

玳玳黄酮自微乳化微丸在大鼠小肠的吸收特性和机制研究

吴晓青, 陈丹*, 程清, 任瑞琴, 黄庆德, 郑利
福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108

摘要: **目的** 考察玳玳黄酮自微乳化微丸在大鼠小肠的吸收特性和促吸收效果, 探讨玳玳黄酮自微乳化微丸的吸收部位及吸收机制。 **方法** 采用大鼠离体外翻肠囊模型, 以柚皮苷和新橙皮苷作为玳玳黄酮自微乳化微丸的特征成分, 高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 技术检测在相同给药质量浓度下大鼠十二指肠、空肠、回肠及不同给药质量浓度下空肠肠囊内的药物浓度; 并比较相同质量浓度玳玳黄酮自微乳化微丸与玳玳黄酮有效部位提取物的吸收效果。 **结果** 玳玳黄酮自微乳化微丸中柚皮苷和新橙皮苷在不同肠段中 90 min 的累积吸收量按十二指肠、空肠、回肠依次下降, 但吸收差异很小, 即十二指肠至回肠均是玳玳黄酮的有效吸收部位。玳玳黄酮自微乳化微丸质量浓度分别为 3.6、7.2、12.0 mg/mL 时, 在空肠段的吸收随时间的增加而增加, 表现出一级吸收动力学过程; 柚皮苷和新橙皮苷的吸收速率常数 (K_a) 均随药液质量浓度的增加而增加 ($P < 0.05$), 表明其为被动吸收; 在相同给药剂量下, 柚皮苷和新橙皮苷在大鼠空肠 90 min 的累积吸收量是玳玳黄酮有效部位提取物的 1.3 倍。 **结论** 大鼠小肠上中段是玳玳黄酮自微乳化微丸的最佳吸收部位; 其吸收呈一级动力学过程, 吸收机制可能为被动扩散; 与玳玳黄酮有效部位提取物比较, 玳玳黄酮自微乳化微丸可显著改善柚皮苷和新橙皮苷的肠吸收。

关键词: 玳玳黄酮; 自微乳化微丸; 肠吸收; 外翻肠囊模型; 新橙皮苷; 柚皮苷; HPLC-MS

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)11-2222-05

Absorptive characteristic and mechanism of Self-microemulsifying Pellets of Daidai Flavones in small intestines of rats

WU Xiao-qing, CHEN Dan, CHENG Qing, REN Rui-qin, HUANG Qing-de, ZHENG Li
Pharmacy College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Abstract: Objective To study the intestine absorptive characteristic and absorption efficiency of Self-microemulsifying Pellets of Daidai (*Citrus aurantium* var. *daidai*) Flavones (SMPDF) in rats and to investigate the absorption sites and absorption mechanism of SMPDF. **Methods** The isolated everted gut sac model was used, naringin and neohesperidin were chosen as representative compositions, the drug concentration in duodenum, jejunum, and ileum of rats with the same administration dosage, and that in jejunum with the different administration dosages were determined by high performance liquid chromatography with mass (HPLC-MS) detector. The absorption efficiencies of SMPDF and the active fraction extraction of Daidai flavones were compared. **Results** In duodenum, jejunum, and ileum of rats, the absorption of naringin and neohesperidin declined in 90 min in turn, but there was no significant difference among them. So duodenum, jejunum, and ileum were all effective absorption sites of Daidai flavones. The absorption in jejunum was increased with time increasing at SMPDF doses of 3.6, 7.2, and 12.0 mg/mL, which was consistent with the first order rate process. The K_a values of naringin and neohesperidin increased along with the increasing dosage of SMPDF ($P < 0.05$), which indicated they were the passive absorption. In the same administration dosage, the accumulative absorption amount of naringin and neohesperidin in SMPDF at 90 min was 1.3-fold as that in the extraction of Daidai flavones. **Conclusion** The duodenum, jejunum, and ileum of rats are all effective absorption sites of SMPDF. In the test dosage, the absorption of naringin and neohesperidin in the jejunum intestine conforms to the first order rate process and shows the passive absorption. The intestinal absorption of naringin and neohesperidin could be significantly improved by SMPDF comparing with the extraction in effective fraction of Daidai flavones.

Key words: Daidai (*Citrus aurantium* L. var. *daidai* Tanaka) flavones; self-microemulsifying pellets; intestine absorption; everted gut sac model; neohesperidin; naringin; HPLC-MS

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2010Y0030); 福建省科技计划项目 (2010Y2004); 福建省自然科学基金资助项目 (2010J01189, 2012J01386)

作者简介: 吴晓青 (1987—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为药物制剂与质量分析评价研究。

*通讯作者 陈丹 Tel: (0591)22861009 E-mail: gscd@tom.com

玳玳 *Citrus aurantium* L. var. *daidai* Tanaka, 又称代代, 是芸香科柑橘属植物, 为酸橙的变种, 在我国福建、四川、浙江等地均有栽培。玳玳黄酮是从玳玳果实中提取的总黄酮部位, 总黄酮质量分数 > 70%, 主要含柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷等二氢黄酮, 其中以柚皮苷和新橙皮苷的量最高。研究表明, 玳玳黄酮具有良好的抗氧化和调血脂作用, 但其仅微溶于水, 口服生物利用度较低^[1-4]。自微乳给药系统 (SMEDDS) 是由油相、非离子表面活性剂和助乳化剂形成的各向同性、均一透明并包含药物的混合溶液, 在环境温度 (通常为 37 °C) 和胃肠蠕动的作用下, 自发乳化形成粒径小于 100 nm 的微乳^[5], 具有在胃肠道均匀、快速分布, 增加溶出度和渗透率, 提高生物利用度等特点^[6]。中药自微乳给药系统的研究已有较多报道, 如淫羊藿苷元^[7]、银杏叶总黄酮^[8]等。本实验采用离体外翻肠囊模型, 考察玳玳黄酮自微乳微丸 (SMPDF) 的大鼠肠吸收部位、吸收机制以及促吸收效果, 为该制剂的研发提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

玳玳果由福建恒馨天然香料有限公司提供, 经福建中医药大学中药鉴定教研室范世明高级实验师鉴定为 *Citrus aurantium* L. var. *daidai* Tanaka 的果实; 玳玳黄酮有效部位提取物 (简称玳玳黄酮提取物), 自制, 总黄酮质量分数 76%; 玳玳黄酮自微乳微丸, 自制, 每克含总黄酮以新橙皮苷计不得少于 40.2 mg。柚皮苷对照品 (批号 110722-200610)、新橙皮苷对照品 (批号 111857-201001), 均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈为色谱纯。Kreb-Ringer's 营养液 (g/L): NaCl 7.8、KCl 0.35、CaCl₂ 0.37、NaHCO₃ 1.37、NaH₂PO₄ 0.32、MgCl₂·6H₂O 0.043、D-葡萄糖 1.4, pH 7.4。

1.2 仪器

Waters HPLC TQD 高效液相色谱三重四级杆质谱联用仪, 配有四元高压泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、TQD 检测器 (三重四级杆、ESI 电离源)、Masslynx 4.0 工作站控制系统, 美国 Waters 公司; AR2140 万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; DKZ 系列电热恒温振荡水槽, 上海一恒科学仪器有限公司; Milli-Q 纯水器, 美国。恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠, 体质量 (400±20) g, SPF 级, 雄性, 福建中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (沪) 2007-005。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 XTerra MS-C₁₈ 柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水 (19:81), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 质谱条件

毛细管电压 3 kV, 锥孔电压 50 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 200 °C, 脱溶剂气体体积流量 350 L/h, 锥孔气体体积流量 50 L/h。ESI 源, 负离子模式; 扫描方式为选择离子监测模式 (SIR); 检测离子 *m/z*: 柚皮苷 579.0、新橙皮苷 609.2。

2.3 药液的制备

2.3.1 空白自微乳微丸药液制备 精密称取缺玳玳黄酮的空白自微乳微丸约 1.20 g, 加入 Kreb-Ringer's 营养液 100 mL, 在 37 °C 下恒温磁力搅拌器温和搅拌 10 min, 即得。

2.3.2 玳玳黄酮自微乳微丸药液制备 精密称取玳玳黄酮自微乳微丸约 0.36、0.72、1.20 g, 分别加入 Kreb-Ringer's 营养液 100 mL, 在 37 °C 恒温下磁力搅拌器温和搅拌 10 min, 即得 3.6、7.2、12.0 mg/mL 的玳玳黄酮自微乳微丸药液。

2.3.3 玳玳黄酮提取物药液制备 精密称取玳玳黄酮提取物适量 (约相当于玳玳黄酮自微乳微丸 0.72 g), 加入 Kreb-Ringer's 营养液 100 mL, 在 37 °C 恒温下磁力搅拌器温和搅拌 10 min, 即得。

2.4 对照品溶液制备

精密称取柚皮苷对照品 5.08 mg、新橙皮苷对照品 6.97 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液适量, 用甲醇配成不同质量浓度的柚皮苷和新橙皮苷混合对照品溶液。

2.5 大鼠离体小肠吸收试验

试验前大鼠禁食不禁水过夜。4%乌拉坦 (2.0 mL/kg) ip 麻醉, 沿腹中线打开腹腔, 从十二指肠段自幽门 1 cm 处、空肠段离幽门 15 cm 处、回肠段距离盲肠上行 20 cm 处、结肠段从盲肠后段开始各取约 10 cm, 放入 37 °C 的 Kreb-Ringer's 营养液中, 用营养液冲洗小肠表面并清除浆膜层表面的肠系膜和脂肪组织。肠段翻转使黏膜层在外、浆膜层在内,

洗净内容物,用手术线结扎肠段一端,另一端固定在塑料管上。将肠囊分别置于含 100 mL 3 种药液的烧杯中,在恒温振荡水槽中 37 °C 保温。肠囊内注入 Krebs-Ringer's 营养液 1.5 mL,使肠囊内液体(受药体系)的液面高于肠囊外液体(供药体系)的液面,持续通入空气。分别于 15、30、45、60、90 min 从肠囊内取样 100 μ L,作为供试品溶液,待用,并立即补加 100 μ L 空白 Krebs-Ringer's 营养液。

2.6 供试品溶液处理与检测

精密吸取 100 μ L 供试品溶液,加入甲醇 300 μ L,涡旋混合 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μ L 进样分析。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 将在空白自微乳化的微丸溶液中培养 1.5 h 后的外翻肠囊内营养液(空白肠内液)、柚皮苷和新橙皮苷混合对照品溶液、玳玳黄酮自微乳化的微丸肠吸收液(与空白肠内液同样处理)分别进样 10 μ L,注入液质联用仪,测定,记录图谱。结果显示,空白肠内液的内源性成分对柚皮苷和新橙皮苷的检测无干扰,结果见图 1。

2.7.2 线性关系考察

精密吸取 Krebs-Ringer's 营养液(空白试验溶液) 100 μ L,分别加入不同质量浓度的柚皮苷和新

橙皮苷混合对照品溶液 100 μ L 和甲醇 200 μ L,混匀,得柚皮苷质量浓度分别为 0.050 8、0.254 0、0.508 0、1.016 0、2.032 0、3.048 0 μ g/mL,新橙皮苷质量浓度分别为 0.069 7、1.349 0、0.697 0、1.394 0、2.788 0、4.182 0 μ g/mL 的混合对照品系列溶液,取混合对照品系列溶液 10 μ L,分别注入液质联用仪,测定。以对照品质量浓度(μ g/mL)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行回归计算。得柚皮苷回归方程为 $Y=5.23 \times 10^4 X-1.98 \times 10^3$, $r=0.999 6$;新橙皮苷回归方程为 $Y=6.21 \times 10^4 X-3.14 \times 10^3$, $r=0.999 7$,表明柚皮苷、新橙皮苷质量浓度分别为 0.050 8~3.048 0 μ g/mL、0.069 7~4.182 0 μ g/mL 时线性关系良好。

2.7.3 精密度试验 按“2.4”项分别配制 3 个质量浓度的混合对照品溶液,使柚皮苷质量浓度分别为 0.152、0.508、2.032 μ g/mL,新橙皮苷质量浓度分别为 0.209、0.697、2.788 μ g/mL,每个质量浓度 5 份样品,于 1 日内连续进样,分别测定,按标准曲线法求得柚皮苷和新橙皮苷质量浓度,计算日内精密度,连续测定 3 d,计算日间精密度。结果低、中、高 3 个质量浓度样品中柚皮苷的日内精密度 RSD 分别为 1.17%、1.28%、1.71%,新橙皮苷的分别为 1.59%、1.05%、1.40%;柚皮苷日间精密度 RSD 分别为 1.39%、1.63%、1.89%,新橙皮苷的分别为 1.94%、1.70%、1.64%。

2.7.4 回收率试验 按“2.7.3”项下操作,计算,求得柚皮苷和新橙皮苷质量浓度,将实测浓度与理论浓度相比得方法回收率,3 个质量浓度水平的回收率柚皮苷分别为 96.39%、95.41%、100.8%,新橙皮苷分别为 100.4%、95.31%、101.6%,RSD 分别为 1.59%、1.05%、1.40%。

2.7.5 稳定性试验 取柚皮苷、新橙皮苷质量浓度分别为 1.016、1.394 μ g/mL 的混合对照品溶液 1 份,分别于 0、2、4、6、8、10 h 注入液质联用仪 10 μ L,测定,记录图谱,结果柚皮苷峰面积的 RSD 为 1.22%,新橙皮苷峰面积的 RSD 为 1.19%,表明柚皮苷和新橙皮苷在甲醇中 10 h 内保持稳定。

另取混合对照品储备液 1 mL,用 37 °C 的 Krebs-Ringer's 营养液配成柚皮苷质量浓度为 1.016 μ g/mL、新橙皮苷质量浓度为 1.394 μ g/mL 的混合对照品溶液,置 37 °C 水浴中,分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 取样,注入液质联用仪,测定,记录图谱,结果柚皮苷峰面积的 RSD 为 1.86%,新橙皮苷峰面

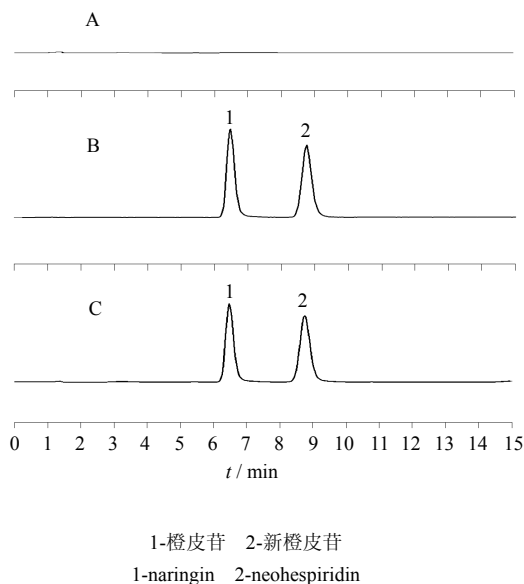


图 1 空白肠内液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和玳玳黄酮自微乳化的微丸肠吸收液 (C) 的质谱总离子流图

Fig. 1 MS total ion currents of blank intestinal solution (A), mixed reference substance solution (B), and SMPDF intestinal absorptive solution (C)

积的RSD为1.79%，表明6h内柚皮苷和新橙皮苷在Krebs-Ringer's营养液中稳定。

2.8 玳玳黄酮自微乳化微丸肠吸收部位考察

取7.2 mg/mL的玳玳黄酮自微乳化微丸药液，按“2.5、2.6”项下操作，重复3次，计算柚皮苷和新橙皮苷的累积吸收量(Q)^[9]。

$$Q = 1.5C_n + 0.1$$

C_n为n时间点的实际检测质量浓度

比较肠道不同部位对柚皮苷和新橙皮苷的吸收，结果90 min在十二指肠、空肠、回肠中柚皮苷的Q分别为(11.76±0.09)、(11.74±0.05)、(11.51±0.07) μg，新橙皮苷的Q分别为(12.84±0.06)、(12.78±0.07)、(12.55±0.10) μg，表明柚皮苷和新橙皮苷在肠道不同部位有相同的吸收趋势，均为十二指肠>空肠>回肠，但吸收差异很小，即十二指肠到回肠均为玳玳黄酮的有效吸收部位。

2.9 不同质量浓度的玳玳黄酮自微乳化微丸溶液对玳玳黄酮吸收的影响

分别取3.6、7.2、12.0 mg/mL的玳玳黄酮自微乳化微丸药液和大鼠空肠外翻肠囊，按照“2.5、2.6”

项下操作，试验各重复3次，绘制质量浓度-时间曲线。以肠囊内柚皮苷和新橙皮苷质量浓度的对数值(lnC)对取样时间(t)作线性回归，结果相关系数均大于0.9，符合一级吸收动力学过程。由斜率计算吸收速率常数(Ka)，柚皮苷低、中、高质量浓度的Ka分别为(0.0194±0.0005)、(0.0288±0.0003)、(0.0309±0.0006) min⁻¹，新橙皮苷的Ka分别为(0.0183±0.0004)、(0.0287±0.0001)、(0.0315±0.0007) min⁻¹。经方差分析和两两多重比较，柚皮苷和新橙皮苷在各肠段的Ka随玳玳黄酮自微乳化微丸质量浓度的增加而增加(P<0.05)，表明这2个化合物的吸收可能为被动吸收。结果见图2。

2.10 玳玳黄酮自微乳化微丸与玳玳黄酮提取物肠吸收比较

分别取7.2 mg/mL的玳玳黄酮自微乳化微丸药液、玳玳黄酮提取物药液和大鼠空肠外翻肠囊，按“2.5、2.6”项下操作，重复3次，绘制质量浓度-时间曲线，结果见图3。分别计算肠囊中柚皮苷和新橙皮苷90 min的Q，结果上述2种药液中柚皮苷Q分别为(11.74±0.05)、(8.79±0.07) μg，新橙皮苷的

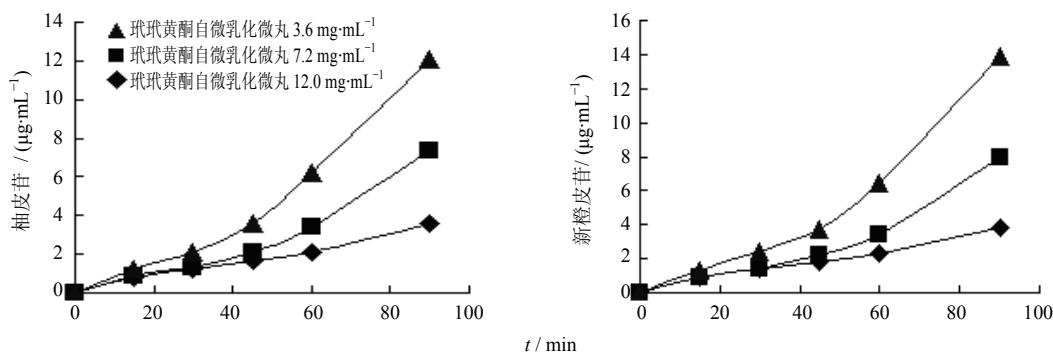


图2 不同质量浓度玳玳黄酮自微乳化微丸药液中柚皮苷和新橙皮苷在大鼠空肠的吸收曲线

Fig. 2 Jejenum absorption curves of naringin and neohesperidin in SMPDF with different dosages in rats

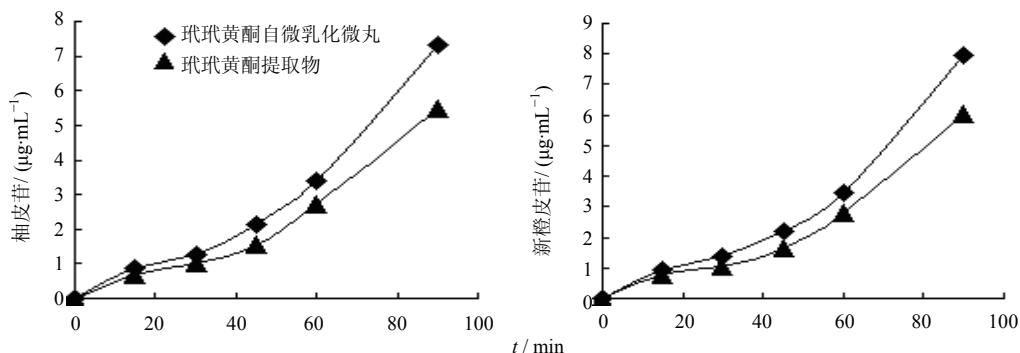


图3 玳玳黄酮自微乳化微丸和玳玳黄酮提取物中柚皮苷和新橙皮苷在大鼠空肠吸收的比较

Fig. 3 Comparison on jejunum absorption between naringin and neohesperidin in SMPDF and extract of Daidai flavones

Q 分别为 (12.78 ± 0.07) 、 (9.66 ± 0.06) μg 。在相同质量浓度下, 玳玳黄酮自微乳化微丸中柚皮苷和新橙皮苷的 Q 均是玳玳黄酮提取物中的 1.3 倍, 表明将玳玳黄酮提取物制成自微乳化微丸可显著提高柚皮苷和新橙皮苷的肠吸收。

3 讨论

自微乳化微丸是将自微乳化组分加入合适的固体赋形剂形成的粒径在 $0.5 \sim 2.5$ μm 的球形或类球形制剂^[10], 其保留了 SMEDDS 的基本特征, 即在环境温度 (通常指体温 37 $^{\circ}\text{C}$) 下, 在胃肠道的蠕动下自发形成 O/W 型微乳, 能够增加药物溶解度, 促进药物在胃肠道的吸收, 提高药物稳定性, 从而提高生物利用度^[11-14]。玳玳黄酮自微乳化微丸与玳玳黄酮提取物的肠吸收比较结果表明, 前者的肠吸收较后者有明显改善。玳玳黄酮自微乳化微丸促吸收效果可能是由于其在 37 $^{\circ}\text{C}$ 模拟胃肠蠕动时形成微乳, 微乳的表面张力较低易通过胃肠道的水化层, 药效成分直接和胃肠上皮细胞接触, 从而促进药效成分吸收等缘故。外翻肠囊法是一种简便、有效的研究药物肠吸收的方法, 具有实验周期短、实验条件易于实现、肠黏膜细胞可得到充足的氧供、肠囊内液体积小、药物经过小肠转运后在肠囊内浓集而易于检测等优点, 因此被广泛应用于口服药物的初步筛选和吸收特点的研究。本实验采用大鼠离体肠囊外翻模型, 考察玳玳黄酮自微乳化微丸在大鼠肠道不同部位的吸收情况, 结果在大鼠十二指肠、空肠和回肠药效成分的吸收依次下降, 但十二指肠与空肠的吸收无显著差异 ($P > 0.05$), 表明小肠上中段是玳玳黄酮自微乳化微丸的最佳吸收部位。玳玳黄酮自微乳化微丸中柚皮苷和新橙皮苷从肠囊黏膜面向浆膜面的转运随时间的增加而增加, 在 90 min 内未出现饱和现象, 符合一级吸收动力学过程, K_a 随给药质量浓度的增加而显著增大, 表明吸收机制可能为被动吸收。

本实验建立同时检测玳玳黄酮特征成分柚皮苷和新橙皮苷的 HPLC-MS 方法, 在选定的色谱、质谱条件下, 柚皮苷和新橙皮苷能够达到完全分离, 且无小肠内源物和其他成分的干扰, 表明该方法准确可靠、灵敏度高, 可作为评价玳玳黄酮自微乳化微丸吸收的方法, 也可为其他 SMEDDS 药物的体内代谢研究提供借鉴。

参考文献

[1] 陈丹, 林超, 刘永静, 等. 玳玳的研究进展 [J]. 福

建中医学院学报, 2008, 18(1): 61-63.

- [2] 陈丹, 刘永静, 黄剑钧, 等. 闽产玳玳果中化学成分的分 离分析 [J]. 福建中医学院学报, 2007, 17(1): 18-20.
- [3] 刘永静, 陈丹, 于丽丽, 等. 玳玳果及其总黄酮有效部位的 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1491-1495.
- [4] 邱红鑫, 陈丹, 刘永静, 等. 玳玳果黄酮滴丸对高脂血症大鼠的降血脂作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(7): 597-601.
- [5] Itoh K, Tozuka Y, Oguchi T, *et al.* Improvement of physicochemical properties of N-4472 Part I formulation design by using self-microemulsifying system [J]. *Int J Pharm*, 2002, 238: 153-160.
- [6] 张晓峰, 韦玮, 陆皞然, 等. 自微乳化释药系统 (SMEDDS) 的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 261-264.
- [7] 王晋艳, 陈彦, 张振海, 等. 淫羊藿苷元自微乳在 Caco-2 细胞模型的肠吸收特性初步研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 476-481.
- [8] 肖璐, 易涛, 刘颖, 等. 银杏叶总黄酮自微乳化口腔速溶膜的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1517-1522.
- [9] 董宇, 张英丰, 杨庆, 等. 戊己丸提取物不同配伍的肠外翻吸收研究 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1377-1382.
- [10] 梅兴国. 微载体药物递送系统 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009.
- [11] Abdalla A, Klein S, Mader K. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, *in vitro* digestion and incorporation into solid pellets [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35(5): 457-464.
- [12] Wang Z Y, Sun J, Wang Y J, *et al.* Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and *in vitro* / *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2010, 383(1/2): 1-6.
- [13] Setthacheewakul S, Mahattanadul S, Phadoongsombut N, *et al.* Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76: 475-485.
- [14] Sun M, Zhai X Z, Xue K, *et al.* Intestinal absorption and intestinal lymphatic transport of sirolimus from self-microemulsifying drug delivery systems assessed using the single-pass intestinal perfusion (SPIP) technique and a chylomicron flow blocking approach: Linear correlation with oral bioavailabilities in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43: 132-140.