doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2019.11.12

牛蒡苷元在仔猪体内的药物动力学研究

何 斌[1],吴利军[1],陈夏冰[1],杨文海[1],邵志勇[1],
陈 洁[1],金尔光[1],周 华[1],李 杰[1],刘志伟[2*]

(1.武汉市农业科学院畜牧兽医研究所,武汉 430208;2.武汉市动物疫病预防控制中心,武汉 430000)

[收稿日期] 2019 - 07 - 22　[文献标识码]A　[文章编号]1002 - 1280 (2019)11 - 0072 - 06　[中图分类号]S853.7

[摘　要]　为研究牛蒡苷元在仔猪体内的药物动力学特征,了解其在仔猪体内的吸收、分布、转化和排泄规律,为新兽药的研发和临床用药提供理论参考依据。选取健康仔猪 8 头(30.0 ± 5.0 kg),以 2.0 mg/kg.bw 的牛蒡苷元静脉注射给药,不同时间点前腔静脉采血,采用 HPLC 法对猪血浆中牛蒡苷元的浓度进行分析。牛蒡苷元静脉注射后,符合无吸收二室模型,主要药动学参数为:分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)0.166 ± 0.022 h;消除半衰期($t_{1/2\beta}$)3.161 ± 0.296 h;表观分布容积(V_d)0.231 ± 0.033 L/kg;清除率(CL_b)0.057 ± 0.003 L/(h · kg);药时曲线下面积(AUC)1.189 ± 0.057 μg · h · mL^{-1}。由此可知,牛蒡苷元静脉注射后在仔猪体内分布迅速、分布组织较少、代谢消除较快。

[关键词]　牛蒡苷元;仔猪;药物动力学

作者简介: 何 斌,兽医师,从事兽医药理与毒理学研究。
通讯作者: 刘志伟。E - mail: 331678317@qq.com

Pan B L, Wang M, Wang W Y, *et al*. Determination of eprinomectin in milk of cow by hplc with fluorescence detection [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2004, 24(2): 174 - 176.

[10] Berendsen B J, Mulder P P, van Rhijn H J. The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: New insights and improvement of the procedure[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 585(1):126 - 133.

[11] Hamel D, Bosco A, Rinaldi L, *et al*. Eprinomectin pour - on (EPRINEX © Pour - on, Merial): efficacy against gastrointestinal and pulmonary nematodes and pharmacokinetics in sheep[J]. BMC Vet Res, 2017, 13(1): 148.

[12] Wen H, Pan B, Wang Y, *et al*. Plasma and milk kinetics of eprinomectin following topical or oral administration to lactating Chinese Holstein cows[J]. Vet Parasitol, 2010, 174(1/2): 72 - 76.

[13] Baoliang P, Yuwan W, Zhende P, *et al*. Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following Subcutaneous Administration to Lactating Dairy Cattle[J]. Vet Res Commun, 2006, 30(3): 263 - 270.

[14] Dupuy J, Sutra J F, Alvinerie M, *et al*. Plasma and milk kinetic of eprinomectin and moxidectin in lactating water buffaloes (Bubalus bubalis)[J]. Vet Parasitol,2008, 157(3/4): 284 - 290.

[15] Dupuy J, Chartier C, Sutra J F, *et al*. Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk[J]. Parasitol Res,2001, 87(4): 294 - 298.

[16] Marriner S E, McKinnon I, Bogan J A. The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses[J]. J Vet Pharmacol Ther,1987, 10(2): 175 - 179.

[17] Cirak VY, Aksit D, Cihan H, *et al*. Plasma dispositions and concentrations of ivermectin in eggs following treatment of laying hens[J]. N Z Vet J,2018, 66(3):121 - 125.

(编 辑:侯向辉)

Pharmacokinetics of Arctiin in Piglets

HE Bin[1], WU Li – Jun[1], CHEN Xia – Bing[1], YANG Wen – Hai[1], SHAO Zhi – Yong[1], CHEN Jie[1], JING Er – Guang[1], ZHOU Hua[1], LI Jie[1], LIU Zhi – wei[2]*

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan* 430208, *China*; 2. *Wuhan Animal Disease Control Center, Wuhan* 430000, *China*)

Corresponding author: *LIU Zhi – wei, E – mail*: 331678317@ *qq. com*

Abstract: The experiment was carried out in order to study the pharmacokinetic characteristics of arctidine in piglets, understand its absorption, distribution, transformation and excretion regulation in piglets, and provide theoretical reference for the development and clinical use of new veterinary drugs. Eight healthy piglets (30.0 ± 5.0 kg) were injected with arctigan at 2.0 mg/kg. bw intravenously, and blood was collected from the anterior vena cava at different time points. The concentration of arctigan in pig plasma was analyzed by HPLC. After intravenous injection of arctiin, the main pharmacokinetic parameters were: distribution half – life (t1/2) 0.166 ±0.022 h; Elimination half – life (t1/2) 3.161 ±0.296 h; Apparent volume of distribution (Vd) 0.231 ± 0.033 L/kg; Clearance rate (CLb) 0.057 ±0.003 L/(h · kg); The AUC was 1.189 ±0.057 g · h · mL^{-1}. The results showed that burdock glycosides were rapidly distributed except for human organ together with high metabolism in piglets after intravenous injection.

Key words: arctiin; piglets; pharmacokinetics

牛蒡子的主要有效成分为木脂素类化合物,包括牛蒡苷和牛蒡苷元等,牛蒡苷在胃肠道微生物作用下转化为牛蒡苷元发挥药理作用,即牛蒡苷元为牛蒡子的直接有效成分[1-2]。牛蒡苷元具有抗炎[3]、抗病毒[4]、抗菌[5]、抗肿瘤[6]、抗糖尿病[7]等众多药理作用,具有良好的研发和应用前景;试验研究了静脉注射牛蒡甘元在仔猪体内的药物代谢动力学特征,为新兽药的研发和临床用药提供理论依据和参考,为中兽药现代化进行有意义的探索。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　药品及配制　牛蒡苷元标准品(批号:160509)含量≥98.1%,由上海融禾医药科技有限公司生产;准确称取牛蒡苷元标准品,甲醇溶解加水定容,制备含牛蒡苷元 1.0 mg/mL 的标准贮备液;准确称取牛蒡苷元标准品,丙二醇溶解加水定容,制备含牛蒡苷元 10.0 mg/mL 的注射液。乙腈、甲醇色谱级,购自美国 Themo 公司;二氯甲烷、丙二醇等分析纯,购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2　仪器　1200 型高效液相色谱仪,自动进样器、紫外检测器,美国 AgiLent 公司;D3024R 高速离心机, SCILO – GEX 公司;电子天平(±0.0001 g),德国赛多利斯公司;N – EVAPTM111 型氮吹仪,美国路易公司。

1.1.3　动物　杜×长×大三元仔猪 8 头,雌雄各半,编号 1 – 8 号,体重:30.0 ± 5.0 kg;购于武汉博牧生物科技有限公司。试验前正常饲养观察 1 周,自由饮水和采食,饲料为不含任何药物的全价日粮。

1.2　方法

1.2.1　药物动力学试验设计　给药前 12.0 h 禁食,对每头仔猪进行称重,并采集血样作为空白对照。1 ~ 8 号仔猪以 2.0 mg/kg. bw 的牛蒡甘元耳静脉注射给药。静脉注射给药后,每头仔猪于 0.167、0.333、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h 采血 5.0 mL 左右;所采集血样置

于已加肝素钠的聚丙烯离心管中,以 3000 r/min 离心 15.0 min 分离血浆,取上清液于 –20 ℃冷冻保存,待测定[12]。

1.2.2　色谱条件　色谱柱为 AgiLent SB – C18 柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);检测波长为 280 nm;流动相为甲醇:乙腈:水(31:20:49 V:V:V);流速为 0.8 mL/min;进样量为 30 μL;柱温为(30 ± 0.1)℃[8-9]。

1.2.3　血浆样品处理　将血浆样品从 –20 ℃冰箱中取出,室温下自然解冻,准确吸取 0.5 mL 于 5.0 mL离心管中,加入 2.0 mL 二氯甲烷,涡旋振荡 60 s 后以 10 000 r/min 离心 10.0 min 吸取二氯甲烷层,同法提取两次,合并两次二氯甲烷层,置于 15.0 mL离心管中,40 ℃水浴氮气吹干,残渣用 200 μL流动相溶解,10 000 r/min 离心 10.0 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后以 30 μL 进样分析,记录色谱图[10-11]。

1.2.4　血浆标准曲线的建立　向 7 支 5.0 mL 聚丙烯离心管中各加入 500 μL 空白血浆,然后依次加入一系列已稀释好的牛蒡苷元标准工作液,得到药物浓度依次为 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 μg/mL 的血浆样品。分别按照血浆样品处理方法处理,进行 HPLC 分析,记录色谱图。以测得的牛蒡苷元峰面积(x)为横坐标,浓度(y)为纵坐标,建立血浆标准曲线,拟合回归方程,求出相关系数(r)。

1.2.5　方法学验证　取空白血浆 500 μL 置于 5.0 mL聚丙烯离心管中,然后依次加入已稀释好的牛蒡苷元标准工作液高、中、低三个浓度,充分混合均匀,配制成含牛蒡苷元浓度分别为 5.0、1.0、0.1 μg/mL的血浆样品,按照血浆处理方法进行处理,进行 HPLC 检测分析,每个浓度一天内设置 5 个平行进行检测,以考察日内变异系数;连续重复检测 5 d,以测定日间变异系数。并计算方法的回收率、准确度、精密度以及灵敏度。

1.2.6　猪血浆中药物浓度的测定　将给药后不同时间点获得的血浆,按"血浆样品的处理"方法处理后进行 HPLC 分析,计算牛蒡苷元的峰面积,代入标准曲线回归方程,计算出血浆中牛蒡苷元的浓度。

1.2.7　数据分析　采用 ExceL 软件分析处理方法学数据并绘制血浆标准工作曲线及药 – 时曲线图;药物动力学模型拟合及参数计算均采用中国药理学会数学专业委员会编制的 3p97 药物动力学软件分析。

2　结果与分析

2.1　牛蒡苷元在血浆中的色谱行为　在本研究所建立的方法下,牛蒡苷元保留时间为 14.0 min,峰形对称性良好,基线平稳,与杂质峰分离良好,检测效率高。空白血浆色谱图如图 1,空白血浆添加牛蒡苷元(1.0 μg/mL)色谱图如图 2,样品(0.55 μg/mL)血浆色谱图如图 3。

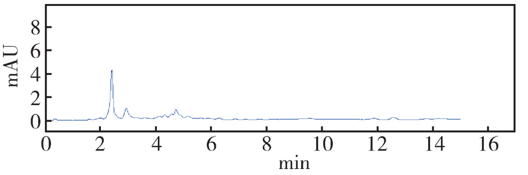

图 1　空白血浆色谱图

Fig 1　Chromatogram of blank plasma

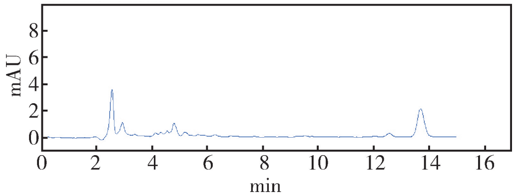

图 2　空白血浆中添加牛蒡苷元(1.0 μg/mL)色谱图

Fig 2　Chromatogram of plasma with arctigenin (1.0 μg/mL)

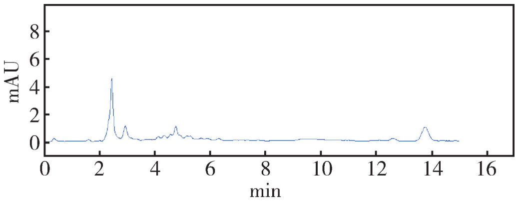

图 3　给药后血浆中牛蒡苷元(0.55μg/mL)色谱图

Fig 3　Chromatogram of arctigenin in plasma (0.55 μg/mL) after administration

2.2　血浆标准工作曲线　由图 4 可知,牛蒡苷元

标准品在 0.05 ~ 10.0 μg/mL 范围内线性关系良好,相关系数 r = 0.9998,线性方程为 y = 0.0265x − 0.0328(x 表示牛蒡苷元的峰面积;y 表示牛蒡苷元在血浆中的浓度)。

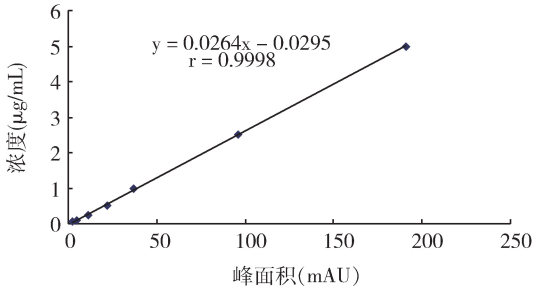

图 4　牛蒡苷元在血浆中标准工作曲线

Fig 4　Calibration curve of arctigenin in piglet plasma

2.3　方法学验证结果　由表 1 和表 2 可知,牛蒡苷元在仔猪血浆中的最低检测限为 0.025 μg/mL,最低定量限为 0.05 μg/mL。牛蒡苷元在 0.05 ~ 5.0 μg/mL范围内线性关系良好,回归方程为 y = 0.0264x − 0.0295,相关系数为 r = 0.9998。该方法回收率大于 83.35%,日内变异系数均在 3.51% 以内,日间变异系数均在 5.90% 以内

表 1　仔猪空白血浆中添加 ACT 的回收率和日内变异系数考察结果(n = 5)

Tab 1　Intra − day recovery and precision vaLues for the determination of ACT in pig plasma(n = 5)

添加药物浓度 /(μg · mL⁻¹)	回收率/% (± S. D)	日内变异系数/%
0.1	89.69 ± 2.79	3.11
1	91.19 ± 3.20	3.51
5	93.08 ± 1.98	2.13

表 2　仔猪空白血浆中添加 ACT 的回收率和日间变异系数考察结果(n = 5)

Tab 2　Inter − day recovery and precision values for the determination of ACT in pig plasma(n = 5)

添加药物浓度 /(μg · mL⁻¹)	回收率/% (± S. D)	日间变异系数/%
0.1	83.35 ± 4.92	5.90
1	91.25 ± 4.36	4.77
5	88.99 ± 0.80	0.90

2.4　药物动力学试验结果　单剂量静脉注射牛蒡苷元(2.0 mg/kg. bw)后,在仔猪体内的血药浓度如表 3,主要药物动力学参数如表 4,血药浓度 − 时间曲线如图 5。

表 3　静脉注射牛蒡苷元(2.0 mg/kg. bw)后在仔猪体内的血药浓度

Tab 3　Blood concentration of arctigenin in piglets after intravenous injection (2.0 mg/kg. bw)

时间/h	每头仔猪的血药浓度/(μg · mL⁻¹)								平均血药浓度(± S. D)
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号	
0.167	0.913	0.924	0.942	0.874	0.934	0.891	0.937	0.876	0.911 ± 0.026
0.333	0.500	0.548	0.558	0.447	0.571	0.523	0.498	0.534	0.522 ± 0.037
0.5	0.338	0.309	0.359	0.367	0.321	0.364	0.346	0.371	0.347 ± 0.021
0.75	0.208	0.206	0.236	0.227	0.254	0.210	0.235	0.236	0.227 ± 0.016
1.0	0.200	0.182	0.211	0.203	0.193	0.181	0.186	0.179	0.192 ± 0.011
1.5	0.124	0.108	0.137	0.118	0.132	0.118	0.154	0.106	0.125 ± 0.015
2.0	0.097	0.081	0.110	0.092	0.087	0. 094	0.106	0.086	0.094 ± 0.010
3.0	0.092	0.076	0.097	0.081	0.073	0.083	0.095	0.072	0.084 ± 0.010
4.0	0.081	0.071	0.086	0.076	0.068	0.073	0.081	0.064	0.075 ± 0.007
5.0	0.060	0.063	0.065	0.055	0.061	0.064	0.071	0.059	0.062 ± 0.004
6.0	0.054	0.052	0.060	0.053	0.051	0.055	0.063	0.051	0.055 ± 0.004
8.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND 表示未检出

表 4　静脉注射牛蒡苷元(2.0 mg/kg. bw)后在仔猪体内的药物动力学参数

Tab 4　Pharmacokinetic parameters of arctigenin (2.0 mg/kg. bw) in piglets after intravenous injection

药物动力学参数	单位	($\bar{x}$ ± S. D)
A	μg/mL	1.479 ±0.191
α	h^{-1}	4.194 ±0.551
B	μg /mL	0.187 ±0.023
β	h^{-1}	0.221 ±0.022
V_d	L/kg	0.307 ±0.033
$t_{1/2\alpha}$	h	0.166 ±0.022
$t_{1/2\beta}$	h	3.161 ±0.296
K_{21}	h^{-1}	0.673 ±0.085
K_{10}	h^{-1}	1.399 ±0.163
K_{12}	h^{-1}	2.396 ±0.349
AUC	μg. h/mL	1.189 ±0.057
CL_b	L/(h. kg)	0.068 ±0.003

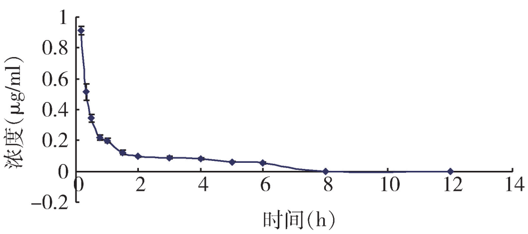

图 5　静脉注射牛蒡苷元(2mg/kg)后在仔猪体内的血药浓度 – 时间曲线

Fig 5　Blood concentration – time curve of arctigenin in piglets after intravenous injection (2.0 mg/kg)

静脉注射牛蒡苷元后,牛蒡苷元仔猪体内的分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)为 0.166 ± 0.022 h、消除半衰期 $t_{1/2\beta}$为 3.161 ± 0.296 h,表观分布容积(V_d)为 0.231 ±0.033 L/kg,药时曲线下面积(AUC)1.189 ±0.057μg · h · mL^{-1}。

3　讨论与结论

牛蒡苷元的色谱条件目前报道不多。在检测波长方面,选择 280 nm 作为紫外检测波长。关于流动相的选择文献报道的主要有以下几种:乙腈:水(V:V,32:68)[8];甲醇:乙腈:0.025 mol/L 磷酸(V:V:V,40:20:40)[13];甲醇:0.5%磷酸水(V:V,48:52)[14];甲醇:乙腈:水(V:V:V,40:20:40)[10];甲醇:水(V:V,55:45)[9]。在试验过程中,对以上流动相均进行了试验研究,发现 V(甲醇):V(水)=55:45 作为流动相,牛蒡苷元的出峰时间较理想、峰型较好且与杂质峰分离良好,但有时存在基线不稳的情况;分析可能是甲醇和水在40% ~60%的范围内由仪器自动混合时极易产生气泡,导致基线不稳,故对流动相稍作更改,在流动相中加入乙腈,并不断调整各流动相的比例,最终确定流动相为甲醇:乙腈:水 =31:20:49(V:V:V)时出峰时间理想,峰形较好,且与杂质峰良好分离。

给仔猪静脉注射牛蒡苷元后,牛蒡苷元仔猪体内的血药浓度 – 时间数据符合无吸收二室模型,与吕佳报道[10]的家兔静注牛蒡苷元无吸收单室模型有一定的差异;在仔猪体内的分布半衰期 $t_{1/2\alpha}$(0.166 ±0.022 h)较短,表观分布容积 V_d(0.307 ±0.033 L/kg)相对较小,表明静注后牛蒡苷元在仔猪体内分布极为迅速,但分布组织相对较少,可能主要分布在主要分布在血液和细胞外液中[12];消除半衰期 $t_{1/2\beta}$(3.161 ±0.296 h)相对较短,较家兔静注牛蒡苷元0.87 h 的消除半衰期长,可能与动物种属有一定关系,表明牛蒡苷元静脉注射后在仔猪体内消除代谢也相对较快,与其分布组织较少有一定关系。

研究采用 HLPC 建立了仔猪血浆中牛蒡苷元的定量分析方法,该方法具有灵敏度高、特异性强、检测时间短等特点,可应用于牛蒡苷元新兽药的临床前药物动力学研究。研究了牛蒡苷元在仔猪体内的药物动力学特征。结果表明:静脉注射牛蒡苷元后,其在仔猪体内的为无吸收二室模型,在仔猪组织中分布较少,半衰期短、能迅速从仔猪血液中清除,发挥药物作用时间较短,建议临床使用时应适当增加用药次数。

参考文献:

[1]　鞠玫君. 牛蒡子中木脂素类成分的提取工艺研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2008

Ju M J. Study on extraction technology of lignans from *Arctium* *lappa L.* [D]. ShenYang: liaoning university of traditional chinese medicine,2008

[2] 于 宏. 牛蒡的化学成分与生物活性[J]. 国外医药 · 植物药分册,2007,22(6):246 – 247

Yu H. The chemical composition and biological activity of burdock [J]. World Phytomedicines,2007,22(6):246 – 247

[3] Cho M K, Jang Y P, Kim Y C, *et al*. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP – 1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF – a inhibition. Int Immunopharmacol, 2004, 4(10): 1419 – 1429

[4] Chen J, Li W T, Jin E G, *et al*. The antiviral activity of arctigenin in traditional Chinese medicine on porcine circovirus type 2. Research in Veterinary Science. 2016,6(106) 159 – 164

[5] 刘 堃. 牛蒡子水煎液、牛蒡苷和牛蒡苷元体外抗菌实验[J]. 天津药学,2008,20(4):10 – 11

Liu K. *In vitro* antibacterial experiment of *Fructus Arctium lappa* decoction, *Arctium aglycone* and *Arctium aglycone* [J]. Tianjin Pharmacy,2008,20(4):10 – 11

[6] 张兴德,张彩琴,刘启迪,等. 牛蒡子抗肿瘤活性成分及作用机制研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(12):12 – 15

Zhang X D,Zhang X Q,Liu Q D, *et al*. Research progress on antitumor constituents and mechanism of *Arctium lappa L.* [J]. Modern Chinese Medicine,2012,14(12):12 – 15

[7] 卢来春. 牛蒡子苷分离、纯化及其对实验性糖尿病大鼠血管内皮细胞保护机制的初步探讨[D]. 重庆:第三军医大学,2007

Lu C L. Study on the seperation and purification way of arctiin and study on the protective mechanism vascular endothelial cell of experimental diabetic rats with arctiin[D]. Chongqing: Army Medical University,2007

[8] Chul Y K, Mi – Jeong A, Jinwoong K. A preparative isolation and purification of arctigenin and matairesinol from Forsythia koreana by centrifugal partition chromatography[J]. J. Sep. Science. 2006, 29, 656 – 659

[9] 葛 亮,张浩科,田树革. 反相液相色谱法测定毛头牛蒡不同部位中牛蒡苷和牛蒡苷元的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):41 – 43

Ge, L, Zhang H K,Tian S G. Content determination of arctiin and arctigen from different parts of arctium tomentosum by RP – HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 2010,16(14):41 – 43

[10] 吕 佳. 牛蒡苷元药物动力学研究[M]. 沈阳:辽宁中医学院,2002.

Lv J. Study on pharmacokinetics of arctigenin[M]. Shenyang: Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, 2002.

[11] He F, Dou D Q, Sun Y, *et al*. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of arctiin and its main metabolite in rats by HPLC – UV and LC – MS[J]. Planta Med, 2012, 78 (8): 800 – 806.

[12] 操继跃,卢笑丛. 兽医药物动力学[M]. 北京:中国农业出版社,2005:176 – 205.

Cao J Y, Lv X C. Veterinary Pharmacokinetics[M]. BeiJing: China Agricultural Press, 2005:176 – 205.

[13] 王 劲,沙 明,杨洪武等. HPLC 法对不同地区商品牛蒡子中牛蒡苷元的定量分析[J]. 中草药,2003,34(5):467 – 468

Wang J,Sha M, Yang H W, *et al*. Quantitative analysis of arctium aglycone in *Arctium lappa L.* from different regions by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34 (5):467 – 468.

[14] 袁 媛. 牛蒡子质量控制方法及其水提物药代动力学和药效动力学研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2009

Yuan Y. Quality control method of burdock and Its pharmacokinetics and pharmacodynamics of water extracts[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2009.

(编 辑:陈 希)