

程度肿胀和空泡变,12周后主动脉内皮细胞病变程度较8周时有较大改善。本实验结果表明Pue对糖尿病大鼠主动脉内皮细胞结构和功能损伤均具有一定的保护作用,该作用的产生可能与Pue降低糖尿病大鼠血糖,调节ET-NO动态平衡,改善内皮功能,提高血管自身保护机制有关。提示Pue对预防或减轻DVC病变无疑是有利的。

References:

- [1] Guo L X, Wang R P. Endothelial converting enzyme, endothelin-1 and diabetic vascular complications [J]. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 2000, 8(5): 301-303.
- [2] Mao C P, Gu Z L, Cao L. Effects of puerarin on renal protein kinase C activity in diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1141-1144.
- [3] Mao C P, Gu Z L. Effects of puerarin on sICAM-1, ox-LDL levels in serum and TNF- α level in plasma of diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 86-88.
- [4] Zhang J T. *Modern Methodology in Pharmacological Experiments* (现代药理实验方法学) [M]. Beijing: Beijing Medical College and Peking Union Medical College United Press, 1998.
- [5] Du X L, Sun Y, Chen L, *et al.* Effect of high-glucose and high-insulin on the adhesive function of vascular endothelial cells [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1998, 14(1): 66-70.
- [6] Chen S, Apostolova M D, Cherian M C, *et al.* Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucose-induced increased permeability in endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(8): 1311-1321.
- [7] Moncada, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109-142.
- [8] Duan W Z, Wang J F, Ding Y, *et al.* Effect of hyperglycemia on vascular endothelium-dependent relaxation in rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1998, 14(5): 488-491.
- [9] Cohen X, Lin S K. Ramipril induces delayed endothelial preconditioning against free radical injury via heart protein synthesis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 27: 156-162.

何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学

孙江浩,袁志芳,王春英,许慧君,张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的 RP-HPLC 测定方法,研究何首乌中二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学及组织分布。方法 色谱条件:用 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m),乙腈-甲醇-水 (15:18:67) 为流动相,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 320 nm。大鼠 iv 二苯乙烯苷 20、10 mg/kg 及 ig 二苯乙烯苷 100、50 mg/kg,于不同时间点取血浆及组织,HPLC 法测二苯乙烯苷血药浓度及在组织中的浓度。数据用 3P97 软件拟合,计算药动学参数。结果 大鼠 iv 不同剂量二苯乙烯苷后药动学模型为二室开放模型;ig 不同剂量二苯乙烯苷后药动学模型符合一室模型;大鼠 iv 及 ig 二苯乙烯苷后,在体内分布广泛,大鼠 iv 二苯乙烯苷后以肝、心、肺中分布较高;ig 二苯乙烯苷后心、肾中分布较高。结论 建立了大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的 RP-HPLC 测定方法,阐明了二苯乙烯苷在大鼠体内的药动学特征及组织分布情况。方法简便快速,结果准确可靠。

关键词:反相高效液相色谱法;何首乌;二苯乙烯苷;药动学

中图分类号:R285.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0405-04

Pharmacokinetics of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* in rats *in vivo*

SUN Jiang-hao, YUAN Zhi-fang, WANG Chun-ying, XU Hui-jun, ZHANG Lan-tong

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Key words: RP-HPLC; *Polygonum multiflorum* Thunb.; stilbene glycoside; pharmacokinetics

二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯 2-O- β -D 葡萄糖苷) 是中药何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 中分离得到的蒽蒽类化合物,具有明显降低大鼠血清中总胆固醇以及抗氧化、清除自由基等药理作用^[1~3]。何首乌原药材及多种含何首乌的制剂均以二苯乙烯苷作为质量控制指标。笔者曾

采用 HPLC 法研究了二苯乙烯苷在小鼠体内的药动学特征,并在研究过程中获得一体内代谢物,确定其为二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合物^[4]。本实验自何首乌中分离提取二苯乙烯苷单体成分,进一步研究其在大鼠体内的药动学及组织分布情况。

1 材料与方法

收稿日期:2004-05-10

作者简介:孙江浩(1980—),男,河北医科大学药学院 2001 级硕士研究生,研究方向为中药有效成分的药动学研究。

* 通讯作者 Tel: (0311) 6265625 Fax: (0311) 6052053 E-mail: zhanglantong@263.net

1.1 仪器:美国 Waters 液相色谱仪;Waters 2487 紫外检测器;浙江大学智能信息研究所 N2000 色谱工作站;LG10—2.4A 型离心机(北京医用离心机厂生产);XW—80C 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂生产)。

1.2 药品与试剂:二苯乙烯苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用,批号 0844-200003);乙腈、甲醇(色谱纯,均由美国 Dikma 公司生产);柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂生产);重蒸水自制;何首乌生药购于石家庄市药材公司,经河北医科大学生药教研室聂凤提教授鉴定;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验动物:SD 大鼠,体重 300 g 左右,雌雄不限(合格证号为:Ⅱ级,04056,由河北医科大学实验动物中心提供)。实验前禁食 18 h,饮水不限。

1.4 二苯乙烯苷对照品溶液的配制:精密称取二苯乙烯苷对照品适量,加甲醇溶解,配成 193.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。按倍数稀释法配成 96.6、48.3、24.2、19.32、9.66、4.83、2.42、1.21、0.966、0.483、0.242、0.121 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列标准甲醇溶液。

1.5 何首乌中二苯乙烯苷单体成分的分离:何首乌粉末(50 目筛)以一定浓度的乙醇回流提取,回收乙醇得何首乌醇浸膏;将稠膏加水分散,石油醚脱脂后以醋酸乙酯萃取,回收即得醋酸乙酯提取部分;将所得的醋酸乙酯提取部分上硅胶柱,石油醚-醋酸乙酯(50:50、40:60、20:80、0:100)梯度洗脱,以薄层色谱法进行监测[展开剂:氯仿-甲醇-水(20:2:1),360 nm 下检视蓝色斑点],得二苯乙烯苷粗提物;将二苯乙烯苷粗提物反复上柱,蒸干溶剂后得二苯乙烯苷粗品,经 HPLC 外标法测定质量分数为 90.25%。

1.6 生物样本的制备:大鼠用乙醚轻度麻醉后行颈动脉插管术,待清醒后分别 iv 二苯乙烯苷 20、10 mg/kg 或 ig 二苯乙烯苷 100、50 mg/kg,于规定时间点颈动脉取血,肝素抗凝,分离血浆备用。大鼠给药后于规定时间处死后立即取出心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、睾丸、脑,用生理盐水洗净表面浮血,滤纸吸干,用生理盐水制成组织匀浆备用。

1.7 色谱条件:色谱柱为 DiamonsilTMC₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-甲醇-水(15:18:67);体积流量为 1.0 mL/min;检测波长 320 nm;灵敏度 0.05 AUFS。

1.8 标准曲线的制备:取空白血浆或空白组织匀浆 0.2 mL,精密加入不同质量浓度的二苯乙烯苷对照

品溶液 0.4 mL,涡流混旋 30 s,4 000 r/min 离心 5 min。取上清液,滤膜滤过(0.46 μm),进样 20 μL ,记录二苯乙烯苷的峰面积,以血浆药物质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,峰面积($\times 10^5$)为纵坐标,经线性回归得回归方程为 $Y=0.8763X-0.0976$, $r=0.9989$ ($n=8$),二苯乙烯苷在 0.121~193.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好,最低检测质量浓度为 0.061 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。绘制标准曲线。

1.9 精密度

1.9.1 日内精密度:取空白血浆 0.2 mL,加入不同质量浓度的对照品溶液 0.4 mL,使血浆中二苯乙烯苷质量浓度分别为 96.6、4.83、0.242 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个质量浓度平行 5 份,按 1.8 项下方法操作,每个样本分别进样 5 次,在同日内同一条标准曲线进行测定,计算日内精密度,3 种不同质量浓度样品的日内精密度分别为 1.8%、2.7% 和 7.3%。

1.9.2 日间精密度:取空白血浆 0.2 mL,处理同 1.9.1 项方法,按 1.8 项下方法操作,每个样本分别进样 5 次,在一周内不同日用不同的标准曲线进样分析,记录峰面积,计算日间精密度,日间精密度分别为 2.2%、3.2% 和 9.3%。

1.10 稳定性考察:供试样品溶液分别放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 后进样测定,峰面积的 RSD 为 2.5%,表明样品在 24 h 内较稳定。

1.11 方法回收率:取空白血浆 0.2 mL,加入不同浓度的标准甲醇稀释溶液 0.4 mL,处理同 1.9.1 项方法,每个质量浓度平行 5 份。按 1.12 项下方法操作,进样分析,测定峰面积,计算方法的回收率分别为 97.98%、100.8%、106.4%,RSD 分别为 6.1%、2.4%、4.8% ($n=5$)

1.12 二苯乙烯苷检测方法:取血浆或组织匀浆 0.2 mL,加甲醇 0.4 mL 沉淀蛋白,涡流混旋 30 s,4 000 r/min 离心 5 min。取上清液,滤膜滤过(0.46 μm),进样 20 μL ,用峰面积进行定量分析,由标准曲线求得血浆或组织匀浆中二苯乙烯苷浓度。

2 结果

2.1 色谱行为:在上述色谱条件下,二苯乙烯苷分离效果良好,无杂质峰干扰。理论塔板数不小于 4 000,保留时间约 10 min,分离度大于 2.0。色谱图见图 1。

2.2 药动学参数:大鼠 iv 及 ig 不同剂量二苯乙烯苷后,不同时间血药浓度见图 2、3。采用 3P97 药动学处理软件进行自动拟合。以理论血药浓度值与实验测定值的相关系数最大和 AIC 最小作为判断标

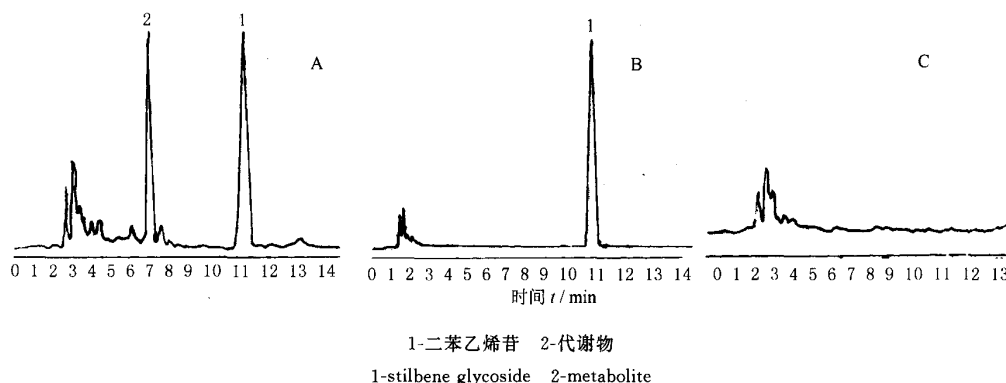


图 1 血浆样品(iv 给药) (A)、空白血浆+二苯乙烯苷对照品 (B)、空白血浆 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of plasma sample (iv) (A), blank plasma + stilbene glycoside (B), and blank plasma (C)

准。曲线经拟合后发现大鼠 iv 20、10 mg/kg 二苯乙烯苷后药动学均符合二室模型;大鼠 ig 100、50 mg/kg 二苯乙烯苷后药动学均符合一室模型,主要药动学参数见表 1、2。

2.3 组织分布:取雄性大鼠 24 只,随机分成 iv 和 ig 组,分别 iv 10 mg/kg 或 ig 50 mg/kg 二苯乙烯苷,于给药后 10、30、60 min 将动物处死,取出各组织并测定血药浓度;按血浆中二苯乙烯苷标准曲

线制备方法得二苯乙烯苷在各组织匀浆中的标准曲线,其回归方程分别为 心: $Y = 0.9275X + 0.7615$, $r = 0.9982$ ($n = 7$);脾脏: $Y = 0.9673X + 0.1294$, $r = 0.9998$ ($n = 6$);胃: $Y = 1.1995X - 0.3880$, $r = 0.9997$ ($n = 6$);肺: $Y = 0.7482X + 0.2158$, $r = 0.9985$ ($n = 6$);肠: $Y = 0.7363X - 0.2072$, $r = 0.9993$ ($n = 6$);肝脏: $Y = 0.7120X - 0.0051$, $r = 0.9990$ ($n = 6$);睾丸: $Y = 0.9398X - 0.2662$, $r = 0.9979$ ($n = 6$);肾脏: $Y = 0.8382X + 0.3826$, $r = 0.9962$ ($n = 9$);脑: $Y = 0.6806X + 0.1350$, $r = 0.9971$ ($n = 5$)。根据回归方程计算出

表 1 大鼠 iv 二苯乙烯苷后药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of rats after iv stilbene glycoside ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

药动学参数	单位	二苯乙烯苷/(mg · kg ⁻¹)	
		20	10
$t_{1/2\alpha}$	min	3.67 ± 0.19	3.02 ± 0.36
$t_{1/2\beta}$	min	54.61 ± 14.40	63.28 ± 21.17
k_{21}	min ⁻¹	0.014 9 ± 0.003 23	0.018 3 ± 0.006 04
k_{10}	min ⁻¹	0.161 ± 0.009 86	0.151 ± 0.016 30
k_{12}	min ⁻¹	0.025 8 ± 0.005 24	0.072 3 ± 0.010 90
VC/L	L	0.219 ± 0.018 6	0.287 ± 0.035 6
AUC	μg · mL ⁻¹	568.22 ± 35.52	233.83 ± 117.67
CL	L · kg ⁻¹	0.035 3 ± 0.002 08	0.043 0 ± 0.003 34

表 2 大鼠 ig 二苯乙烯苷后药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of rats after ig stilbene glycoside ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

药动学参数	单位	二苯乙烯苷/(mg · kg ⁻¹)	
		100	50
$t_{1/2ka}$	min	2.57 ± 1.08	3.81 ± 1.11
$t_{1/2ke}$	min	24.07 ± 3.86	17.64 ± 3.36
k_e	min ⁻¹	0.029 5 ± 0.005 27	0.040 7 ± 0.008 90
k_a	min ⁻¹	0.304 ± 0.098 9	0.191 ± 0.039 5
t_{max}	min ⁻¹	8.95 ± 1.99	5.84 ± 1.40
C_{max}	μg · mL ⁻¹	25.75 ± 0.95	10.50 ± 1.14
AUC	μg · mL ⁻¹	1164.04 ± 125.67	222.79 ± 41.60

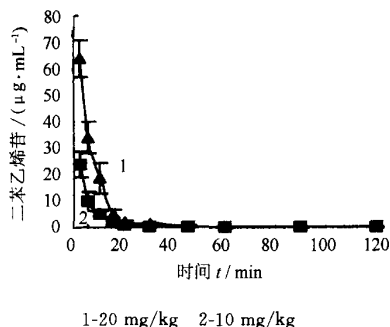


图 2 大鼠 iv 二苯乙烯苷后血浆药物浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Plasma drug concentration-time curve of rats after iv stilbene glycoside ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

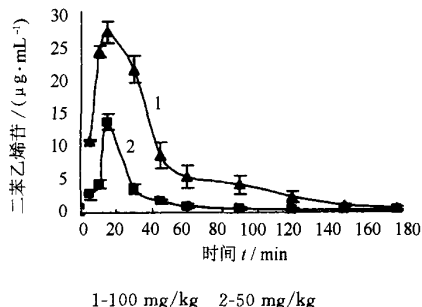


图 3 大鼠 ig 二苯乙烯苷后血浆药物浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Plasma drug concentration-time curve of rats after ig stilbene glycoside ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

各组织单位质量的含药量。结果表明,大鼠 iv 二苯乙烯苷后,组织分布迅速,10 min 各组织中二苯乙烯苷浓度即达高峰,单位组织中以肝、心、肺中分布较高;脾、肾、胃次之;肠、脑、睾丸组织中分布较少。见图 4。大鼠 ig 二苯乙烯苷后 30 min,各组织二苯乙烯苷浓度即达高峰,单位组织中以心、肾、肝分布较高;肺、胃、脾、肠次之;睾丸、脑组织中分布较少。见图 5。

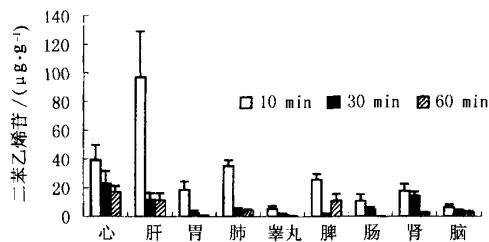


图 4 大鼠 iv 二苯乙烯苷 (10 mg/kg) 后组织分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 4 Tissue distribution in rats after iv stilbene glycoside (10 mg/kg) ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

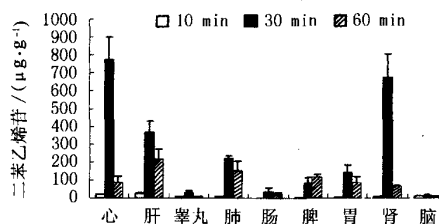


图 5 大鼠 ig 二苯乙烯苷 (50 mg/kg) 后组织分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 5 Tissue distribution in rat after ig stilbene glycoside (50 mg/kg) ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3 讨论

本实验采用醇提—石油醚脱脂—醋酸乙酯萃取—硅胶柱色谱分离的路线,成功地从何首乌药材中分离得到二苯乙烯苷单体成分,比较传统的低压或中压柱色谱法,该法操作简便,在实验室中容易实现。

本实验对二苯乙烯苷单体成分 iv 和 ig 给药在大鼠体内的药动学进行研究,消除了何首乌中其他成分的干扰,如蒽醌类成分对实验动物具有泻下作用,影响药物的吸收。采用 RP-HPLC 法测定大鼠血浆及组织匀浆中二苯乙烯苷的浓度,样品前处理方法简便快速,从色谱图可见血浆及组织匀浆中内源

性物质不干扰样品测定,方法专属性强,结果准确。

本实验采用大鼠颈动脉取血,因需要多次采血,所以每次采血后都给大鼠补以同体积生理盐水,大鼠血液被稀释,故可能对个别浓度低的点影响较大。

大鼠 iv 不同剂量二苯乙烯苷,大鼠体内药动学过程均符合二室开放模型,分布相 $t_{1/2\alpha}$ 为 (3.67 ± 0.19)、(3.02 ± 0.36) min,说明二苯乙烯苷自中央室向周边室分布迅速;消除相 $t_{1/2\beta}$ 为 (54.61 ± 14.40) 及 (63.28 ± 21.17) min,说明二苯乙烯苷在体内消除很快;大鼠 iv 二苯乙烯苷后,表观分布容积分别为 (0.219 4 ± 0.018 6)、(0.286 8 ± 0.035 6) L,约为大鼠血容量的 15 倍,说明二苯乙烯苷在大鼠体内分布于广泛组织中,分布实验结果也证明了这一点。

在组织分布实验研究中发现,大鼠 iv 和 ig 二苯乙烯苷,均以心脏、肝脏中二苯乙烯苷含量最高,这可能与心脏与肝脏中血管丰富,血流量大有关。何首乌在中医理论中归心、肝、肾经,现代药理学研究证明二苯乙烯苷有保肝、提高心脏 SOD 的活性,可降低乳过氧化物酶 (LPO) 和脂褐素含量,具有明显的抗氧化、抗自由基、拮抗过氧化损伤的作用,被认定是何首乌中保肝的主要有效成分,本实验研究结果验证了中医归经的传统理论。二苯乙烯苷在脑组织及睾丸组织中分布较少可能与其水溶性较大,难以通过血脑屏障及血睾屏障有关。

在本实验中也发现大鼠体内存在一明显的代谢物峰,其保留时间与小鼠体内的代谢物峰保留时间一致,推测其为二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合物。组织中的其他代谢产物有待于进一步研究。

References:

- [1] Arichi H, Kimura Y, Okuda H, et al. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30 (5): 1766-1770.
- [2] Su W, Guo Q. The general review of modern pharmacological research of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(2): 119-121.
- [3] Ryu G, Ju J H, Park Y J, et al. The radical scavenging effects of stilbene glycosides from *Polygonum multiflorum* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(5): 636-639.
- [4] Sun J H, Zhang L T, Wang C Y, et al. Study on metabolite of stilbene glycoside in mice by liquid chromatography tandem-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38(12): 968-970.