

牛蒡子苷大鼠在体肠吸收动力学研究

李沉纹, 罗明和, 李卓恒, 于彩平, 管海燕, 卢来春*

第三军医大学大坪医院野战外科研究所 药剂科, 重庆 400042

摘要:目的 研究牛蒡子苷在大鼠小肠内的吸收动力学特征。方法 采用大鼠在体肠灌流方法建立牛蒡子苷大鼠肠吸收模型, 考察牛蒡子苷在大鼠小肠的吸收情况, 计算牛蒡子苷的吸收速率常数 (K_a)、吸收半衰期 ($t_{1/2}$)、单位时间吸收率 (P)、表观渗透系数 (P_{app})。结果 牛蒡子苷 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 在肠道吸收的 K_a 、 $t_{1/2}$ 、 P 、 P_{app} 值不随质量浓度的变化而变化, 基本保持恒定。结论 牛蒡子苷在大鼠体内的小肠吸收符合一级动力学过程, 吸收机制为被动转运。

关键词: 牛蒡子苷; 肠吸收; 动力学特性; 在体肠灌流; 被动转运

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0727-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.018

In vivo absorptive dynamics of arctiin in intestine of rats

LI Chen-wen, LUO Ming-he, LI Zhuo-heng, YU Cai-ping, GUAN Hai-yan, LU Lai-chun

Department of Pharmacy, Daping Hospital and the Research Institute of Surgery of the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: Objective To investigate the *in vivo* absorptive characteristic of arctiin in small intestine of rats. **Methods** The intestine absorption model of arctiin was established by *in vivo* intestinal perfusion method. The absorption rate constants (K_a), absorption half time ($t_{1/2}$), absorption percent of per unit of time (P), and apparent permeability coefficient (P_{app}) were calculated and compared to investigate the absorptive dynamics of arctiin in intestine of rats. **Results** At the concentration range of 10—50 $\mu\text{g/mL}$, K_a , $t_{1/2}$, P , and P_{app} showed no significant difference, and had no connection with concentration of arctiin. **Conclusion** Arctiin complies with the first-order absorptive kinetics and the absorptive mechanism in intestine may be passive transport.

Key words: arctiin; absorption in intestine; dynamic characteristic; *in vivo* intestinal perfusion; passive transport

牛蒡子苷 (arctiin) 是牛蒡子中的有效成分, 具有抗菌、抗肿瘤、降血糖等多种药理作用^[1-3]。然而目前临床上尚无以牛蒡子苷单体作为药物的制剂上市, 有关牛蒡子苷的肠吸收动力学研究也鲜见报道。本实验选用大鼠在体灌流的方法^[4]建立牛蒡子苷在体肠吸收模型, 采用 HPLC 法进行检测, 研究牛蒡子苷小肠吸收特性, 以期牛蒡子苷制剂的研发提供生物药剂学实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

牛蒡子苷, 本实验室提取, 质量分数 > 98%; 牛蒡子苷对照品, 质量分数为 94.6%, 批号 110819-201108, 购于中国食品药品检定研究院。酚红, 成

都市科龙化工试剂厂; 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂为分析纯。

1.2 仪器

Agilent Technologies 1200 series 高效液相系统, Agilent 公司; BS110S 型电子分析天平, Sartorius 公司; VG3S25 旋涡混合仪, 德国 IKA 公司; GS—15 冷冻离心机, Beckman 公司; BT101L 恒流泵, 保定雷弗流体科技有限公司; UV—VIS 8500 紫外/可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 (250±20) g, 第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 许可证号: SYXK (军) 2007-040。

收稿日期: 2012-05-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973908); 重庆市攻关项目 (2009AC5025); 中小企业创新基金 (HC26215113529)

作者简介: 李沉纹 (1986—), 女, 硕士, 药师, 研究方向为药物新剂型。Tel: (023)68757098 E-mail: lichenwen-lcw@163.com

*通信作者 卢来春 Tel: (023)68757098 E-mail: lulaicq@163.com

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 Krebs-Ringer (K-R) 溶液制备 称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、NaHCO₃ 1.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g、葡萄糖 1.4 g，加水定容至 1 000 mL，即得 (pH 7.4)。

2.1.2 空白肠循环液制备 精密称取酚红适量，用 K-R 溶液溶解并稀释成酚红质量浓度为 20 μg/mL 的溶液，即得。

2.1.3 供试品肠循环液制备 精密称定牛蒡子苷适量，用空白肠循环液溶解并稀释成含牛蒡子苷质量浓度分别为 10、20、50 μg/mL 的溶液，即得 (简称供试品溶液)。

2.2 酚红标准曲线的绘制及其测定

用 K-R 液配制质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60 μg/mL 的酚红对照品溶液，每个质量浓度各精密吸取 0.5 mL，加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL。以 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液为参比，在 558 nm 处测吸光度 (*A*) 值，以 *A* 值对酚红质量浓度 (*C*) 绘制标准曲线并进行线性回归，得回归方程 $A=0.018\ 1\ C+0.005\ 2$ ($r=0.999\ 7$, $n=3$)，线性范围 10~60 μg/mL。

2.3 牛蒡子苷的定量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水 (60:40)；柱温 30 ℃；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 280 nm；进样量 20 μL。

2.3.2 牛蒡子苷标准曲线的绘制 精密称取牛蒡子苷对照品，用含酚红 20 μg/mL 的 K-R 液溶解并稀释成含牛蒡子苷 5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL 的系列对照品溶液。取上述溶液 200 μL，加入甲醇 400 μL，涡旋混匀 1 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，以峰面积为纵坐标 (*Y*)、牛蒡子苷质量浓度为横坐标 (*X*) 绘制标准曲线并进行线性回归，得回归方程 $Y=4.492\ 7\ X+6.116\ 8$ ($r=0.999\ 8$, $n=3$)，线性范围 5.0~200.0 μg/mL。

2.3.3 专属性试验 取空白肠循环液、对照品+空白肠循环液和供试品肠循环液进样分析，色谱见图 1。可见，牛蒡子苷的保留时间为 4.8 min，肠循环液中其他成分不干扰牛蒡子苷的测定。

2.3.4 精密度试验 按“2.3.2”项方法配制 5.0、50.0、200.0 μg/mL 的牛蒡子苷对照品溶液，其中含酚红

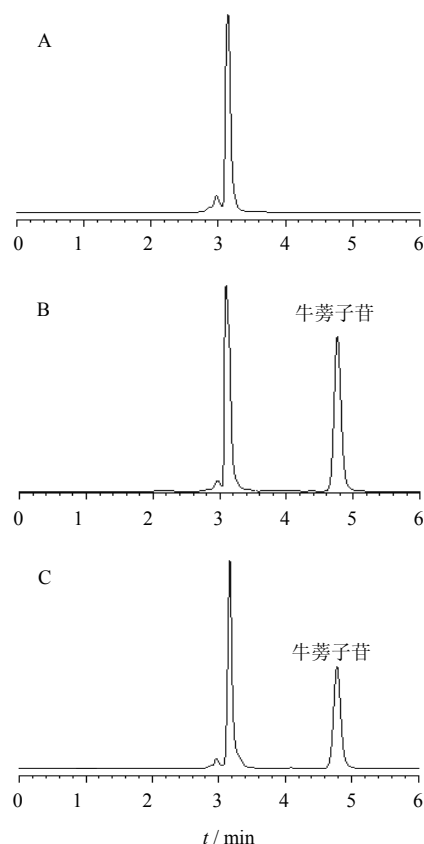


图1 空白肠循环液 (A)、对照品+空白肠循环液 (B) 和供试品肠循环液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank intestinal circulating fluid (A) and reference + blank intestinal circulating fluid (B), and sample intestinal circulating fluid (C)

为 20 μg/mL。每个质量浓度取 3 个样品，于 1 d 内重复测定 3 次，计算日内精密度；每个质量浓度取 3 个样品，每日测定 1 次，连续测定 3 d，计算日间精密度。结果日内精密度 RSD 分别为 6.05%、1.05%、0.42%，日间精密度 RSD 分别为 7.78%、4.07%、2.16%。

2.3.5 回收率试验 取“2.3.4”项下牛蒡子苷对照品溶液，按“2.3.1”项色谱条件测定 5 次，将所得的峰面积带入回归方程计算质量浓度，以所得质量浓度与实际质量浓度的比值作为方法回收率。结果方法回收率分别为 103.24%、109.32%、97.40%，RSD 分别为 9.25%、2.25%、0.99%。

2.3.6 稳定性考察 用 K-R 溶液对大鼠原位小肠灌注 2 h，获得大鼠小肠空白灌注液。用小肠空白灌注液配制牛蒡子苷质量浓度分别为 5.0、50.0、200.0 μg/mL 的酚红溶液 (含酚红 20 μg/mL)，于 (37±0.5) ℃ 水浴中孵育 3 h，分别于孵育 0、3 h 取样；另同法制备样品于 (4±0.5) ℃ 放置 24 h，分别于 0、

24 h 取样,按照“2.3.1 项”色谱条件检测,分别用 3、24 h 的样品中牛蒡子苷的量除以 0 h 时样品中牛蒡子苷的量,计算剩余药物率,考察牛蒡子苷在大鼠空白小肠灌注液中的稳定性。结果见表 1。结果表明,牛蒡子苷在大鼠小肠空白灌注液中 37 ℃ 孵育 3 h 或 4 ℃ 放置 24 h 均稳定,满足测定要求。

表 1 牛蒡子苷在大鼠空白小肠灌注液中的稳定性
Table 1 Stability of arctiin in blank intestinal perfusate of rats

牛蒡子苷 / (μg·mL ⁻¹)	剩余药物率 / %	
	37 ℃ 孵育 3 h	4 ℃ 放置 24 h
5.0	99.67	96.07
50.0	100.29	99.21
200.0	102.56	102.96

2.4 大鼠在体肠吸收实验

取自由饮水、禁食 12~18 h 的大鼠, ip 10% 水合氯醛溶液 6 mL/kg 麻醉,背位固定于手术台板,保持 37 ℃ 体温,沿腹部正中中线切开腹部约 3 cm。在大鼠小肠部位,两端剪切后插管,用线结扎。先用适量 37 ℃ 的生理盐水将肠内容物冲洗干净,再用空气将生理盐水排净。取供试品溶液(预热至 37 ℃) 100 mL,以 5 mL/min 体积流量循环 10 min 后,立即取灌注液 2 份(分别为 0.5、0.2 mL),作为 0 时刻牛蒡子苷和酚红测定的样品液,同时补加 0.7 mL 空白肠循环液(含酚红 20 μg/mL),体积流量调为 2.5 mL/min,之后每隔 15 min 按同法取样并补加空白肠循环液,循环 3 h 后,终止实验。取 0.2 mL 样品液,加入 400 μL 甲醇,涡旋 1 min 混匀,12 000

r/min 离心 10 min,取上清液,按“2.3”项方法测定灌注液中牛蒡子苷的量。取 0.5 mL 样品液,按“2.2”项方法测定灌注液中酚红的量。利用不同时刻酚红质量浓度的变化计算供试液的体积,计算肠循环液中的剩余药量(X)。

2.5 肠吸收参数计算

以小肠剩余药量的对数(lnX)对取样时间(t)做图,得一直线,从直线的斜率求得速率常数(K_a),计算吸收半衰期($t_{1/2}$)、单位时间吸收率(P)、表观渗透系数(P_{app})。

$$\ln X = \ln X_0 - K_a t$$

$$t_{1/2} = 0.693 / K_a$$

$$P = (C_0 \times V_0 - C_t \times V_t) / (C_0 \times V_0 \times t)$$

$$P_{app} = K_a / (3\ 600\ A)$$

X_0 为 0 时刻灌注液中的药物量, C_0 为灌注液中药物初始质量浓度, V_0 为灌注液初始体积, C_t 为 t 时刻灌注液中药物质量浓度, V_t 为 t 时刻灌注液体积, A 为小肠吸收面积

2.6 牛蒡子苷质量浓度对其肠吸收的影响

分别取“2.1.3”项制备的质量浓度为 10、20、50 μg/mL 牛蒡子苷供试品溶液,按“2.4”项方法进行小肠段循环的在体肠灌注吸收实验,计算在不同质量浓度下牛蒡子苷的肠吸收动力学参数。结果见表 2。结果显示,牛蒡子苷在大鼠小肠有一定的吸收,但 $P < 15\%/h$,吸收较差;在 10、20、50 μg/mL, K_a 、 $t_{1/2}$ 、 P 、 P_{app} 值均无显著差异,表明质量浓度对牛蒡子苷在小肠的吸收动力学无显著影响,提示牛蒡子苷在大鼠小肠的吸收主要以被动转运为主。

表 2 不同质量浓度牛蒡子苷大鼠小肠吸收动力参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Absorptive dynamic parameters of arctiin at different concentration in small intestine of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

参数	单位	牛蒡子苷 / (μg·mL ⁻¹)		
		10	20	50
K_a	h ⁻¹	0.078 ± 0.003	0.074 ± 0.020	0.066 ± 0.003
$t_{1/2}$	h	8.932 ± 0.347	9.715 ± 2.226	10.511 ± 0.430
P	%·h ⁻¹	12.160 ± 1.930	10.550 ± 0.400	9.960 ± 0.920
P_{app}	× 10 ⁻⁷ cm·s ⁻¹	1.703 ± 0.156	1.767 ± 0.462	1.643 ± 0.132

3 讨论

动物给药后,小肠在吸收过程中不仅吸收药物,也吸收水分,从而导致供试液体积减少,故不能采用直接测定药物浓度的方法计算剩余药量。酚红为大分子络合物,不被小肠吸收,可用来测定被小肠吸收的水量^[5]。通常苷类药物在肠循环液中较不稳定,易水

解代谢为苷元,本实验分别考察牛蒡子苷在 37、4 ℃ 条件下的稳定性,发现在肠吸收实验过程和样品储存过程中,牛蒡子苷较稳定,未发生水解。

本实验结果表明,牛蒡子苷 10~50 μg/mL,在肠道的吸收动力学相关指标 K_a 、 $t_{1/2}$ 、 P 、 P_{app} 的值不随质量浓度的变化而变化,基本保持恒定,提示

其在小肠内的吸收符合一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。牛蒡子苷 $P < 15\%/h$,表明牛蒡子苷在大鼠小肠的吸收量较少。牛蒡子苷在肠道菌群存在下会被降解成一系列代谢产物,主要代谢产物为牛蒡子苷元^[6-9]。因此,本实验在测定牛蒡子苷的同时也测定了牛蒡子苷元在肠吸收过程中的生成量,结果在牛蒡子苷 10、20 $\mu g/mL$ 时,检测不到牛蒡子苷元,而牛蒡子苷 50 $\mu g/mL$ 时,随着肠吸收时间延长,牛蒡子苷元的量逐渐增多,在 3 h 时生成的牛蒡子苷元达约 200 μg ,表明牛蒡子苷在 10~50 $\mu g/mL$ 肠道菌群对其代谢较少。但由于代谢作用的存在,本实验得到牛蒡子苷小肠吸收数据不能完全反映牛蒡子苷在肠道的真实吸收情况,其具体的肠吸收情况及机制仍需采用 Caco-2 细胞平台等多种手段进行深入研究。

参考文献

- [1] Abdulrahman A, Alghadyan. Diabetic retinopathy: An update [J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2011, 25(2): 99-111.
- [2] Wu J G, Wu J Z, Sun L N, *et al.* Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(11): 1033-1041.
- [3] 王 潞, 赵 烽, 刘 珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(3): 467-470.
- [4] 容 慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1): 25-29.
- [5] 陆 彬. 药剂学实验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [6] 郑一敏, 蔡绍哲, 胥秀英, 等. 牛蒡子苷代谢动力学与分布研究 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 2006, 23(4): 265-267.
- [7] Nose M, Fujimoto T, Takeda T, *et al.* Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract [J]. *Planta Med*, 1992, 58(6): 520-523.
- [8] Nose M, Fujimoto T, Nishibe S, *et al.* Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract II. serum concentration of lignans and their metabolites [J]. *Planta Med*, 1993, 59(2): 131-134.
- [9] Xie L H, Ahn E M, Akao T, *et al.* Transformation of arctiin to estrogenic and antiestrogenic substances by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(4): 378-384.