

研究生系列教材

INTRODUCTION TO
THE METHOD OF DRUG EVALUATION

药物评价方法 概论

蒋学华 主编



四川大学出版社



责任编辑:孙 激
责任校对:周树琴 刘志勇
封面设计:罗 光
责任印制:杨丽贤

图书在版编目(CIP)数据

药物评价方法概论 / 蒋学华主编. — 成都: 四川大学出版社, 2005.3

ISBN 7-5614-2863-4

I. 药... II. 蒋... III. 药物-评价-方法
IV. R969

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 076756 号

书名 药物评价方法概论

主 编 蒋学华
出 版 四川大学出版社
地 址 成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行 四川大学出版社
印 刷 郫县犀浦印刷厂
开 本 787mm×1 092mm 1/16
印 张 26.5
字 数 605 千字
版 次 2005 年 3 月第 1 版
印 次 2005 年 3 月第 1 次印刷
印 数 0 001~2 000 册
定 价 39.00 元

◆读者邮购本书,请与本社发行科
联系。电 话:85408408/85401670/
85418023 邮政编码:610065

◆本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆网址:www.scupress.com.cn

版权所有◆侵权必究
此书无本社防伪标识一律不准销售

目 录

第一章 药物评价在药学科学中的作用	(1)
第一节 药物评价的发展概况	(1)
一、从新药发现方法的发展看药物评价的发展	(1)
二、从药学学科的发展看药物评价的发展	(6)
第二节 药物评价在药学科学中的作用	(9)
第三节 药物评价的内容	(13)
第四节 我国的新药注册与评价	(13)
一、新药的概念与分类	(14)
二、药品注册申请需完成的申报资料	(16)
三、我国新药评价与注册审批过程	(18)
第二章 药学科科研课题及其评价	(20)
第一节 药学科科研课题的评价原则	(20)
第二节 药学科科研课题的评价指标与方法	(21)
第三节 科研课题的评价举例	(23)
第四节 近年来我国药学科科研选题举例	(24)
一、我国药学科科研选题的国家导向	(24)
二、国家自然科学基金项目	(25)
三、“十五”国家重大科技专项创新药物和中药现代化.....	(27)
四、中药现代化研究与产业化开发	(31)
五、国家科技部“当前优先发展的高技术产业化重点领域指南”	(33)
六、其他项目简介	(33)
第三章 药学科科研论文与科研成果的评价	(35)
第一节 药学科科研论文的评价	(35)
一、药学科科研论文概述	(35)
二、药学科科研论文的评价	(37)
三、科研论文评价的计分方法	(39)
四、学位论文	(42)
第二节 药学科科研成果的评价	(44)
一、药学科科研成果概述	(44)
二、药学科科研成果鉴定	(45)
三、药学科科研成果评价的计分方法	(48)

第三节 科研论文和科研成果评价中常见的问题及新的评价方式	(50)
一、以核心期刊来评价科研论文和科研成果	(50)
二、影响因子在科研评估方面的应用	(51)
三、采用《SCI》评估科研绩效	(52)
第四章 新型给药系统的评价	(53)
第一节 缓释、控释制剂的设计与评价	(53)
一、缓释、控释制剂的释放度评价	(55)
二、缓释、控释制剂动物药动学评价	(63)
三、缓释、控释制剂的人体生物利用度评价	(64)
四、体外试验与体内试验的相关性评价	(67)
第二节 靶向给药系统的评价	(72)
一、靶向微粒给药系统的评价	(73)
二、靶向给药乳剂的评价	(86)
第三节 脂质体评价	(91)
一、理化性质评价	(91)
二、药剂学性质评价	(93)
三、脂质体产品开发研究的其他注意点	(95)
第四节 胃肠道生物粘附制剂及其评价方法	(96)
一、胃肠道生物粘附机制及其影响因素	(97)
二、胃肠道粘附制剂的适用范围和常用黏性辅料	(98)
三、胃肠道粘附制剂的评价方法	(100)
四、第二代胃肠道生物粘附材料——凝集素及其应用	(102)
第五节 透皮给药系统及其评价方法	(105)
一、透皮给药系统的特点	(105)
二、透皮给药系统药物吸收理论	(106)
三、透皮给药系统的评价指标及评价方法	(106)
第六节 基因传递系统	(109)
一、概述	(109)
二、基因传递系统	(110)
三、非病毒基因传递系统的评价方法	(114)
第五章 药物分析方法与药品质量标准的评价	(118)
第一节 药物分析方法及其评价	(118)
一、药物分析方法的分类	(118)
二、药物分析方法的评价	(120)
第二节 药品质量标准的设计	(124)
一、药典与药品质量标准	(124)
二、药品质量标准项目	(124)
三、药品质量标准中项目的研究与设置	(125)

四、药品质量标准中相关项目限度的制定.....	(137)
第三节 药品质量标准的评价指标与评价方法.....	(139)
一、药品质量标准的评价指标.....	(139)
二、药品质量标准的评价方法.....	(141)
第四节 质量标准研究资料的评价.....	(142)
一、方法学研究资料的评价.....	(142)
二、质量标准起草说明书的评价.....	(146)
三、检验用药品标准物质研究资料评价.....	(147)
四、中药注射剂指纹图谱研究资料评价.....	(150)
五、研究实验原始记录的评价.....	(151)
第六章 药物稳定性评价.....	(154)
第一节 药物稳定性评价的意义与内容.....	(154)
一、药物稳定性评价的意义.....	(154)
二、药物稳定性评价的内容.....	(155)
第二节 药物稳定性评价的基本要求.....	(156)
一、稳定性评价的用样要求.....	(156)
二、稳定性评价对所用样品包装条件的要求.....	(156)
第三节 药物稳定性评价.....	(157)
一、稳定性评价中对项目选择的评价.....	(157)
二、稳定性评价中对样品分析方法的评价.....	(159)
三、稳定性评价中对图谱与照片的评价.....	(159)
四、稳定性评价中对检测数据的评价.....	(159)
五、稳定性评价中对直接接触药品包装材料选择的评价.....	(160)
第四节 使用期限与贮存期的统计计算.....	(160)
一、恒温法.....	(161)
二、程序升温法.....	(162)
第五节 药物稳定性评价方法进展.....	(165)
一、程序升温加速试验法.....	(165)
二、固体药物稳定性评价.....	(167)
第七章 新药临床前药理学评价.....	(168)
第一节 新药临床前药理学评价与临床评价的关系.....	(168)
第二节 新药临床前药理学评价的前提.....	(168)
一、新中药、天然药物的临床前药理学评价.....	(169)
二、化学药品的临床前药理学评价.....	(170)
三、生物制品的临床前药理学评价.....	(171)
第三节 新药临床前药理学评价的内容.....	(171)
一、新药的主要药效学研究.....	(171)
二、新药的一般药理作用研究.....	(172)

三、新药的药动学研究.....	(173)
第四节 新药的药效学评价要点.....	(173)
一、药效学试验的动物模型选择.....	(173)
二、实验动物的选择.....	(174)
三、试验方法的选择.....	(175)
四、观察指标的选择.....	(176)
五、对照的设置.....	(176)
六、试验设计的随机性.....	(177)
七、试验的可重复性.....	(178)
八、给药剂量的选择.....	(178)
九、给药途径的选择.....	(180)
十、实验结果的处理.....	(181)
第五节 目前新药临床前药理学研究尚存在的主要问题.....	(182)
第八章 新药临床前毒理学评价.....	(183)
第一节 概 述.....	(183)
一、新药毒理学试验的内容.....	(183)
二、毒理学研究的基本要求.....	(184)
第二节 新药的一般毒理学试验.....	(187)
一、急性毒性试验.....	(187)
二、长期毒性试验.....	(188)
第三节 新药的特殊毒性试验.....	(191)
一、遗传毒性试验.....	(191)
二、生殖毒性试验.....	(192)
三、致癌性试验.....	(193)
第四节 局部用药的毒性试验.....	(194)
一、急性皮肤刺激性试验.....	(194)
二、皮肤过敏性试验.....	(195)
三、皮肤光毒性试验.....	(196)
四、眼刺激试验.....	(196)
五、吸入剂、喷鼻剂刺激试验.....	(198)
六、直肠、阴道制剂刺激试验.....	(198)
第五节 新药的其他毒理学试验.....	(198)
一、全身过敏性试验.....	(198)
二、药物依赖性试验.....	(199)
第六节 新药的毒代动力学试验.....	(203)
第九章 药物体内过程评价.....	(204)
第一节 药物体内过程评价的一般方法.....	(204)
一、药物吸收试验.....	(204)

二、药物体内分布试验.....	(217)
三、血浆蛋白结合试验.....	(219)
四、药物生物转化试验.....	(225)
第二节 新药开发研究中的药物体内过程评价.....	(234)
一、药物体内过程评价在新药开发研究中的作用.....	(235)
二、新药临床前体内过程评价的基本内容与要求.....	(235)
三、新药临床药动学研究的基本内容与要求.....	(238)
第三节 药物体内过程评价中的生物样品检测方法.....	(240)
一、生物样品检测的特点与方法.....	(240)
二、生物样品前处理方法.....	(242)
三、生物样品检测方法的评价指标与要求.....	(243)
四、生物样品测定方法的质控.....	(245)
第四节 生理药动学模型简介.....	(245)
一、生理模型的提出及其发展.....	(245)
二、生理药动学模型的基本特点.....	(246)
三、生理药动学模型的建立.....	(247)
第五节 群体药动学方法简介.....	(250)
一、定义	(250)
二、群体药动学参数的求算方法	(251)
第十章 现代中药制剂评价方法.....	(254)
第一节 现代中药制剂制备过程中的一般评价方法.....	(254)
一、中药的浸出(提取)、纯化工艺	(254)
二、提取纯化工艺的实验设计.....	(258)
三、提取纯化工艺评价.....	(260)
第二节 现代中药制剂质量评价.....	(262)
一、指纹图谱法.....	(262)
二、模式识别.....	(270)
三、人工神经网络评价方法.....	(271)
四、模糊数学法	(271)
第十一章 药物制剂生物利用度与生物等效性评价.....	(273)
第一节 生物利用度的概念.....	(273)
第二节 生物等效性与生物等效性评价方法.....	(274)
一、药剂等效性与生物等效性.....	(274)
二、生物等效性评价方法.....	(275)
第三节 生物利用度的研究方法.....	(276)
一、血药浓度法	(277)
二、尿药浓度法	(278)
三、药理效应法.....	(278)

第四节	生物利用度的影响因素	(279)
第五节	生物利用度研究的基本要求	(280)
一、	研究机构的基本条件	(281)
二、	对供试品的基本要求	(281)
三、	新药申请人在生物利用度研究中的工作	(282)
四、	参比制剂的选择	(282)
五、	检测方法的选择与评价	(283)
六、	对受试对象的要求	(283)
七、	试验设计	(284)
八、	洗净期确定	(285)
九、	给药剂量与方法	(285)
十、	采样点的确定	(286)
十一、	试验中的医学监护	(286)
十二、	结果处理方法	(286)
第六节	生物等效性统计分析方法	(287)
一、	等效性检验标准与方法	(287)
二、	方差分析	(288)
三、	双单侧 t 检验法	(289)
四、	90% 置信区间分析	(289)
第七节	生物利用度研究的记录内容与保存文件	(290)
一、	生物利用度研究的记录内容	(290)
二、	生物利用度研究的文件保存	(291)
第八节	生物利用度研究的新课题与进展	(291)
一、	生物利用度研究的新对象	(291)
二、	关于群体生物利用度与个体生物等效性	(293)
三、	关于吸收速率的评价	(294)
四、	生物利用度的群体药动学求算	(295)
五、	高变异性药物的生物利用度研究	(295)
第十二章	新药临床评价	(296)
第一节	新药临床评价的重要性与规范性	(296)
第二节	新药临床研究内容	(298)
一、	新药临床试验	(298)
二、	生物等效性试验	(299)
第三节	新药临床评价前的准备	(300)
第四节	受试者的权益保障	(300)
第五节	临床试验设计	(301)
一、	临床试验方案	(301)
二、	I 期临床试验方案的设计要点	(302)

三、Ⅱ期临床试验方案的设计要点.....	(305)
四、Ⅲ期、Ⅳ期临床试验方案设计要点.....	(310)
五、病例报告表.....	(310)
第六节 临床试验中研究者的职责.....	(311)
第七节 新药临床试验中申请人的职责.....	(311)
第八节 临床试验中监察员的职责.....	(312)
第九节 试验用药品的管理.....	(312)
第十节 数据管理与统计分析.....	(313)
第十一节 质量保证.....	(314)
第十二节 总结报告.....	(315)
第十三节 我国目前新药临床试验存在的问题.....	(316)
第十三章 药物利用研究与评价.....	(318)
第一节 药物利用.....	(318)
一、药物利用的含义.....	(318)
二、药物利用的影响因素.....	(318)
第二节 药物利用研究.....	(319)
一、药物利用研究的定义与发展概述.....	(319)
二、药物利用研究的内容与作用.....	(320)
三、药物利用研究的方法.....	(321)
四、药物利用研究的常见应用及举例.....	(323)
第三节 药物利用评价.....	(329)
一、药物利用评价的定义与发展.....	(329)
二、药物利用评价的性质与目的.....	(331)
二、药物利用评价的实施步骤.....	(332)
三、药物利用评价举例.....	(335)
第十四章 药物经济学评价方法.....	(338)
第一节 药物经济学概述.....	(338)
一、药物经济学的兴起与发展.....	(338)
二、药物经济学的定义、目的与意义.....	(339)
三、药物经济学研究中涉及的基本概念.....	(340)
第二节 药物经济学评价的基本方法.....	(341)
一、最小成本分析方法.....	(341)
二、成本-效益分析方法.....	(344)
三、成本-效果分析方法.....	(347)
四、成本-效用分析方法.....	(352)
第三节 药物经济学研究设计、基本步骤与评价.....	(357)
一、药物经济学研究设计.....	(357)
二、药物经济学研究的基本步骤.....	(359)

三、药物经济学研究的评价标准.....	(362)
第十五章 上市药品再评价.....	(364)
第一节 药品上市后再评价的意义	(364)
第二节 药品上市后再评价制度建立的历程.....	(365)
一、现代药品不良反应报告制度建立的医药背景.....	(365)
二、现代药品不良反应报告制度的建立.....	(366)
第三节 药品引发风险的分析.....	(369)
一、产品缺陷.....	(369)
二、已知副作用.....	(369)
三、可避免性副作用.....	(369)
四、不可避免副作用.....	(369)
五、非预期副作用.....	(370)
六、药物治疗错误.....	(370)
第四节 上市药品安全性监测方法.....	(370)
一、自发报告系统.....	(371)
二、处方事件监测.....	(372)
三、记录链接.....	(372)
第五节 药品不良反应因果关系的分析和评价.....	(373)
一、不良反应报告的个例评价.....	(373)
二、不良反应报告的集中评价.....	(375)
第六节 药物流行病学在药品风险评价中的作用.....	(376)
第七节 风险的管理和疗效的评价.....	(377)
一、药品风险－利益的分析方法.....	(377)
二、风险管理.....	(379)
第八节 药物遗传学在药物安全性再评价中的作用.....	(384)
第九节 循证医学对药品再评价的指导作用.....	(385)
一、循证医学的特点.....	(385)
二、循证医学在药品再评价中的作用.....	(386)
第十节 特殊人群用药评价.....	(386)
一、儿童用药评价.....	(386)
二、妊娠期用药评价.....	(388)
第十一节 我国上市药品再评价现状.....	(392)
一、国内对上市药品再评价研究的现状.....	(392)
二、国内人员对药品再评价的认知程度.....	(393)
参考文献.....	(394)

第九章 药物体内过程评价

药物体内过程评价是通过定量研究药物进入人体后的吸收、分布、代谢和排泄等过程进行的，其目的是为了揭示药物剂型因素、生物学因素和药物效应间的关系。其研究内容与研究结果可以为新药设计与筛选、剂型设计与评价、药品质量研究、药物的药理学评价与毒理学评价、药物临床合理使用的方法研究打下坚实的基础。

药物体内过程评价方法与内容涉及生物药物分析学、生物药剂学、药理学、药动学、临床药动学、细胞生物学及分子生物学等学科的理论与方法。

第一节 药物体内过程评价的一般方法

一、药物吸收试验

（一）药物口服吸收评价方法

口服给药是最常见的临床给药途径，口服药物制剂欲发挥其全身作用，吸收是关键。

一种药物能否采取口服途径给药，主要取决于肠内酶及细胞对药物的代谢及屏障作用。科学地研究肠吸收方法，可以使人们了解肠内酶及其细胞的屏障作用对药物吸收的影响，获得药物在肠道的吸收动力学、有效吸收部位、吸收机制、影响吸收的因素等信息。这些信息对合理确定临床给药方案及指导各种制剂的处方设计，尤其是缓释、控释制剂的处方设计具有重要的指导意义。

药物肠吸收实验的研究方法主要有在体肠回流法、肠攀法、外翻囊法、分离肠黏膜法、Caco-2 细胞模型法等。药物肠吸收的整体试验方法，如口服给药后测定血药浓度或者尿药浓度求算药动学参数，虽然这样也可获知药物吸收的有关信息，但它是反映物化、生理和剂型等因素对吸收的影响，以及药物的体内分布、代谢和排泄等过程的综合结果，而不能特异性地反映肠道的吸收作用。在药物口服吸收的研究中，选用两种以上实验方法对同一药物的吸收规律进行综合评价，能增加实验结果的可靠性。

1. 在体肠灌注法 在体肠灌注法（in situ intestine perfusion）是在动物（大鼠）麻

醉状态下不切断血管和神经, 打开腹腔, 对肠腔进行插管, 用等渗生理盐水洗净肠腔内容物, 用恒速泵使灌注液在肠腔内循环灌流, 构成回路, 药物透过上皮细胞后即被血液运走, 于不同时间测定灌注液内药物的浓度变化, 通过剩余药物量来计算吸收参数的吸收研究方法。在实验中, 应用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面以保湿, 并注意实验动物的保温。由于灌注液内药物浓度受肠组织对水分吸收或分泌的影响, 常在灌注液中加入不吸收的酚红或放射性标记聚乙二醇 4000 进行浓度校正。与其他方法相比, 本方法保持了肠道神经与内分泌输入的生理状态, 同时保证了血液与淋巴液的供应, 与整体实验动物的吸收研究最接近; 可以考察吸收过程药物的代谢情况; 能避免胃内容物排出及消化管固有运动的生理影响。该法从肠腔侧进行取样测定, 能排除肝首过效应, 以及药物在肠壁组织中的代谢等生物转化对吸收的影响, 测得的吸收参数能较真实反映药物的透膜特性。但该法只限于溶液状态给药, 结果准确性受多种因素的影响。对在体肠灌注法进行的改进措施主要有: 在灌注过程中既取灌注液测定药物的减少量, 又取血液测定吸收的药物量; 借助肠道插管, 可以对非麻醉动物与人进行试验; 在灌注方式上选择单向灌注 (single-pass perfusion)、振动灌注 (oscillating perfusion) 和循环灌注 (recirculating perfusion) 等。

消化管内药物吸收的主要方式是被动扩散。可以用 Fick's 方程定量描述这一过程

$$-\frac{dQ}{dt} = Dk \frac{C - C_0}{h} \quad (9-1)$$

式中, $\frac{dQ}{dt}$ 为分子型药物的透过速率, D 为药物在膜中的扩散系数, k 为药物在膜/水溶液中的分配系数, C_0 为血液中药物浓度 (膜内浓度), C 为消化液中药物浓度 (膜外浓度), h 为膜的厚度。

式 (9-1) 经处理, 得式 (9-2)。以小肠内剩余药量的对数 ($\ln X$) 对取样时间 t 作图, 得到一条直线, 从直线斜率可求吸收速率常数 K_a (h^{-1})

$$\ln X = \ln X_0 - K_a t \quad (9-2)$$

其中, X 为小肠剩余药物量, X_0 为小肠内初始药物量, K_a 为吸收速率常数, 单位为 h^{-1} 。

药物的吸收半衰期 $t_{1/2}$ (h) 的计算公式为

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_a} (h) \quad (9-3)$$

单位时间吸收百分率 ($P\%$) 的计算公式为

$$P\% = \frac{C_0 \times V_0 - C_t \times V_t}{C_0 \times V_0 \times t} \times 100\% (h^{-1}) \quad (9-4)$$

式中, C_0 为灌注液药物初始浓度, V_0 为灌注液初始体积, C_t 为 t 时刻灌注液药物浓度, V_t 为 t 时刻灌注液体积, t (h) 为灌注液循环灌注时间。

膜表观透过系数 (P_{app}) 的计算公式为

$$P_{app} = \frac{K_a}{3600A} (cm^{-2} \cdot sec^{-1}) \quad (9-5)$$

式中, K_a 为吸收速率常数, 单位为 h^{-1} , A 为小肠吸收面积。

2. 肠攀法 肠攀法是将大鼠麻醉，开腹结扎肠腔（需进行部位研究时，可分段结扎肠腔），将含有一定浓度药物的人工肠液注入肠攀中，经过一定时间吸收后，取出肠攀，收集冲洗肠腔内肠液，测定其中的药物剩余量，进而了解药物肠吸收情况。该法较在体肠灌注法操作简单，但由于肠腔内容物的存在，分析时样品处理较为复杂。

3. 分离肠黏膜法 分离肠黏膜法是在大鼠麻醉状态下开腹，在其肠腔内插管，用生理盐水洗净内容物，取出肠段置于 pH 值为 7.4 的 Krebs-Henseleit 缓冲液中，将肠段套在一个直径为 0.3cm~0.5cm 的玻璃棒上，用解剖刀小心刮掉上皮下层组织，分离制得肠黏膜，固定于扩散池上，测定药物透过上皮细胞的情况，研究药物吸收的方法。此方法的优点主要有：可以通过改变扩散池供药室溶液组成，考察离子、pH 值及制剂辅料等对透膜吸收的影响；通过改变取样部位（黏膜侧或浆膜侧），则可考察药物不同方向转运情况，了解转运机制是被动扩散还是载体介导；此外，还可以进行药物肠道代谢的考察。此方法在实验中因肠黏膜易于破损，分离黏膜的操作较困难；不同肠段因组织结构的差异，表现出对药物透过的屏障作用不同，所以可影响吸收研究结果。例如，上段肠道的细胞旁路通道（paracellular pathway）多于下段肠道，于不同肠道血流供应的差异，所以对细胞旁路通道和药酶活性有影响。

4. 外翻囊法 外翻囊法（everted gut sac）是将麻醉动物（常用家兔）开腹取出肠段（约 10cm），用 Krebs-Ringer 溶液（pH 值为 7.4）冲洗，将肠段外翻套于玻璃棒上，一端固定于聚乙烯试管上，另一端结扎，经针头向肠段内注入 7ml~10ml Krebs-Ringer 溶液后，置于含有药物的 Krebs-Ringer 溶液中，在 5% 二氧化碳气流下，37℃ 恒温放置，定时从肠管内外两侧取样，测定药物浓度的变化，考察药物吸收情况。应用此法时，应注意组织活性的保持，实验时间不宜过长。

5. Caco-2 细胞模型法 Caco-2 细胞（the human colon adenocarcinoma cell lines）系来源于人的结肠（直肠）癌组织。电子显微镜进行的亚显微结构研究结果表明，Caco-2 细胞与人小肠上皮细胞在形态上十分相似，具有相同的细胞极性和紧密连接。对于不能穿过小肠上皮细胞屏障的相关物质，如荧光黄 CH、菊粉、聚乙二醇或甘露醇等，也不能透过 Caco-2 细胞在聚酯膜上形成的单层。Caco-2 胞饮功能的检测，也表明 Caco-2 细胞与人小肠上皮细胞类似。存在于小肠上皮中的各种转运系统，代谢酶等在 Caco-2 细胞中都有相同的存在。例如谷氨酰胺转氨酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶、葡萄糖醛酸酶、细胞色素 P450 同工酶及糖、氨基酸、二肽、维生素 B₁₂ 等多种主动转运系统在 Caco-2 细胞中都有与小肠上皮细胞类似的表达。因此，Caco-2 细胞模型的跨膜转运实验，可以用来模拟药物在体内经小肠上皮吸收的过程。与正常的成熟小肠上皮细胞在体外培育过程中出现逆向分化（反分化）不同，Caco-2 细胞在传统的细胞培养条件下，生长在多孔的可渗透的聚酯（polycarbonate）膜上，可达到融合并自发分化为肠上皮细胞，形成连续的单层（monolayer）。将 Caco-2 培育约 10d 后，单层的跨膜电阻（transepithelial electrical resistance, TEER）约为 260Ω/cm²，细胞密度约为 0.9×10⁶cells/cm²。此时，Caco-2 细胞单层对漏出标志物，如聚乙二醇（MW4000）或甘露醇是不渗透的，这种性质可以维持恒定约 20d，可以在这段时间对其进行药物的跨膜转运实验。

Caco-2 细胞模型作为药物吸收研究的一种快速筛选工具,能够在细胞水平提供关于药物分子通过小肠黏膜的吸收、代谢、转运的信息,较之以前的翻转囊、肠攀实验及在体肠吸收模型更适合药物吸收进入黏膜细胞的研究。同时,它提供了关于治疗药物可能引起的肠黏膜毒性的信息,以及药物结构-转运方面的信息,组合化学药物库的高通量筛选 (high-throughput screening) 是一个很好的工具。Caco-2 细胞来源于人体,不会造成上皮细胞的形态学和生理学性质上的种属差异,也不会像许多其他的体外小肠吸收模型一样,要求使用实验动物,其结果具有较好的重现性。Caco-2 细胞模型的缺点或限制在于:分化的 Caco-2 细胞单层中的紧密连接比在小肠上皮细胞中更有特征性,其 TEER 值比正常小肠上皮细胞高。Caco-2 细胞单层缺乏粘蛋白产生细胞。因此,缺乏小肠上皮中黏液层。此模型不能说明生理参数,如小肠流动性或运送时间在药物吸收中的作用;细胞培养的时间和代系对于 Caco-2 细胞的形态学和生理学性质有影响,从而影响细胞对药物的转运。Caco-2 细胞模型在不同实验室之间由于培养条件的差别,使结果有时缺乏可比性。对于难溶性药物,在 Caco-2 细胞模型试验时,可以适当地加入一些表面活性剂来提高药物的溶解度,一般多采用聚山梨酯-80,PEG-400 等表面活性剂,但要求将其控制在一定的浓度以下,不破坏细胞模型的紧密和完整性。

尽管 Caco-2 细胞模型有许多限制,但是在阐明药物吸收机制、预测体内吸收和药物相互作用,设计有更好吸收和更高生物利用度的口服药物或制剂,并评价它们的安全性等方面,该法仍然是一个很好的工具。随着新一代细胞模型的建立,如加速的 Caco-2 细胞穿透模型、TC-7 细胞模型,使原有的 Caco-2 细胞单层模型的一些缺点得到克服。所以改进的 Caco-2 细胞模型在药物开发研究中将发挥愈来愈大的作用。Caco-2 细胞模型的研究与应用,则为其他细胞模型的建立奠定了良好的基础。

(二) 药物口服吸收特征的预测方法

在新药研究过程中,随着组合化学等高新技术的出现,候选化合物的出现速率大大加快,每年都有成千上万的新化合物需进行筛选。除对药物的药效与毒性进行筛选外,药动学筛选也愈来愈受到重视。通过药动学的筛选,可以确定候选化合物是否有继续开发的價值,或者依据药动学结果可对候选化合物进行结构改造或修饰,使之具有理想的药动学性质,以增加新药开发成功率、降低投资风险。

用整体动物进行药动学筛选,是长期以来备受重视的方法。以整体动物筛选方法的最大优点是,可以从整体水平上直观反映药物的体内过程特征,这对预测被筛选化合物的开发价值和应用前景十分重要,但需消耗大量的样品和实验动物,且筛选的样品数量有限,成本较高,很大程度上影响了新药开发速率。在此基础上,组织、器官水平药动学筛选模型的建立和应用,在药物筛选中发挥了十分重要的作用。但组织、器官水平药动学筛选模型仍然不能克服效率低、自动化程度低、结果影响因素多等不足,所以在药物筛选应用中受到一定的限制。近年来,出现了许多细胞水平的和基于药物-生物膜相互作用的体外药动学筛选模型(方法)。由于这些模型(方法)避免或减少了试验动物的使用,大大简化了筛选过程,具有筛选速率快、成本低、方法重现性好等特点。许多体外模型(方法)与整体动物试验相比,显示了良好的相关性。

1. Caco-2 细胞模型 如前所述,Caco-2 细胞已经作为目前研究药物经小肠吸收

和转运的经典体外模型。采用 Caco-2 细胞模型也是预测药物口服吸收特征的方法之一。

2. 平行人工膜穿透分析 平行人工膜穿透分析 (parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA) 为 Caco-2 细胞模型的替代方法, 现已被广泛接受。PAMPA 使用的穿透膜由磷脂合成, 与 Caco-2 细胞相比, 优点在于适用的 pH 值范围广, 对二甲亚砜耐受性较高, 穿透速率依赖于磷脂膜材料的性质, 成本较低, 方法容易改进。PAMPA 法的缺点为耗时 (需要较长的温孵时间), 穿透数值的测定要求准确地测量释放池和接受池的药物浓度。有研究结果表明, PAMPA 能预测以被动扩散转运的药物的吸收, 其结果与 Caco-2 细胞相关性良好, 药物从绒毛膜一侧到基底膜一侧透过 Caco-2 细胞的穿透系数与 pH 值为 7.3 PAMPA 中人工膜穿透系数呈显著相关性 ($r^2 = 0.98$), 这证实了 PAMPA 是预测药物被动扩散吸收简单而有效的模型。

3. 色谱方法 药物作用的动力学过程被认为和色谱基本过程是相似的。在适合的试验条件下, 药物分子的基本性质, 如疏水性、电性、空间排布决定了化合物在生物环境中 and 色谱环境中的行为。另外, 药物基本的色谱过程和除代谢外的药物体内过程都没有键的产生或断裂。由于色谱技术可严格控制试验条件, 结果重现性好, 所以在用于药物吸收的预测时, 比膜依赖性方法简单、成本低廉、准确度高, 符合先导化合物快速筛选的要求。

(1) 固定人工膜 (immobilised artificial membrane, IAM) 柱色谱: 是将不同的磷脂, 以单分子层化学键键合在固定相上形成人工膜, 进行色谱分析的方法。IAM 可以包含单一的或者是混合的磷脂。单一的磷脂有 PC, PE, PG, PA, PS。Pidgeon 等用 PC 键合的 IAM 柱预测 11 个结构相似的头孢类化合物的吸收, 结果相关性良好 ($r^2 = 0.89$)。Muriel 等用 IAM 和理化描述互相结合的方法, 模拟药物经大鼠肠的被动吸收, 得到了 12 个不同结构化合物的色谱容量因子 ($\log K - IAM$), 与经大鼠肠渗透系数的相关性良好, 如果用药物摩尔体积对容量因子做校正, 这一相关性增强。IAM 柱色谱方法的优点是试验简单, 可用于药物开发研究初期的大量筛选。

(2) 固定脂质体色谱 (immobilised liposome chromatography, ILC): 脂质体混悬于水中, 化合物在脂质体双分子层和水之间进行分配可得脂质体-水分配系数。ILC 的固定相是脂质体, 以位阻、疏水、静电作用, 或者以共价键固定在凝胶颗粒上进行色谱分析的方法。与 IAM 相比, ILC 所用流动相不含有机溶剂, 不会对疏水药物的保留值测定造成干扰。用于制备脂质体的材料——磷脂、蛋白质、胆固醇的比率, 可以调节到与生物膜的组成很相似的程度。将卵磷脂 (EPC) 脂质体固定在琼脂糖-右旋糖酐硅胶柱上制成 ILC 柱, 并测定了 12 个药物的保留值, 结果表明药物的人体口服吸收分数和 ILC 的特征保留值存在 S 型曲线关系。在 ILC 柱上测定 29 个结构不同的药物的保留值, 并将其保留值进行换算, 得到膜分配系数, 将该膜分配系数用于描述药物小肠吸收, 也获得了定性的 S 型曲线。但是经细胞旁路转运外排和经主动转运的药物偏离该 S 型曲线。

(3) 胶束液相色谱技术 (micellar liquid chromatography, MLC): 胶束液相色谱是以达到胶束浓度的表面活性剂溶液作为流动相的一种反相液相色谱。用胶束溶液可以使

表面活性剂单体吸附到固定相上,因而提供药物相互作用的疏水和静电作用位点。测定 6 个 β 阻滞剂在 MLC 中的保留值,胶束流动相的 pH 值为 3、浓度为 0.1125mol/L 的 SDS 溶液和 10% 的正丙醇的混合溶剂。这 6 个 β 阻滞剂的 MLC 保留值与药物经 Caco-2 细胞的穿透系数 P_c 、经离体小肠的穿透系数 P_{app} 的相关性高于 IAM。

(4) 生物分配胶束色谱 (biopartitioning micellar chromatography, BMC): 是指用 C18 柱作为固定相、Brij35 溶液为胶束流动相形成的色谱系统。BMC 系统与生物膜及细胞外液的特性相似, Brij35 以疏水作用吸附在固定相上模拟了生物膜的有序碳氢链, 其亲水-亲油特征模拟了生物膜结构, 药物分子的色谱行为模拟了透膜过程。药物分子在该色谱系统的保留, 主要依靠疏水作用、静电作用、较弱的空间位阻作用, 这些性质同时也是影响药物经被动扩散穿过细胞膜的因素。

Molero 等用生物分配胶束色谱预测了药物在体内的吸收程度。该实验选择 74 个结构不同的, 经被动扩散、口服吸收分数从 16% 到 100% 的药物作为研究对象。这些药物的物理化学特性存在明显的差异, 主要表现在疏水性 ($\log P$) 从 0.34 到 5.20 不等, 电离程度也不一样。其研究表明, 药物在 pH 值为 6.5 与 7.4, 浓度为 0.04mol/L 的 Brij35 作为流动相的 BMC 中, 保留参数与药物吸收分数的相关性呈双曲线模型。比较药物 BMC 保留值与 PAMPA 穿透系数、Caco-2 细胞表观穿透系数及药物吸收分数的相关性, 结果相似。但以 BMC 保留值与药物吸收分数的相关性最好。

(三) 其他给药途径的吸收研究方法

1. 药物透皮吸收研究方法 药物透皮吸收的研究方法主要有离体试验方法、在体试验方法和药动学研究方法。

(1) 离体试验方法: 离体试验方法是将离体皮肤夹在扩散池中, 药物应用于皮肤的角质层面, 在一定的时间间隔测定皮肤另一面接受介质中药物的浓度, 计算单位面积皮肤药物的通过速率与程度的透皮吸收研究方法。离体试验结果主要受离体皮肤、扩散装置、接受液等因素的影响。

1) 离体皮肤或合成膜: 用于透皮吸收研究的离体皮肤, 常取自于家兔、小鼠、大鼠、豚鼠、羊、猫、犬、猴、猪、马等。有研究证明, 家兔、大鼠和豚鼠的皮肤渗透性大于人的皮肤, 而猪和猴的皮肤渗透性与人更接近。小鼠皮肤的角质层太薄, 渗透性强, 模拟人皮肤的误差大。国外常用的无毛小鼠的毛囊数目和直径与人的皮肤接近, 而角质层仅为人的 $1/2$ 。

离体皮肤的分离应根据研究目的而定, 需考察皮肤组织不同层的药物吸收时, 应获取不同层的皮肤。通常, 离体试验是分离皮肤表皮用于研究的。皮肤表皮的分离方法有热分离法、化学分离法和手术分离法等。热分离法是将皮肤浸于 60°C 水中约 45s, 或将皮肤置于预热的金属板中间直接进行分离, 移取表皮, 进一步处理也可得到角质层。化学分离法是将皮肤浸在化学药品溶液中进行分离的方法, 常用化学药品包括甲酸、氢氧化钠、乙二醇四乙酸、溴化钠、胰酞酶等。手术分离方法是以手术刀剥离动物皮肤, 进行不同层皮肤分取的方法。大鼠表皮分离方法通常为: 将大鼠处死, 喷洒脱毛液, 或用剪刀剪去其腹部的毛后, 剥离腹部表皮, 并除去皮下的脂肪, 洗净后保存于 -20°C 的生理氯化钠溶液中待用。

离体皮肤应该在适当的条件下贮存，原则上不能影响皮肤的渗透性和代谢活性。离体皮肤的常用贮存方法为低温或冷冻贮存。贮存过程对皮肤所含水分有影响，当受试药物为亲水性时，透皮吸收的限速过程为活性表皮的透过，此时表皮水分含量将对结果产生影响；若药物透皮吸收的限速过程是角质层的透过时，角质层所含水分少，低温或冷冻贮存对吸收的影响小。

蛇蜕作为透皮吸收的离体皮肤，具有如下优点：①与人类皮肤在角质层结构、组成、类脂含量和水渗透性等方面相似；②获得方法容易且不伤害实验动物；③作为非活体组织保存方便；④同一张蛇蜕可分割为多个小张，试验结果的个体差异小；⑤由于蛇为非哺乳动物，皮肤缺乏毛囊，可以排除经毛囊路径吸收对药物试验结果的影响。

人工合成膜具有稳定性好、使用方便、批次间重现性好等显著优点，已经应用于药物结构、药物理化性质、介质 pH 值、辅料等与药物透膜性能间关系的研究。目前文献报道的人工合成膜材料主要有：醋酸纤维素、聚氨酯、聚甲基硅氧烷、聚砜等。多孔薄膜的屏障功能与分子大小、形状、静电作用等有关。无孔薄膜的渗透限速功能更强，药物在无孔薄膜的渗透过程与在生物组织中的扩散过程相近。纤维素膜的通透性比动物离体皮肤和无孔薄膜的更高。硅橡胶膜的渗透性能与聚合物链的流动性和药物分子在骨架中的溶解度密切相关，由于是无孔的惰性脂溶性化合物，硅橡胶膜对渗透的限速性能更佳，是药物体外透皮吸收研究的常用合成膜。

2) 扩散装置：包括静态扩散装置和流通扩散装置两种。

静态扩散装置主要有两种类型：水平型和直立型，分别如图 9-1 和图 9-2 所示。水平型静态扩散装置，以 Valia-Chien 扩散池为代表。此装置由两个对称的玻璃半室组成，分别作为供给半室与接受半室，皮肤固定在两个半室之间，用钢夹固定，在两个半室中有供放置磁力搅拌子的凹槽。该装置适合液体介质中成分的经皮扩散研究，研究结果可不受重力的影响，如果在两侧加上电极，则很容易用于离子导入给药系统的研究。直立型静态扩散装置以 Franz 扩散池为典型代表，此装置由上下两个杯状磨口玻璃容器

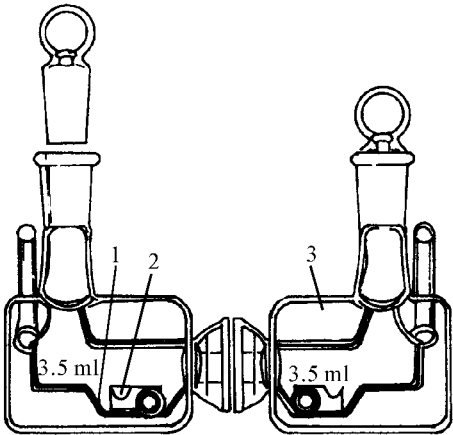


图 9-1 Valia-Chien 静态扩散池
1. 搅拌平台 2. 星头搅拌器 3. 水浴夹层