

银杏叶鼻用原位凝胶的制备及体外吸收研究

崔海珍¹, 刘福强², 王艳萍², 赵楠², 李子严² (1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000 2. 解放军第 208 医院, 吉林 长春 130062)

[摘要] 目的 制备银杏叶鼻用原位凝胶剂, 并考察促渗剂对银杏叶透黏膜吸收作用。方法 以卡波姆 934 HPMC 为凝胶基质制备 pH 敏感型鼻用原位凝胶剂, 对粘度、粘附性及药物离体透黏膜吸收进行研究。结果 0.8% 卡波姆 934 和 1.5% HPMC 可制备原位凝胶。3 种促渗剂黏膜渗透速率为: 1% 氮酮 > 1% 吐温 > 0.5% 冰片。随氮酮浓度的增大, 药物黏膜吸收逐渐增加, 吸收过程符合 Weibull 动力学方程。结论 本银杏叶鼻用原位凝胶剂制备工艺可行, 氮酮能有效地促进银杏叶的鼻腔吸收。

[关键词] 银杏叶提取物; 鼻用原位凝胶; 吸收促进剂

[中图分类号] R 283 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)02-0118-04

Studies of preparation and *in vitro* absorption of ginkgo biloba leaf *in-situ* nasal gel

CUI Hai zhen¹, LIU Fu-qiang², WANG Yan-ping², ZHAO Nan², LI Zi-yan² (1. College of pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China 2. 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

[Abstract] **Objective** To preparation of ginkgo biloba leaf *in-situ* nasal gel and exp bation of the effect of sorbefacients on nasal mucosa absorption. **Methods** Carbopol 934 and HPMC were used as gel matrix to prepare pH sensitive *in-situ* ginkgo biloba leaf nasal gel, whose viscosity, adhesion, and *in vitro* nasal mucosa absorption were studied. **Results** The *in-situ* ginkgo biloba leaf gel can be best prepared with 0.8% of Carbopol 934 and 1.5% of HPMC as gel matrix. Three sorbefacients were studied. The sequence of their permeation rate were 1% of Azone > 1% of Tween-80 > 0.5% of Bomeol. The drug absorption rate increases as the Azone concentration increases, the its absorption process fits Weibull equation. **Conclusion** The preparation technology of *in-situ* ginkgo biloba leaf nasal gel is viable. And Azone is the most effective sorbefacient for nasal mucosa absorption.

[Key words] ginkgo biloba leaf extract; *in-situ* nasal gel; sorbefacients

银杏叶提取物 (ginkgo biloba leaf extract, GBE), 是从银杏科植物银杏叶中提取的有效成分, 主要含有 24% 黄酮苷类和 6% 萜内酯类^[1]。其药理作用主要有抗氧化、抗自由基、改善心脑血管系统及外周循环、拮抗血小板活化因子和神经保护作用。目前临床上主要用于治疗心、脑血管疾病、增加动脉血流量及对老年痴呆预防性治疗。但由于血-脑屏障的存在, 常规给药途径脑内药物浓度普遍较低, 限制了脑部疾病的治疗。而鼻腔给药后药物分子可滞留于嗅部黏膜而吸收进入脑部, 因而绕过血-脑屏障, 起到治疗作用^[2]。因此, 根据鼻腔的生理特点, 以卡波姆 934、HPMC 为凝胶基质, 制备 pH 敏感型原位凝胶剂, 并考察促进剂对银杏叶透黏膜吸收的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-10AVT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SPD-10AV 紫外检测器 (日本岛津公司); N2000 双道色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所); 电磁搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); NDJ-1 型旋转式粘度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 槲皮素 (批号: 100081-200406)、山柰素 (批号: 110861-200808)、异鼠李素 (批号: 110860-200608) 均由中国药品生物制品检定所提供; 银杏叶提取物 (GBE, 西安瑞芬生物工程有限公司); 卡波姆 934 (BF Goodrich); HPMC (上海化学试剂公司, 型号: RT50); 羟丙基-β-环糊精 (HP-β-CD, 西安德立生物化工有限公司); 甲醇 (色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 银杏叶黄酮的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent C₁₈ 柱 (250 mm

[作者简介] 崔海珍 (1983-), 女, 硕士研究生, Tel: (0431) 86988187, 13604436278, E-mail: haizhen@163.com

× 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸溶液 (50 : 50 v/v); 流速: 0.8 ml/min; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取经 P₂O₅ 干燥过的的槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 分别含 0.03、0.03、0.02 mg 的溶液, 作为黄酮对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取银杏提取物 50 mg 置于 250 ml 圆底烧瓶中, 加入甲醇-2% 盐酸 (4 : 1) 混合溶液 35 ml 摇匀溶解, 放入 90 °C 恒温水浴槽内回流提取, 1h 后取下放至室温, 转移至 50 ml 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 超声摇匀。提取液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 所得滤液供 HPLC 分析。

2.1.4 总黄酮计算公式^[3] 总黄酮含量 = (槲皮素含量 + 山柰素含量 + 异鼠李素含量) × 2.51。

2.1.5 标准曲线制备 分别精密吸取黄酮贮备液 2.4、6、8、10 ml 稀释至 10 ml 按“2.1.1”项下色谱条件进样 20 μl 测定。以槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程。结果表明: 槲皮素、山柰素和异鼠李素线性范围分别为 9.6~32.9、6~32.6、3~21 μg/ml 回归方程分别为 $Y = 52.472.1X - 41.473.4 (r = 0.9999)$ 、 $Y = 56.955.8X - 106.838 (r = 0.9994)$ 、 $Y = 57.985.9X - 47.768.9 (r = 0.9998)$ 。

2.2 银杏叶鼻用原位凝胶的制备

2.2.1 基质优选

2.2.1.1 人工鼻液的配制 精密称取磷酸二氢钾 13.6 g 加去离子水 1 L 溶解, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 6.8^[4]。

2.2.1.2 原位凝胶基质的选择方法 配制浓度为 0.5%、0.8%、1% 的卡波姆溶液, 分别加入不同浓度 (1.5%、2%、3%) 的 HPMC 调节凝胶强度, 此混合液再按 1 : 1 (v/v) 与人工鼻液反应, 用数字旋转粘度计分别测定 pH 4.3 和 pH 5.3 时的粘度 (2005 版《中国药典》二部附录 VIG 第二法)。

2.2.1.3 粘附性试验 取洁净的 20 cm × 5 cm 玻璃板, 将凝胶基质 (2.2.1.2 所得) 1 滴滴于玻璃板一端 (距边缘 2 cm), 将玻璃板与水平面成 45° 角放置, 2 min 后测量高分子材料流动的距离, 以此作为评价材料粘附性的指标。评判标准为: 大于 0.2 cm, 差; 0.1~0.2 cm, 较差; 低于 0.1 cm, 好。粘度和粘附性见表 1。

表 1 结果, 当粘度 < 500 mpa·s (pH 4.3) 时, 易成滴落下; 粘度 > 3 000 mpa·s (pH 5.3) 时, 粘度增

大, 可滞留于鼻腔。因此, 我们选择处方 2 流动性和粘度均能满足滴鼻剂的要求。

表 1 凝胶基质 (卡波姆 934+HPMC) 不同含量配方的粘度和粘附性试验结果比较

处方号	含量 (%)	pH 4.3 (mpa·s)	pH 5.3 (mpa·s)	粘附力
1	0.5 : 1.5	317.0 ± 3.6	732.5	差
2	0.8 : 1.5	305.3 ± 4.0	3 160.0 ± 20.0	较差
3	1.0 : 1.5	1 211.0 ± 10.1	3 746.7 ± 2.9	较差
4	0.5 : 2.0	524.3 ± 1.1	1 523.3 ± 2.9	差
5	0.8 : 2.0	629.3 ± 3.9	2 520.0	较差
6	1.0 : 2.0	2 380.0	5 300.0	好
7	0.5 : 3.0	809.7 ± 2.5	1 683.3 ± 10.4	差
8	0.8 : 3.0	1 168.0	3 620.0 ± 20.0	较差
9	1.0 : 3.0	3 836.7 ± 5.8	6 250.0	好

2.2.2 HP-β-CD 对银杏叶提取物增溶试验 由于 GBE 的主要活性成分在水中溶解度小, 不利于吸收, 故需要加入增溶剂。

2.2.2.1 相溶解度试验 配制 0%、5%、10%、20%、30%、40% 的 HP-β-CD 溶液。分别取上述溶液 10 ml 置具塞试管中, 加入 GBE 使其达到过饱和, 于 (25 ± 1) °C 恒温水浴中振荡 48 h 至建立溶解平衡。所得混悬液静置, 上清液按“2.1.1”项下处理, HPLC 进样分析, 计算总黄酮浓度。

以 HP-β-CD 浓度为横坐标, 总黄酮浓度 (mg/ml) 为纵坐标, 绘制平衡相溶解度图, 结果见图 1。对增溶曲线部分回归, 得到溶解度曲线, $Y = 0.5875X + 1.7550 (r = 0.9628)$ 。根据公式: $K_c = \text{斜率} / \text{截距} (1 - \text{斜率})$, 计算包合物的表观稳定常数 $K_c = 0.1381 \text{ mg/ml}$ 。

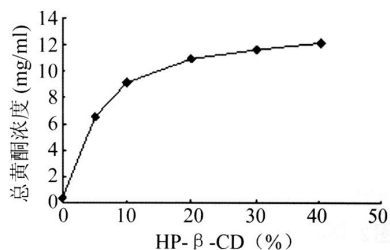


图 1 银杏叶总黄酮在 HP-β-CD 中的相溶解度图

2.2.2.2 HP-β-CD 的增溶效应 运用相溶解度法测定 HP-β-CD 对 GBE 增溶效应, 结果见表 2。随着 HP-β-CD 的比例增大, 对银杏叶的增容作用增大, 但比例为 30%~40% 时, 增容作用趋于恒定。考虑 HP-β-CD 对鼻黏膜的毒性, 因此选择 30% HP-β-CD。

表 2 HP-β-CD 的增溶效应

HP-β-CD(%)	0	5	10	20	30	40
s	1.49	26.12	36.72	43.56	46.64	48.64
s/s ₀	1	17.48	24.58	29.16	31.22	32.56

注: s为银杏叶提取物在 HP-β-CD 中的浓度; s₀ 为银杏叶提取物在水中的饱和溶解度; s/s₀ 为增溶倍数

2.2.3 制备工艺 室温下取银杏叶提取物 4.5 g 加入已用蒸馏水溶解的 HP-β-CD 溶液, 不断搅拌溶解, 加入处方剂量的防腐剂 (苯甲醇), 抗氧化剂 (维生素 C), 促进剂, 搅拌使溶解, 加入 1.5 g HPMC, 使之水化溶胀, 再将 0.8 g 卡波姆 934 溶解其中搅拌约 24 h 使之充分溶胀。用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 4.3。

2.3 银杏叶原位凝胶对离体透膜吸收试验 将宰杀 2 h 内的绵羊鼻部取下, 切开鼻腔, 暴露出鼻中隔及两侧鼻甲骨, 用一圆头细玻璃棒及镊子将覆盖其上的鼻腔黏膜小心剥离, 用生理盐水洗净黏膜上残留的血迹, 再将其平铺在铝箔上冷冻储藏备用。

渗透实验采用 Franz 扩散池, 温度 (32 ± 0.2) °C, 搅拌速度 200 r/min, 供给室与接收池容积均为 7 ml, 扩散面积 0.97 cm²。供给室中加入人工鼻液 50 μl, 银杏叶原位凝胶 200 μl (相当于银杏叶提取物 9 mg), 使其均匀覆盖于黏膜表面, 接收池中加入生理盐水, 分别于 15、30、45、60、90、120、180、240、300、360 min 从接收池中取样 1 ml 立即补加等量新鲜生理盐水。样品用微孔滤膜过滤, 续滤液于 4°C 冰箱贮存, 备用。以 HPLC 法测定接收池中总黄酮浓度, 计算累积吸收百分率。本试验考察不加促进剂、加 1% 氮酮、1% 吐温-80、0.5% 冰片 (3 个常用浓度) 的累积吸收率; 分别加不同浓度氮酮的累积吸收率。结果见图 2 及图 3。

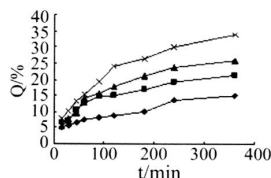


图 2 不同促进剂对银杏叶总黄酮的吸收影响

○ 不加促进剂 □ 0.5% 冰片 ▲ 1% 吐温-80 ◆ 1% 氮酮

结果表明: GBE 可以通过鼻腔黏膜吸收, 但总体吸收速度较慢。因此, 为了提高 GBE 吸收速度和吸收量, 有必要加入吸收促进剂。从图 2 及图 3 可看出, 不同吸收促进剂对透过羊鼻黏膜吸收促进作用为: 1% 氮酮 > 1% 吐温 > 0.5% 冰片。因此, 氮酮促进吸收作用最大。而后我们分别选择 0.1%、0.5%、1%、1.5%、2% 氮酮考察吸收促进作用, 随氮

酮浓度的增大, 促吸收作用增大。

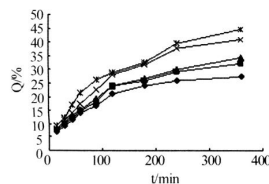


图 3 不同浓度酮对银杏叶总黄酮的吸收影响

○ 0.1% 氮酮 □ 0.5% 氮酮 ▲ 1% 氮酮 ◆ 1.5% 氮酮 ◇ 2% 氮酮

2.4 释药机制研究 对数据分别按零级释放、单指数模型、对数正态分布及 Higuchi 分布模型拟合, 按 r 值最大原则来判断各模型的拟合优劣, 结果见表 3。结果显示, 对银杏叶鼻用原位凝胶剂中药物吸收数据进行方程拟合后, 比较各方程拟合的优劣, 药物的吸收动力学特性与 Weibull 分布模型拟合最佳。

表 3 银杏叶原位凝胶体外吸收拟合

拟合方式	方程式	r	ACC
Zero order	$Q = 0.129955 + 0.000994t$	0.9522	-36.9121
First order	$\lg(Q_{\infty} - Q) = 0.05633 - 0.00061t$	0.9709	-40.4158
Weibull	$\ln[1/(1-Q)] = 0.584584 \ln t - 3.91668$	0.9938	-54.5597
Ritger-Pappas	$\lg Q = 0.510413 \lg t - 1.62293$	0.9909	-48.8075
Higuchi	$Q = 0.012115 + 0.023808t^{1/2}$	0.9906	-51.4229

3 讨论

3.1 银杏叶提取物水溶性小, 不利于吸收, 故应提高其溶解度。 由相溶解度试验可知, 随着 HP-β-CD 的浓度增大银杏叶提取物溶解度增大, 当 HP-β-CD 浓度为 21.74×10^{-2} mol/L 时, 银杏叶提取物的溶解度为固有溶解度的 31.22 倍, 说明银杏叶提取物与 HP-β-CD 形成包合物后, 有效地提高了其在水中的溶解度。

3.2 pH 敏感型原位凝胶是根据体液具有一定的缓冲作用, 能够通过改变聚合物周围环境的 pH 值而诱发胶凝变态。 即原位凝胶制剂制备时控制 pH 4.3 为液态, 当滴入鼻腔后, 由于 pH 升高 (药物在鼻腔中 pH 上升到 5.3 以上), 呈半固体状态, 而滞留于给药部位 (鼻腔内)。本研究选用卡波姆 934 制备 pH 敏感型原位凝胶, 当单独使用卡波姆时不易被调节, 因此加入 HPMC 作为增粘剂调节凝胶强度。

3.3 本研究采用离体羊鼻黏膜吸收实验的方法考察银杏叶原位凝胶的吸收, 发现吸收很少, 但吸收促进剂可改善药物吸收, 结果显示氮酮是一种良好的吸收促进剂, 随着用量的增加, 药物的吸收速率增加。促进剂增加膜渗透性机制是能影响脂质的排列顺序, 引起斜方晶系向液相系转换, 促使极相分离导

致暂时打开细胞间的紧密结合^[5]。

【参考文献】

- [1] 常新全, 丁丽霞. 中药活性成分分析手册 [M]. 北京: 学苑出版社, 2006 1961.
- [2] 王 峰, 蒋新国. 鼻黏膜作为脑内递药途径的研究进展 [J]. 药 学 学 报, 2001, 36(8): 636.
- [3] 中国药典 2005 年版 [S]. 一部. 2005: 220

(上接第 106 页)

离得到了 5 个原小檗碱型生物碱 (化合物 1~5), 并对这 5 个化合物进行细胞毒活性研究, 结果显示这 5 个生物碱均具有一定的细胞毒活性。这个结果也证实了民间应用小叶锦鸡儿进行抗癌治疗的这一传统功效。

总生物碱以及这 5 种生物碱单体, 在较低浓度下即可抑制肿瘤细胞的生长, 提示其细胞毒活性可能较强。其中化合物 5(刻叶紫堇明碱)对 Saos-2 和 A375 细胞株表现出很强的细胞毒活性, 总生物碱对 HeLa 细胞株的细胞毒作用最强。5 个生物碱单体细胞毒活性的差异与它们的分子结构直接相关。其母环结构上的 7 位 (见表 1) 的 N^+ 是细胞毒作用的关键结构。另外, A、B、C、D 环上的取代基的不同对其细胞毒活性有一定的影响^[11]。其中 A、D 环氧化程度越高, 可能其细胞毒活性越强。另外 C-13 位上的取代基不同对于化合物的活性也有不同的影响^[12]。化合物 5(刻叶紫堇明碱)与化合物 2(黄连碱)的氧化程度相同, 但其在 B 环上有一个甲基, 因此它对 Saos-2 和 A375 抑制作用最强。另有报道原小檗碱含量丰富的草本植物能合成 MDR (多药耐受) 外排泵抑制剂 5-甲氧基氢诺卡啶, 可以抑制金葡菌 MDR 外排泵排出小檗碱^[13]。还有报道提到小檗碱或其类似物能诱发多重耐药转运物在癌细胞中的表达, 可以影响某些化合物的摄入和排出^[14]。这些研究结果表明, 小檗碱及类似物能与其他分子相互作用, 影响细胞对于物质摄入或排出, 这也许解释了总生物碱对 HeLa 细胞表现出最强的抗癌作用。

小叶锦鸡儿在我国西、北部分布广泛, 属多年生灌木, 生长于贫瘠的沙化地, 为传统的防风固沙植物, 其能增强土壤的储水能力, 增加土壤有机 C 和 N 的积累, 降低土壤碱性, 因此, 对当地环境保护有重要意义。虽然它的根和种子都可入药, 但当地居民主要使用其根入药。但如果对于该植物过度利用, 其资源将会逐渐减少甚至趋于灭绝, 对当地环境会产生严重影响。为此, 我们对小叶锦鸡儿的种子进行了研究, 首次报道了从小叶锦鸡儿的种子中提取

- [4] Washington N, Steele RJC, Jackson SJ *et al* Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers [J]. *Int J Pharm*, 2000 198(2): 139.

- [5] Pilgram GSK, Engelsmarvan Pelt AM, Koerten HK, *et al* The effect of tozone on the lateral lipid organization of human stratum corneum and its permeability [J]. *Pharm Res* 2000 17: 796

[收稿日期] 2009-12-29

[修回日期] 2010-02-10

生物碱。研究结果, 其种子同样具有抗癌活性, 这对于保护小叶锦鸡儿资源具有重要的现实意义。

【参考文献】

- [1] 内蒙古革命委员会卫生局. 内蒙古中草药 [M]. 内蒙古: 内蒙古人民出版社, 1972 418.
- [2] 江苏医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1985 392.
- [3] Jin GZ, Li JD, Ahn BZ. Isoflavones from the root of *Caragana microphylla* Lam [J]. *Yakuhok Hochoji* 1992, 36(5): 481
- [4] 刘红霞, 林文翰, 杨峻山. 锦鸡儿属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(5): 327.
- [5] Bhakuni DS, Chauarvedi R. The alkaloids of *Corydalis mefolia* [J]. *Journal of Natural products* 1983, 46(4): 466.
- [6] Tong SQ, Yan JZ, Lou JZ. Preparative Isolation and Purification of Alkaloids from *Corydalis yanhusuo* WT Wang by High Speed Counter-Current Chromatography [J]. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 2005 28(18): 2979.
- [7] Ikuta A, Itokawa H. Alkaloids of tissue cultures of *Nandina domestica* [J]. *Phytochemistry* 1988, 27(7): 2143.
- [8] Slavik J, Slavkova L. Alkaloids of the Papaveraceae LXV II Alkaloids from *Corydalis cava* (L.) Schw [J]. *et Koerte Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1979 44(7): 2261
- [9] 王恒山, 杨海荣. 透裂黄堇生物碱的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 1997, 9(1): 37.
- [10] 朴惠顺, 金光洙, 张善玉. 小叶锦鸡儿对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用 [J]. *延边大学医学学报*, 2004 27(1): 16.
- [11] Sanders MM, Liu AA, Li TK, *et al* Selective cytotoxicity of topoisomerase-directed protoberberines against glioblastoma cells [J]. *Biochemical Pharmacology* 1998, 56: 1157.
- [12] Kinuko I, Yumi N, Mamoyo I *et al* Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antitumor activity [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 34 1077.
- [13] Frank R, Sternitz PL, Jeanne N, *et al* Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxyhydrocarpin—a multidrug pump inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97(4): 1433.
- [14] Lin HL, Liu TY, Wu CW. Berberine modulates expression of mdrl gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel [J]. *Br J Cancer* 1999, 81(3): 416.

[收稿日期] 2009-10-21

[修回日期] 2010-02-19