

Pharm Bull, 1991, 39(7): 1871-1872.

- [11] HUANG H Q, CHENG Z H, SHI H M, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties [J]. Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4562-4569.
- [12] XIN W B, HUANG H Q, YU L, et al. Three new flavanonol glycosides from leaves of *Engelhardtia roxburghiana*, and their anti-inflammation, antiproliferative and antioxidant

properties [J]. Food Chem, 2012, 132(2): 788-798.

- [13] SUN T, DENG A J, LI Z H, et al. Flavonoids from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* [J]. Chin Pharm, 2012, 47(20): 1617-1620.
- [14] SUN T, QIN H L. A study on chemical constituents of the leaves from *Engelhardtia roxburghiana* and brassica pekinensis [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Science Peking Union Medical College, 2012.

收稿日期: 2014-11-28

川陈皮素自组装前体脂质体大鼠在体肠吸收研究

林薇¹, 姚静², 周建平² (1. 宁波大学医学院附属医院药剂科, 浙江 宁波 315020; 2. 中国药科大学药剂教研室, 南京 210009)

摘要: 目的 考察川陈皮素自组装前体脂质体在大鼠肠道的吸收情况。方法 以川陈皮素溶液、普通脂质体为对照, 采用单向灌注法, 研究不同肠段川陈皮素自组装前体脂质体在大鼠肠道吸收动力学。结果 3种制剂在全肠段都有吸收, 在各个肠段, 3种制剂的净累积吸收量、 K_a 和 P_{eff} 均表现为川陈皮素自组装前体脂质体>川陈皮素普通脂质体>川陈皮素($P<0.05$)。结论 川陈皮素自组装前体脂质体可显著促进川陈皮素的口服吸收。

关键词: 川陈皮素; 自组装前体脂质体; 肠道吸收

中图分类号: R917.101; R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2015)07-0817-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.010

Intestinal Absorption Kinetics of Nobiletin Self-assemble Proliposomes in Rats

LIN Wei¹, YAO Jing², ZHOU Jianping² (1. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Medical College, Ningbo University, Ningbo 315020, China; 2. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the intestinal absorption kinetics of nobiletin self-assemble proliposomes(NSAP) in rats. **METHODS** Compared with nobiletin and nobiletin liposome, the in situ intestinal absorption of NSAP in different intestinal segments was investigated by means of single-pass rat intestinal perfusion technique. **RESULTS** The results showed that three preparations could be absorbed at each intestinal segment. The cumulative absorptions, K_a and P_{eff} of three preparations at each intestinal segment appeared NSAP>nobiletin liposome>nobiletin($P<0.05$). **CONCLUSION** NSAP can effectively improve the oral absorption of nobiletin in the intestinal tract.

KEY WORDS: nobiletin; self-assemble proliposome; intestinal absorption

川陈皮素是天然黄酮类化合物, 具有抗肿瘤、降血脂、神经保护等多种药理作用^[1-3]。目前有关川陈皮素的研究主要集中在药理作用和提取等方面^[4], 因其脂溶性差且难溶于水, 制剂学的研究比较少^[5-6], 其在体肠吸收情况仅见自微乳系统的研究^[5]。笔者将川陈皮素制成口服给药的川陈皮素自组装前体脂质体(nobiletin self-assemble proliposomes, NSAP), 制备工艺简单, 可行性高, 并经大鼠体内药动学研究证实, 该脂质体可显著增加川陈皮素的口服吸收^[7]。本研究采用大鼠在体肠灌注的方法考察川陈皮素及其前体脂质体在不同肠

段的吸收情况, 并对 NSAP 促进口服吸收的机制进行初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 试剂

川陈皮素(南京神州佳美制药有限公司, 批号120728, 纯度: 97.12%); NSAP(批号131008, 自制^[7]); 大豆磷脂(上海太伟制药, 注射级); 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

TU-1800 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); FA-2004 型分析天平(上海精密仪器有限公

作者简介: 林薇, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0574)87035029

E-mail: 154102235@qq.com

司); LC-2010 型高效液相色谱仪(日本岛津制作所); HH-S 恒温水浴锅(江苏省东台市电器厂), FB-1 恒流泵(上海金达生化仪器有限公司)。

1.3 动物

SD 清洁级大鼠, ♂, 体质量(200±20)g, 由青龙山实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(苏)2009-0001。

2 方法

2.1 灌流液的配制

2.1.1 NSAP 灌流液的制备^[7] 将处方量川陈皮素直接溶解在含有大豆磷脂、修饰剂 A 的无水乙醇溶液中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 即制成 NSAP。将该前体脂质体直接注入适宜的水合介质中, 即可快速自组装成纳米级川陈皮素脂质体。NSAP 的包封率可达 80%以上, 平均粒径为 212.1 nm, 稳定性好。

2.1.2 川陈皮素(nobiletin, NOB)普通脂质体的制备 精密称取 NOB 药物适量溶解在含有大豆磷脂的无水乙醇溶液中, 将其注入水合介质即可。

2.1.3 灌流液的配制 将上述制剂加 Krebs-Ringer 营养液(简称 K-R 液)稀释, 混匀, 即得含 15 μg·mL⁻¹NOB 的灌流液。

2.2 川陈皮素浓度测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Shimadzu ODS(4.6 mm × 150 mm); 流动相: 甲醇-水(75:25); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 紫外检测波长: 332 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.2.2 方法专属性考察 分别考察空白肠液、酚红以及前体脂质体中各组分对药物的测定是否有干扰。

2.2.3 标准曲线的考察 精密量取浓度为 40 μg·mL⁻¹的 NOB 储备液各 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mL, 置于事先加有 1.0 mL 空白 K-R 液的 10 mL 量瓶中, 甲醇定容。分别移取上述溶液 1 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 取 20 μL 进样。记录峰面积, 以峰面积对浓度线性回归, 得标准曲线方程。

2.2.4 回收率、精密度测定 按“2.2.3”项下方法配制终浓度分别为 0.08, 0.40, 0.80 μg·mL⁻¹的对照品溶液(n=5), 分别考察回收率和精密度。

2.2.5 肠灌流液中药物浓度的测定 移取灌流液 0.2 mL, 加入 4.8 mL 甲醇, 涡旋混合后, 进样 20 μL, 记录峰面积, 代入标准曲线计算浓度。

2.3 酚红标准曲线

分别量取含 400 μg·mL⁻¹酚红的 K-R 储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 用 K-R 液定容至 10 mL。分别移取“2.2.4”项下对照品溶液 0.2 mL, 用 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 4.8 mL 涡旋混合显色, 在紫外测定仪 558 nm 处测定吸光度。以吸光度值对浓度线性回归, 得酚红的标准曲线方程。实验中以酚红校正肠灌流液可能的体积变化。

2.4 大鼠在体小肠单向灌注实验

取禁食 24 h(自由饮水)的 SD 大鼠, 腹腔注射 20%的乌拉坦生理盐水溶液(1.2 g·kg⁻¹), 背位固定, 沿腹中线打开腹腔。自幽门以下 2 cm 处起向下 10 cm 作为十二指肠, 幽门以下 15 cm 向下取 10 cm 为空肠段, 盲肠上端 2 cm 向上取 10 cm 为回肠段, 盲肠以下 10 cm 为结肠段。找到所需肠段后, 在始端和末端插管, 结扎。用 37 °C 生理盐水缓慢清洗肠管, 直至流出液干净, 排空生理盐水后, 接上恒流泵, 用空白的 K-R 液预饱和灌流管路和肠管(流速 0.2 mL·min⁻¹)30 min 后, 排空液体。接上药液开始单向灌流的实验(流速为 0.2 mL·min⁻¹), 以充满整个管路后流出第一滴药液的时刻作为零时刻, 根据需要每隔一段时间收集灌流样品。

2.5 大鼠在体肠吸收实验影响因素考察

2.5.1 制剂在肠液中的稳定性 用空白肠循环液配制浓度为 15 μg·mL⁻¹ NSAP 灌流液, 在 37 °C 恒温水浴中, 分别测定 0, 1, 2 h NOB 的含量。

2.5.2 肠段对药物的吸附 取未损伤的十二指肠、空肠、回肠和结肠各 10cm, 将黏膜层翻出, 置于一定量已知浓度的药液中, 在 37 °C 水浴中孵育 3 h, 取出肠段, 测定孵育液中的药物浓度。

2.6 不同制剂在各肠段的吸收比较

分别配制含有 80 μg·mL⁻¹酚红和 15 μg·mL⁻¹NOB 的不同制剂的 K-R 溶液作为灌流液, 按“2.4”项下方法, 考察各制剂在十二指肠、空肠、回肠和结肠的吸收情况。

2.7 数据分析

表观吸收速率常数 K_a 的计算:

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \times \frac{PR_{in}}{PR_{out}}\right) \times \frac{Q}{\pi r^2 l}$$

有效渗透系数 P_{eff} 的计算:

$$P_{eff} = -\frac{Q}{2\pi r l} \ln \frac{C_{out}}{C_{in}}$$

上式中的 PR_{in} 和 PR_{out} 分别表示进出肠管的灌注液中酚红的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C_{in} 和 C_{out} 分别表示进出肠管的灌注液中药物的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q 代表灌注的体积流速($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$); l 代表被灌注的肠管长度(cm)。各组实验数据采用 t 检验比较。

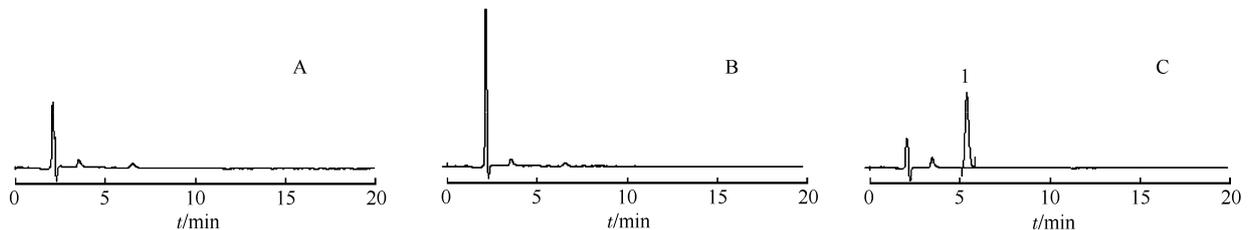


图1 高效液相色谱图
A-空白肠循环液; B-含酚红的肠循环液; C-含药物和酚红的肠循环液; 1-川陈皮素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank intestinal juice; B-phenol red in intestinal juice; C-NOB in intestinal juice added phenol red; 1-NOB.

川陈皮素在 $0.08\sim 1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好, 回归方程: $A=82\ 636C+131.45$, $R^2=0.999\ 8$ 。川陈皮素在 $0.08, 0.40, 0.80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 回收率($n=5$)分别为 $(100.04\pm 1.23)\%$ 、 $(99.61\pm 2.15)\%$ 和 $(100.63\pm 0.87)\%$, 日内精密度分别为 0.58% , 0.37% , 0.12% , 日间精密度分别为 2.20% , 0.49% , 0.34% ($n=5$), 均符合要求。

酚红在 K-R 液中的最大吸收波长为 $558\ \text{nm}$, 且在该波长附近肠液, 辅料以及药物对酚红的测定没有干扰, 故选 $558\ \text{nm}$ 为酚红紫外测定波长。酚红在 $0.8\sim 4.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好, 回归方程为 $C=0.185A+0.019\ 4$, $R^2=0.999\ 8$ 。酚红在浓度为 $0.8, 2.4$ 和 $4.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 回收率($n=5$)分别为 $(98.36\pm 2.22)\%$ 、 $(101.90\pm 1.10)\%$ 和 $(99.47\pm 0.63)\%$ 。酚红低、中、高浓度的日内精密度分别为 2.16% , 0.80% , 0.29% , 日间精密度分别为 2.87% , 0.94% , 0.82% ($n=5$), 均符合要求。

3.2 大鼠在体肠吸收实验影响因素的考察

稳定性和肠壁吸附实验结果显示, 川陈皮素在空白循环液中及大鼠小肠壁共孵 $2\ \text{h}$ 后, 药物含量无显著变化, 空白肠循环液中 NOB 的含量为零时刻的 $(100.2\pm 0.6)\%$, 故 NOB 在空白循环液中稳定, 且小肠壁对川陈皮素基本无物理吸附。

3.3 不同肠段 NOB、普通脂质体和 NSAP 的吸收比较

大鼠按药物浓度 $15\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 给药后, 在不同肠段对 NOB 溶液、普通脂质体及 NSAP 的累计吸收量见图 2, 从图 2 可明显看出, 不同 NOB 制剂

3 结果

3.1 灌流液中药物和酚红浓度测定方法学

HPLC 测定小肠灌流液中 NOB 浓度, 结果表明空白肠灌流液及酚红不干扰药物测定。色谱图见图 1。

在各肠段的累积吸收量大小顺序均为 $\text{NSAP}>\text{普通脂质体}>\text{NOB}$, 统计结果表明不同制剂组之间在各肠段均有显著性差异, 同一制剂在不同肠段的差异则不显著。其 K_a 、 P_{eff} 结果见表 1。NOB 制剂在各肠段的 K_a 和 P_{eff} 均表现为 $\text{NSAP}>\text{普通脂质体}>\text{NOB}$, 统计结果表明, 各制剂组之间均有显著性差异($P<0.05$)。

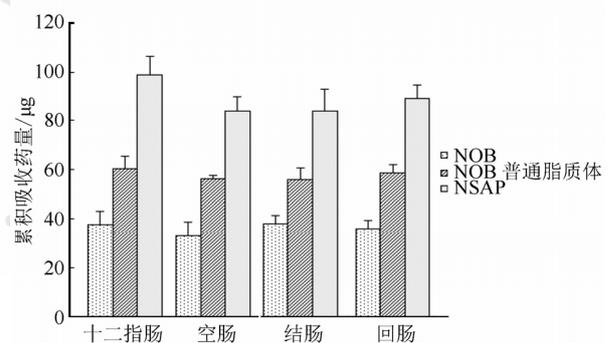


图2 不同制剂的累计吸收量($n=5$)

Fig. 2 The cumulative absorption amount of different preparations($n=5$)

4 讨论

肠吸收动力学研究可获得有效吸收部位、吸收机制、代谢特点及影响因素等信息, 是评价药物生物利用度的重要手段。当大鼠药物 $P_{\text{eff}}<0.18\times 10^{-3}\ \text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$, 吸收差; $P_{\text{eff}}>1.2\times 10^{-3}\ \text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$, 吸收完全^[8]。本实验得出川陈皮素各肠段 $P_{\text{eff}}>1.2\times 10^{-3}\ \text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$, 表明川陈皮素属于高渗透性药物。推测其生物利用度问题可能与其溶解度或首过效应等因素有关。

表 1 不同制剂各肠段的表观吸收速率常数及有效渗透系数($n=5$)

Tab. 1 The apparent absorption rate constant and effective permeation coefficient of intestinal segments for different preparations($n=5$)

参数	肠段	NOB	NOB 脂质体	NSAP
$K_a \times 10^{-2} / \text{min}^{-1}$	十二指肠	4.11±0.40	6.84±0.72 ¹⁾	8.71±0.81 ¹⁾²⁾
	空场	3.87±0.37	6.41±0.53 ¹⁾	7.54±0.54 ¹⁾²⁾
	回肠	3.99±0.22	6.42±0.49 ¹⁾	7.72±0.42 ¹⁾²⁾
$P_{\text{eff}} \times 10^{-3} / \text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	十二指肠	5.00±0.22	5.64±0.23 ¹⁾	8.61±0.58 ¹⁾²⁾
	空场	4.08±0.61	5.26±0.26 ¹⁾	7.39±0.42 ¹⁾²⁾
	回肠	3.82±0.33	5.36±0.34 ¹⁾	7.60±0.50 ¹⁾²⁾
	结肠	4.51±0.53	5.69±0.77 ¹⁾	7.43±0.80 ¹⁾²⁾

注: 与 NOB 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 NOB 脂质体组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。
Note: compared with NOB group, compared with NOB liposome group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.05$.

实验表明普通脂质体对 NOB 的吸收有明显促进, NSAP 则较普通脂质体更明显促进药物在肠道的吸收。根据以上结果, 对 NSAP 促进药物吸收的机制如下推测: 磷脂分子形成的普通脂质体有促进 NOB 肠道吸收的能力, 这与磷脂可以促进黄酮类药物的肠道吸收的文献^[9]报道相符, 可能是脂质体改善了药物的两亲性。NSAP 的促吸收作用较普通脂质体更高, 可能是由于 NSAP 中修饰剂的加入一方面使脂质体的可变形性增加, 药物更易穿过细胞屏障^[10], 另一方面也使脂质体的粒径减小、粘附性增加^[11], 从而增加了药物与肠壁的接触面积和接触时间。但是自组装前体脂质体的促吸收机制还有待于进一步证实。

大鼠在体肠吸收实验和大鼠体内药动学研究^[7]均表明本实验制备的川陈皮素自组装前体脂质体

可以显著促进药物的口服吸收。

REFERENCES

- [1] TANG M, OGAWA K, ASAMOTO M, et al. Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(4): 471-477.
- [2] GREEN C O, ASEMOTA H N. Compositions and methods for treating hypercholesterolemia using ortanique peel extract: US, 20100015255 [P]. 2010-01-21.
- [3] SEKI T, KAMIYA T, FURUKAWA K, et al. Nobiletin-rich Citrus reticulata peels, a kampo medicine for Alzheimer's disease: a case series [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2013, 13(1): 236-238.
- [4] WEI Z, YANG L, LI M, et al. Optimization of extraction technology of hesperidin and nobiletin from citrus reticulata by Box-Behnken Design-Response Surface Methodology [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2013, 19(10): 17-20.
- [5] YAO J, LU Y, ZHOU J P, et al. Preparation of nobiletin-loaded self-microemulsifying system and its absorption kinetics in rat intestines [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2007, 38(1): 35-38.
- [6] ZHANG X F, XING C F, GUO Q T. Preparation of nobiletin solid lipid nanoparticles [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2014, 36(9): 1857-1862.
- [7] LIN W, YAO J, ZHOU J P. Preparation of self-assemble nobiletin proliposomes and its pharmacokinetics in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2009, 44(2): 192-196.
- [8] FAGERHOLM U, JOHANSSON M, LENNEMAS H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [9] DING J S, ZHANG J S. Absorption of breviscapine in small intestine of rat [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2003, 34(1): 65-69.
- [10] DESHMUKH D D, RAVIS W R, BETAGERI G V, et al. Improved delivery of cromolyn from oral proliposomal beads [J]. *Int J Pharm*, 2008, 358(1/2): 128-136.
- [11] WANG G, CHANG M Q, YANG G Y, et al. Oral absorption of long circulating nano-liposomes of quercetin in mice [J]. *Her Med (医药导报)*, 2011, 30(10): 1266-1269.

收稿日期: 2014-12-18

心可舒片的质量控制

赵振霞, 王敏, 刘永利, 冯丽* (河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立心可舒片的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱法对山楂中黄酮类成分进行定性鉴别, 对木香中主要成分木香烯内酯与去氢木香内酯进行定量测定。结果 鉴别方法分离度良好; 木香烯内酯和去氢木香内酯与相邻峰完全分离; 线性关系良好, 平均加样回收率($n=9$)分别为 99.99%(RSD=1.3%)和 99.68%(RSD=1.1%)。结论 该方法专属性

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2012ZX09304005-005); 河北省科技计划项目(13272513)

作者简介: 赵振霞, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0311)85212008-8042 E-mail: 200611163@163.com *通信作者: 冯丽, 女, 主任药师 Tel: (0311)85210960 E-mail: jianyan882@163.com