重庆维普 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2008)09-1038-04

# 药物体外转运模型及普萘洛尔异构体转运动力学研究

龙潇鸿[1],邱 峰[2],徐 霞[1],李惠芝[1]

(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院药剂科,重庆 400016)

【摘 要】目的:用近年来最具代表性的研究口服药物吸收机制的 Caco-2 细胞单层模型,研究盐酸普萘洛尔异构体的吸收及其吸收机制。方法:建立 Caco-2 细胞单层模型,研究不同浓度不同时间点该药物异构体的转运情况,通过柱前衍生化的 RP-HPLC 法检测盐酸普萘洛尔的异构体。结果:盐酸普萘洛尔吸收完全,主要为被动吸收,其异构体在 Caco-2 细胞模型上吸收无手性选择性。结论:本文建立了 Caco-2 细胞模型,并进行了完整性评价,表明 Caco-2 细胞模型完整性良好,将其用于手性药物盐酸普萘洛尔的吸收转运实验。同时还建立了柱前衍生化的 RP-HPLC 法,可以在 20min 内分离测定盐酸普萘洛尔异构体,方法操作简便、精密度好、结果准确可靠。

【关键词】手性衍生化;HPLC;盐酸普萘洛尔;Caco-2 细胞;GITC;表观通透系数;对映选择性

【中国图书分类法分类号】R969.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-16

# Enantioselective transport of R/S-propranolol in Caco-2 cell monolaysers

*LONG Xiao-hong, et al*

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: to study the absorption and absorption characteristics of isomer of propranolol hydrochloride in Caco-2cell monolayers model, which have taken as the most representative model to investigate the absorption mechanism of oral drug in recent years. ***Methods***: Caco-2 cell monolayers model was set up to study transport of isomer of propranolol hydrochloride. RP-HPLC method was applied to analyze isomer of propranolol hydrochloride through precolumn derivatization. ***Results***: Propranolol hydrochloride was absorbed completely, and was a passive diffusion mechanism. There was no chiral selectivity of transport and absorption of them across Caco-2 cell monolayers. ***Conclusion***: Caco-2 cell model was established and the cell integrity was evaluated. The integrity of Caco-2 cell was in good condition, which could be used to study the absorption and transport. RP-HPLC method was established to separated isomer of propranolol hydrochloride within 20 min by precolumn derivatization. The method is convenient, sensitive, accurate and suitable for the analysis of telbivudine.

【Key words】 Chiral derivatization; HPLC; Propranolol hydrochloride; Caco-2 cells; GITC; $P_{app}$; Enantioselectivityl

Caco-2 细胞模型是近十几年来在药物研发中得到广泛应用的一种口服药物体外吸收模型[1~7],Caco-2 细胞在体外培养条件下,可在多孔的可渗透聚碳酸酯膜上形成分化完好的肠上皮细胞融合的单层,并形成紧密联结,分化出绒毛面,其形态学特征、标志酶的功能表达与小肠上皮细胞相似[8],是一种研究口服药物吸收特性和各种转运的理想体外模型。盐酸普萘洛尔是临床上广泛应用的一种重要的 β 受体阻滞剂,其制剂一直是外消旋体的形式,但其对映体在对 β 受体的阻滞程度和系统清除速度都具有显著的立体选择性[9]。我们选取盐酸普萘洛尔作为模型药物,以简单、可控的 Caco-2 细胞模型,研究盐酸普萘洛尔的吸收机制。

作者介绍:龙潇鸿(1982- ),女,硕士,
研究方向:药物分析。

通讯作者:邱 峰,男,副主任药师,E-mail:qiufeng.cn@gmail.com。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2005BB5227)。

## 1 材 料

### 1.1 试剂与药品

胎牛血清、DMEM(高糖)(Hyclone);荧光黄(Lucifer yellow CH, SIGMA 公司);S-/R- 盐酸普萘洛尔(SIGMA 公司,批号 1230-9701);甲醇(色谱纯);氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、碳酸氢钠、葡萄糖等均为分析纯水为超纯水。

### 1.2 仪器

日本岛津 LC-6AD 高效液相色谱仪;岛津 SPD-10Avp 紫

重庆维普 http://www.cqvip.com



外－可见检测器;CS501 电热恒温水浴锅(重庆实验设备厂);超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂);$CO_2$ 恒温恒湿培养箱(重庆汗瞻仪器有限公司);数显恒温水浴箱(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),荧光分光光度计(日本岛津公司)Millicell ERS 电子伏欧计 Millicell®插入式细胞培养皿、24 孔板、一次性 Millipore 滤器(Millipore Corporation,美国);Transwell™ 培养板(Coming,美国)。

## 2 方法与结果

### 2.1 Caco-2 细胞模型的建立及完整性考察

2.1.1 Caco-2 细胞模型的建立 Caco-2 细胞在 DMEM 培养液中,含胎牛血清(FBS)10%、37℃、5%$CO_2$、湿度为 90%的环境中培养。隔天换 1 次培养液,当达到 80%～90%融合时,用胰酶－EDTA 液消化,按1∶3 的比例传代。将对数生长期的 Caco-2 细胞计数,按 $5.67 \times 10^5$cells/ml 接种于 Transwell™ 细胞培养皿(0.4ml/孔),培养皿下腔加入培养基 0.6ml。接种24h 后更换培养液,其后 1 周隔天换液 1 次,1 周后每天换液;培养 21～25d 后,测定胯膜电阻(TEER)和物质的表观通透系数(Apparent permeability coefficients,$P_{app}$),同时对 Caco-2 细胞单层模型分别进行扫描电镜、透射电镜观察。

2.1.2 细胞模型的完整性考察 当 Caco-2 细胞模型长至 21d 后,以荧光黄作为标志物测定单细胞层的通透量,并且结合细胞的胯膜电阻(TEER)和形态学 3 个指标来对 Caco-2 细胞模型的完整性进行评价。

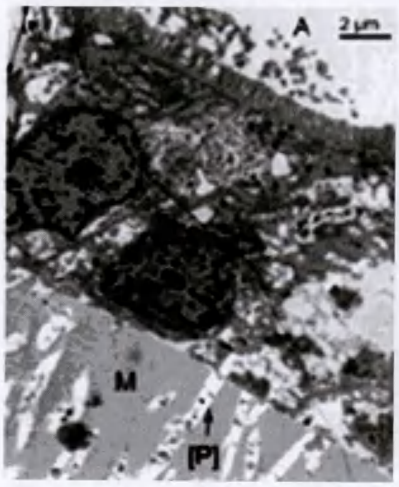
根据荧光黄测定方法和计算公式,测得各孔单层细胞膜的荧光黄的表观通透系数 $P_{app}$ 均$<1.0 \times 10^{-6}$cm/s,以及各孔胯膜电阻(TEER)$>200(\Omega \cdot cm^2)$。

形态学检查可观察到细胞融合成连续而完整的单细胞层,细胞间连接紧密。细胞表面覆盖一层刷状缘微绒毛,垂直于细胞表面,并且细胞具有不对称性(图 1)。这些形态与小肠上皮细胞相似。

以上 3 方面都说明 Caco-2 细胞膜具有良好的完整性,可用于药物吸收实验。

### 2.2 盐酸普萘洛尔细胞模型的转运试验

用提前预热至 37℃,pH 为 7.4 的 HBSS 溶液将培养好的细胞单层膜洗涤 2、3 次。最后 1 次洗涤后测定跨上皮电阻以监控细胞质量。将药物用 pH7.4 的 HBSS 溶液稀释,使配制成 20、40、80、160、240 μmol/L 的溶液。其中 DMSO 的含量小于 1%,不会影响Caco-2




A. 细胞单层外部; M. 细胞单层内部; P. 气孔

**图 1 Caco-2 细胞单层模型电镜图(×100)**



**图 2 Caco-2 细胞单层模型电镜扫描图(×100)**

细胞模型的完整性。对于从 AP(肠腔侧)到 BL(基底侧)转运:将药物溶液 0.4ml 加到 AP 作为供给池,同时 BL 侧加入空白 pH7.4 HBSS 溶液 0.6ml 作为接收池;对于从 BL 到 AP 转运:将药物溶液 0.6ml加到 BL 侧作为供给池,空白 HBSS 0.4ml;加到 AP 侧作为接受池。在培养箱中培养,模拟体内吸收情况,在 0、0.5、1、2、4、6、8h 分别从接受池中取样 0.3ml,待检测,并在取样后补充等量的37℃空白 pH7.4 HBSS 溶液。这样从两个方向来考察盐酸普萘洛尔的吸收。

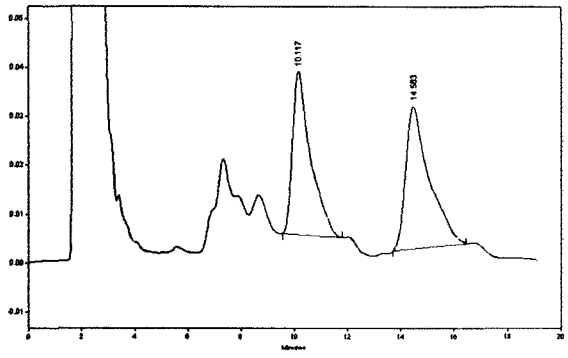
### 2.3 盐酸普萘洛尔手性 HPLC 分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Shimadzu Vp-ODS $C_{18}$ (4.6μm×150mm 5μm),日本岛津公司;流动相:甲醇－20mmol/L $NaH_2PO_4$ 缓冲液(75∶25);检测波长:220nm;流速:1ml/min;柱温:室温;进样量:20μl。色谱图见图 3。

2.3.2 衍生化条件 取各样品溶液 150μl 减压干燥后,加入 20μl 甲醇和 400μl,GITC 溶液(浓度为

重庆维普 http://www.cqvip.com





第 1 个色谱峰为 S - 普萘洛尔,第 2 个色谱峰为 R- 普萘洛尔

**图 3 S/R-普萘洛尔衍生化产物的色谱图**

480 μ mol/L),涡旋混合 1min 后,80℃反应 45min,在45℃条件下氮气吹干,加入 100 μ l 甲醇使溶解,涡旋混合 1min,以转速为 5 000r/min 离心 10min,取上清液作为样品溶液供试。

2.3.3 测定 取经过处理的各生物样品 20 μ l 进样,记录色谱图,根据保留时间定性,根据峰面积采用外标法定量。

2.3.4 标准曲线的绘制与最低检测浓度 将药物的标准储备液,用经过细胞模型的 HBSS 溶液稀释使配制成由低到高系列浓度的药物标准样品,分别定量准确吸取 150 μ l 稀释液,按样品处理方法处理后进样测定,结果显示:在本条件下盐酸普萘洛尔异构体的浓度从 1 μ mol/L 到 80 μ mol/L,见表 1。

经实验并按信噪比(S/N)的 3 倍值计算,S-/R- 盐酸普萘洛尔两异构体的检测限(LOD)为0.1 μ mol/L。

2.3.5 精密度与回收率试验 取经过细胞模型的 HBSS 溶液,准确加入一定量的药物标准液,使配成高、中、低 3 种浓度的 HBSS 溶液样品,分别定量准确吸取 150 μ l 样品溶液,同种浓度平行做 3 份,按样品处理方法处理,于当日测定,计算回收率和精密度。HBSS 溶液中盐酸普萘洛尔的回收率及精密度试验结果见表 2。

2.3.6 数据处理 药物 $P_{app}$ 的测定,按照 $P_{app}$ 的测定公式进行计算,测定 20、40、80、160、240 μ mol/L 盐酸普萘洛尔型异构体在 2h 的 $P_{app}$。

表 3 中,列出了 S-/R- 盐酸普萘洛尔在通过Caco-2

**表 1 盐酸普萘洛尔异构体在 HBSS 溶液中的标准曲线方程**

| 药物 | 回归方程 | $r(n=9)$ | 线形范围( μ mol/L) |
|---|---|---|---|
| S- 普萘洛尔 | A=22 853C+22 640 | 0.999 8 | 1.0 ~ 80 |
| R- 普萘洛尔 | A=26 607C+15 876 | 0.999 9 | 1.0 ~ 80 |

**表 2 HBSS 溶液中盐酸普萘洛尔回收率及精密度实验**

| 浓度 (μ mol/L) | 回收率 | | 精密度 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | S- 普萘洛尔 | R- 普萘洛尔 | S- 普萘洛尔 | RSD | R- 普萘洛尔 | RSD |
| 1 | 108 | 110 | 1.08 ± 0.13 | 11.6 | 1.10 ± 0.15 | 14.1 |
| 20 | 94.95 | 95.65 | 18.99 ± 1.42 | 7.46 | 19.13 ± 1.51 | 7.90 |
| 80 | 93.42 | 103.56 | 74.74 ± 5.27 | 7.05 | 82.85 ± 3.06 | 3.69 |

**表 3 在 AP-BL 和 BL-AP 方向上 R-/S- 盐酸普萘洛尔在 Caco-2 细胞模型中的 $P_{app}$ 测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)**

| | AP-BL | | BL-AP | |
|---|---|---|---|---|
| 浓度 | R- 盐酸普萘洛尔 | S- 盐酸普萘洛尔 | R- 盐酸普萘洛尔 | S- 盐酸普萘洛尔 |
| μmol/L | $P_{app}$ ( $\times 10^{-6}$cm/s) | | $P_{app}$ ( $\times 10^{-6}$cm/s) | |
| 20 | 30.6 ± 16.6 | 13.1 ± 8.48 | 11 ± 4.17 | 16.7 ± 4.33 |
| 40 | 26.6 ± 1.96 | 22.5 ± 8.19 | 22.3 ± 2.21 | 20.5 ± 1.42 |
| 80 | 22.81 ± 8.33 | 24.18 ± 3.44 | 21.65 ± 2.08 | 21.35 ± 4.24 |
| 160 | 23.77 ± 1.81 | 22.11 ± 1.87 | 21.86 ± 3.66 | 20.45 ± 2.76 |
| 240 | 28.04 ± 1.86 | 22.01 ± 1.50 | 17.60 ± 2.01 | 16.36 ± 1.49 |

重庆维普 http://www.cqvip.com



细胞模型中的 Papp。根据 T- 检验结果统计，S/R- 盐酸普萘洛尔在从 AP-BL 方向和 BL-AP 方向上均未见手性选择性，符合被动转运中，药物的转运无选择性的特点。

## 3 讨 论

文献报道 Caco-2 细胞模型在无血清的 HBSS 溶液中只能稳定 4h，而我们考察了 8h，所以在最后 8h 以后也重新测量了荧光黄的 $P_{app}$ 和 TEER 值，结果 8h 内荧光黄的 $P_{app}<1.0\times10^{-6}$cm/s；单细胞层的跨膜电阻 TEER>200($\Omega\cdot cm^2$)，可见细胞膜的完整性还是很好的。$P_{app}$ 值可由 BL-AP 方向测得($P_{app}1$)，也可由 AP-BL 方向测得($P_{app}2$)，2 个方向的 $P_{app}$ 的比值可以判断该药物的转运情况。结果显示，在 20～240 μmol/L 的浓度范围内测得的 $P_{app}$ 值，无论对于R- 盐酸普萘洛尔，还是 S- 盐酸普萘洛尔，$P_{app}$ 值变化微小，均无显著性差异。同时，对于 R- 盐酸普萘洛尔，从 BL 到 AP 方向的 $P_{app}2$ 是从 BL 到 AP 方向的 $P_{app}1$ 的值的 1.1 到 2.6 倍，根据 $P_{app}1/P_{app}2>1.5$ 则可能存在主动转运机制，表明对于 R- 普萘洛尔的转运仍以被动转运为主要转运机制，而出现 $P_{app}2$ 值比$P_{app}1$ 值大的原因不知是否与一些代谢酶有关；而对于 S- 盐酸普萘洛尔，2 个方向的 $P_{app}$ 几乎相同，没有显著性差异，即提示 S- 盐酸普萘洛尔吸收主要以被动转运为主。因此，从两个方面的考虑都表明，盐酸普萘洛尔的吸收主要以被动吸收为主。

根据药物被动转运的特点：药物从高浓度侧向低浓度侧的顺浓度梯度转运，不需要载体，膜对药物无特殊选择性。根据我们实验得出的数据，以 2h为吸收点，从 2h 的表观通透系数看，2 个方向的 S-/ R- 盐酸普萘洛尔的表观通透系数均在 95%的置信水平无显著性差异，即符合被动转运中药物的吸收转运无特殊的选择性。

对口服给药后人体的吸收情况与 Caco-2 细胞单层中的药物被动通透性的相关性研究表明，在 Caco-2 细胞单层模型中，完全被吸收的药物的表观通透系数较高($P_{app}>1\times10^{-6}$cm/s)，而吸收在 1%～10%者，药物的表观通透系数则偏低 $P_{app}$ 为>(0.1～1)$\times10^{-6}$cm/s，吸收低于 1%者 $P_{app}<1\times10^{-7}$cm/s，更多的研究显示，在复杂的吸收模型中(如 In situ per-fu-sion models)，药物吸收程度的试验结果与 Caco-2 细胞单层研究结果相一致，表明 Caco-2 细胞单层可用于研究药物的吸收性质。因此根据我们实验的结果，普萘洛尔的表观通透系数大约为 $28\times10^{-6}$cm/s，属于吸收较完全的药物。与文献中报道的盐酸普萘洛尔属于易溶于水，同时吸收也较完全的药物相符。

## 参 考 文 献


[1] Brown JR,Collett JH,Attwood D,et al.Intluence of moncaprinon the perm eability of a diacidic drug BTA-243 across Caco-2 cell monlayers and everted gut csc[J]. Int J Pharm,2002;245(1-2):133-142.

[2] Artursson P.Cell cultures as models for drug absorption across the intestinalmucosa[J]. Crit.Riv.Ther.Drug Carrier Syst,1991;8(5):305-330.

[3] Tavelin S,Grasjo F,Tainpalensuu J,et al.Applications fepithelial cell culture in studies of drug transport[J]. Methods MolBiol,2002;188(8):233-272.

[4] 沙先谊，方晓玲，吴云娟. 9- 硝基喜树碱在 Caco-2 细胞模型中的体外摄取、转运及外排动力学[J]. 药学学报，2004;39(10):839-843.

[5] 杨海涛，王广基.Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用[J].药学学报，2000;35(10):797-800.

[6] Pigman EA,Blanchard J,Laird,ll H.E. et al. A study of cadmium transport pathways using the caco -2 cell model[J]. Toxicology and App lied Pharmacology,1997;142(2):243-247.

[7] Lennernas H,Palm U,Fagerholm P,et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2)cells in vitro and human jejunum in vivo[J]. International Journal of Phar maceutics,1996;127(1):103-107.

[8] Walgren RA,Karnaky KJ,Lindenrmayer GE,et al. Efflux of diet ary flavonoid guercetin 4-β-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apicalmultidrugresistance-associatedproten-2 [J]. JPharmcolExpTher,2000;294(3):830.

[9] Pham-Huy C,Sabui-Gnassi A,Saada V,et al. Microassay of propr anolol enantiomers and conjugates in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography after chiral derivatization for pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal,1994;12(9):1189-1198.

[10] Lennernal H,Palm K,Fagerholm U,et alComparison hetween active and passive drug ransport in human intestinal epithelial(Caco-2)cells in vitro and human jeiunum in vivo[J]. Internation Journal of Pharmac eutics,1996;127(85):103-107.

[11] Zuo Z,Zhang L,Zhou L,et al. Intestinal ahsorption of hawthorn flavonoids-in vitro,in situ and in vivo correlations[J]. Life Sciences,2006;79(26):2455-2462.

[12] Helena Engman,Christer Tannergren,et al. Enantioselective tra nsport and CYP3AE-mediated metabolism of R/S-verapamil in Caco-2 cell monolayers [J]. European Jouranl of Pharmaceutical Sciences,2003;19(1):57-65.


(责任编辑：谭乐勤)