

일회통과 관류실험시 물의 수송: 관류액의 종류와 삼투압의 영향

이정화 · 이현주 · 용철순* · 오두만[†]
대구효성가톨릭대학교 약학대학, *영남대학교 약학대학
(Received May 3, 1995)

Water Transport during the Single-pass Perfusion Experiments: Effects of Some Perfusates and Their Osmolality

Jeong-Hwa Lee, Hyun-Joo Lee, Chul-Soon Yong* and Doo-Man Oh[†]
College of Pharmacy, Taegu Hyosung Catholic University, Kyungsan, Kyungbuk 713-702, Korea
*College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyungsan, Kyungbuk 712-749, Korea

Abstract—The single-pass perfusion experiments were performed in anesthetized rats to investigate the effects of perfusates and their osmolality on the water transport and to determine the correlation between the extent of water transport and the volume change of perfusate. Phenol red was used as a nonabsorbable marker. In normal rats, when perfused at a flow rate of 0.5 ml/min, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) and Sørensen's phosphate buffers showed minimal net water transport as 0.125 and 0.173 %/cm of intestinal length, respectively. Hypotonic perfusate of 200 mOsm/kg of water and hypertonic perfusate of 400 mOsm/kg of water generated significant water transport compared with isotonic perfusate of 300 mOsm/kg of water. There was a linear correlation between the extent of water transport and the volume change of perfusate, suggesting that the volume change can be used as a measure of water transport.

Keywords □ Intestinal water transport, perfusate buffer, osmolality, phenol red, single-pass perfusion experiment

신약의 생체이용률을 평가하는데 있어 흡수실험은 그 신약에 대한 허가 뿐만 아니라 경구제제로서의 가능성에 대한 기본적인 정보를 제공하므로, 임상시험의 전 단계에서 동물을 이용한 흡수실험은 필수적이다.

소장에서 약물흡수에 대한 다양한 실험법이 개발되었으며 그 중 소장의 일부에 약물을 관류시켜 흡수 동태를 연구하는 *in situ* perfusion법이 많이 이용되고 있다. *In situ* 실험법에는 일회통과 관류법,^{1, 3)} recirculating perfusion,⁴⁾ oscillating perfusion⁵⁾ 및 closed loop method,^{6, 7)} 등이 있는데, 사용하는 방법에 따라 흡수율의 평가에 차이가 나타난다. 그 중 일회통과 관류법은 이론적 배경이 확고하고 실험결과로부터 사람에게 있어서의 흡수율에 대한 예측이 가능할 뿐만

아니라,⁸⁾ 흡수 기전도 확인할 수 있어 많이 이용되고 있다.^{2, 3, 9)}

소장에서의 약물흡수에 영향을 미치는 요소들은 여러 가지가 있으며, 그 중 생체측에서 보면 위내용 배출속도, 소장의 운동, 전해질이나 물의 정상적인 유동 및 위장관 내의 pH 등이 있다. 또한 흡수실험시 약물의 흡수에 영향을 미치는 인자에는 장관내 교반,¹⁰⁾ 마취제,¹¹⁾ 비교반수층,^{12, 13)} 관류속도,^{14, 16)} 장관의 반경,¹⁵⁾ 삼투압¹⁹⁾ 등이 있으며, 이들에 대해서 많은 연구가 행해져 왔다. 특히 그 중에서 관류속도가 약물의 소화관내에서의 흡수에 영향을 미친다는 보고들이 있다.^{14, 15)} 일반적으로 관류속도가 빠를수록 장관내에서의 약물흡수율은 증가되며 그 이유는 다음과 같다. 첫째 관류속도가 빠르면 점막표면에서 교반이 증대되어 점막표면에 존재하는 비교반수층의 두께를 현저히 감소시킨다. 그러므로 어떤 약물의 막

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

투과 속도보다 비교반 수층을 확산하는 속도가 느린 경우 이러한 비교반 수층의 두께를 감소시킴으로써 흡수를 증가시킬 수 있다. 두번째로 관류속도가 빨라지면 장관이 팽창하여 보다 많은 용모 표면이 노출됨으로써 흡수 가능한 표면적을 증가시킬 것이다. 세번째로 빠른 관류는 장관 내압을 상승시켜 aqueous channel을 통한 수동수송을 증가시킬 수 있다.¹⁴⁾ 반면 이론적으로는 장관 내압이 증가하면 점막의 혈류가 감소되어 오히려 약물의 흡수가 감소될 것으로 예측할 수 있으나 Bolie 등¹⁸⁾은 장관 내압이 30 mmHg를 넘을 때까지 혈류는 감소되지 않으며, Lewis 등¹⁴⁾은 1 ml/min로 관류시킬 때 평균 장관 내압은 2.9 ± 0.2 mmHg이었으며 관류속도를 10 ml/min로 할 때까지 압력의 변화가 거의 없음을 보고하였다. 이 외에도 일회통과 관류법을 이용하여 약물의 흡수율을 평가하고자 할 때는, 관류실험동안 항시 일어나고 있는 소장내 물의 수송에 대해 고려하는 것이 필요하다. 즉, 소장에서 발생하는 물의 수송에 대해 고려하지 않을 경우 일회통과 관류실험에 의한 막투과도의 계산에 커다란 오류가 생길 수 있다. 왜냐하면 흡수된 약물의 양을 계산하기 위해서 관류 전후의 약물의 농도차를 비교하게 되는데, 만약 소장내 물의 수송 때문에 약물농도가 변화하였다면 길보기 흡수율에는 많은 오차가 생기기 때문이다.

따라서 약물의 흡수율을 정확하게 평가하기 위해서는 소장내에서 자연발생적으로 일어나는 물의 유동을 계산하여 약물농도를 보정해 주어야 한다. 즉 여러가지 실험조건을 변화시켜 소장에서 정상적으로 일어나는 물의 수송의 영향을 최소화하면서 약물의 흡수율에 영향을 미치는 요인들에 대해 보정해 줌으로써 흡수율을 정확하게 예측할 수 있도록 하는 것이 필요하다. 관류속도가 높아지면 장관내에서의 약물 흡수 증가와 더불어 관류속도에 따라 물의 수송에도 변화가 생길 수 있는데 Oh¹⁶⁾에 의하면 0.5 ml/min 이하의 관류속도에서는 물의 수송이 유의성있게 일어나지 않았고, Winne¹⁵⁾는 관류속도를 0.1 ml/min에서 0.5 ml/min로 변화시킬 때까지 장관의 길이와 반경의 변화가 없음을 보고하였다. 또한 Savina 등¹⁹⁾은 0.48~0.6 ml/min의 관류속도에서 iopanoic acid의 흡수율에 가장 작은 변화가 나타난다고 보고하였다.

그러나 *in situ* 실험 중에 일어나는 물의 수송에 대해 영향을 미치는 관류속도 이외의 다른 요인들에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 흡수실험시 빈용되

고 있는 완충액 중 물의 수송을 최소로 유발하는 완충액을 검토하였다. 또한 일반적으로 식후 공장강내의 내용물은 등장액으로 생각되었으나 최근의 연구에서 어떤 식이후의 강내용물의 삼투압이 400 mOsm/kg of water에 가까워²⁰⁾ 관류실험시 관류액의 삼투압이 물의 수송에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료되어 삼투압의 영향에 대한 실험을 하였다. 그리고 관류액이 소장을 통과하는 동안 물의 수송에 의해 관류액의 부피변화가 생길 것이므로 물의 수송 정도와 부피변화 정도간의 상관성을 구명하여 부피변화가 물의 수송 정도를 평가하는 지표로서 이용될 수 있는지를 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 우레탄, 구연산, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)제품을 사용하였고, 인산이수소칼륨, 인산일수소나트륨, 염화칼륨은 Hayashi Pure Chem. Ind.(Osaka, Japan)제품을 사용하였다. 염화나트륨과 페놀레드는 Wako Pure Chem. Ind.(Osaka, Japan)제품을 사용하였다. 기기는 infusion pump model 100 (KD Scientific Inc., Boston, U.S.A.)와 UV spectrophotometer (영우기기, SMART plus 190 DUV), pH 측정기 (Dongwoo Medical Systems Co., Ltd, DMS DP-880M)를 사용하였고, 삼투압은 KARL KOLB vapour pressure osmometer (KARL KOLB GmbH & Co. KG, Germany)를 사용하여 측정하였다.

관류액의 제조 - 관류액의 완충액으로 McIlvaine (citrate) 완충액, Sørensen 인산염 완충액, modified MES 완충액 및 생리식염수를 제조하여 사용하였다. 모든 관류액의 pH는 수산화나트륨을 사용하여 소장강내의 pH와 일치하도록 6.5로 맞추었다.²¹⁾ 삼투압은 염화나트륨을 사용하여 등장액은 300 ± 10 mOsm/kg of water, 저장액은 200 ± 10 mOsm/kg of water, 고장액은 400 ± 10 mOsm/kg of water로 맞추었고, 각 관류액에 흡수되지 않는 표식자로서 페놀레드를 0.03 mM이 되도록 첨가하였다.

In situ 일회통과 관류법 - 체중 200~250 g의 Sprague-Dawley (Life Science, 대구) 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 실험전 15~18시간 동안 절식시키고, 물은

자유로이 먹게 하였다. 이 쥐를 50%(w/v) 우레탄 용액 (1.5 g/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 Oh 등⁹⁾의 일회통과 관류법으로 실험을 하였다. 마취 후 체온을 유지시키기 위해 흰쥐를 가열판 위에 놓고 가열램프를 설치하였다. 복강의 중앙선을 절개한 후 소장 Treitz ligament의 3~4 cm 아래로부터 약 10 cm 길이로 cannulation 하였다. Cannulation 후 시료를 관류시키기 전에 장관 내 이물질을 제거하기 위해 0.9% 생리식염수를 관류액이 맑아질 때까지 통과시키고 남아 있는 식염수를 완전히 제거하였다. 각 cannula에 silicon tubing (Cole-Parmer Instrument Co., Niles, Illinois)을 연결시키고 입구쪽은 정속주입펌프에 장치한 50 ml 주사기 (Hamilton Co., Reno, Nevada)에 연결하였고, 출구쪽은 시험관으로 들어가게 하였다. 정수압 구배가 발생하지 않도록 입구와 출구쪽을 같은 높이에 위치하도록 하였다. Cannulation한 후 장관을 꼬이지 않게 놓고 수술부위를 생리식염수로 적신 paper towel로 덮고 증발을 막기 위해 parafilm (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO.)으로 덮어 주었다. 관류속도를 0.5 ml/min로 하여 관류시키면서 30분 후 물의 유동이 평형상태에 도달한 후 10분 간격으로 5개의 시료를 취하였다. 실험이 끝난 후 관류시킨 장관의 길이는 실을 이용하여 장관의 축을 따라 측정하였다. 10분 간격으로 취한 시료는 부피를 측정하고 inlet 부피와 비교하여 부피변화를 구한 뒤, 원심분리하고 440 nm에서 페놀레드의 흡광도를 측정하였다.

물의 수송 측정 - 물의 수송을 측정하기 위해 분자량이 큰 염료인 페놀레드를 표식자로 사용하였다. 페놀레드가 소장내에서 전혀 흡수되지 않는다고 가정하고^{22, 23)} 각각의 시료에 대해 소장 길이의 단위 cm당 물의 수송 %를 다음 식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Water Transport} = \frac{A_{\text{out}} - A_{\text{in}}}{A_{\text{in}}} \cdot \frac{100}{L} \quad (1)$$

여기에서 A_{in} 은 페놀레드의 inlet 농도, A_{out} 은 페놀레드의 outlet 농도, L 은 관류시킨 장관의 길이(cm)이다. Outlet의 농도가 inlet의 농도보다 낮을 경우 즉 negative % water transport 가 나타나는 경우는 혈액 쪽에서 소장강내로 물의 이동이 일어났음을 의미하고, positive % water transport는 소장강내로부터 혈액 쪽으로의 물의 이동이 일어났음을 의미한다.

결과 및 고찰

일반적으로 일회통과 관류법에 의한 약물의 dimensionless 장관벽 투과도 (P_{eff}^*)의 계산은

$$P_{\text{eff}}^* = \frac{(1 - C_{\text{out}}/C_{\text{in}}) \cdot Q}{2\pi DL} \quad (2)$$

로 할 수 있다.²⁴⁾ C_{in} 과 C_{out} 은 각각 관류액 중 약물의 inlet 농도와 outlet 농도를 나타내고, D 는 확산계수, L 은 관류시킨 장관의 길이, Q 는 관류액의 관류속도를 의미한다. 이때 관류액 중 약물의 outlet 농도는 식 (1)을 이용하여 실험중에 일어난 물의 수송에 대해 보정된 값을 사용하게 된다. 따라서 정확한 약물 농도의 변화를 알기 위해 물의 수송에 영향을 미치는 요인들을 검토하는 것이 필요하므로 관류액의 완충액의 종류와 삼투압의 차이가 미치는 영향을 고찰하였다.

완충액의 영향

흡수실험시 사용하는 관류액 중 완충액의 종류에 따라 물의 수송에 차이가 생길 수 있다. 본 실험에서는 흡수실험에 자주 사용되는 완충액들을 중심으로 물의 수송에 미치는 영향들을 비교하고 물의 수송을 최소로 유발하는 완충액을 조사하였다. 이때 모든 완충액의 삼투압은 $300 \pm 10 \text{ mOsm/kg of water}$ 로 등장액이 되게 하였다. 생리식염수, McIlvaine, MES, Sørensen 인산염 완충액을 사용하여 제조한 관류액이 일회통과 관류실험 도중 일으키는 물의 수송의 정도를 Fig. 1에 나타내었다. 생리식염수를 사용하였을 때 물의 수송은 $-0.017 \pm 0.397\%/cm$ 로 평균값으로는 가장 적은 물의 수송을 유발하는 것으로 나타났으나 실험동물간에 표준편차가 크게 나타났다. 완충액으로는 MES 완충액과 Sørensen 인산염 완충액이 각각 $0.125 \pm 0.125\%/cm$ 와 $0.173 \pm 0.215\%/cm$ 의 값으로, MES 완충액이 적은 물의 수송을 유발하는 것으로 나타났으나 paired Student's t-test하였을 때 양자간에 유의성있는 차이를 보이지는 않았다 ($p=0.374$). McIlvaine (citrate) 완충액은 $-0.258 \pm 0.152\%/cm$ 의 물의 수송을 나타내었고 MES 완충액이나 인산염 완충액에 비해 소장강내로 유의성있는 물의 수송을 나타내었다. 따라서 관류액의 완충액으로 MES 완충액과 인산염 완충액을 사용하였을 때 개체차가 적게 나타나고, 물의 수송에 미치는 영향도 적은 것으로 보이며, 약물의 P_{eff}^* 를 구하는데 더

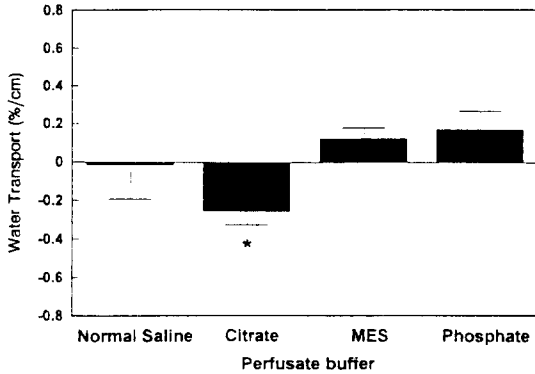


Fig. 1—Effect of perfusate buffers on the water transport. Flow rate was 0.5 mL/min. Results are expressed as mean \pm SE (n=6).

적합하다고 사료된다. Lu 등²⁵⁾에 의하면 MES 완충액과 McIlvaine 완충액은 *in situ*와 isolated loop technique 양자에서 유의성있는 차이를 나타내는 물의 수송을 유발하였고, Meadow²⁶⁾는 McIlvaine 완충액과 Sørensen 인산염 완충액, modified Krebs-Henseleit 완충액에 대해 실험하여 Krebs-Henseleit 완충액이 다른 두 가지 완충액에 비해 물의 수송을 크게 유발하므로 실험 조건에 부적절함을 보고하여 본 실험결과와 잘 일치하였다.

삼투압의 영향

완충액으로는 MES 완충액 또는 인산염 완충액을 사용하고, 염화나트륨을 사용하여 저장액, 등장액 및 고장액에 있어서의 물의 수송의 정도를 비교하고 그 상관성을 알아보았다. Fig. 2는 물의 수송에 미치는 각 완충액의 삼투압의 영향을 나타내었다. 저장액(200 \pm 10 mOsm/kg of water)의 관류액으로 관류시켰을 때 등장액에 비해 소장강내로부터 blood로의 물의 이동이 현저하게 일어난 것을 볼 수 있고, 고장액(400 \pm 10 mOsm/kg of water)의 관류액으로 관류시켰을 때는 blood로부터 소장강내로의 물의 이동이 현저하게 일어난 것을 볼 수 있었다. 특히 고장액 관류액의 경우 99% 신뢰구간에서 유의성있는 물의 수송을 나타내었다. 이러한 물의 수송의 양상은 Lu 등¹⁷⁾의 보고와 일치하였으며 특히 본 실험결과 각 삼투압에서의 물의 수송 정도간에는 상관계수 $r^2=0.976$ 의 높은 상관성을 나타내었다. Fig. 3에는 각 삼투압에서의 물의 수송으로 생긴 부피변화를 나타내었다. 저장액과 고장액의 경우 등장액보

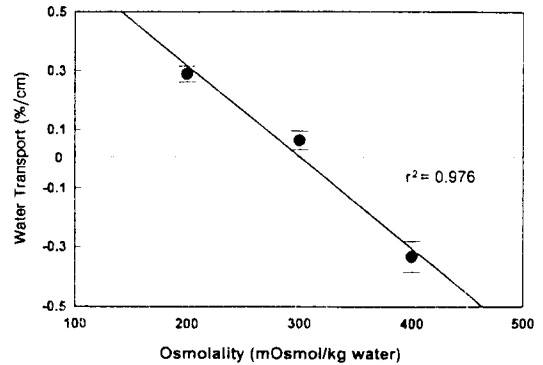


Fig. 2—Effect of perfusate osmolality on the water transport. Results are expressed as mean \pm SE (n=6).

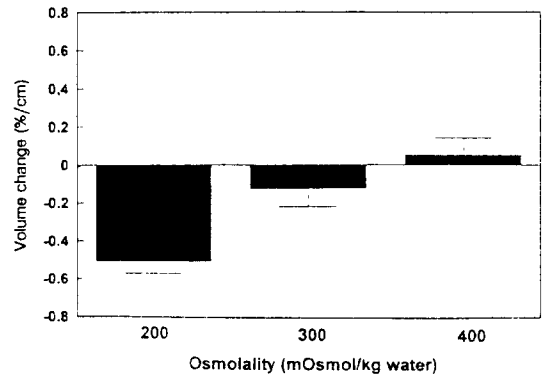


Fig. 3—Effect of osmolality on the volume change of the perfusate after perfusion. Results are expressed as mean \pm SE (n=6).

다 물의 수송이 커서 저장액의 경우는 소장강내의 물이 체내로 많이 소실되었고, 고장액의 경우는 보다 많은 물이 소장강내로 빠져 나온 것으로 보이며 이에 따른 관류액의 부피 변화가 유발됨을 알 수 있었다.

부피변화와 물의 수송과의 상관성

관류액이 장관을 통과하는 동안 일어나는 물의 수송에 의해 inlet과 outlet 관류액 사이에 부피변화가 생길 것으로 예측할 수 있으므로 이 부피변화 정도와, 측정된 물의 수송 사이에 유의성있는 상관성이 있는지를 검토해 보았다. 부피변화는 관류시킨 장관의 길이(cm)당 관류시키기 전의 관류액의 부피에 대한 관류시킨 후의 부피변화를 %로 나타내었다. 즉 관류 후의 부피가 물의 수송에 의해 관류 전에 비해 증가되었을 경우 positive한 %를 나타낸다. Fig. 4에 부피변화에 대한 물

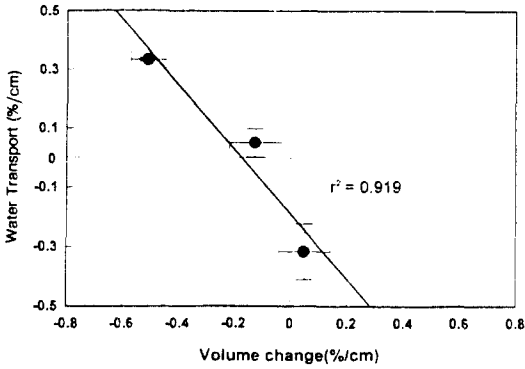


Fig. 4—The relationship between volume change and water transport. Each point represents mean \pm SE of water transport and volume change.

의 수송 정도를 도시하였다. 양자간에는 $r^2=0.919$ 의 상관성을 나타내었다. 따라서 비교적 높은 상관관계가 물의 수송과 부피변화 사이에 있는 것으로 보아, 부피변화만을 가지고도 일회통과 관류실험시 물의 유동을 모니터링 할 수 있으리라 사료된다.

결 론

경구투여한 약물의 생체이용률을 평가하기 위한 흡수 실험에서 약물의 흡수정도를 평가하는 데 영향을 미칠 수 있는 물의 수송에 대해 실험한 결과 MES 완충액과 Sørensen 인산염 완충액이 각각 소장의 단위 길이 (cm)당 0.125, 0.173%의 물의 수송을 유발하여 흡수 실험시 유용한 완충액으로 사료된다. 관류액의 삼투압을 200 mOsm의 저장액과, 400 mOsm의 고장액으로 하였을 때는 300 mOsm의 등장액에 비해 현저한 물의 수송이 유발되었다. 관류시킨 후의 관류액의 부피변화와 물의 수송 사이에는 비교적 높은 상관성이 있었다.

감사의 말씀

이 연구는 1993년도 대구효성가톨릭대학교 특별 연구비 지원에 의해 일부 수행되었으며, 이에 감사드린다.

문 헌

1) Doluisio, J. T., Billups, N. F., Dittert, L. W., Sugita, E. T. and Swintosky, J. V.: Drug absorption : An *in situ* gut technique yielding real-

istic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* **58**, 1196 (1969).

2) Ho, N. F. H. and Higuchi, W. I.: Theoretical method studies of intestinal drug absorption IV: Bile acid transport at pre-mucosal concentrations across diffusion layer-membrane barrier. *J. Pharm. Sci.* **63**, 686 (1974).

3) Sinko, P. J. and Amidon, G. L.: Characterization of the oral absorption of β -lactam antibiotics : I. Cephalosporins : determination of intrinsic membrane absorption parameters in the rat intestine *in situ*. *Pharm. Res.* **5**, 645 (1988).

4) Schanker, L. S., Tocco, D. J., Brodie, B. B. and Hogben, C. A. M.: Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **123**, 81 (1958).

5) Dackson, K., Stone, J. A. and Charman, W. N.: Evaluation of the mass balance assumption with respect to the two-resistance model of intestinal absorption by using *in situ* single-pass intestinal perfusion of theophylline in rats. *J. Pharm. Sci.* **81**, 321 (1992).

6) Yata, N., Sugihara, N., Yamajo, R., Murakami, T., Higashi, Y., Kimata, H., Makayami, K., Kuzuki, T. and Tanaka, O.: Enhanced small intestinal absorption of β -lactam antibiotics in rats in the presence of monodesmosides isolated from pericarps of *Sapindus Mukurossi* (ENMEI-HI). *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**, 211 (1981).

7) Poelma, F. G. J. and Tukker, J. J.: Evaluation of a chronically isolated internal loop in the rat for the study of drug absorption kinetics. *J. Pharm. Sci.* **76**, 433 (1987).

8) Amidon, G. L., Sinko, P. J. and Fleisher, D.: Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm. Res.* **5**, 651 (1988).

9) Oh, D.-M., Sinko, P. J. and Amidon, G. L.: Characterization of the oral absorption of several aminopenicillins: Determination of intrinsic membrane absorption parameters in the rat intestine *in situ*. *Int. J. Pharm.* **85**, 181 (1992).

10) Levitt, M. D., Fetzter, C. A., Kneip, J. M., Bond,

- J. H. and Levitt, D. G.: Quantitative assessment of luminal stirring in the perfused small intestine of the rat. *Am. J. Physiol.* **252**, G 325 (1987).
- 11) Yuasa, H., Matsuda, K. and Watanabe, J.: Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm. Res.* **10**, 884 (1993).
- 12) Winne, D.: Dependence of intestinal absorption in vivo on the unstirred layer. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **304**, 175 (1987).
- 13) Winne, D., Gorig, H. and Muller, U.: Closed rat jejunal segment *in situ*: Role of preepithelial diffusion resistance (unstirred layer) in the absorption process and model analysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **335**, 204 (1987).
- 14) Lewis, L. D. and Fordtran, J. S.: Effect of perfusion rate on absorption, surface area, unstirred water layer thickness, permeability, and intraluminal pressure in the rat ileum *in vivo*. *Gastroenterology* **68**, 1509 (1975).
- 15) Winne, D.: Rat jejunum perfused *in situ*: Effect of perfusion rate and intraluminal radius on absorption rate and effective unstirred layer thickness. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **307**, 265 (1979).
- 16) Oh, D.-M.: Effect of water flux on the determination of membrane permeability using single-pass perfusion. *J. Kor. Pharm. Sci.* **24**(3), S19 (1994).
- 17) Lu, H.-H., Thomas, J. D. and Fleisher, D.: Influence of D-glucose-induced water absorption on rat jejunal uptake of two passively absorbed drugs. *J. Pharm. Sci.* **81**, 21 (1992).
- 18) Bolie, S. J.: Vascular disorders of the intestine. New York, Meredith Corp., p. 431 (1971)
- 19) Savina, P. M., Staubus, A. E., Gaginella, T. S. and Smith, D. F.: Optimal perfusion rate determined for *in situ* intestinal absorption studies in rats. *J. Pharm. Sci.* **70**, 293 (1981).
- 20) Ladas, S. D., Isaacs, D. E., Slorden, G. E.: Post-prandial changes of osmolality and electrolyte concentration in the upper jejunum of normal man. *Digestion.* **26**, 218 (1983).
- 21) Fleisher, D., Sheth, N., Griffin, H., McFadden, M. and Aspader, G.: Nutrient influences on rat intestinal phenytoin uptake. *Pharm. Res.* **6**, 332 (1989).
- 22) McLeod, G. M., French, A. B., Good, C. J. and Wright, F. S.: Gastrointestinal absorption and biliary excretion of phenolsulfonphthalein (phenol red) in man. *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 192 (1968).
- 23) Miller, D. L., Schedl, H. P.: Total recovery studies of nonabsorbable indicators in the rat small intestine. *Gastroenterology* **58**, 40 (1970).
- 24) Johnson, D. A. and Amidon, G. L.: Determination of intrinsic membrane transport parameters from perfused intestine experiments: A boundary layer approach to estimating the aqueous and unbiased membrane permeabilities. *J. theor. Biol.* **131**, 93 (1988).
- 25) Lu, H.-H., Thomas, J. and Fleisher, D.: Intestinal water and solute absorption studies: Comparison of *in situ* perfusion with chronic isolated loops in rats. *Pharm. Res.* **9**, 894 (1992).
- 26) Meadows, K. C.: The intestinal uptake mechanism of purine bases and analogues. Ph. D. Thesis. The University of Michigan, Ann Arbor, MI (1988).