

· 药物代谢 ·

## 脱氢水飞蓟宾的溶解度及大鼠在体肠吸收特性考察

许颖<sup>1</sup>, 金雪锋<sup>2</sup>, 童珊珊<sup>1</sup>, 陈美<sup>1</sup>, 徐希明<sup>1\*</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏奥赛康药业股份有限公司, 南京 211100)

**[摘要]** 目的: 测定脱氢水飞蓟宾(DHS)的溶解度并探讨 DHS 在小肠的吸收动力学特征。方法: 采用 HPLC 测定 DHS 含量, 流动相甲醇-0.2% 甲酸水溶液(60:40), 检测波长 255 nm。应用大鼠在体肠循环模型考察 DHS 在大鼠十二指肠、空肠、回肠的吸收特性。结果: DHS 于 20, 37 °C 振荡 24 h 的溶解度分别为 0.46, 1.23 mg·L<sup>-1</sup>。DHS 在十二指肠、空肠及回肠中单位时间吸收率( $n=3, \bar{x} \pm s$ ) 分别为 (17.81 ± 6.37)%, (8.41 ± 2.43)%, (12.95 ± 5.06)%, 吸收速率常数( $K_a$ ) 依次为 (0.176 ± 0.069), (0.089 ± 0.053), (0.158 ± 0.058) h<sup>-1</sup>; DHS 在十二指肠的  $K_a$  随药物质量浓度的增加基本保持不变。结论: 温度对 DHS 溶解度存在一定影响。DHS 在十二指肠、空肠、回肠均有吸收, 在十二指肠段吸收量和  $K_a$  显著高于空肠段。DHS 在小肠的吸收机制以被动扩散为主。

**[关键词]** 脱氢水飞蓟宾; 溶解度; 在体肠吸收特性; 高效液相色谱; 酚红

**[中图分类号]** R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0165-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013240165

## Investigation of Solubility of Dehydrosilybin and Its *in situ* Intestinal Absorption Characteristics in Rats

XU Ying<sup>1</sup>, JIN Xue-feng<sup>2</sup>, TONG Shan-shan<sup>1</sup>, CHEN Mei<sup>1</sup>, XU Xi-ming<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Jiangsu Aosaikang Pharmaceutical Co. Ltd, Nanjing 211100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine solubility of dehydrosilybin (DHS) and investigate its intestinal absorption kinetics characteristics. **Method:** HPLC was adopted to determine solubility of DHS with mobile phase of methanol-0.2% formic acid solution (60:40) and detection wavelength of 255 nm. Absorption characteristics of DHS in duodenum, jejunum and ileum was investigated by *in situ* intestinal circulation model in rats. **Result:** Solubility of DHS were 0.46, 1.23 mg·L<sup>-1</sup> oscillated at 20, 37 °C for 24 h, respectively. Absorption rate per unit time of DHS in duodenum, jejunum and ileum were (17.81 ± 6.37)%, (8.41 ± 2.43)%, (12.95 ± 5.06)%, absorption rate constant ( $K_a$ ) of them were (0.176 ± 0.069), (0.089 ± 0.053), (0.158 ± 0.058) h<sup>-1</sup>, respectively;  $K_a$  of DHS in duodenum generally kept unchanged with drug concentration increased. **Conclusion:** Temperature had a certain influence on solubility of DHS. DHS had absorption in duodenum, jejunum and ileum, but absorption amount and  $K_a$  in duodenum were significantly higher than them in jejunum. Absorption mechanism of DHS in small intestine was based on passive diffusion.

**[Key words]** dehydrosilybin; solubility; *in situ* intestinal absorption characteristics; HPLC; phenol sulfonphthalein

**[收稿日期]** 20130805(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202930);江苏省高校自然科学研究面上项目(12KJB350002);江苏大学高级人才科研启动基金(11JDG122)

**[第一作者]** 许颖, 博士, 讲师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0511-85038451, E-mail:xying@mail.ujs.edu.cn

**[通讯作者]** \*徐希明, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0511-85038135, E-mail:xuxm@163.com

水飞蓟在清除自由基、抗肝纤维化、抗肿瘤、保护肝细胞膜等方面具有良好的疗效<sup>[1]</sup>,主要活性成分为黄酮木脂素类化合物<sup>[2]</sup>,其中以水飞蓟宾含量最高且研究最为广泛<sup>[3-5]</sup>。脱氢水飞蓟宾(DHS)是水飞蓟中一种水飞蓟宾脱氢衍生物,在天然植物中含量极低,长期以来未引起广泛关注,近期研究发现该成分较水飞蓟宾显示出更强的抗氧化活性,具有更强效的 DNA 拓扑酶抑制效果<sup>[6]</sup>。本实验拟通过考察 DHS 的溶解性能,并应用大鼠在体肠循环灌流模型分析其在大鼠体内的吸收动力学过程,为 DHS 的制剂开发提供生物药剂学依据。

## 1 材料

LC10-ADVP 型高效液相色谱仪(日本岛津),79-1 型磁力加热搅拌器(江苏省金坛市中大仪器厂),ALC-110.4 型电子天平(德国赛多利斯公司),HL-2B 型恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司)。脱氢水飞蓟宾(自制,经 IR 和 NMR 确定结构纯度 >95%),聚山梨酯-80(Tween-80,国药集团化学试剂有限公司),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SD 大鼠 SPF 级,雄性,体重(250 ± 20) g,由江苏大学医学部实验动物部提供,合格证号 SCXK(苏)2009-0002。

## 2 方法与结果

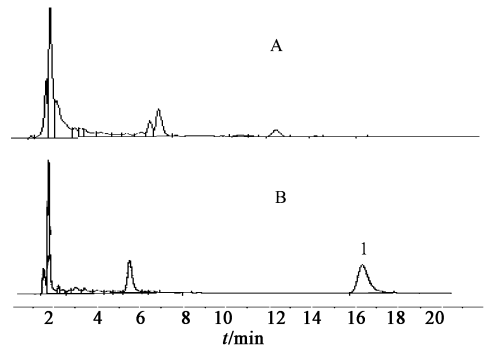
**2.1 溶液的配制** 称取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl<sub>2</sub> 0.37 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.37 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.32 g, MgCl<sub>2</sub> 0.02 g 和葡萄糖 1.4 g,加水溶解并定容至 1 L,即得 Krebs-Ringer 缓冲液(K-R 试液, pH 7.4)。在磁力搅拌条件下,向 K-R 试液中加入一定量 Tween-80,使 Tween-80 质量分数至 0.2%;精密称取酚红适量,加含 Tween-80 的 K-R 试液溶解并稀释至 20 mg·L<sup>-1</sup>,即得空白肠循环液。取预热至 37 °C 含 Tween-80 的空白肠循环液,以 5 mL·min<sup>-1</sup> 的流速循环 10 min,排除肠内气泡,将流速调至 2.5 mL·min<sup>-1</sup>,开始计时,回流 3 h,即得空白肠灌流液。

**2.2 肠循环液中酚红浓度的测定** 用 K-R 试液精密配制质量浓度分别为 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg·L<sup>-1</sup> 的系列酚红溶液,各精密吸取 0.5 mL,加 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠 5 mL 显色 10 min,利用紫外-可见分光光度计在 558 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,酚红质量浓度为横坐标,得回归方程  $A = 0.0186C + 0.073$  ( $R^2 = 0.9993$ ),线性范围 10 ~ 60 mg·L<sup>-1</sup>。取待测大鼠肠循环液 2.0 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 0.5 mL,按上述方法测定

A,计算肠循环液中酚红质量浓度。

## 2.3 脱氢水飞蓟宾的 HPLC 测定

**2.3.1 色谱条件** VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 甲酸水溶液(60:40),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,检测波长 255 nm,进样量 20 μL,见图 1。



A. 空白肠灌流液; B. DHS 肠循环液; 1.

图 1 空白肠灌流液及 DHS 肠循环液 HPLC

**2.3.2 标准曲线制备** 精密称取 DHS 10 mg 置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 DHS 储备液。精密量取该储备液用甲醇逐步稀释,配制质量浓度分别为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 的 DHS 系列溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 14001C - 656.93$  ( $R^2 = 0.9999$ ),线性范围 0.2 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.3 精密度试验** 精密称取适量 DHS,配制低、中、高 3 个质量浓度(0.5, 5, 20 mg·L<sup>-1</sup>) 的 DHS 溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,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,结果显示日内和日间精密度的 RSD 均 < 3.0%。

**2.3.4 回收率试验** 取 2.3.3 项下各质量浓度的 DHS 溶液,分别按 2.3.1 项下色谱条件测定 5 次,计算低、中、高质量浓度样品的回收率分别为 (101.2 ± 1.7)%, (98.3 ± 2.1)%, (99.2 ± 1.3)%,符合检测要求。

**2.3.5 稳定性试验** 称取适量 DHS,用空白肠灌流液溶解,于 37 °C 恒温水浴中孵育 3 h,分别于 0, 3 h 取样 1 mL 至 1.5 mL 离心管中,高速离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>) 5 min,取上清液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算 3 h 后剩余药物率达 (101.57 ± 1.1)%,较 0 h 时稍有增大,可能是水分稍有挥发所致,表明

DHS 在 37 ℃ 恒温水浴中稳定性良好。

**2.4 DHS 溶解度的测定** 取过量的 DHS 共 4 份,等分成 2 组,各加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 10 mL,超声 30 min,分别于 20,37 ℃ 气浴振荡仪中振荡 24 h。20 ℃ 振荡样品取上清液过滤,精密移取滤液 1 mL,用甲醇定容至 5 mL,按 2.3.1 项下色谱条件测定;37 ℃ 振荡样品趁热过滤(滤器使用前 40 ℃ 保温),其余同法操作。计算 DHS 溶解度分别为 0.46,1.23 mg·L<sup>-1</sup>,表明 DHS 溶解度很低,随温度升高,溶解略有增大,故在肠循环试验中应向循环液中加入增溶剂。

**2.5 肠壁物理吸附的影响** 取生理盐水清洗干净的空白小肠 3 段(十二指肠、空肠、回肠各约 10 cm),用玻璃棒将黏膜层翻出,分别置于 50 mL 含 DHS 的肠循环液中,于 37 ℃ 水浴振荡,分别于 0,1,2,3 h 取样 1 mL 至 1.5 mL 离心管中,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果见图 2,表明药物在各肠段孵育 3 h 后,DHS 残留质量分数均 >95%,提示大鼠小肠壁对药物基本无物理吸附,不干扰 DHS 测定。

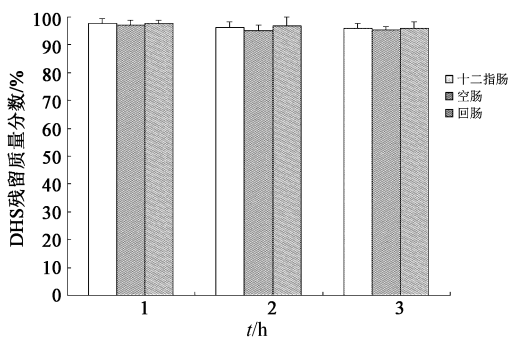


图 2 肠壁物理吸附对 DHS 含量测定的影响

**2.6 大鼠在体肠吸收试验** 取禁食 12 h 的大鼠,自由饮水,按大鼠质量于试验前腹腔注射一定量 2% 戊巴比妥钠,麻醉并固定。沿腹中线切开腹部约 3 cm,分离出十二指肠、空肠、回肠各约 10 cm,十二指肠自幽门 1 cm 处开始;空肠段离幽门 15 cm 处开始;回肠段离盲肠上行 20 cm 处开始<sup>[7]</sup>。用注射器将 37 ℃ 生理盐水缓缓注入肠管,清洗肠管内容物至净,于两端切口插管,结扎。肠管两端玻璃管与蠕动泵的胶管连接,形成回路,用 K-R 试液冲洗 30 min。伤口处用生理盐水润湿的脱脂棉覆盖保湿,红外灯下保温。取预热至 37 ℃ 含有 DHS 的肠循环液 100 mL,以 5 mL·min<sup>-1</sup> 的流速循环 10 min,排除肠内气泡,将流速调至 2.5 mL·min<sup>-1</sup>,开始计时。从 0 时刻开始,每隔 30 min 取样 2 mL 并立即补加等体积

的 37 ℃ 空白肠循环液。循环液趁热经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 0.5 mL,加流动相 2 mL 稀释,按 2.3.1 项下色谱条件测定 DHS 含量,按 2.2 项下方法测定酚红含量。根据酚红质量浓度计算循环液体积和药物吸收率,根据文献方法计算<sup>[8-9]</sup> DHS 在十二指肠、空肠及回肠中单位时间吸收率( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )分别为 (17.81 ± 6.37)%, (8.41 ± 2.43)%, (12.95 ± 5.06)%, 吸收速率常数 ( $K_a$ ) 依次为 (0.176 ± 0.069), (0.089 ± 0.053), (0.158 ± 0.058) h<sup>-1</sup>。数据分析经 SPSS 12.0 软件进行组间的两两比较,结果表明 DHS 在十二指肠,空肠,回肠均有吸收,且 DHS 在十二指肠的  $K_a$  和吸收率均显著高于空肠 ( $P < 0.05$ ),但与回肠相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),故选择考察不同质量浓度药物在十二指肠的吸收情况。

**2.7 药物质量浓度对吸收的影响** 配制 DHS 质量浓度分别为 5.0,7.5,10.0 mg·L<sup>-1</sup> 的肠循环液,按 2.6 项下方法对大鼠十二指肠段的肠吸收特征进行研究,结果 DHS 在十二指肠的  $K_a$  分别为 (0.171 ± 0.077), (0.169 ± 0.052), (0.183 ± 0.055) h<sup>-1</sup>,  $K_a$  无显著性差异,推测 5.0 ~ 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 的 DHS 在十二指肠的吸收方式以被动转运为主。

### 3 讨论

比较了乙醇、脱氧胆酸钠, Tween-80 等增溶剂对 DHS 的增溶效果,发现 Tween-80 对 DHS 具有较好的增溶效果,且不干扰药物的检测。药物在小肠的吸收特性研究常采用在体肠循环灌流法及单向灌流法,在体试验能较真实地反映肠道的生理环境,且操作简单易行、技术成熟可靠。但在体单向肠灌流试验必须具有一定数量的试验动物以保证变异足够小<sup>[10]</sup>,故本文采用大鼠在体肠循环灌流模型。试验发现当 DHS 质量浓度在 5.0 ~ 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, DHS 在十二指肠的吸收以被动扩散为主,且呈现一级动力学特征,提示 DHS 制剂的开发应考虑采用增溶手段,并设计成缓控释制剂,延长其在十二指肠部位滞留时间,以增加生物利用度。

### [参考文献]

- [1] 张丹,张朝凤,张勉. 水飞蓟果实中的黄酮类化合物[J]. 药学与临床研究,2011,19(1):40.
- [2] 巫秀美,刘光明,冯玉冰,等. 水飞蓟类黄酮木素衍生物的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2010,37(3):187.

# 注射用双黄连粉针在大鼠体内的药代动力学分析

周雪玲,孔雪姣,袁颖琳,杨梅,代晶\*  
(成都医学院药学院,成都 610083)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的血药浓度,探析注射用双黄连粉针中 3 种成分在大鼠体内的药代动力学特征。方法:采用 HPLC 同时测定绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷含量,以葛根素为内标,流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0~10 min,10%~20% A;10~35 min,20%~35% A;35~40 min,35% A;40~40.5 min,35%~10% A;40.5~55 min,10% A),绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷和葛根素的检测波长分别为 328,328,277,249 nm。结果:绿原酸和连翘酯苷 A 在 0.2~20 mg·L<sup>-1</sup>、黄芩苷在 2.0~300 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r > 0.999 4$ );日内和日间精密度的 RSD 均 < 13.6%,低、中、高 3 个质量浓度样品的方法回收率在 88.3%~109.3%,提取回收率均 > 80.8%。绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的主要药动学参数 AUC<sub>0-1</sub> 分别为(8.406 ± 1.175), (9.696 ± 2.349), (145.35 ± 22.02) mg·h·L<sup>-1</sup>; MRT<sub>0-</sub> 依次为(0.619 ± 0.105), (0.634 ± 0.115), (0.456 ± 0.068) h; t<sub>1/2z</sub> 分别为(0.532 ± 0.064), (0.732 ± 0.357), (0.542 ± 0.175) h; Vz 分别为(0.384 ± 0.050), (0.673 ± 0.422), (0.324 ± 0.072) L·kg<sup>-1</sup>; CL<sub>z</sub> 分别为(0.504 ± 0.067), (0.634 ± 0.150), (0.426 ± 0.066) L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>。结论:该方法灵敏、简便、准确,适用于大鼠血浆中绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的测定及注射用双黄连粉针的药代动力学研究。

**[关键词]** 双黄连粉针; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 血药浓度; 药代动力学

**[中图分类号]** R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0168-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013240168

## *In vivo* Pharmacokinetics of Shuanghuanglian Powder Injection in Rats

ZHOU Xue-ling, KONG Xue-jiao, YUAN Ying-lin, YANG Mei, DAI Jing\*  
(School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

**[收稿日期]** 20130723(010)

**[基金项目]** 四川省教育厅理科重点项目(12ZA026);成都医学院创新实验项目(CX201224)

**[第一作者]** 周雪玲, 学士, 从事药物制剂研究, Tel:15196617606, E-mail:15196617606@163.com

**[通讯作者]** \* 代晶, 博士, 讲师, 从事药物代谢与药代动力学研究, Tel:028-62308639, E-mail:daijing320@126.com

- [3] Cao X, Deng W, Fu M, et al. Seventy-two-hour release formulation of the poorly soluble drug silybin based on porous silica nanoparticles; *in vitro* release kinetics and *in vitro/in vivo* correlations in beagle dogs [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48(1/2):64.
- [4] Khazim K, Gorin Y, Cavaglieri R C, et al. The antioxidant silybin prevents high glucose-induced oxidative stress and podocyte injury *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Physiol: Renal Physiol, 2013, 305(1):691.
- [5] 何杨, 刘彬丽, 李木子, 等. 快速膜乳化-溶剂萃取/挥发法制备水飞蓟宾 PLGA 微球的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1):1.
- [6] Thongphasuk P, Stremmel W, Chamulitrat W. 2, 3-Dehydrosilybin is a better DNA topoisomerase I inhibitor than its parental si-lybin [J]. J Chemotherapy, 2009, 55(1):42.
- [7] 孙启文, 陈军, 陈明磊, 等. 高车前苷油水分分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):193.
- [8] 周伟, 狄留庆, 毕肖林, 等. 在体肠循环法研究连翘酯苷 A 的肠吸收机制 [J]. 药学学报, 2010, 45(11):1373.
- [9] 马宁, 王建芬, 徐芳, 等. 白藜芦醇衍生物大鼠在体肠吸收特性研究 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4):586.
- [10] 何承华, 张振海, 王舒, 等. 芹菜素大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9):1416.
- [责任编辑 全燕]