

葛根素腹腔注射在兔视网膜组织中的药动学研究

邓新国¹, 胡世兴^{1,2*}, 张清炯¹, 杨锦南¹, 林少春¹, 陈 慷^{1*}

(1. 中山大学 中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 中国中医研究院眼科医院, 北京 100040)

摘要: 目的 测定 ip 葛根素后不同时间新西兰白兔视网膜组织中葛根素含量, 计算其药动学参数, 研究药动学特点。方法 44 只家兔随机分为 11 组, 各组每只家兔 ip 葛根素 80 mg/kg 加等量 5% 葡萄糖液, 在用药前 (0 h) 和用药后 0.5、1、2、3、4、6、8、12、16、24 h 取视网膜组织, 采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 进行测定, 3P87 软件拟合药动学参数。结果 ip 葛根素后在兔视网膜组织中药动学符合开放式二房室模型, 药动学参数理论值为: $C_{\max} = 1.08 \mu\text{g}/\text{mg}$, $t_{\max} = 1.52 \text{ h}$, $t_{1/2\alpha} = 1.02 \text{ h}$, $t_{1/2\beta} = 7.37 \text{ h}$, $CL = 2.67 \text{ g}/\text{h}$, $AUC = 6.89 \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mg})$ 。实测值为: 30 min 时视网膜中葛根素的量为 $(0.06 \pm 0.02) \mu\text{g}/\text{mg}$, 在 2 h 达到高峰 $C_{\max}$ 为 $(0.21 \pm 0.05) \mu\text{g}/\text{mg}$, 随后逐渐下降, 8 h 降至较低为 $(0.02 \pm 0.00) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。结论 本方法特异、准确、灵敏, 可用于视网膜组织中葛根素含量测定, 葛根素通过 ip 给药能透过血-视网膜屏障, 进入视网膜组织。

关键词: 葛根素; 药动学; 视网膜

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)12-1382-03

Pharmacokinetic study of puerarin in retinal tissue of rabbits by intraperitoneal injection

DENG Xing-guo¹, HU Shi-xing^{1,2}, ZHANG Qing-jiong¹, YANG Jin-nan¹, LIN Shao-chun¹, CHEN Kang¹

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Eye Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100040, China)

Abstract: **Object** To determine the concentration and pharmacokinetic changes of puerarin in retinal tissue of rabbits by ip administration. **Methods** Forty-four rabbits were randomly divided into 11 groups. Puerarin (80 mg/kg) in addition of 5% glucose solution was given by ip administration to each rabbit in every groups. After administration, the retinal tissue was collected at different time points such as 0 h pre-administration and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, and 24 h post-administration and the concentration of puerarin was detected by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameter was fitted by 3P87 software. **Results**

The pharmacokinetics of puerarin in the retinal tissue was subjected to the two-compartment open model. The pharmacokinetic parameters were separately as following: $C_{\max} = 1.08 \mu\text{g}/\text{mg}$, $t_{\max} = 1.52 \text{ h}$, $t_{1/2\alpha} = 1.02 \text{ h}$, $t_{1/2\beta} = 7.37 \text{ h}$, $CL = 2.67 \text{ g}/\text{h}$, $AUC = 6.89 \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mg})$. The practical data of the concentration of puerarin in retinal tissue was $(0.06 \pm 0.02) \mu\text{g}/\text{mg}$ at 30 min and maximum concentration was $(0.21 \pm 0.05) \mu\text{g}/\text{mg}$ at 2 h, respectively. Then the concentration of puerarin in retinal tissue was gradually decreased to the lower level $(0.02 \pm 0.00 \mu\text{g}/\text{mg})$ at 8 h. **Conclusion** The method of RP-HPLC is particular, accurate, and sensitive. The puerarin by ip administration can penetrate the blood-retina barriers and enter the retinal tissue.

Key words: puerarin; pharmacokinetics; retina

葛根素 (puerarin) 主要由豆科植物野葛或甘葛藤干燥根中所提取, 化学名为 8-β-D-吡喃葡萄糖-4',7'-二羟基异黄酮苷, 属于异黄酮类。葛根素临床应用广泛, 主要用于心脑血管疾病的治疗^[1]。近年来关于葛根素在眼科的应用和研究的报道日趋增多, 其主要用于降低眼内压和眼底疾病的治疗^[2,3]。但就葛根素全身用药后在视网膜组织中的药动学研

究, 至今未检索到文献报道。本实验给家兔 ip 葛根素后, 测定葛根素在兔视网膜中的药动学变化, 以期为其临床应用提供理论依据。

1 材料

Waters 液相色谱仪, 510 型高压泵, 486 紫外检测器, 上海三锐色谱工作站, 高速台式离心机 (TGL-16, 上海), METTLER AE260 分析天平。葛

* 收稿日期: 2004-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300467); 广东省自然科学基金资助项目 (010765)

作者简介: 邓新国 (1961—), 男, 河南郑州市人, 中山大学中山眼科中心临床眼科药理实验室副主任, 讲师, 眼科学博士, 主要从事眼科药物对眼科疾病治疗的实验和药理作用研究, 在国内核心期刊上发表论著 30 余篇。Tel: (020) 87330289

* 通讯作者 E-mail: Markhu@263.net

根素对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 752-200108),葛根素药物来自浙江康恩贝制药有限公司(批号 020319, 100 mg/2 mL)。实验用试剂均为色谱纯,溶剂及流动相用水为重蒸水。

2 方法

2.1 分组及给药: 44 只健康新西兰白兔(中山大学实验动物中心提供),眼底检查无异常,体重 2.0~2.5 kg,随机分为 11 组,各组兔 ip 葛根素 80 mg/kg 加等量 5% 葡萄糖液,分别于用药前(0 h)和用药后 0.5、1、2、3、4、6、8、12、16、24 h 处死家兔,取视网膜置 -20℃ 冰箱备用。

2.2 对照品溶液的配制: 精确称取葛根素对照品 2.4 mg,加 1 mL 甲醇,即得 2.4 mg/mL 的对照品储备液 A。取储备液 A 50 μ L 移入 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配成 12 mg/L 的储备液 B,以储备液 B 为母液用甲醇配制为 12、1.5、0.375、0.037 5 μ g/mL 的对照品工作液,置 -20℃ 冰箱备用。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 不锈钢柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 迪马公司),流动相为甲醇-水-冰醋酸(35:65:0.2),体积流量: 0.9 mL/min,紫外检测波长为 250 nm。

2.4 样品处理: 精确称取不同时间组视网膜组织约 200 mg,放入 5 mL 玻璃研磨器中,加入等体积 0.5 mol/L 高氯酸后研磨 5 min,将视网膜匀浆液移入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 40 μ L 进样测定。

2.5 标准曲线制备: 精确称取正常兔视网膜组织约 200 mg,放入 5 mL 玻璃研磨器中,加入等体积的 0.5 mol/L 高氯酸溶液,并用不同质量浓度的葛根素工作液配制不同终质量浓度的视网膜加标准液(0.005、0.012 5、0.037 5、0.075、0.15、0.3、0.6 μ g/mL),研磨 5 min,按 2.4 项方法对视网膜组织进行处理,并按上述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)和质量浓度(X)进行线性回归,回归方程为 $Y = 324\,824.9X + 82.7$ ($r = 0.9997$),线性范围 0.005~0.6 μ g/mL,按信噪比为 3 计算最低检测质量浓度,葛根素在视网膜组织中的最低检测质量浓度为 2 ng/mL。

2.6 回收率和精确度试验: 分别配制 0.012 5、0.075、0.3 μ g/mL 3 种质量浓度的葛根素标准视网膜液,按 2.4 项下操作并进行分析,求得葛根素在视网膜组织中的回收率。在同 1 天和 5 d 间(每天 1 批)对以上 3 种质量浓度的葛根素标准视网膜液分

别处理 5 批后进样分析,分析日内和日间 RSD。结果见表 1。葛根素在视网膜中的回收率较高,日内和日间变异较小,表明该方法较为稳定。

表 1 葛根素在视网膜组织中的回收率和精确度试验结果 (n=5)

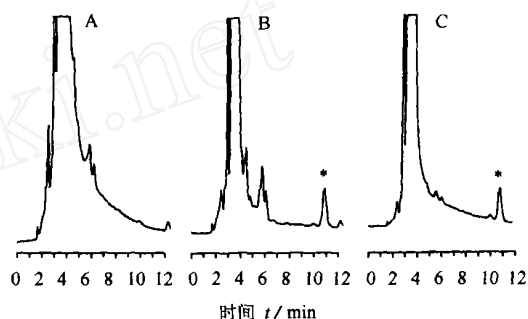
Table 1 Recovery and accuracy of puerarin in retinal tissue (n=5)

质量浓度/(μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	回收率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
0.012 5	96.18 $\pm$ 0.04	4.75	4.47
0.075	95.84 $\pm$ 0.03	2.56	3.43
0.3	95.24 $\pm$ 0.02	3.02	2.05

2.7 药动学参数计算: 数据经 3P87 软件进行房室拟合,并计算药动学参数。

3 结果

3.1 色谱行为: 葛根素的保留时间为 10.9 min,无其他峰干扰,方法的准确度和精确度符合生物样品的测定要求。色谱图见图 1。



*-葛根素 A-视网膜组织空白
B-视网膜组织+葛根素标准液 C-视网膜组织样本
* -puerarin A-retinal tissue blank
B-retinal tissue+ puerarin C-retinal tissue sample

图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

3.2 视网膜组织中葛根素含量: 葛根素经 ip 给药,不同时间兔视网膜中葛根素含量的测定结果见图 2。可见 ip 2 h 后葛根素在视网膜中的量达高峰为 (0.21 ± 0.05) μ g/mg, 3 h 开始下降, 16 h 几乎测不到, 仅为 0.01 μ g/mg。

3.3 葛根素在视网膜组织中的药动学模型拟合及相关参数: ip 葛根素后, 其在正常新西兰白兔视网膜组织中药动学模型呈开放式二房室模型, 药动学参数如下: $V/F = 72.63$ μ g/mg, $t_{1/2\alpha} = 1.02$ h, $t_{1/2\beta} = 7.37$ h, $AUC = 6.89$ μ g/(h $\cdot$ mg), $CL = 2.67$ g/h, $t_{max} = 1.52$ h 和 $C_{max} = 1.08$ μ g/mg。

4 讨论

HPLC 法是测定血样和药物中葛根素含量的常用方法之一^[4,5]。吴正红等^[6]应用 HPLC 技术测定

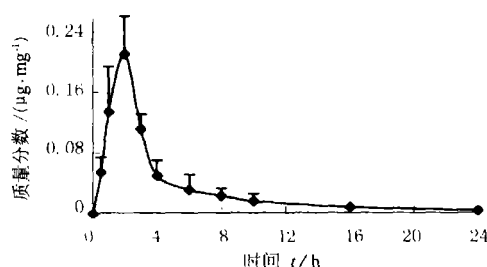


图 2 兔 ip 葛根素后视网膜组织的药物浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curve of puerarin in retinal tissue of rabbits after ip administration

了眼局部应用葛根素滴眼液房水中葛根素的药动学,笔者也曾通过 ip 葛根素,应用 HPLC 技术测定了兔眼房水中葛根素的药动学变化^[7]。本研究通过 ip 葛根素,应用 HPLC 技术对视网膜组织中葛根素的药动学进行研究,葛根素在视网膜组织中的药动学变化符合开放式二房室模型,2 h 达高峰,以后逐渐下降,但葛根素进入视网膜组织中的量较低,8 h 就降至 0.02 μg/mg,16 h 几乎测不到,消除较快。

本实验采用高氯酸和高速离心技术沉淀视网膜中的蛋白质,以甲醇-水-冰醋酸(35 65 0.2)为流动相,色谱柱为DiamondsilC₁₈不锈钢柱,在波长为 250 nm 紫外光下对兔视网膜中的葛根素含量进行了测定。结果表明,本方法具有特异、灵敏、快速等

优点,适用于对视网膜中葛根素含量的测定。本实验结果表明葛根素通过 ip 能透过血-视网膜屏障,进入视网膜组织,此结果为葛根素全身用药治疗眼底疾病提供了实验依据。

References:

- [1] Ji Y B. *Pharmacology and Application of the Active Ingredients of Chinese Traditional Medicine* (中药有效成分药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1995.
- [2] Guo Y X, Wu H Q, Lui J Q. The current and future of puerarin to treat glaucoma [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol* (中国中医眼科杂志), 2002, 24(6): 519-520.
- [3] Yang H Y, Zhou Y Q, Wu Z H, et al. puerarin eyedrops: action of reducing intraocular pressure and the concentration in aqueous humor [J]. *Recent Adv Ophthalmol* (眼科新进展), 1999, 19(2): 73-77.
- [4] Chen S L, Chen S B, Yang D J, et al. HPLC fingerprint analysis of *Radix Puerariae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 661-663.
- [5] Guo Y R, Meng T P, Wei G, et al. Determination of puerarin in whole blood by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20(6): 343-344.
- [6] Wu Z H, Zhu Y Q, Cheng G X, et al. Studies on pharmacokinetics of puerarin eyedrops [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 28(3): 221-224.
- [7] Deng X G, Hu S X, Zhang Q J, et al. Pharmacokinetic study of puerarin in aqueous humor of rabbits following intraperitoneal [J]. *Chin Ophthalmic Res* (眼科研究), 2003, 21(3): 258-260.

大蒜素对二甲基亚硝胺诱发的肝纤维化大鼠的保护作用

朱兰香¹, 陈卫昌¹, 许春芳¹, 刘世增², 顾振纶², 王响英^{3*}

(1. 苏州大学附属第一医院 消化科, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州大学医学院 药理学系药理教研室, 江苏 苏州 215007; 3. 苏州大学 电镜室, 江苏 苏州 215007)

摘要: 目的 研究大蒜素对实验性肝纤维化大鼠的保护作用。方法 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常对照组、模型组(给等量蒸馏水)、大蒜素(11、22 mg/kg)组、秋水仙碱(0.15 g/kg)组。二甲基亚硝胺(DMN)诱发大鼠肝纤维化模型, 各组在造模开始时 ig 给药, 实验共进行 42 d。腹主动脉取血, 制备血清, 进行肝功能、血脂、肝细胞病理学检查。结果 大蒜素各组均能明显降低实验性肝纤维化大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST) ($P < 0.05, 0.01$) 水平, 以大蒜素 22 mg/kg 组作用明显, 而秋水仙碱对肝功能没有明显的改善作用 ($P > 0.05$)。大蒜素均能明显降低血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)水平, 提高血清白蛋白(ALB)含量。病理学检查结果, 大蒜素组肝细胞的坏死、空泡变性、出血及脂肪沉积较模型组和秋水仙碱组明显减轻, 炎症细胞明显减少。电镜检查结果显示, 大蒜素 11 mg/kg 组肝细胞坏死、自溶较模型组明显减轻, 大蒜素 22 mg/kg 组肝细胞接近正常。结论 大蒜素对 DMN 所致肝损伤具有保护作用。

关键词: 大蒜素; 二甲基亚硝胺; 肝纤维化

中图分类号: R 286.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)12-1384-04

* 收稿日期: 2004-03-22

作者简介: 朱兰香(1963—), 女, 江苏人, 硕士学位, 副主任医师, 研究方向为肝纤维化的防治。

Tel: (0512) 62002430 E-mail: zhulanxiang@medmail.com.cn