文章编号 1006-8147(2015)02-0113-04

论 著

鱼腥草挥发油中甲基正壬酮的肠吸收动力学研究

孙 瑜[1],王 健[2],肖学凤[1]
(1.天津中医药大学附属保康医院药剂科,天津 300193;2.天津市儿童医院药剂科,天津 300074)

摘要 **目的:**对鱼腥草挥发油中甲基正壬酮进行肠吸收动力学研究。**方法:**采用大鼠离体外翻肠囊法和大鼠在体肠循环灌流法研究鱼腥草挥发油中甲基正壬酮的肠吸收动力学,以判断甲基正壬酮的吸收方式和途径。**结果:**大鼠离体外翻肠囊法实验中,相对于十二指肠和空肠,回肠的吸收率最高,4 h吸收率达87.39%;十二指肠、空肠、回肠内药液浓度的对数logC与取样时间 t 的线性回归方程的相关系数均大于0.9。大鼠在体肠循环灌流法实验中,吸收半衰期为7.5 h,最大吸收率为72.35%。**结论:**小肠中回肠段对甲基正壬酮的吸收半衰期短,吸收率大,是甲基正壬酮的主要吸收部位。鱼腥草挥发油中甲基正壬酮肠吸收属一级动力学过程,吸收方式为被动转运。

关键词 鱼腥草挥发油;甲基正壬酮;外翻肠囊法;在体肠循环灌流法;肠吸收动力学;大鼠
中图分类号 R96 **文献标志码** A

Intestinal absorption dynamics on methyl nonyl ketone in volatile oil from houttuynia cordata

SUN Yu[1], WANG Jian[2], XIAO Xue-feng[1]
(1.Department of Pharmacy, Baokang Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Department of Pharmacy, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China)

Abstract **Objective:** To investigate absorption on methyl nonyl ketone of the volatile oil in houttuynia cordata in small intestine of rats. **Methods:** The absorption pattern and channel on methyl nonyl ketone of the volatile oil from houttuynia cordata were determined by using reverted gut sac method and body circulatory perfusion technique. **Results:** In reverted gut sac test, the absorption rate of methyl nonyl ketone in ileum was the highest, with 87.39% in 4 h; linear regression coefficient correlations of logC and t exceed 0.9 for duodenum, jejunum and ileum. The result from body circulatory perfusion technique showed the maximum absorptivities of Methyl nonyl ketone in the intestine was respectively 72.35% and the absorption was 7.5 h. **Conclusion:** In the ileum, the absorption is the shortest and the absorptivity is highest, which is considered to be essential part for small intestine absorption. The aborption process on methyl nonyl ketone of the volatile oil in houttuynia cordata conforms to the first-order kinetics and passive transport mechanism.

Key words volatile oil from houttuynia cordata; methyl nonyl ketone; everted gut sac; body circulatory perfusion technique; intestinal absorption dynamics; rat

鱼腥草始载于《名医别录》,为三白草科植物蕺菜(Houttuynia cordata Thunb.)的新鲜全草或干燥地上部分,味辛,微寒,归肺经,历代本草文献记载其"以清解肺热见长,为治肺痈之要药";具有清热解毒、利尿通淋、消痈排脓之功效,主要用于治疗痰热喘咳、肺痈吐脓等[1]。现代药理实验表明,鱼腥草具有抗菌、抗病毒、利尿、提高机体免疫力等作用[2]。甲基正壬酮作为其挥发油中的主要有效成分,性质稳定,是主要的抗菌、抗病毒成分之一,故可作为鱼腥草各种制剂含量检测的指标性成分[3]。本实验在确定鱼腥草挥发油在家兔静注给药后体内吸收过程及其在小鼠灌胃后体内吸收和组织分布过程的基础上,采用大鼠离体外翻肠囊法和在体肠循环灌流法对鱼腥草挥发油中甲基正壬酮的肠吸收动力学进行研究,以判断甲基正壬酮的吸收方式和途径,从而对鱼腥草药材的进一步开发提供肠吸收动力学依据。

作者简介 孙瑜(1979-),女,主管中药师,博士在读,研究方向:药代动力学、药理学;通信作者:王健,E-mail: kingdom_80@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠,雌雄兼有,体质量200~300 g,购自中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心。

1.1.2 实验仪器 安捷伦气相色谱仪(型号:Agilent6820),QA-QC工作站,氢火焰离子检测器;恒流泵(型号:HL-2,上海市沪西仪器厂);氮吹仪(型号:N-EVAPTM111O,Organomation Associates,Jnc. 266 River Road West Berlin,MA01503.U.S.A.);高速离心机(型号:LG10-2.4A,北京医用离心机厂);电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);微型漩涡混合仪(型号:XW-80A,上海沪西分析仪器厂)。

1.1.3 实验药品 氯化钠(分析纯,天津化学试剂六厂),氯化钾(分析纯,天津化学试剂五厂),磷酸二氢钾(分析纯,天津市北方化玻购销中心),氯化钙(分析纯,天津市塘沽邓仲化工厂),硫酸镁(分析纯,天津化学试剂一厂),碳酸氢钠(分析纯,北京化工厂),Glucose BSA(北京鼎国生物技术科技有限责任公司),对照品:甲基正壬酮(中国药品生物制品检定所,批号:0834-9501),气相色谱参比物:正十五烷(分析纯,天津市化学试剂二厂色谱技术开发公司),无水乙醇、正己烷(分析纯,天津市北方天医化学试剂厂),氧气(纯度>98%),鱼腥草挥发油购自安舜大药房(产地:湖北,批号:050412)。

大鼠离体肠肌营养液 KRBB 的配制[4-5]:129 mmol/L NaCl,4.7 mmol/L KCl,1.2 mmol/L KH_2PO_4,2.5 mmol/L $CaCl_2$,1.2 mmol/L $MgSO_4$,5.0 mmol/L $NaHCO_3$,3 mmol/L Glucose,BSA (牛血清白蛋白)0.1%, 调节 pH7.4(大鼠离体肠肌营养液 KRBB 需当天配制)。

大鼠在体肠循环灌流液的配制:精密称取鱼腥草挥发油适量,加入一定量 2%吐温-80,制成乳液;取鱼腥草挥发油乳液适量,用标准 KRBB 空白营养液稀释至一定浓度,于 37 ℃水浴中保温备用。实验时液体均当天配制。

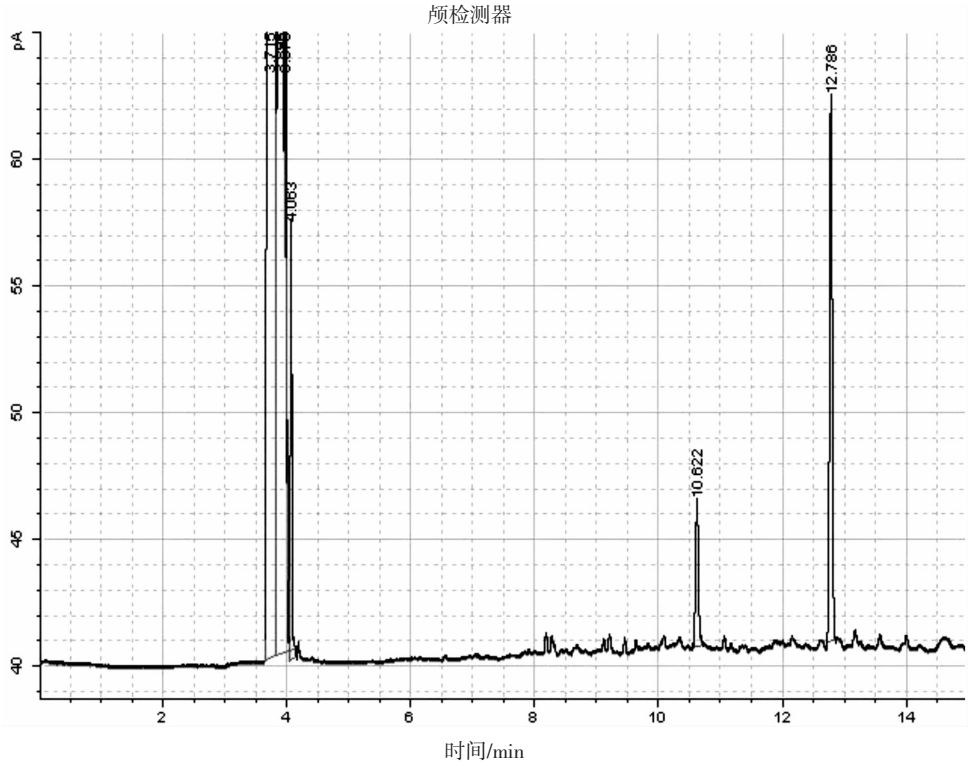
鱼腥草挥发油的提取:参照中国药典 2010 年版一部附录 XD 挥发油测定法,以水蒸气蒸馏法提取鱼腥草药材中的挥发油,产率为 0.14%。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件[6-7] 毛细管色谱柱(型号:SPB-5;内径:0.32 mm;长度:30 m;涂膜厚:0.25 μm);进样口温度:250 ℃;FID 检测温度:300 ℃;程序升温:初始温度 90 ℃, 以 10 ℃/min 升温至 190 ℃后保持 5 min;柱头压:55.2 kPa;载气:氮气;无分流进样;进样量:5.0 μL;内标物:正十五烷;溶剂:正己烷。

1.2.2 样品预处理 分别于不同时间点,采集肠囊内外营养液各 0.5 mL 于离心管中,加入适量正十五烷无水乙醇溶液和 4.0 mL 正己烷, 漩涡混合 5 min 后以 5 000 r/min 离心 10 min。吸取正己烷层,氮吹仪常温吹干,100.0 μL 无水乙醇复溶,进样 5.0 μL,见图 1。

1.2.3 外翻肠囊的制备[8] 选取健康合格 SD 大鼠,脱颈处死,开腹腔,迅速取不同部位肠段(十二指肠、空肠、回肠),去除系膜,用 37 ℃的肠营养液洗净,剪取 5 cm 一段,结扎一端,用圆头玻棒小心将肠段翻转使肠黏膜层在外,浆膜层在内,放入营养液中洗净,滤纸吸干黏膜表面液体,肠囊放入取样套筒后扎紧,肠囊内充盈 3 mL 营养液,放入 50 mL 浴槽中,通入 98%氧气,置水浴锅中 37 ℃保温,浴槽营养液中加入鱼腥草挥发油乳液(以 2%吐温-80 配制), 使黏膜层的鱼腥草挥发油浓度为 2.0 mg/mL。



甲基正壬酮保留时间:10.622 min 正十五烷保留时间:12.786 min

图 1 甲基正壬酮及正十五烷在营养液中的气相色谱图

Fig 1 GC chromatogram of methyl nonyl ketone and n-pen tadecane in KRBB

于不同时间点，通过采样套筒采集肠囊内营养液，测定鱼腥草挥发油中甲基正壬酮含量。

吸收量=肠囊内药液浓度

$$吸收率=\frac{肠囊内药液浓度}{浴槽中药物浓度}\times 100\%$$

1.2.4　大鼠在体肠循环灌流法的建立[9]　选取健康合格 SD 大鼠,实验前禁食不禁水 12 h,用 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,背位固定于小动物手术台上,沿腹中线打开腹腔,在需要考察的部位两端剪切后插管、结扎。灌流前先用空白循环液冲洗肠道 10 min,然后用空气排空水分后,用含药灌流液平衡 2 h。灌流时灌流液经磁力恒温搅拌器在线混合,分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0 h 记录药液体积,测定循环液药物浓度,并同时补加等量 37 ℃空白循环液,分析药物的吸收情况。按下列公式对数据进行处理,获得甲基正壬酮大鼠小肠的吸收动力学参数:

以剩余药量的对数对取样时间进行线性回归,斜率即为吸收速率常数 $Ka(h^{-1})$。

$$吸收半衰期\ T_{1/2}=\frac{0.693}{Ka(h^{-1})}$$

$$每小时吸收分数=\frac{初始药物量/终末药物量}{初始药物量}/时间(h)$$

$$药物表观渗透系数=\frac{Ka}{A(小肠面积\ cm^2)}/时间(3\ 600\ s)$$

$$最大吸收率(\%)=\frac{初始药物量/终末药物量}{初始药物量}\times 100\%$$

1.3　方法学考察

1.3.1　标准曲线　取空白营养液 0.5 mL,加入不同量甲基正壬酮对照品无水乙醇溶液,配制成含 0.2、5.0、50.0、100.0、500.0、1 000.0、2 000.0 μg/mL 的甲基正壬酮溶液,按 1.2.2 项下样品预处理方法操作。以对照品甲基正壬酮与内标物正十五烷的峰面积比(Y)对甲基正壬酮的浓度(C)作图。结果:甲基正壬酮在 0.2~2 000.0 μg/mL 内线性关系良好,回归方程为 Y=0.004 111 21C+0.013 411 4(n=7,r=0.998 33)。

1.3.2　精密度试验　用空白营养液将甲基正壬酮对照品分别稀释成 50.0、100.0、500.0 μg/mL,各浓度分别测定 5 次,记录峰面积,计算精密度,结果RSD值分别为 1.58%、1.54%和 1.47%,均小于 2.0%。

1.3.3 准确度试验 用空白营养液配制 50.0、100.0、500.0 μg/mL 的甲基正壬酮样品溶液,按上述色谱条件进行测定，计算相对回收率分别为 85.24%、91.60%和 97.36%，准确度均在 80%~100%之间,符合药物临床前药动学研究指导原则要求。

1.3.4　提取回收率　按 1.2.2 项下样品预处理方法，配制 50.0、100.0、500.0 μg/mL 的甲基正壬酮样品,各 5 份;测定结果以甲基正壬酮对照品溶液为标准计算提取回收率均大于 70%,RSD 值均小于 2.0%,见表 1。

表 1　甲基正壬酮在营养液中的提取回收率($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab 1　Absolute recovery of Methyl nonyl ketone in KRBB($\bar{x}\pm s$,n=5)

加入量/(μg/mL)	测得量/(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
51.900	44.241±0.699	75.27±0.015	1.96
103.800	95.082±1.465	85.92±0.016	1.84
519.000	505.290±7.428	93.15±0.010	1.04

1.3.5　鱼腥草挥发油在空白营养液中的稳定性考察　精密称取鱼腥草挥发油适量，加入一定量 2%吐温-80 制成乳液后,取鱼腥草挥发油乳液适量,用空白营养液稀释至实验浓度，置 37 ℃水浴中保温,分别于 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 取样测定;另同法配制两份置-20 ℃冰箱保存，分别于第 1、2 天取样测定。结果 RSD 值为 2.57%,稳定性良好。

2　结果

2.1　大鼠离体肠吸收动力学实验结果　在制备好的外翻肠囊内,于不同时间点通过采样套筒采集肠囊内营养液,测定甲基正壬酮含量,计算吸收量及吸收率,结果见表 2~4。

表 2　十二指肠中甲基正壬酮的吸收测定结果($\bar{x}\pm s$,n=4)

Tab 2　Absorption of Methyl nonyl ketone in duodenum($\bar{x}\pm s$,n=4)

取样时间/h	吸收量/(μg/mL)	吸收率/%
1.0	22.499±0.561	10.55±0.003
2.0	32.322±1.552	15.74±0.007
3.0	43.315±1.619	24.97±0.009
4.0	53.455±1.944	39.27±0.014

表 3　空肠中甲基正壬酮的吸收测定结果($\bar{x}\pm s$,n=4)

Tab 3　Absorption of Methyl nonyl ketone in jejunum($\bar{x}\pm s$,n=4)

取样时/h	吸收量/(μg/mL)	吸收率/%
1.0	30.082±1.358	14.02±0.006
2.0	41.926±1.436	22.84±0.008
3.0	60.840±0.841	47.44±0.005
4.0	77.286±1.245	68.57±0.018

表 4　回肠中甲基正壬酮的吸收测定结果($\bar{x}\pm s$,n=4)

Tab 4　Absorption of Methyl nonyl ketone in ileum($\bar{x}\pm s$,n=4)

取样时间/h	吸收量/(μg/mL)	吸收率/%
1.0	33.507±1.334	16.42±0.007
2.0	46.178±1.388	26.19±0.008
3.0	62.781±1.360	54.81±0.015
4.0	83.981±0.787	87.39±0.013

以十二指肠、空肠、回肠内药液浓度的对数对取样时间 t 做线性回归,可求得各肠段的回归方程:

十二指肠：Y=0.125 5X + 1.242 9，R^2 = 0.986 3

空肠：Y=0.139 1X +1.345 5，R^2 = 0.992 9

回肠：Y=0.133 1X+1.395 3，R^2 = 0.999 5

2.2 大鼠在体肠循环灌流法实验结果 将含鱼腥草挥发油的循环灌流液经大鼠小肠循环灌流6 h，于不同时间记录循环灌流液的剩余体积，取样测定循环灌流液中剩余的药量及现存药量，结果见表5、图2。

表5 甲基正壬酮大鼠小肠灌流结果($\bar{x}\pm s$，n=6)

Tab 5 The perfusion result of Methyl nonyl ketone in rat intestine ($\bar{x}\pm s$，n=6)

取样时间/h	现存药量/mg	剩余药量/mg	Log剩余药量
0.0	19.585±0.064	19.585±0.064	1.292±0.001
0.5	17.184±0.091	18.045±0.915	1.256±0.022
1.0	15.069±0.158	15.330±0.081	1.186±0.002
1.5	14.186±0.069	14.480±0.052	1.161±0.002
2.0	13.176±0.082	13.455±0.087	1.129±0.003
2.5	11.451±0.075	11.779±0.076	1.071±0.003
3.0	10.188±0.150	10.879±0.061	1.037±0.002
4.0	8.061±0.053	8.487±0.077	0.929±0.004
5.0	6.362±0.065	6.833±0.096	0.835±0.006
6.0	5.088±0.068	5.415±0.054	0.734±0.004

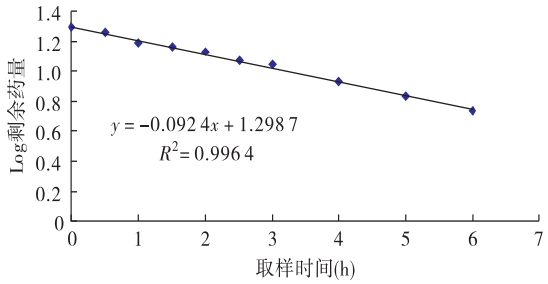


图2 甲基正壬酮大鼠小肠灌流液剩余药量-时间曲线(n=6)

Fig 2 The perfusion remaining dosage-time curve of Methyl nonyl ketone in rat intestine(n=6)

以剩余药量的对数对取样时间进行线性回归，进而计算出甲基正壬酮大鼠小肠吸收动力学参数。见表6。

表6 鱼腥草挥发油中甲基正壬酮肠吸收动力学参数

Tab 6 Intestinal absorption dynamic parameters of Methyl nonyl ketone of volatile oil from Houttuynia cordata in rat

吸收动力学参数	数值
Ka/h^{-1}	0.092 4
$T_{1/2}$/h	7.50
每小时吸收分数	0.120 6
最大吸收率/%	72.35
渗透系数(Papp)	3.19×10^{-7}

3 讨论

鱼腥草作为清热解毒的良药，被国家卫生部正式确定为“既是药品，又是食品”的资源之一，极具开发潜力。近年来，随着鱼腥草在临床上的大量应用，其不良反应的报道也日渐增多。中药肠吸收动力学的研究方法大致分为体外实验法、在体实验法和体内实验法3种[10]。本实验是在确定鱼腥草挥发油在家兔静注给药后体内吸收过程及其在小鼠灌胃后体内吸收和组织分布过程的基础上，采用大鼠离体外翻肠囊法和在体肠循环灌流法对鱼腥草挥发油中甲基正壬酮的肠吸收动力学进行了进一步深入研究，以说明鱼腥草挥发油在各生物体内的吸收和分布过程，从而对鱼腥草药材的二次开发提供药代动力学依据。由于鱼腥草挥发油不易溶于营养液，我们参考相关文献[11]，先将鱼腥草挥发油溶于2%吐温-80中，再将其与营养液混溶，从而大大增加其溶解度。兼顾药效学试验有效剂量及仪器检测灵敏度，我们按大鼠灌胃鱼腥草挥发油的1/10给药，最后确定药液浓度为2 mg/mL。

离体外翻肠囊法实验中，相对于十二指肠和空肠，回肠的吸收半衰期短，吸收率大，是甲基正壬酮的主要吸收部位，4 h吸收率达87.39%；十二指肠、空肠、回肠内药液浓度的对数logC与取样时间t的线性回归方程的相关系数均大于0.9，表明鱼腥草挥发油中甲基正壬酮肠吸收属一级动力学过程，吸收方式为被动转运。在体肠循环灌流法研究结果表明，甲基正壬酮在大鼠小肠的最大吸收率为72.35%，吸收速率常数为0.092 4 h^{-1}，每小时吸收分数为0.120 6，吸收半衰期为7.50 h。

参考文献：

[1] 陈婧, 方建国, 吴方建, 等. 鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(2): 284

[2] 李娟, 邵慧, 钟正灵, 等. 鱼腥草抗菌作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(12): 1427

[3] 杨立新, 张永欣, 易红, 等. 气相色谱-质谱法测定鱼腥草挥发油中甲基正壬酮含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1987

[4] 储晓岩, 陈济民. γ-亚麻酸甲酯乳剂小肠吸收动力学研究[J]. 沈阳药学院学报, 1994, 11(1): 5

[5] 陈金佩, 汪珊珊, 汪电雷, 等. 新藤黄酸大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(2): 166

[6] 于健东, 胡玉霞, 田金改. 鱼腥草中甲基正壬酮的含量测定[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 50

[7] 高静, 周日宝, 童巧珍, 等. GC法测定鱼腥草中甲基正壬酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(5): 561

[8] 唐晓荞, 杨祥良. 灯盏花素磷脂复合物改善大鼠小肠吸收的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 222

[9] 李沉纹, 罗明和, 李卓恒, 等. 牛蒡子苷大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中草药, 2013, 44(6): 727

[10] 朱容慧, 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

[11] 魏立平, 吴玫涵. β-细辛醚及石菖蒲挥发油中β-细辛醚在家兔体内的药代动力学[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(15): 1431

(2014-05-30收稿)