH 至 7.4,再加入 0.5 mL 葡萄糖溶液 (1 mol·L⁻¹),用蒸馏水稀释至 100 mL,混匀即得。

2.2 试验药物溶液的制备

将瑞巴派特溶解在 pH 7.4 的混合气体 (95% O₂:5% CO₂) 饱和的新鲜配制的 HEPES 中,实验用瑞巴派特的最终浓度为 80 μmol·L⁻¹。

制备含月桂酸的瑞巴派特溶液,首先用适量 labrasol 溶解月桂酸,使 labrasol 在试验药物溶液中的最高浓度不超过 0.4%。月桂酸在试验药物溶液中的浓度分别为 0.5、1 和 2 mmol·L⁻¹。

2.3 渗透研究

用扩散 Chamber 池实验法,使用离体大鼠小肠黏膜,研究 120 min 内瑞巴派特经不同肠黏膜的经时透过量^[2]。Wistar 大鼠,禁食 16 h,用戊巴比妥钠 (32 mg·kg⁻¹) 麻醉。取出全部肠道组织,用 pH 7.4 的 PBS 冲洗干净。去掉小肠顶部的 5 cm,接着的 10 cm 的小肠被作为空肠,最后的 10 cm 被作为回肠。去掉大肠的最初 2 cm,接着的 6 cm 被作为结肠。剥离浆膜侧的浆膜层,将肠黏膜固定在扩散室中,扩散室的有效面积为 1.78 cm²。一旦肠黏膜被固定好后,即刻在扩散池的黏膜侧或浆膜侧加入已经加热到 37.5 °C, pH 7.4 的 HEPES 缓冲液 7 mL,而等体积同温度的试验用瑞巴派特溶液被加入到相反侧。扩散池的两边均通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,并以 37.5 °C 恒温来维持肠黏膜的活性。在给定的时间间隔,接收侧取样 0.4 mL 同时立刻补充同温度的等体积的 HEPES 缓冲液。样品中瑞巴派特的浓度用 HPLC 来分析。在本研究中所有涉及动物实验过程均得到京都药科大学实验动物研究委员会的批准。

2.4 表观透过系数 (Papp)

用下列公式计算: $Papp = (dC/dT) \times (1/AC_0)$, 这里 Papp 以 cm·s⁻¹ 表示, dC/dT 是透过曲线直线部分的斜率, A 指扩散面积, C₀ 是药物在供体室的初始浓度。

2.5 HPLC 分析条件

分析柱为 Cosmosil (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相: 1.5% 冰醋酸溶液含 10% 四氢呋喃的乙腈溶液 (69:31), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 240 nm。瑞巴派特保留时间为 (5.45 ± 0.1) min。所建立测定方法日内、日间 RSD 分别为 0.39% 和 0.93%, 方法的平均回收率为 94.7%。当药物的浓度在 50 ~ 3 200 nmol·L⁻¹ 之间, 具有较好的线性关系, 相关系数 (R²) 达到 0.999 以上。

2.6 瑞巴派特经过不同肠黏膜的渗透差异

瑞巴派特经大鼠不同肠黏膜的吸收 (黏膜侧到浆膜侧转运, M-S) 和分泌方向 (浆膜侧到黏膜侧转运, S-M) 的经时曲线图见图 1; 瑞巴派特在不同肠黏膜的 Papp 汇总结果见图 2。如图 1 和 2 所示, 体外瑞巴派特的渗透性存在部位差异。

瑞巴派特经空肠和回肠的渗透性比结肠的要高。然而, 在空肠和回肠区域的渗透性无显著差异。而且, 瑞巴派特在空肠和结肠部位其 S-M 方向的转运同其 M-S 方向的转运几乎一样, 但是, 在回肠组织, 其 S-M 方向的转运量略高于其 M-S 方向的转运量。根据部位渗透差异的研究结果, 我们进一步选择结肠作为一种模型区域来评价吸收促进剂月桂酸对瑞巴派特在结肠部位转运的影响。

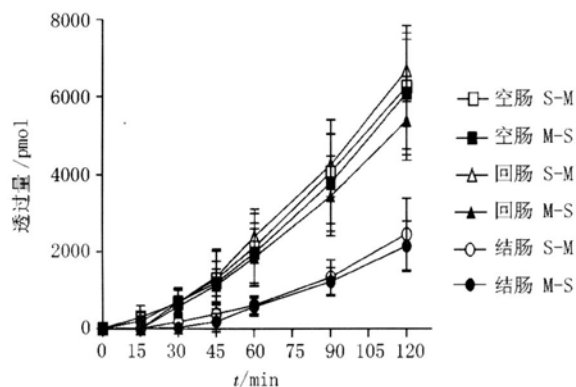


图 1 瑞巴派特经大鼠不同肠黏膜的吸收 (M-S) 和分泌 (S-M) 方向的经时曲线图 ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$)

Fig 1 Time course of M-S and S-M transport of rebamipide across the different intestinal tissues ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$)

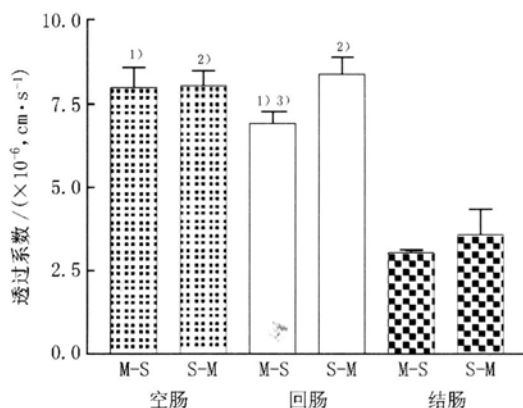


图 2 瑞巴派特在不同肠黏膜的表观透过系数 ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$) 与结肠的吸收方向比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与结肠的分泌方向比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与回肠的分泌方向比较, ³⁾ $P < 0.05$ ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$)

Fig 2 Papps of rebamipide across the different intestinal regions ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$)

Compared with colon M-S, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with colon S-M, ²⁾ $P < 0.01$; compared with ileum S-M, ³⁾ $P < 0.05$ ($n=6 \sim 15, \bar{x} \pm s$)

Cl2 对瑞巴派特经结肠黏膜透过量 and Papp 的影响见图 3, 4。从图中可以看出, Cl2 可以显著地增加瑞巴派特从结肠黏膜的透过性。而且在 0.5 ~ 2 mmol·L⁻¹ 的试验浓度范围内, Cl2 对瑞巴派特从结肠黏膜的透过性存在浓度依存性。一般来说, 随着 Cl2 浓度的增加, 瑞巴派特的透过性增加。在实验中, 使用了 0.4% 的 labrasol 来增加 Cl2 在 HEPES 中的溶解度, 是由于 Cl2 在 HEPES 中不易溶解。因此, 笔者也考察了 labrasol 对瑞巴派特经结肠黏膜渗透性的影响。

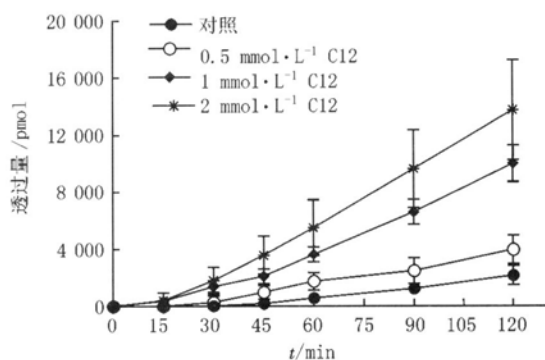


图3 不同浓度 C12 对瑞巴派特经肠黏膜透过的经时曲线
Fig 3 Time course of transport of rebamipide across the colonic tissues in the presence of various concentrations of C12

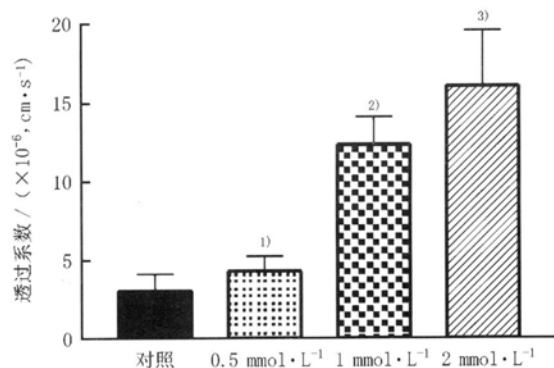


图4 不同浓度 C12 对瑞巴派特经肠黏膜的表现透过系数与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$
Fig 4 Effect of various concentrations of C12 on the Papps of rebamipide in the colonic tissues

Compared with control, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.8 Labrasol对瑞巴派特经结肠黏膜渗透性的影响

Labrasol对瑞巴派特经结肠黏膜的渗透量和 Papp 的增加作用存在着浓度依赖性,见图 5、6。但在低浓度的 labrasol (0.4%) 时,对瑞巴派特的透过没有影响。另外, labrasol 对瑞巴派特的透过作用没有 C12 那样显著。

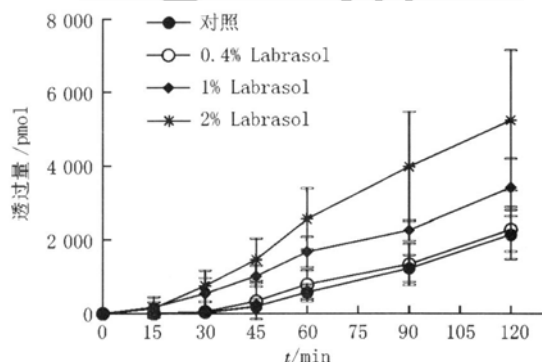


图5 不同浓度 labrasol对瑞巴派特经肠黏膜透过的经时曲线
Fig 5 Time course of transport of rebamipide across the colonic tissues in the presence of various concentrations of labrasol

3 讨论

口服给药是药物释药最容易和最有用的方法,因此,预测药物的吸收在设计一种口服给药制剂中是非常重要的。至

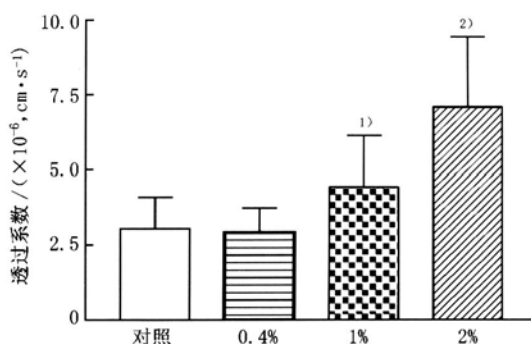


图6 不同浓度 labrasol对瑞巴派特经肠黏膜的表现透过系数与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Fig 6 Effect of various concentrations of labrasol on the Papps of rebamipide in the colonic tissues

Compared with control, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

今,只有少数的体外实验被建立起来预测药物在体内吸收的能力。Caco-2单层一般认为是药物转运研究的一种合适的体外模型,因为这些细胞已经显示了具有小肠黏膜的大多数酶、功能和形态学特征^[3]。然而,用 Caco-2单层不能预测药物在胃肠道的区段差异。而且,在 Caco-2单层中转运体的表达量通常是变化的,取决于培养条件,这是 Caco-2单层细胞用于估计药物实际渗透的主要局限之一。另一方面,扩散室技术是建立在大鼠肠透过性基础上的预测药物在人体吸收的另一个有效的手段。最近, Watanabe等^[4]通过扩散室实验获得了 15 种水溶性和不溶性药物的表现渗透系数 (Papp),并比较了同人吸收分数 (Fa) 的相关性,结果发现试验药物的 Papp 和 Fa 之间存在非常好的相关性。因此,笔者使用扩散室实验研究了瑞巴派特经不同胃肠道黏膜的透过性。

按照生物药剂学分类系统 (BCS),由于溶解度小以及透过性差,瑞巴派特应该分为 IV 类^[5]。已经发现在 BCS 分类中属于 IV 类的药物许多为 P-gp 的底物^[6]。而且,实验证明,肠道 P-gp 是一种 ATP 依赖的多药耐药排泵,通过将药物从细胞中转运到肠道中,而成为一种有效的分泌和吸收屏障。同时,本实验结果表明瑞巴派特经不同胃肠道区段在 M-S 或 S-M 方向的透过性几乎相等,虽然在回肠部位,瑞巴派特的 S-M 透过性略高于其 M-S 透过性。由此显示在瑞巴派特的转运中,可能没有载体介导的肠道转运,而被动扩散可能是其肠道转运的主要机制。

在本实验中,瑞巴派特的浓度为 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,主要是为了方便 HPLC 的检测。但对于大多数载体介导的肠转运来说,药物的转运存在着其浓度的饱和作用^[7]。因此,一旦建立了瑞巴派特更加敏感的检测方法后,为了阐明其经肠黏膜确切的转运机制,有必要进行低浓度瑞巴派特在 M-S 或 S-M 方向的渗透特性的研究。另外,本实验发现瑞巴派特经过结肠黏膜在吸收方向的 Papp 为 $(3.06 \pm 0.07 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 15$), Miyake 等^[8]报告的为 $(2.93 \pm 0.35 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。这种微小的差异可能来自不同的实验条件。

从瑞巴派特在人体生物利用度和体外渗透性不一致的角度考虑,可能在人体肠道中存在瑞巴派特的代谢或其他

转运。瑞巴派特的生物利用度仅 10%,而本实验结果,瑞巴派特在吸收方向经空肠或回肠的渗透系数分别为 $(8.0 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $(6.9 \times 10^{-6}) \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。一般而言,当一种药物经 Caco-2 细胞单层的 $P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,可认为该药物容易在人体吸收。参考 Walle 等^[9]用 Caco-2 细胞单层研究紫杉醇的结果 (P_{app} 为 $4.4 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$),紫杉醇低的生物利用度同药物在肝脏的首过代谢有关而并不是不易吸收引起的。因此,本扩散室实验得到的渗透参数,应该结合上述因素一起来评价瑞巴派特的吸收特征。

从生物药剂学、药理学和经济学的角度考虑,使用吸收促进剂来提高药物的透过性是非常有吸引力的。许多研究者调查了各种辅料的吸收促进作用。然而,在实际中使用这些附加剂是非常困难的,因为它们可能引起局部毒性。只有中链脂肪酸和中链甘油酯被认为是相对安全的,所以,至今,在日本、丹麦和瑞典用癸酸钠 (C_{10}) 加入到氨苄青霉素栓剂中被作为一种吸收促进剂使用并上市,日本上市的头孢唑肟栓剂中也含有 C_{10} ^[10-11]。最近, Miyake 等^[8]证明在相同浓度时, C_{12} 比 C_{10} 更加有效和安全。因而,本实验以透过性最差的结肠黏膜为模型区域鉴于瑞巴派特在结肠黏膜的透过性最差,考察了 C_{12} 对瑞巴派特经结肠黏膜吸收方向的透过性的影响。笔者发现在结肠黏膜瑞巴派特的透过性由于加入了 C_{12} 而显著地增加。一般认为,吸收促进剂的效果也经常受到吸收部位的不同而不同的影响。因此,笔者也研究了 C_{12} 对瑞巴派特经空肠和回肠吸收方向透过的影响,发现使用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 C_{12} 时和没有 C_{12} 共存存在时, P_{app} 比例分别增加了 1.54 倍和 1.92 倍,而在结肠部位增加了 4.04 倍,这里 P_{app} 比例 = $P_{\text{app}}(\text{含 } \text{C}_{12}) / P_{\text{app}}(\text{无 } \text{C}_{12})$ 。另一方面, C_{12} 不容易溶解在实验性 HEPES 缓冲液中,因此,本实验用 labrasol 来增加 C_{12} 在介质中的溶解度。Labrasol 是一种含有聚氧乙烯化的饱和 $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ 甘油酯,它的 NMR 特征表明本品由 C_8 和 C_{10} 脂肪酸的 30% 单、双和三甘油酯, 50% 单和双聚乙二醇酯以及 20% 游离 PEG 400 组成^[12]。大鼠实验表明, labrasol 的 LD_{50} 为 $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,具有高的耐受性和低的毒性,1998 年本品在欧洲药典中作为一种药用辅料被收载。结果表明,用 0.4% labrasol 可以使 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ C_{12} 在 HEPES 中溶解。同时发现在此浓度时对瑞巴派特的透过性没有影响,1% 或 2% 的 labrasol 可以增加瑞巴派特经过结肠黏膜的透过性,但同样存在剂量依存性。

REFERENCES

- [1] YAMASAKI K, KANBE T, CHIJWA T, *et al*. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel anti-ulcer compound, in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 1987, 142(1): 23-30.
- [2] YODOYA E, UEMURA K, TENMA T, *et al*. Enhanced permeability of tetragastrin across the rat intestinal membrane and its reduced degradation by acylation with various fatty acids [J]. *J Pharmacol Exp*, 1994, 271(3): 1509-1513.
- [3] HILGERS A R, CONRADI R A, BURTON P S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa [J]. *Pharm Res*, 1990, 7(9): 902-910.
- [4] WATANABE E, TAKAHASHI M, HAYASHI M. A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an *in vitro* chamber method [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(3): 659-665.
- [5] AMIDON G L, LENNERNAS H, SHAH V P, *et al*. A theoretical for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.
- [6] MARTINEZ M N, AMIDON G L. A mechanistic approach to understanding the factor affecting drug absorption: a review of fundamentals [J]. *J Clin Pharmacol*, 2002, 42(6): 620-643.
- [7] LIN J H. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of p-glycoprotein [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(1): 53-81.
- [8] MIYAKE M, OKA Y, MINAMI T, *et al*. Combinatorial use of sodium laurate with taurine or L-glutamine enhances colonic absorption of rebamipide, poorly absorbable antiulcer drug, without any serious histopathological mucosal damages [J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(4): 911-921.
- [9] WALLE U K, WALLE T. Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26(4): 343-346.
- [10] LINDMARK T, KIMURA Y, ARTURSSON P. Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 284(1): 362-369.
- [11] MOTOHIRO T, ARAMAKI M, TANAKA K, *et al*. Fundamental study on ceftiozime suppository in adults and children [J]. *Jpn J Antibiot*, 1985, 38(10): 3013-3056.
- [12] KREILGAARD M, PEDERSEN E J, JAROSZEWSKI J W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems [J]. *J Control Release*, 2000, 69(3): 421-433.

收稿日期: 2007-11-06

本刊 2008 年度特邀审稿专家名单

本刊邀请医药专家 62 人(以姓氏拼音为序)审定稿件,专家以严谨的科学作风,高超的学术造诣,对作者负责的高尚精神认真审稿,并提出修改意见,保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者,在此表示衷心感谢!

曹观坤	陈碧莲	陈国神	陈红梅	陈丽珍	陈枢青	方理本	高建青	郭青龙	郭增喜	何俏军	洪利娅	胡永洲
黄真	蒋惠娣	来平凡	李会林	李水福	梁文权	刘滔	楼宜嘉	李士敏	刘炜	陆森泉	吕圭源	吕献康
马凤森	马珂	倪维芳	邱利焱	茹仁萍	阮邹荣	申屠建中	王珏	王梦	王溶溶	王胜浩	王玮琴	王知坚
吴永江	徐云根	许东航	杨波	杨伟峰	姚彤炜	尤启冬	俞辉	俞佳	俞建平	俞永平	曾苏	詹金彪
赵昱	张琳	张仲苗	郑彩虹	郑高利	郑国钢	周长新	周建军	周权	祝明			