

王庆容,徐晓舒,王林先.五倍子鞣质在猪体内的药代动力学研究[J].江苏农业科学,2019,47(3):138-143.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.035

# 五倍子鞣质在猪体内的药代动力学研究

王庆容,徐晓舒,王林先

(遵义师范学院生物与农业科技学院,贵州遵义 563006)

**摘要:**研究中草药复合饲料中五倍子鞣质在猪体内的药代动力学特征和残留规律,以期进行更加有效的疾病防治和得出明确的禁药期。采用含有五倍子的中草药复合饲料 1 和复合饲料 2 饲喂猪,分别于 0、4、8、12、24、48、96 h 后取血液、肝脏、肾脏、胃、小肠、脑等组织,用高效液相色谱检测各组织中没食子酸的含量。在猪的血液、肝脏、肾脏、胃、小肠、脑等组织中,4、8、12、24、48 h 后均检测到了没食子酸,但在 96 h 后几乎检测不到没食子酸,结果表明,没食子酸在 96 h 后已基本代谢完毕。

**关键词:**没食子酸;高效液相色谱;药代动力学

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0138-05

五倍子是我国传统的中药,其有效成分能凝固微生物体内的原生质及多种酶,具有抗菌、抗病毒、清除自由基和抗氧化等作用。五倍子作为传统中药,有解毒、止血、敛疮、涩肠、敛肺、止汗之功效;按其药理还有抑突变、癌化学预防等作用<sup>[1]</sup>。五倍子在我国四川、贵州、陕西、云南、湖南、湖北 6 省产量较高,占全国总产量的 90% 以上,另外,河南、甘肃、广东、浙江、安徽、福建、江西、山西等地亦产<sup>[2]</sup>。

鞣质为五倍子的主要成分,含量可达 60%~70%,它是葡萄糖上的羟基与没食子酸所形成的酯类化合物的混合物<sup>[3]</sup>。鞣质是一类混合物,在酸性条件下,鞣质可水解成没食子酸,两者成正比关系,通过测定其中的没食子酸含量,可反映鞣质的多少<sup>[4]</sup>。没食子酸是白色或微黄色针状晶体,常温时(25℃)微溶于水,易溶于沸水、乙醚、丙酮等,不溶于三氯甲烷、苯等有机溶剂<sup>[5]</sup>。没食子酸具有强还原性,遇空气中的氧变成褐色,还可与蛋白质、凝胶、重金属、生物碱等结合。它是植物体中一类次生代谢产物,以游离酸或形成酯类化合物的形式存在于五倍子、茶、没食子等植物中,属于低毒物质。经由没食子酸生成的没食子酸丙酯、次没食子酸铋等多种衍生物,可用于食品、制药及轻工行业<sup>[6]</sup>。

在检测药物含量的众多方法中,高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)是有效的方法之一,它具有简便、快速、灵敏度高、专一性强和重复性好的优点,应用非常广泛。因此,利用高效液相色谱法对猪各组织中不同时段没食子酸含量进行检测,观察其代谢动态变化过程,可以为养殖业以及中草药复合饲料的生产、安全使用和推广提供理论参考。

收稿日期:2017-10-09

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合 NZ[2013]3027);贵州省教育厅“125 计划”重大科技专项(编号:黔教合重大专项字[2013]025)。

作者简介:王庆容(1972—),女,贵州遵义人,硕士,教授,主要从事动物分子生物学教学与科研、养殖动物疾病的中草药防治工作。

E-mail:610194977@qq.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将黄连、五倍子、姜、石菖蒲、紫苏、连翘、黄芩等中草药按一定比例混合,按 1% 的质量分数添加到普通饲料中混合成中草药复合饲料 1(用 F<sub>1</sub> 表示),按 2% 的比例添加到普通饲料中混合成中草药复合饲料 2(用 F<sub>2</sub> 表示),于 2016 年春季在遵义市沙湾镇尚窝沟养殖场选择 30 头质量约为 50 kg 的(长白)猪,随机分为 2 组,先用普通饲料饲喂 15 d。禁食 12 h,不禁水。之后分别饲喂中草药复合饲料 1 和中草药复合饲料 2 各 1 次,在此期间禁食不禁水。24 h 后全部转为饲喂普通饲料。从饲喂复合饲料开始,分别于 0、4、8、12、24、48、96 h 后每组随机选择 1 头猪屠宰,取血液、肝脏、肾脏、胃、小肠、脑等组织,放入液氮中运回实验室,保存在-80℃的冰箱中备用。

### 1.2 仪器与试剂

主要仪器:岛津高效液相色谱仪(LC-20A)、恒温柱箱、自动进样器、超声波清洗机(SB-120D,宁波新芝生物科技股份有限公司)、AR2224CN 电子分析天平、循环水真空泵(SH2-ⅢD,上海亚荣生化仪器厂)、旋转蒸发仪(RE52CS-1,上海亚荣生化仪器厂)、容量瓶、微量移液器、研钵、0.22 μm 滤膜。主要试剂:甲醇(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂)、乙醚、没食子酸标准品(南通飞宇生物制备,供含量测定用)、纯水和超纯水(密理博超纯水器)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 色谱条件** 根据盛达成等的色谱条件进行改良<sup>[7]</sup>,将有机相换为甲醇,流动相设为甲醇、水(体积比为 80:20)。色谱柱为 InertSustain C<sub>18</sub>/phenylhexyl 柱(5 μm,250 mm×4.6 mm),检测波长为 254 nm,泵 A 流速为 0.20 mL/min,泵 B 流速为 0.80 mL/min,柱温为 25℃,进样体积为 20 μL。

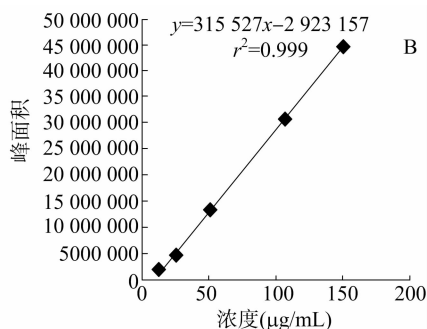
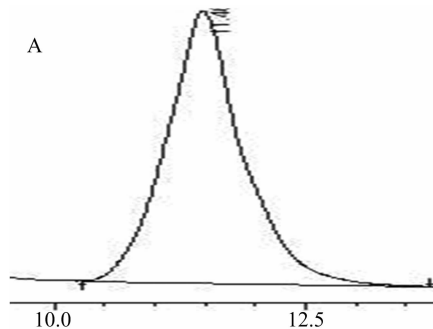
**1.3.2 样品的制备** 分别称取各个组织 2 mg,加入 20 mL 甲醇和 1 mL 乙醚充分研磨后,浸泡 2 h,超声抽提 30 min<sup>[8]</sup>,最后将研磨液于 12 000 r/min 离心 15 min,离心后吸取上清液,即得样品,将提取好的样品放入 4℃ 冰箱保存,待测。

1.3.3 标准品的制备 标准品的制备参照杜瑞莲等的方法<sup>[4]</sup>,称取没食子酸标准品 4.15 mg 于 20 mL 容量瓶中,加入 50% 甲醇溶解稀释并定容,摇匀,配制成浓度为 215  $\mu\text{g/mL}$  的没食子酸母液,放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中待用。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制备

吸取浓度为 215  $\mu\text{g/mL}$  的标准品溶液 0.6、1.2、2.4、5.



A—标准曲线峰图, B—标准曲线图。y 为峰面积, x 为标准品浓度

图1 没食子酸的标准曲线峰图及标准曲线

### 2.2 样品检测的色谱图

将制备好的各个样品溶液,经 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤到进样瓶中,按上述“1.3.1”节的色谱条件用 HPLC 法进行检测分析,得出各组织中没食子酸的峰分离情况良好,各个组织中五倍子鞣质保留时间均为 10 ~ 12 min,与没食子酸标准品曲线的保留时间大致相同,符合定性分析的要求,所以用高效液相色谱法能够准确地测出猪体内五倍子鞣质的含量。用上述试验过程对各组织进行处理,重复测定 3 次,流动相色谱峰的峰形及结果的重现性均很好, *RSD* 值均不超过 5%,符合没食子酸代谢的特点,在不同组织中的代谢色谱结果见图 2。将 3 次测定的各图峰面积平均值代入回归方程中,得到没食子酸的含量见表 1、表 2。

2.2.1 没食子酸在不同组织中的代谢状况 0 h 时,各个组织都没有检测到没食子酸,说明普通饲料中没有没食子酸或含有能分解没食子酸的物质。在血液中,4 ~ 12 h 后没食子酸的含量逐渐增多,在 12 h 时达到吸收高峰,48 h 后血液中的没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在肝脏中,4 ~ 8 h 后没食子酸的含量逐渐增多,8 h 时达到高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在胃中,4 ~ 8 h 后没食子酸的含量逐渐增多,8 h 时达到高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在肾脏中,4 ~ 12 h 后没食子酸的含量逐渐增多,在 12 h 时达到高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在小肠中,4 ~ 12 h 时肠壁中没食子酸的含量逐渐增多,在 12 h 时达到高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在脑中,4 ~ 12 h 时没食子酸的含量逐渐增多,在 12 h 时达到吸收高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到(图 3 - A)。在 96 h 后,各组织中几乎检测不到没食子酸,说明此时没食子酸在猪体内基本代谢完毕。比较图 3 - A 和 3 - B,没食子酸的代谢曲线基本一致,说明猪对没食子酸的吸收是比较恒定的,与饲料中没食子酸含量不成正比关系,饲料中过多

0.7、0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释定容,得到浓度分别为 12.9、25.8、51.6、107.5、150.5  $\mu\text{g/mL}$  的标准液,用 HPLC 法进行检测分析。以峰面积(y)对浓度(x)进行统计回归,得到回归方程为  $y = 315\,527x - 2\,923\,157$ ,  $r^2 = 0.999$ , *RSD* (相对标准偏差, relative standard deviation) = 0.82% ( $n = 5$ ),没食子酸在 12.0 ~ 200.0  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好,详见图 1。

的没食子酸可能随粪便或尿液排出体外,但本研究没有对粪便或尿液进行没食子酸含量的检测。

2.2.2 没食子酸在不同时段的代谢状况 没食子酸在猪体内不同时间段的代谢状况如下:在 4 ~ 12 h 时,在肝脏中的含量最高,在血液中的含量最低;在 24 h 时,  $F_1$  在肝脏中的含量最高,  $F_2$  在肾脏中的含量最高,血液中的含量最低;在 48 h 时,在肾脏中的含量最高,血液中的含量最低(图 4 - A 和 4 - B)。

## 3 讨论

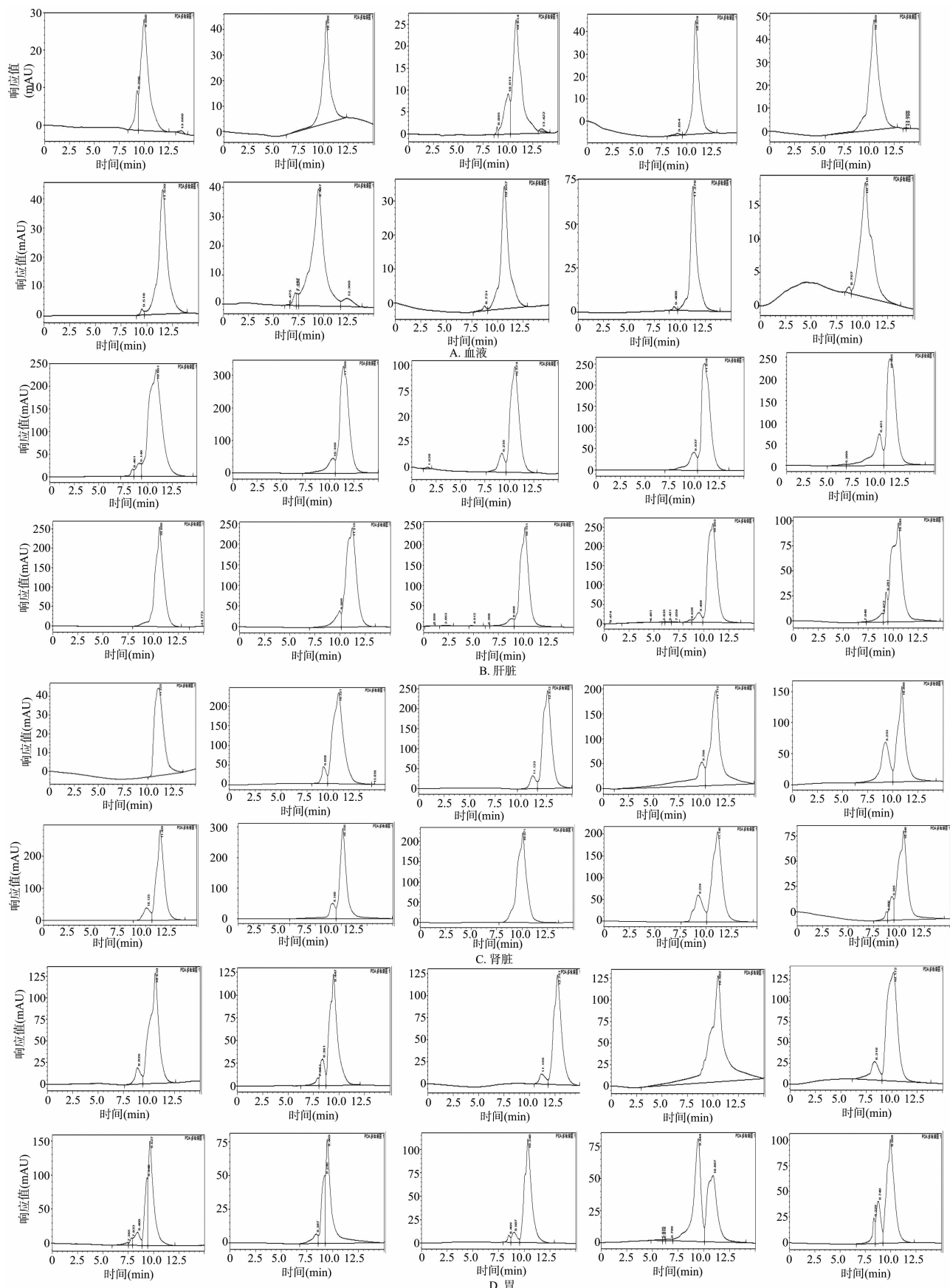
### 3.1 没食子酸在不同组织中的代谢状况

在血液、肾脏、肠壁、脑中,4 ~ 12 h 后没食子酸的含量逐渐增多,在 12 h 时达到吸收的高峰,48 h 后血液中没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到;在肝脏和胃中,4 ~ 8 h 没食子酸的含量逐渐增多,8 h 时达到高峰,48 h 后没食子酸的含量变得很低,96 h 后未检测到,详见图 3 - A 和 3 - B。在 96 h 时,几乎检测不到没食子酸,说明此时没食子酸在猪体内基本代谢完毕。

### 3.2 没食子酸在不同时段中的代谢状况

在 4、8、12 h 时,没食子酸在肝脏中的含量最高,在血液中的含量最低。在 24 h 时,  $F_1$  在肝脏中的含量最高,在血液中的含量最低;  $F_2$  在肾脏中的含量最高,在血液中的含量最低。在 48 h 时,没食子酸在肾脏中的含量最高,在血液中的含量最低,此时没食子酸在肾脏中的含量最高是因为没有代谢完的没食子酸要通过肾脏排出体外,详见图 4 - A 和 4 - B。

综上所述,猪在饲喂  $F_1$  和  $F_2$  饲料后,没食子酸在血液中的含量最少,可能是因为没食子酸微溶于水,难于被吸收进入血液中。金石等分析大鼠血浆中儿茶素主要代谢产物没食子酸含量,认为茶多酚中儿茶素在血浆中仅有少量的代谢产物没食子酸,可能由于儿茶素极性极强,水溶性高,难于被吸收进入血液,因此代谢产物也比较少<sup>[9]</sup>,本研究结果与之相似。



各个组织中第1行的5个图从左到右分别为饲喂复合饲料1后4、8、12、24、48 h的色谱结果,第2行的5个图从左到右分别为饲喂复合饲料2后4、8、12、24、48 h的色谱结果

图2 没食子酸在不同组织中代谢的色谱



表1 复合饲料1中没食子酸在各组织中的代谢

组织	类别	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	96 h
血	面积(平均值)	0	1 686 842	2 050 358	3 304 038	2 029 936	1 304 962	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.21	1.3	1.9	4.2	0.6	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	14.61	15.76	19.73	15.70	13.40	0
小肠	面积(平均值)	0	5 438 077	6 090 395	6 677 768	5 842 107	3 156 345	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.16	2.2	2.8	1.4	4.3	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	26.50	28.57	30.43	27.78	19.27	0
胃	面积(平均值)	0	5 593 446	6 457 659	7 919 887	6 634 088	3 001 554	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.20	2.4	1.3	3.0	1.0	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	26.99	29.73	34.36	30.29	18.78	0
肝	面积(平均值)	0	14 968 446	17 092 738	16 046 886	14 213 332	7 175 121	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.16	0.80	1.5	1.7	1.0	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	56.70	63.44	60.12	54.31	32.00	0
肾	面积(平均值)	0	10 872 246	16 515 939	14 420 599	12 848 532	8 119 918	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.17	3.4	1.8	2.3	1.9	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	43.72	61.61	54.97	49.98	35.00	0
脑	面积(平均值)	0	4 279 697	6 480 677	9 583 523	6 777 889	4 124 493	0
	<i>RSD</i> (%)	0	0.17	0.18	1.4	3.9	2.6	0
	含量( $\mu\text{g/mL}$ )	0	22.83	29.80	39.64	30.75	22.34	0

## 4 结论

中草药具有天然、高效、毒副作用少、资源丰富等优点,含有与动物免疫功能密切相关的生物碱、多糖、皂苷、萜醌类、挥

发油和有机酸等<sup>[10]</sup>。五倍子是具有很高的实用价值和经济价值的林产品,它是产生单宁酸、没食子酸、焦性没食子酸、药用鞣质等一系列化工产品的主要原料。这些化工原料用在医药工业中,能够生产多种药物。鞣质具有与抗菌素相等的抑

表 2 复合饲料 2 中没食子酸在各组织中的代谢

组织	类别	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	96 h
血	面积(平均值)	0	2 579 957	3 290 095	3 423 479	2 148 898	1 517 641	0
	RSD(%)	0	0.14	1.6	1.3	1.1	2.5	0
	含量(μg/mL)	0	17.44	19.69	20.11	16.07	14.07	0
小肠	面积(平均值)	0	11 288 189	11 825 206	14 293 367	9 450 060	5 486 640	0
	RSD(%)	0	0.14	3.7	2.5	1.3	0.46	0
	含量(μg/mL)	0	45.04	46.74	54.56	39.21	26.65	0
胃	面积(平均值)	0	3 522 815	5 360 899	6 448 607	5 244 952	3 600 964	0
	RSD(%)	0	0.13	3.5	1.2	1.8	4.1	0
	含量(μg/mL)	0	20.43	26.25	29.70	25.89	20.68	0
肝	面积(平均值)	0	15 479 091	21 966 925	21 627 983	13 501 540	6 942 794	0
	RSD(%)	0	0.23	1.4	2.1	1.7	0.82	0
	含量(μg/mL)	0	58.32	78.89	77.81	52.05	31.27	0
肾	面积(平均值)	0	13 209 312	14 297 828	14 254 413	13 698 301	7 323 958	0
	RSD(%)	0	0.25	0.58	1.2	2	1.5	0
	含量(μg/mL)	0	51.13	54.58	54.44	52.68	32.48	0
脑	面积(平均值)	0	7 009 314	8 759 576	10 071 769	7 096 957	4 478 107	0
	RSD(%)	0	0.3	1.4	1.7	1.1	0.93	0
	含量(μg/mL)	0	31.48	37.03	41.18	31.76	23.46	0

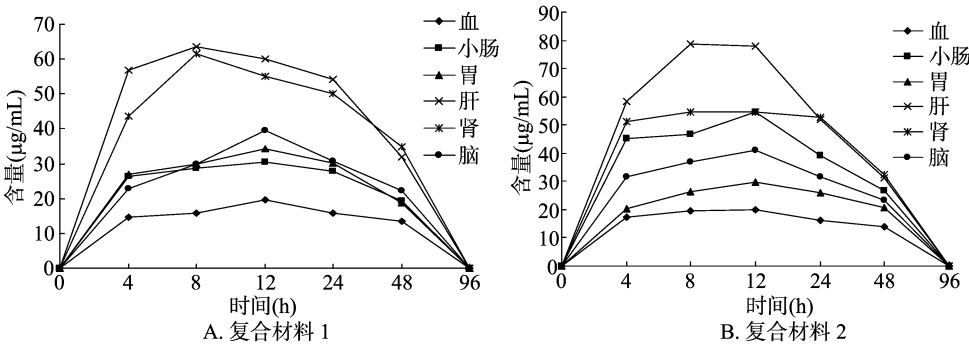


图3 没食子酸在不同组织中的代谢情况

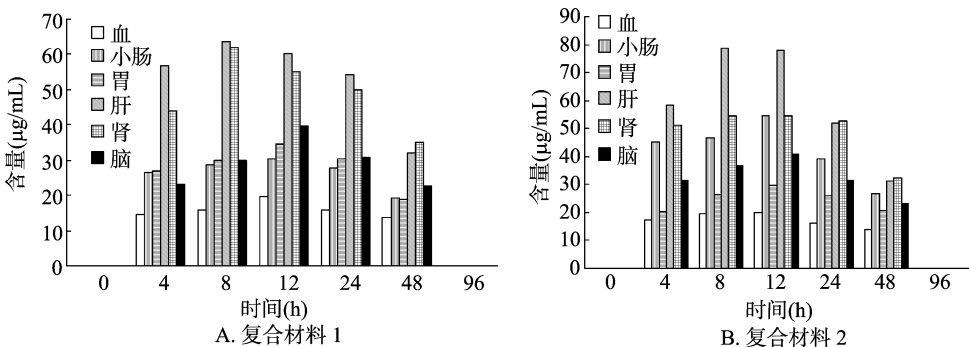


图4 没食子酸在猪体内不同时间的代谢情况

制细菌的作用,同蛋白质络合能制成鞣酸蛋白,治疗肠道急性病症<sup>[11]</sup>。在饲喂中兽药复合饲料 4、8、12、24、48 h 时,都检测到了五倍子鞣质;在 96 h 时,几乎检测不到没食子酸,说明此时没食子酸在猪的体内已经代谢完毕,试验结果表明,禁药期是 96 h。

通过饲喂中兽药复合饲料后,在猪的各个器官中都检测到了没食子酸,其中肝脏含量最高。肝脏除了分泌胆汁、储存动物淀粉、调节蛋白、脂肪和碳水化合物化合物的新陈代谢以外,还有解毒、造血和凝血的作用,肝脏还是最大的解毒器官,而

五倍子也有解毒、止血的功效,这就增大了肝脏解毒功效,使猪的抵抗力提高,从而有效防止疾病的发生。而在我国五倍子分布较广,原料丰富,容易获得,这无疑为养殖业带来了很大的便利。

影响五倍子鞣质被猪体内组织吸收的因素还有很多,如能吃多少饲料、猪的体质及其代谢速率情况、水的 pH 值、操作过程和药品、试验仪器误差等皆是影响本试验结果的因素,给本试验带来极大的困难,进一步的成分系统分析鉴定和比较有待深入进行。

姜兴荣,李 冰,孙继超,等. 添加防腐剂的五氯柳胺混悬液抑菌效力的检测与评价[J]. 江苏农业科学,2019,47(3):143-145.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.036

# 添加防腐剂的五氯柳胺混悬液抑菌效力的检测与评价

姜兴荣,李 冰,孙继超,王玮玮,张吉丽,张继瑜

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,甘肃兰州 730050)

**摘要:**为了比较添加防腐剂的五氯柳胺混悬液与未添加此类防腐剂的五氯柳胺混悬液的抑菌效力,探讨其防腐剂添加的合理性及必要性,选取未添加防腐剂和原药、未添加防腐剂、添加防腐剂的制剂,采用《中华人民共和国药典》2015 版四部 1121 抑菌效力检查法,以铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种菌株对其进行抑菌效力测定。结果表明:添加防腐剂的五氯柳胺混悬液均达到《中华人民共和国药典》2015 版抑菌效力标准;不添加防腐剂的未能达到抑菌效力标准。可见五氯柳胺混悬液中防腐剂的添加是合理的,不含防腐剂的五氯柳胺混悬液可能存在潜在的风险。

**关键词:**五氯柳胺;混悬液;防腐剂;抑菌剂效力;评价

**中图分类号:**S853.74 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)03-0143-03

在国外,五氯柳胺是水杨苯胺类抗寄生虫类药物,对吸虫病具有优良的疗效,主要用于治疗牛羊肝片吸虫病,同时对绦虫和线虫均具有良好的治疗效果。但在国内,五氯柳胺尚无成品制剂上市。本试验对添加防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)的五氯柳胺混悬液的抑菌效力进行了探究。口服制剂在使用过程中容易存在微生物污染问题,《中华人民共和国药典》2015 年版(ChP2015)允许这类产品添加防腐剂,但是过量的防腐剂存在危害,所以对防腐剂的应用进行评价<sup>[1-3]</sup>。本试验针对未添加防腐剂的五氯柳胺(主药)和添加防腐剂的五氯柳胺混悬剂的抑菌效力进行考察,探究其防腐剂添加的合理性。

## 1 试验样品、仪器及试验设计

收稿日期:2018-11-06

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2015BAD1101);国家现代农业产业技术体系专项(编号:CAR-38)。

作者简介:姜兴荣(1994—),男,山东菏泽人,硕士,研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail:Jiangxingcan0908@163.com。

通信作者:张继瑜,研究员,博士生导师,研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail:infzjy@sina.com。

### 1.1 供试品

五氯柳胺混悬液(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所自制),考察其抑菌效力情况。

### 1.2 仪器

隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台、LDZM-60KCS-II 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)、电热恒温鼓风干燥箱、恒温振荡器、优普超纯水制造系统、THOMAS 细胞密度计、比色杯(光径为 10 mm)、KQ3200DE 数控超声波清洗器、BSA423S-CW 天平(sartorius)、烧杯、三角瓶等。

### 1.3 培养基及试剂

胰酪大豆胨液体培养基(TSB)(产品批号:1073051)、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)(产品批号:1073051)、胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)(产品批号:1073191)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)(产品批号:1072401)均来自广东环凯微生物科技有限公司;培养基适用性检查结果符合中华人民共和国药典要求;对羟基苯甲酸甲酯(批号:20180118)和对羟基苯甲酸丙酯(批号:20130830)购自国药集团化学试剂有限公司,氯化钠(批号:L218041910)购自四川科伦药业股份有限公司。

## 参考文献:

- [1]李秀萍,李春远,渠桂荣,等. 五倍子的研究概况[J]. 中医学报,2002,30(3):72-74.
- [2]赵 拉. 五倍子制备没食子酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2008,25(5):5-7.
- [3]林启寿. 中草药化学成分[M]. 北京:科学出版社,1977:168.
- [4]杜瑞莲,杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药,2008,30(6):839-841.
- [5]张雅丽. 五倍子没食子酸的制备,抑菌作用及机理研究[D]. 西安:陕西师范大学,2014.
- [6]张雅丽,李建科,刘 柳,等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食

品工业科技,2013(10):386-390.

- [7]盛达成,陈 凌,王文茂,等. 高效液相色谱法同时分析五倍子提取物中的没食子酸和鞣花酸[J]. 中国农学通报,2013,29(4):148-154.
- [8]李红然,付大友,李艳清,等. 超声微波协同萃取-HPLC 测定五倍子中的没食子酸含量[J]. 化工时刊,2011,25(1):36-38,41.
- [9]金 石,高 梓. 大鼠血浆中儿茶素主要代谢产物没食子酸含量测定[J]. 海峡药学,2011,23(6):41-43.
- [10]程志斌,葛长荣,韩剑众. 中草药有效成分对动物免疫功能的影响及其应用[J]. 动物科学与动物医学,2002,19(1):M1-M3.
- [11]聂秀丽. 发挥我省五倍子资源优势的几个问题[J]. 贵州社会科学,1986(7):41-44.