

麦冬多糖单次静脉注射在大鼠体内组织分布*

卢智玲¹, 冯 怡², 徐德生², 林 晓²

(1. 杭州市药品检验所, 310017; 2 上海中医药大学, 201203)

[摘要] 目的 建立柱前荧光衍生-高效凝胶色谱(HPGPC)法测定大鼠组织样品中麦冬多糖的方法, 并研究麦冬多糖在大鼠体内的分布特点和规律。方法 将SD大鼠单次静脉注射麦冬多糖 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 于5, 10, 30, 60 min取各组织, 用HPGPC法测定药物浓度。结果 大鼠心、肝、脾、肺、胃、肾、脑的AUC分别为3.270, 2.031, 2.303, 6.178, 4.963, 214.571, 0.613 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 绝大多数药物聚集在肾脏, 并以尿的形式排泄, 其他组织中含药量分布顺序从高到低依次为肺、胃、心、脾、肝、脑。

[关键词] 麦冬多糖; 柱前荧光衍生-高效凝胶色谱法; 组织分布; 抗心肌缺血

[中图分类号] R286; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)05-0497-04

Distribution of Polysaccharide MDG-1 after Single Intravenous Dose in Rats

LU Zhi-ling¹, FENG Yi², XU De-sheng², LIN Xiao² (1. Hangzhou Drug Control Institute, Hangzhou 310017, China; 2. Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for measuring polysaccharide MDG-1 from tissues by pre-column FITC labeled-HPGPC and investigating the distribution of it in rat tissues. **Methods** Various tissues were obtained at 5, 10, 30 and 60 min, respectively, after a single intravenous administration of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ polysaccharide MDG-1. The concentration of MDG-1 in samples were subsequently determined by HPGPC. **Results** Most of MDG-1 was readily accumulated in kidneys and excreted in urine. The distribution sequence of different tissues ranking from high to low was lung, stomach, heart, spleen, liver, brain. **Conclusion** MDG-1 could exert anti-myocardial ischemia effects directly on the target organ.

KEY WORDS Polysaccharide MDG-1; Precolumn FITC labeled-HPGPC method; Tissue distribution; Anti-myocardial ischemic activity

国内外有关多糖给药后在体内的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程的报道笔者较少见到, 已报道的多糖包括六味地黄多糖^[1]、银耳多糖^[2]、右旋糖苷^[3]、云芝多糖^[4]等。究其原因, 主要是因为多糖自身无光化学功能团, 分子量在一定范围内变化等特点, 使糖类在生物体内的含量测定比较困难。笔者经多年的前期研究积累, 对麦冬多糖注射液的新药研究已取得阶段性成果。实验前期已成功建立了灵敏度高、专属性强的柱前荧光衍生-高效凝胶色谱(HPGPC)法, 用于分析多糖跨细胞膜样品^[5]。在此基础上, 完全能利用该微量分析方法对麦冬多糖静脉注射给药后各组织分布情况进行研究, 探讨药物在体内的分布特征, 一方面为麦冬多糖注射液的药学研究提供资料, 另一方面也可从药物在靶器官的分布情况来探讨其抗心肌缺血的可能作用机制。

1 材料

1.1 试药 异硫氰酸荧光素衍生多糖 MDG-1 (FITC-

[收稿日期] 2007-09-27

[基金项目] *上海市青年科技启明星计划资助项目(项目编号:07QA14050)

[作者简介] 卢智玲(1977-), 女, 博士, 主管药师, 主要从事中药制剂分析。电话: 0571-86499182, E-mail: luzhiling0212@126.com。

[通讯作者] 林 晓, 男, 博士, 副教授。

MDG-1)(自制, 批号:060621), 三氯乙酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 氢氧化钠(分析纯, 上海试剂四厂), 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4 , 分析纯, 上海新华化工厂), 磷酸氢二钠(NaH_2PO_4 , 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 三蒸水(实验室自制)。

1.2 仪器 LC-20AB 高效液相色谱仪(日本Shimadzu); RF-10AXL 荧光检测器; 5417R 高速冷冻离心机(德国, Eppendorf); F6/10 超细匀浆器(上海弗鲁克流体机械制造有限公司); QL-9010 旋涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂); 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.3 动物 SD 大鼠, 雄性, (250 ± 50)g, 7~8 周龄, 上海中医药大学动物试验中心提供, 合格证号: SCXK(沪)2003-0002。

2 方法

2.1 组织样品高效凝胶色谱分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Shodex Sugar ks-802(日本昭和电工); 流动相: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ - Na_2HPO_4 缓冲液(pH 值 = 7.0), 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 荧光检测波长: 激发波长 495 nm, 发射波长 515 nm; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $20 \mu\text{L}$ 。

2.1.2 组织样品的预处理^[6] 取各组织样品(脑、心、肝、脾、肺、肾、胃)约 0.5 g, 加入 3 倍体积的 0.1

mol · L⁻¹ pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液,制备匀浆。将 30% (W/V) 三氯乙酸 80 μL 加入于 25% (W/V) 的组织匀浆液 200 μL 中,混合物涡旋,并以 10 000 r · min⁻¹ 的速度离心 10 min,取上清液 100 μL 加 11% (W/V) NaOH 15 μL 以中和,并加入流动相 85 μL,稀释使成 200 μL,再以 10 000 r · min⁻¹ 转速离心 10 min 后,取上清液注入 HPLC 色谱仪。

2.1.3 方法专属性考察 取大鼠空白组织,按组织样品预处理项下方法处理并分析,获得空白样品的色谱图;将空白组织匀浆液加一定浓度的 FITC-MDG-1 溶液,同法操作后,获得相应的色谱图。

2.1.4 组织样品标准工作曲线的绘制 精密称取 FITC-MDG-1 适量,以 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液为介质,配成质量浓度为 0.55 mg · mL⁻¹ 的储备液,备用。然后取母液逐步稀释,得到质量浓度为 2.75, 5.50, 11.00, 27.50, 55.00, 110.00, 220.00 μg · mL⁻¹ 的 FITC-MDG-1 对照品溶液。

分别取上述系列对照品溶液 20 μL,加入到 200 μL 各组织空白匀浆液中,配成各组织相应线性范围内的一系列浓度溶液,按“2.1.2”项下的“组织样品预处理”方法进行处理、进样。以所得的峰高 *H* 对浓度 *C*,用加权(1/*C*²)最小二乘法进行回归运算,得到各组织中 FITC-MDG-1 含量测定标准曲线。

2.1.5 方法回收率测定 取大鼠空白组织匀浆液 200 μL,分别加入适量高、中、低浓度的对照品溶液,每种浓度 5 份样品,按“2.1.2”项下的“组织样品预处理”方法进行处理,于上述色谱条件下进样测定,代入标准曲线求得实测浓度,与理论浓度相比得到方法回收率。

2.1.6 方法精密度测定 取大鼠空白组织匀浆液 200 μL,分别加入适量高、中、低浓度的对照品溶液,各 5 份。按“2.1.2”项下的“组织样品预处理”依法操作后,在上述色谱条件下,于一日内连续进行含量测定,根据标准曲线计算样品中 FITC-MDG-1 浓度并计算得日内差;连续 3 d 进行测定,得到日间差。

2.2 组织分布研究^[7] 取健康 SD 大鼠 20 只,雄性。随机分成 4 组,自由进食和饮水。以 50 mg · kg⁻¹ 的剂量缓慢经大鼠股静脉注射给予 MDG-1,4 组受试大鼠分别于给药后 5, 10, 30, 60 min 从大鼠腹主动脉放血处死(每个时间点取 5 只),迅速取出脑、心、肝、脾、肺、肾、胃等组织,组织用 0.9% 氯化钠溶液冲净表面血液及内容物后,分别称量各脏器湿重,装入自封袋,置于 -20 °C 冰箱中保存至分析测定。

3 结果

3.1 组织样品分析方法的确定

3.1.1 方法专属性考察 以心脏组织样为代表,样品分析方法专属性测定结果见图 1,其他组织图谱均类似。结果表明,在上述色谱条件下分析,组织中内源性物质不干扰 FITC-MDG-1 的测定。

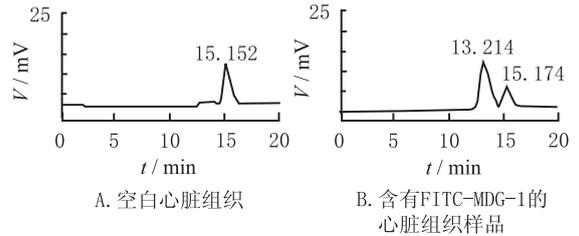


图 1 空白组织干扰图

3.1.2 标准曲线的绘制 记录各组织样品的峰高,以药物浓度 *X* 为横坐标,峰高 *H* 为纵坐标,用加权(1/*C*²)最小二乘法进行回归计算,求得的直线回归方程即为工作曲线方程。各组织回归方程和相关系数结果见表 1。

表 1 各组织样品标准曲线方程

组织	方程	<i>R</i>	线性范围/ (μg · mL ⁻¹)
心	$H = 14\ 071X + 708.74$	0.998 9	0.25 ~ 20.00
肺	$H = 11\ 553X + 695.40$	0.995 4	0.25 ~ 20.00
胃	$H = 12\ 455X + 391.19$	0.995 9	0.25 ~ 20.00
脑	$H = 10\ 451X + 923.79$	0.997 9	0.25 ~ 20.00
肾	$H = 12\ 659X + 490.83$	0.997 4	0.25 ~ 50.00
脾	$H = 11\ 246X + 725.83$	0.998 1	0.25 ~ 20.00
肝	$H = 12\ 276X + 755.26$	0.996 3	0.25 ~ 20.00

3.1.3 方法精密度与回收率 各组织样品的精密度与回收率结果均能满足生物样品测定的要求,分别见表 2,3。

3.2 大鼠体内各脏器组织中药物浓度测定结果 大鼠按 50 mg · kg⁻¹ 剂量静脉注射给予 FITC-MDG-1 后,5, 10, 30, 60 min 时间点的组织分布实验结果见表 4。其中肾组织样品为稀释 5 倍,使测定浓度在标准曲线线性范围内,进行含量测定。根据不同时间组织中药物分布绘制药物分布柱形图,由于肾脏中分布明显多于其他组织,不再将其绘制入柱形图,便于更好比较其他各组织的分布情况,结果见图 2。

3.3 药动学数据处理结果 根据麦冬多糖 MDG-1 静脉注射后各组织脏器中的浓度绘制组织浓度-时间曲线,梯形法计算各组织中的药物 *AUC*,结果心、肝、脾、肺、胃、肾、脑的 *AUC* 分别为 3.270, 2.031, 2.303, 6.178, 4.963, 214.571, 0.163 μg · h · mL⁻¹。

表 2 检测方法的精密度测定结果

组织	大鼠/只	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	
			日内差	日间差
心	5	0.25	6.80	5.14
		1.00	7.37	8.12
		10.00	3.01	6.44
肺	5	0.25	4.73	4.08
		1.00	3.43	7.26
		10.00	5.68	5.80
胃	5	0.25	7.21	4.71
		1.00	3.10	7.96
		10.00	4.43	4.65
脑	5	0.25	4.35	7.53
		1.00	2.86	2.99
		10.00	1.36	1.75
肾	5	0.50	2.22	6.83
		5.00	1.27	3.22
		20.00	6.29	7.19
脾	5	0.25	4.83	6.31
		1.00	4.70	4.67
		10.00	3.59	4.08
肝	5	0.25	4.30	6.08
		1.00	7.94	10.07
		10.00	7.26	7.03

表 3 检测方法的回收率测定结果

组织	大鼠/只	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均回收率/	RSD/
			%	%
心	5	0.25	96.86 ± 3.11	3.21
		1.00	103.97 ± 6.28	6.04
		10.00	98.33 ± 5.04	5.13
肺	5	0.25	100.29 ± 3.59	3.58
		1.00	96.39 ± 5.22	5.42
		10.00	89.87 ± 4.22	4.70
胃	5	0.25	103.07 ± 5.58	5.42
		1.000	97.83 ± 6.24	6.38
		10.00	89.89 ± 3.05	3.39
脑	5	0.25	99.61 ± 5.43	5.45
		1.000	89.24 ± 2.20	2.47
		10.00	98.89 ± 1.45	1.46
肾	5	0.50	101.64 ± 5.84	5.75
		5.00	101.69 ± 2.41	2.37
		20.00	102.81 ± 5.97	5.81
脾	5	0.25	107.32 ± 5.99	5.58
		1.00	91.22 ± 3.91	4.29
		10.00	98.04 ± 3.90	3.97
肝	5	0.25	100.09 ± 5.00	4.99
		1.00	97.71 ± 8.69	8.90
		10.00	100.71 ± 5.94	5.90

4 讨论

MDG-1 静脉注射给药后,绝大多数聚集在肾脏,

表 4 FITC-MDG-1 静脉给药后大鼠组织分布

组织	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s, n=5$			
	5 min	10 min	30 min	60 min
心	7.65 ± 1.07	4.67 ± 0.40	3.32 ± 1.72	1.11 ± 0.32
肝	3.75 ± 0.37	2.63 ± 0.30	2.18 ± 0.98	1.05 ± 0.23
脾	4.66 ± 0.41	3.07 ± 0.32	2.44 ± 1.10	1.03 ± 0.17
肺	12.55 ± 1.66	8.90 ± 0.95	6.46 ± 2.64	2.35 ± 0.55
胃	9.09 ± 1.30	6.88 ± 1.39	5.44 ± 2.08	2.02 ± 0.47
肾	323.57 ± 63.34	309.48 ± 150.57	268.84 ± 254.06	44.53 ± 19.69
脑	0.72 ± 0.14	0.49 ± 0.07	n. d	n. d

n. d 表示未达检测限

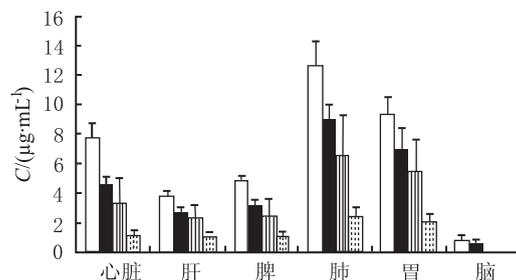


图 2 麦冬多糖在各组织分布柱形图

□ 5 min ■ 10 min ▨ 30 min ▤ 60 min

并以尿的形式排泄,因此肾脏分布最多。这与麦冬多糖 MDG-1 的相对分子量约 5 000,粒径 < 2.0 nm, 低于肾小球的截留值的特性是一致的。并且与文献[3]中提到的低分子量葡聚糖如 FD-4 易分布在肾并通过尿排泄的结果相符合。根据各组织的 AUC 值,其他组织中含药量分布顺序从高到低依次为肺、胃、心、脾、肝、脑。另外,各组织中药物浓度也与静脉注射血药浓度一样,表现为随时间增加,分布逐渐减少。可能由于多糖是水溶性药物,因血脑屏障的存在,脑中分布最少,在 30 min 时间点后几乎检测不到。由于大部分麦冬多糖因分子量较小而从肾中被清除了,下一步可以考虑对多糖 MDG-1 进行结构修饰,通过增加其分子量使其肾清除减少,则多糖可更多地在系统循环,更好地起效。

前期的麦冬多糖 MDG-1 的体外药效学实验研究结果表明,MDG-1 具有明显的拮抗缺血-再灌注引起的体外心脏损伤及保护作用。同时 MDG-1 在培养心肌细胞的药效实验中也表明多糖对心肌缺氧细胞具有一定的保护作用。而从本实验组织分布情况分析,心脏对 MDG-1 有较强的摄取能力,再结合以往药效实验结果,则可从药物在心脏有一定分布的药动学角度,作进一步推断,麦冬多糖之所以有抗心肌缺血的作用,可能是其直接作用于靶器官,从而发挥药效。

[参考文献]

[1] 郑年新,阮金秀,张永祥,等. 六味地黄多糖在小鼠体内

的吸收[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(4): 403 - 405.

[2] 高其品, 陈慧群, 王 坤, 等. 银耳多糖在大鼠体内的吸收、分布和排泄[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(3): 205 - 208.

[3] MEHVAR R, ROBINSON M A, REYNOLDS J M. Molecular weight dependent tissue accumulation of dextrans: in vivo studies in rats[J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83(10): 1495 - 1499.

[4] IKUZAEA M, MATSUNAGA K, NISHIYAMA S, *et al.* Fate and distribution of an antitumor protein-bound polysaccharide PSK (krestin) [J]. *Int J Immunopharm*, 1988, 10: 415 - 423.

[5] 卢智玲, 林 晓, 徐德生, 等. 麦冬多糖 MDG-1 在 Caco-2 细胞模型中转运机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(6): 452 - 454.

[6] KANE0 Y, UEMURA T, TANAKA T, *et al.* Polysaccharide as drug carriers: biodisposition of fluorescein-labeled dextrans in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(2): 181 - 187.

[7] 李 柯, 钟大放. 高效液相色谱法测定大鼠组织及血浆中 9-硝基喜树碱含量[J]. 药理学学报, 2003, 38(2): 124 - 128.

葛根素对细胞色素 P₄₅₀ 酶活性的影响

王启斌, 狄 伟, 程晓莉, 张蓬华, 涂自良

(鄖阳医学院附属太和医院药学部、鄖阳医学院药检学院, 湖北十堰 442000)

[摘要] **目的** 研究葛根素体外对细胞色素 P₄₅₀ 酶 1A2 (CYP1A2)、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的影响。**方法** 分别以咖啡因、甲苯磺丁脲、美芬妥因、美托洛尔和咪达唑仑为探针药, 利用高效液相色谱法测定探针药与相应代谢产物的浓度, 采用重组酶研究葛根素对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 酶活性的影响。**结果** 在体外重组酶反应体系中, 葛根素对 CYP2C9、CYP2C19 及 CYP3A4 酶活性无明显影响。但低浓度葛根素 (0.1 mmol · L⁻¹) 使 CYP1A2 的活性降低 (48 ± 9)% (P < 0.05), CYP2D6 的活性降低 (61 ± 8)% (P < 0.01); 高浓度 (0.4 mmol · L⁻¹) 使 CYP1A2 的活性降低 (82 ± 8)% (P < 0.01), CYP2D6 的活性降低 (88 ± 6)% (P < 0.01)。**结论** 葛根素 (0.1 mmol · L⁻¹) 对 CYP1A2 和 CYP2D6 酶活性有较明显的体外抑制作用; 且随着葛根素浓度的增高, 对这两种酶活性的抑制作用也增强。为研究葛根素与其他药物的相互作用及作用机制等奠定了基础。

[关键词] 葛根素; 重组酶; CYP₄₅₀

[中图分类号] R286; R969

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)05-0500-05

Effects of Puerarin on the Activities of Cytochrome P₄₅₀ Enzyme *in vitro*

WANG Qi-bin, DI Wei, CHENG Xiao-li, ZHANG Peng-hua, TU Zi-liang (Department of Pharmacy, Taihe Hospital Affiliated with the Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of puerarin on the activities of cytochromes 1A2 (CYP1A2)、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 and CYP3A4 *in vitro*. **Methods** Caffeine, tolbutamide, mephenytoin, metoprolol and midazolam were incubated as probes with or without puerarin respectively to study the effect of puerarin on different cytochromes P₄₅₀ activities. The concentrations of probe drugs and their metabolites were determined by HPLC, and the activities of cytochrome P₄₅₀ were measured by the recombinant enzyme reaction system. **Results** Puerarin had no significant effects on the activities of CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4; however, the lower concentration (0.1 mmol · L⁻¹) decreased the activities of CYP1A2 by (48 ± 9)% (P < 0.05), CYP2D6 by (61 ± 8)% (P < 0.01); the higher concentration (0.4 mmol · L⁻¹) decreased the activities of CYP1A2 by (82 ± 8)% (P < 0.01), CYP2D6 by (88 ± 6)% (P < 0.01). **Conclusion** Puerarin remarkably inhibits the activity of CYP1A2 and CYP2D6 in a dose-dependent fashion *in vitro*. This finding might benefit for the study of drug interaction and the mechanism related to puerarin.

KEY WORDS Puerarin; Recombinant enzyme; Cytochrome P₄₅₀

葛根素 (puerarin) 属于黄酮类物质, 自 1959 年柴田承二等人从豆科属植物野葛的干燥根中提取分离得到该药以来, 对它的研究日渐增多。该药化学名为 4', 7-二羟基-8-β-D-葡萄糖异黄酮, 相对分子量为 416。因其药源丰富、毒性低、安全范围广、疗效确切、具有较为广

阔的发展前景而受到了广泛关注。葛根素口服吸收快, 在体内分布快且广泛, 消除快, 不易蓄积, 无代谢饱和现象, 但生物利用度低, 因此临床上多采用其注射液。该药具有扩张冠状动脉和脑动脉, 抗氧化, 降低心肌耗氧量和改善微循环等作用, 目前已广泛应用于临床治疗冠