

单向灌流法研究叶黄素微囊的大鼠在体肠吸收

鲁萍¹, 王新春^{1,2*}, 陈文¹, 尹俊涛³

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008;
3. 神内食品有限公司, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 目的: 研究叶黄素微囊在大鼠在体肠吸收特性。方法: 采用单向灌流模型, 紫外分光光度法测定在体肠灌流叶黄素微囊质量浓度的变化, 研究不同肠段、不同质量浓度叶黄素微囊的吸收部位和吸收机制。结果: 叶黄素微囊在大鼠各肠段的吸收速率常数(K_a)、有效渗透系数(P_{app})是回肠 > 空肠 > 十二指肠 > 结肠, 且各肠段的 K_a , P_{app} 值无显著性差异; 灌流液中不同质量浓度叶黄素微囊的 K_a , P_{app} 值均无显著性差异。结论: 叶黄素微囊在大鼠肠道无特定吸收窗, 药物质量浓度对叶黄素微囊的 K_a , P_{app} 值无影响, 其吸收机制为被动扩散。

[关键词] 叶黄素微囊; 在体肠吸收; 单向灌流法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0133-04

Study on Intestinal Absorption of Lutein Microcapsules in Rats by *in situ* Single Pass Perfusion Method

LU Ping¹, WANG Xin-chun^{1,2*}, CHEN Wen¹, YIN Jun-tao³

(1. Pharmacy of College, Shihezi University, Shihezi 832002 China; 2. The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China; 3. Shennai Food Co. Ltd., Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in situ* intestinal absorption behaviors of lutein microcapsules in rats.

[收稿日期] 20110510(014)

[基金项目] 科技人员服务企业行动项目(SQ2009GJG4102765)

[通讯作者] *王新春, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药开发及其新型纳米给药系统研究, Tel: 0993-2855827, E-mail: cwjwxc@163.com

4 结论

本文所开发的方法专属性强, 灵敏度高, 准确可靠, 可为后续的药代动力学研究提供方法学依据。大鼠静脉注射给药的半衰期约为 0.45 h, 体内的药动学过程符合二室模型, 不完全符合线性动力学过程。

[参考文献]

- [1] Takuji Tanakak, Kunihiro Kawabata, Mikio Kakumoto, et al. Immuno-modulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice[J]. Carcinogen, 1997, 18(11): 2155.
- [2] Hideki Mori, Kenji Niwa, Qiao Zheng, et al. Cell proliferation in cancer prevention: effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis

model and on an *in vitro* model in human colorectal cells [J]. Mut Res, 2001, 480/481(1): 201.

- [3] Kyuichi Kawabata, Akira Murakami, Hajime Ohigashi. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK 1/2-dependent and mTOR-independent mechanism[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22): 5288.
- [4] Francesco Epifano, Gemma Molinaro, Salvatore Genovese, et al. Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables[J]. Neurosci Lett, 2008, 443(2): 57.
- [5] Kayo Kuroyanagi, Min-Sook Kang, Tsuyoshi Goto, et al. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Research Commun, 2008, 366(1): 219.

[责任编辑 邹晓翠]

Method: *In situ* the rat single-pass intestinal perfusion model was used and the concentrations of the perfusate were determined by UV to investigate the intestinal absorption site and mechanism. **Result:** The K_a and P_{app} of Lutein Microcapsules showed ileum > jejunum > duodenum > colon in four different region of rat intestine. The K_a and P_{app} between four intestinal segments had no significant influence. The K_a and P_{app} of different drug concentration had no significant influence. **Conclusion:** Lutein Microcapsules could be absorbed in whole intestinal segment, drug concentration had no effect to K_a and P_{app} , its absorbing mechanism may be for passive diffusion.

[**Key words**] Lutein Microcapsules; *in situ* intestinal absorption; single-pass intestinal perfusion

叶黄素是天然类胡萝卜素的一种,又名植物黄体素^[1],存在于蔬菜、水果和花卉中,其中万寿菊是叶黄素含量最高的一种植物。现代药理学研究结果表明,叶黄素对于因视网膜黄斑退化而导致的失明,肌体衰老引发的心血管硬化、冠心病及肿瘤等疾病具较强的保健预防作用^[2-4]。然而,叶黄素稳定性及溶解性差的问题,却大大限制了其在医药和食品领域中的广泛应用。

微囊化技术是一种有效改善药物稳定性及溶解性的药剂学手段^[5-6]。因此,本研究采用喷雾干燥法制备叶黄素微囊,大鼠在体单向灌流法对叶黄素微囊的吸收动力学进行考察,以期为叶黄素微囊新剂型的研制提供一定的科学依据。

1 材料

NS1001L 型高压匀质机(意大利 Niro Soavi 公司),FA25 型高剪切乳化机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司),BUCHI Mini Spray Dryer B-290(瑞士布奇公司),UV-2401PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),TG16B 型台式高速离心机(中国湖南长沙凯达科学仪器有限公司),T01-100 型蠕动泵驱动器(保定兰格恒流泵有限公司),AE-200 型 1/万电子分析天平(海特勒-托利多仪器有限公司)。

叶黄素(含量 $\geq 90\%$,陕西天润植物化工有限公司),无水乙醇,注射用水,pH 6.8 PBS 缓冲液(即磷酸盐缓冲液,取 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 250 mL,加 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 118 mL,用水稀释至 1 000 mL,摇匀,既得),空白肠循环液(用空白 pH 6.8 PBS 缓冲液进行大鼠小肠循环灌注 2 h 既得),空白肠循环液消解液(取空白肠循环液按叶黄素微囊肠灌流供试液相同的消解方法消解得到),其余试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,清洁 II 级,体重 $(200 \pm 50) \text{ g}$,购自新疆医科大学实验动物中心,合格证号新医动字第 2003-0001。

2 方法与结果

2.1 叶黄素微囊的制备 称取变性淀粉、麦芽糊精适量,溶于 100 mL 蒸馏水中制得水相,称取叶黄素晶体 1.0 g 置于研钵中,向其中加入 10 mL 药用大豆油,研磨分散均匀,180 °C 油浴中加热 10 s 得油相。将油相在高速剪切下缓慢加入水相,形成初乳,再将初乳在 600 bar 压力下高压乳匀 10 次,形成乳液。在喷雾干燥进风温度为 160 °C,喷雾气体流量 $414 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,进料速度 $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,抽气流量 $40 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ 条件下制备叶黄素微囊。

2.2 肠循环液中药物浓度的测定

2.2.1 检测波长的选择 精密移取叶黄素微囊肠灌流供试液、阴性样品肠灌流供试液适量,空白肠循环液,于波长 200 ~ 800 nm 扫描,结果,叶黄素在 446 nm 处有最大吸收,阴性样品肠灌流供试液,空白肠循环液对叶黄素测定无干扰,故选择 446 nm 为 UV 法检测波长。

2.2.2 标准曲线的绘制 取叶黄素约 1.0 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用无水乙醇定容刻度,得到 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 叶黄素储备液。分别精密移取叶黄素储备液适量,置 10 mL 的量瓶中,用空白肠循环液消解液定容至刻度,制得 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的叶黄素对照品溶液。以空白肠循环液消解液为空白,于 446 nm 处测定吸光度(A)。以 A 对叶黄素质量浓度 C 进行线性回归,得标准曲线方程 $A = 0.059C + 0.0137 (r = 0.9997)$ 。结果表明,叶黄素溶液在 2 ~ 12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 分别取高、中、低 3 个质量浓度的叶黄素溶液,于 1 d 内重复测定 3 次,计算日内精密度;隔天测定 1 次,连续测定 3 次,计算日间精密度。结果日内精密度小于 4%,日间精密度小于 3% ($n = 3$)。

2.2.4 回收率试验 精密移取叶黄素储备液,加入 pH 6.8 PBS 缓冲液稀释成含叶黄素 2.0, 4.0, 8.0

mg·L⁻¹的溶液,于446 nm处测定A,结果平均回收率为98.94%,RSD 0.80%(n=9)。

2.2.5 叶黄素微囊肠灌流液的配制 取叶黄素微囊适量,精密称定,与适量空白肠灌流液研磨混合,至微囊粉末完全润湿,再用空白肠灌流液少量多次将其转移至烧杯中,边加热边搅拌,搅拌时间为24 h,加热温度为40℃,充分溶散后,置100 mL量瓶中,空白肠灌流稀释至刻度,即可。

2.2.6 叶黄素微囊在空白肠灌流液中稳定性考察 取叶黄素微囊适量,精密称定,按2.2.5项下方法,用pH 6.8 PBS缓冲液分别配制高、中、低3个浓度的叶黄素微囊肠灌流液,并于0,4,6 h测定溶液中叶黄素的含量,根据药物的减少量来考察其稳定性。结果表明6 h内叶黄素含量未发生明显变化,稳定性较好。

2.2.7 叶黄素微囊肠灌流供试液的测定 取叶黄素微囊肠循环液1.0 mL,置10 mL量瓶中,加入无水乙醇至刻度消解,超声10 min,充分消解微囊,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,以空白肠灌流消解液为空白,测定吸光度。

2.3 大鼠在体肠灌流试验^[7-8] 取禁食18 h(可自由饮水)的大鼠,称重,腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)麻醉,于恒温手术台上固定并保持体温。沿腹中线切开腹腔,选择实验肠段,缓缓注入37℃生理盐水将肠道内容物冲净,上端插管,手术线结扎固定,再将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。将肠段两端的插管与蠕动泵胶管连接形成通路。取37℃供试液以0.5 mL·min⁻¹的流速泵入肠段,使肠段内充满供试液且无气泡,平衡30 min。在将流速调至0.25 mL·min⁻¹恒速灌流,开始计时。进口处用已知质量的装有供试液的小瓶进行灌流,出口处用已知质量的小瓶每隔15 min分段收集流出液,共收集5次流出液,每收集1次迅速精确称定供试液小瓶和收集液的小瓶质量。收集结束后,将大鼠处死,剪下所灌流的肠段,测量其长度(l)和内径(r)。将收集液分别取1.0 mL置于瓶中,用无水乙醇按照一定比例超声10 min用以消解,在以10 000 r·min⁻¹的速度离心10 min后,取上清液用紫外分光光度法测定在线性范围内的叶黄素A,从而计算得到质量浓度C。

各肠段区间划分如下:十二指肠段自幽门1 cm处开始;空肠段自幽门15 cm处开始;回肠段自盲肠

上行20 cm处开始;小肠自幽门1 cm处开始至盲肠前端结束;结肠段从盲肠后端开始,各取10 cm结扎。

采用重量分析法校正因肠道吸收水分导致灌流液体积的变化,按以下2个公式分别计算药物吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out} Q_{out}}{C_{in} Q_{in}}\right) \frac{Q}{V} - Q \ln\left(\frac{C_{out} Q_{out}}{C_{in} Q_{in}}\right)$$

$$P_{app} = \frac{Q}{2\pi r l}$$

式中Q_{in}和Q_{out}分别为肠道进出口灌流液的体积(mL);C_{in}和C_{out}分别为肠道进出口供试液的质量浓度(mg·L⁻¹);l和r分别为被灌流肠段的长度(cm)和内径(cm);Q为灌流速度(0.25 mL·min⁻¹);V为灌流肠段的体积;K_a和P_{app}为最后5个时间段(45~105 min)样品的平均值。

大鼠肠道各区段吸收情况考察 以20 mg·L⁻¹叶黄素微囊供试液对大鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠吸收特性进行考察,灌流速度为0.25 mL·min⁻¹。按照2.2.1项下的方法进行操作,计算两肠段的K_a值和P_{app}值。结果见表1。

表1 叶黄素微囊在大鼠不同肠段的K_a和P_{app}值(̄x±s,n=5)

肠段	P _{app} × 10 ⁻² / cm·min ⁻¹	K _a × 10 ⁻² / min ⁻¹
十二指肠	4.841 8 ± 0.395 0	2.472 1 ± 0.369 6
空肠	5.091 8 ± 0.377 7	2.507 1 ± 0.324 2
回肠	5.931 3 ± 0.301 7	2.875 4 ± 0.307 6
结肠	4.039 7 ± 0.330 4	2.013 8 ± 0.073 6

由表1结果可知叶黄素微囊在各肠段的K_a,P_{app}值是回肠>空肠>十二指肠>结肠,经软件SPSS 17.0中ANOVA分析,各肠段的K_a,P_{app}值无显著性差异,表明叶黄素微囊在大鼠整个肠段均有吸收。

不同质量浓度药物吸收情况考察 分别采用10.0,20.0,40.0 mg·L⁻¹叶黄素供试液进行大鼠在体肠灌流模型吸收机制考察,灌流速度为0.25 mL·min⁻¹。按照2.2.1项下的方法进行操作,计算肠段的K_a值和P_{app}值。结果见表2。

表2 不同浓度叶黄素微囊在大鼠肠段的K_a和P_{app}值(̄x±s,n=5)

叶黄素/mg·L ⁻¹	P _{app} × 10 ⁻² / cm·min ⁻¹	K _a × 10 ⁻² / min ⁻¹
10.0	4.984 2 ± 0.322 3	2.491 7 ± 0.301 1
20.0	5.091 8 ± 0.377 7	2.507 1 ± 0.324 2
40.0	5.115 2 ± 0.356 1	2.510 4 ± 0.315 8

由表 2 结果可知:不同质量浓度叶黄素微囊在大鼠空肠的 K_a , P_{app} 值基本不变,且经软件 SPSS 17.0 中 ANOVA 分析各肠段的 K_a , P_{app} 值无显著性差异,表明叶黄素微囊在小肠的吸收机制为被动扩散。

2.4 叶黄素微囊供试液肠壁物理吸附试验 剪取清洗后的大鼠实验肠段约 10 cm,用玻璃棒将黏膜层翻出,洗净,置于 25 mL 一定质量浓度的叶黄素供试液中,于 37 °C 孵育 2 h,取出肠段,测定孵育液中剩余叶黄素的质量浓度,为供试液质量浓度的 $(101.0 \pm 0.45)\%$ ($n=3$),由此可见,肠壁对叶黄素微囊无物理吸附。

3 讨论

中药新制剂口服吸收特性是中药新制剂剂型研究的重要内容。本实验吸收机制的研究结果表明,在吸收面积不变时,随着浓度增加,药物质量浓度在大鼠小肠的 K_a 和 P_{app} 无显著性差异,符合 Fick's 扩散定律,表明叶黄素微囊主要以被动扩散的方式吸收,表现出一级动力学过程。叶黄素微囊在整个肠段均有吸收,无特异吸收部位。研究结果为叶黄素微囊口服给药新制剂的研究提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Frederick Khnahik, Paul S Bernstein, Donita L Garland.

Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997,38:1802.

- [2] Handelman G J, Dratz E A, Reay C C, et al. Carotenoids in the human macula and whole retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988, 29: 850.
- [3] Baun O, Vinding T, Krogh E. Natural course in fellow eyes of patients with unilateral age related exudative maculopathy. A fluorescein angiographic 4 year follow up of 45 patients [J]. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993, 71(3): 398.
- [4] Krinsky N I, Landrum J T, Bone R A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye [J]. Annu Rev Nutr, 2003, 23: 171.
- [5] 李腾霞. 微囊的制备及研究进展[J]. 广州医药, 2010,40(6):18.
- [6] 王会娟,袁泉,刘艳. 番茄红素微囊的制备及稳定性考察[J]. 中国新药杂志, 2004,13(5):411.
- [7] 黄怀鹏,刘霞. 积雪草苷大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中草药,2008,39(7):102.
- [8] 吴雅娜,立标. 独活有效成分大鼠在体单向灌流肠吸收[J]. 药学学报,2008,43(1):102.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,304 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发售,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjzz.com。