

虎杖苷在大鼠体内的药动学特点和组织分布研究

吕春艳, 张兰桐*, 袁志芳, 景秀娟, 刘洋, 刘伟娜

(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 RP-HPLC 测定大鼠血浆及组织样本中虎杖苷的方法, 研究虎杖苷在大鼠体内的药动学行为和分布特点。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水 (26:74) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 303 nm。结果 虎杖苷在大鼠血浆及各组织中一定质量浓度范围内线性关系良好, 其高、中、低 3 种不同质量浓度的回收率及日内、日间精密密度均符合方法学要求。大鼠 ig 虎杖有效部位后, 虎杖苷在大鼠体内的药动学行为符合二室开放模型, 在体内分布广泛, 以脾、心、肺、胃中分布较高。结论 建立了大鼠血浆及组织匀浆中虎杖苷的 RP-HPLC 测定方法, 此方法简便、快速, 结果准确、可靠; 并首次阐明了虎杖苷在大鼠体内的药动学特点和不同组织内的分布情况。

关键词: RP-HPLC; 虎杖苷; 药动学; 组织分布

中图分类号: R286.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0235-04

Pharmacokinetic characteristics and tissue distribution of polydatin in rats *in vivo*

LÜ Chun-yan, ZHANG Lan-tong, YUAN Zhi-fang, JING Xiu-juan, LIU Yang, LIU Wei-na

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

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method to determine the polydatin in plasma and tissues of rats *in vivo* and to study its pharmacokinetic behaviour and tissue distribution characteristics.

Methods Chromatographic separation was achieved by RP-HPLC using C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) as stationary phase and acetonitrile-water (26:74) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min. The UV detective wavelength was 303 nm.

Results Good linearties were obtained in plasma and every kind of tissue over a certain range. The recovery, intra-day and inter-day precision of three different concentrations of polydatin in plasma and tissues met the requirements of methodology. The pharmacokinetic characteristics of polydatin after ig administration to rats complied with the open two-compartment model. The results of tissue distribution showed that polydatin was distributed widely in rats. The highest level was found in spleen, heart, lung, and stomach after ig administration (50 mg/kg) of polydatin. **Conclusion** The RP-HPLC method is established to determine the concentration of polydatin in plasma and tissues. The method is quick, precise, and reproducible. It is the first time to study the pharmacokinetic characters and tissue distribution of polydatin in rats *in vivo* after ig administration.

Key words: RP-HPLC; polydatin; pharmacokinetics; tissue distribution

虎杖苷 (3, 4', 5-三羟基二苯乙烯-3-O-β-D-葡萄糖苷) 是从虎杖 *Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati* 中分离得到的多羟基芪类化合物, 近年研究表明, 虎杖苷在防止动脉内皮损伤性血栓形成, 改善休克微循环, 提高休克大鼠存活率, 提高移植皮瓣存活率和减轻缺血-再灌注、自由基、内毒素等造成的组织器官损伤等诸方面有良好作用。本实验室自虎杖中分离提取虎杖有效部位, 首次研究了口服给药后虎杖苷在大鼠体内的药动力学特点和不同组织的分布

情况, 为该药合理的临床应用提供了理论依据。

1 实验材料

1.1 仪器: Waters 1525 液相色谱仪; Waters 2996 DAD 检测器; Waters 2487 紫外检测器; Empower Project 色谱工作站; XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂), LG16-W 高速离心机 (北京医用离心机厂)。

1.2 药品与试剂: 虎杖苷对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 供定量测定用); 虎杖有效部位由本

收稿日期: 2006-06-09

基金项目: 河北省药学重点学科资助项目

作者简介: 吕春艳 (1980—), 女, 河北医科大学药学院 2003 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 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 Fax: (0311) 86052053 E-mail: zhanglantong@263.net

实验室自虎杖药材中提取制得,经 RP-HPLC 法测得其中含虎杖苷 77.25%;柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂生产);虎杖生药购于安国药材市场,经河北医科大学生药教研室聂凤提教授鉴定;乙腈(色谱纯),重蒸水(自制),其他所用试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 实验动物:健康雄性 SD 大鼠,体重 170~200 g,由河北医科大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(26:74);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 303 nm;灵敏度 0.5 AUFS。

2.2 对照品溶液的配制:精密称取虎杖苷对照品适量,加甲醇溶解,配成质量浓度为 60.625 μg/mL 的标准储备液。按倍比稀释法配成一系列质量浓度(12.125、6.063、3.031、1.213、1.010、0.758、0.606、0.303、0.152、0.076 μg/mL)的甲醇溶液。

2.3 虎杖有效部位的制备:以 50% 乙醇回流提取虎杖粉末(50 目筛),减压回收乙醇至无醇味,浓缩成 1:2 的水溶液,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.8 后,以醋酸乙酯萃取,减压回收溶剂,得提取物;将所得的提取物上硅胶柱(300~400 目),用氯仿-甲醇(50:10)等度洗脱,以薄层色谱法进行监测[展开剂:氯仿-丙酮-甲酸-水(4:4:0.8:0.2),300 nm 下检视蓝色斑点],收集流份,合并相同组分,回收溶剂即得虎杖有效部位,经 RP-HPLC 外标法测定虎杖苷质量分数为 77.25%。

2.4 供试药品的配制:取制备的虎杖有效部位适量,精密称定,加入蒸馏水少量,超声 10 min 使溶解,制成 3 mg/mL 虎杖苷混悬液。

2.5 生物样本的制备

2.5.1 血样的制备:雄性 SD 大鼠 6 只,给药前禁食 12 h,自由饮水。大鼠 ig 虎杖有效部位,给药剂量为 50 mg/kg (以虎杖苷计),给药后,分别于 5、10、15、25、30、45、60、90、120、150、180、240 min 从大鼠眼底静脉丛取血 0.3 mL,置 1 mL 肝素化的离心管中,以 10 000 r/min 离心 10 min,取血浆,于 -20 °C 冷冻保存,待测。

2.5.2 组织样本的制备:雄性 SD 大鼠 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只。给药前禁食 12 h,自由饮水。大鼠 ig 给予虎杖有效部位,给药剂量为 50 mg/kg (以虎杖苷计),分别于吸收相(10 min)、分布相(30 min)和消除相(120 min)各断头处死 6 只大鼠

(以上时间点根据其血药浓度-时间曲线确定),立即取出心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、睾丸、脑,除小肠和胃剪开去除内容物后用生理盐水清洗外,其余器官用生理盐水洗净表面浮血,置 -20 °C 冷冻保存。测定前取出组织样本,解冻,称质量,剪碎,加 2 倍量生理盐水在冰浴中制成匀浆。

2.6 生物样本处理^[1]:取 2.5 项下生物样本 0.1 mL,置 1 mL 离心管中,加甲醇 0.3 mL 沉淀蛋白,涡流混旋 30 s,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μL 进样,测定。

2.7 药动学参数的获得:采用 3P97 药动学软件对血药浓度-时间数据进行拟合,以理论血药浓度值与实验测定值的相关系数最大和 AIC 值最小作为判断标准,选择适当的房室模型,计算药动学参数。

2.8 数据处理:组织含药量(μg/g)=测得质量浓度(μg/mL) × 2 (mL/g),计算平均值及标准偏差,绘制给药后不同时间组织中药物分布柱形图。

3 结果

3.1 方法专属性考察:取大鼠空白生物样本,按 2.6 项下方法处理并分析,得到空白样品的色谱图;将一定质量浓度虎杖苷对照品溶液加入大鼠空白生物样本中,同法操作,获得相应的色谱图;同法得到大鼠给药后生物样本色谱图,典型色谱图见图 1 和 2。在上述色谱条件下,生物样本色谱图中虎杖苷保留时间为 5.8 min,虎杖苷与内源性物质分离良好,无其他峰干扰,理论塔板数不低于 5 000,虎杖苷与内源性物质分离度大于 2.0。

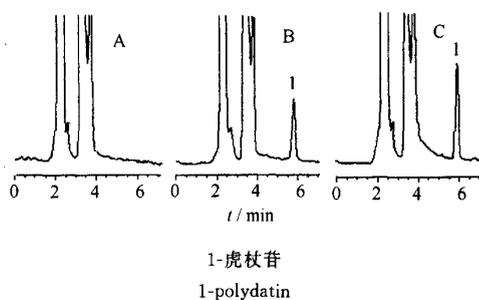


图 1 空白血浆(A)、空白血浆加虎杖苷对照品(B)和血浆样品色谱图(C)

Fig. 1 Chromatograms of blank plasma sample (A), blank plasma sample spiked with polydatin (B), and plasma sample (C)

3.2 标准曲线制备:取空白生物样本各 0.1 mL,置 1 mL 离心管中,加入一定量的虎杖苷对照品溶液,涡旋混匀,按预试验结果确定各组织不同的标准曲线的质量浓度范围,分别制成系列质量浓度的样本,按 2.6 项下方法进行样品处理和测定。以虎杖苷在

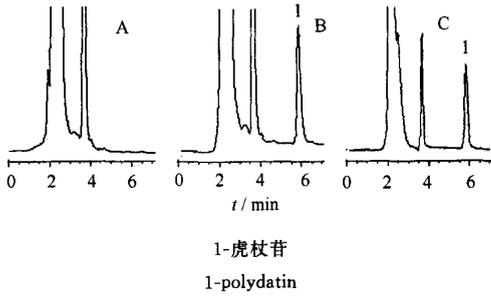


图 2 空白肝脏 (A)、空白肝脏加虎杖苷对照品 (B) 和肝脏样品色谱图 (C)

Fig. 2 Chromatograms of blank liver sample (A), blank liver sample spiked with polydatin (B), and liver sample (C)

生物样本中的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 经线性回归求得回归方程。分别为血浆: $Y = 5.876 \times 10^{-5} X - 0.0098$, $r = 0.9994$ ($n = 9$); 心脏: $Y = 5.282 \times 10^{-5} X + 0.0368$, $r = 0.9995$ ($n = 8$); 肝脏: $Y = 5.608 \times 10^{-5} X + 0.0028$, $r = 0.9988$ ($n = 7$); 脾脏: $Y = 4.974 \times 10^{-5} X + 0.0848$, $r = 0.9993$ ($n = 9$); 肺: $Y = 5.009 \times 10^{-5} X + 0.0726$, $r = 0.9975$ ($n = 7$); 肾脏: $Y = 5.421 \times 10^{-5} X + 0.0222$, $r = 0.9954$ ($n = 7$); 胃: $Y = 5.480 \times 10^{-5} X - 0.0066$, $r = 0.9967$ ($n = 6$); 小肠: $Y = 5.552 \times 10^{-5} X - 0.0044$, $r = 0.9993$ ($n = 6$); 睾丸: $Y = 5.532 \times 10^{-5} X + 0.0057$, $r = 0.9976$ ($n = 6$); 脑: $Y = 5.216 \times 10^{-5} X + 0.0418$, $r = 0.9998$ ($n = 7$)。

根据回归方程, 血浆中虎杖苷测定的线性范围为 $0.076 \sim 12.125 \mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限 ($S/N > 5$) 为 $0.015 \mu\text{g}/\text{mL}$; 心脏、肺、脑中虎杖苷测定的线性范围为 $0.152 \sim 6.063 \mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限为 $0.013 \mu\text{g}/\text{mL}$; 肝脏、肾脏、胃、小肠中虎杖苷测定的线性范围为 $0.152 \sim 3.031 \mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限为 $0.021 \mu\text{g}/\text{mL}$; 脾脏中虎杖苷测定的线性范围为 $0.152 \sim 12.125 \mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限为 $0.019 \mu\text{g}/\text{mL}$; 睾丸中虎杖苷测定的线性范围为 $0.152 \sim 1.213 \mu\text{g}/\text{mL}$, 定量下限为 $0.015 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.3 回收率与精密度试验: 按 3.2 项下同法配制虎杖苷在组织匀浆样品中的高、中、低 3 个不同质量浓度的质量控制 (QC) 样品, 按 2.6 项下同法处理, 用其峰面积与相应对照品溶液直接进样得到的峰面积进行比较, 计算绝对回收率。将组织样品测得的峰面积代入各自的标准曲线方程, 求出虎杖苷的质量浓度, 根据测得值与加入值之比计算其相对回收率。高、中、低 3 种质量浓度的组织样品的绝对回

收率均高于 70%, 相对回收率均高于 90%, RSD 均小于 15%。配制虎杖苷在各组织样品中的高、中、低 3 个不同质量浓度的 QC 样品, 每个质量浓度平行做 5 份, 连续测定 3 d, 随行标准曲线, 计算 QC 样品的测得质量浓度, 求得各组织样品测定方法的精密度, 日内及日间精密度 RSD 均小于 15%。

3.4 药动学研究结果: 大鼠 ig 给予虎杖有效部位后, 血药浓度-时间曲线经拟合后, 发现大鼠以 $50 \text{ mg}/\text{kg}$ ig 给予虎杖有效部位后, 虎杖苷在大鼠体内的药动学行为符合二室开放模型; 主要药动学参数见表 1, 血药浓度-时间曲线见图 3。

表 1 大鼠 ig 给予虎杖有效部位后主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of extract after ig administration to rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	$\bar{x} \pm s$
V	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	20.24 ± 5.92
$t_{1/2\beta}$	min	89.84 ± 27.52
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$	126.80 ± 34.16
CL	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	0.42 ± 0.12
t_{max}	min	20.80 ± 4.37
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.44 ± 0.41

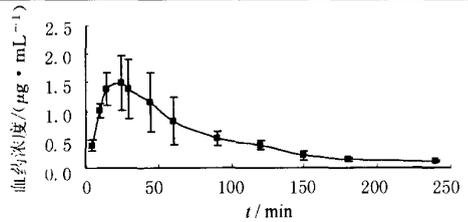


图 3 大鼠 ig 虎杖有效部位后平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of extract after ig administration to rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 虎杖苷 (ig 给药) 在大鼠体内的分布情况: 大鼠 ig 给予虎杖有效部位后 10、30、120 min 的组织分布实验结果见图 4。结果表明, 大鼠 ig 给予虎杖苷后, 组织分布迅速, 10 或 30 min 各组织中虎杖苷浓度即达峰值, 单位组织中以脾、心、肺、胃中分布较高, 肝、脑、肾次之, 小肠、睾丸组织中分布再次之。

4 讨论

4.1 药动学: 对 SD 大鼠一次性 ig 虎杖有效部位后血药浓度-时间曲线呈二室开放模型。从药动学参数可以看出, 虎杖苷口服吸收较快, t_{max} 为 $(20.80 \pm 4.37) \text{ min}$; $t_{1/2\beta}$ 为 $(89.84 \pm 27.52) \text{ min}$, CL 为 $(0.42 \pm 0.12) \text{ L}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, 说明虎杖苷在血中清除较快, 虎杖苷在大鼠体内很快消除, 不易蓄积中毒。YL 为 $(20.24 \pm 5.92) \text{ L}/\text{kg}$, 远大于大鼠的体液总

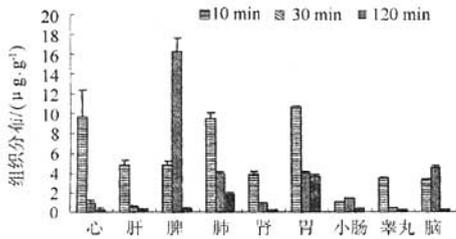


图 4 大鼠 ig 虎杖有效部位 (50 mg/kg) 后的组织分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Tissue distribution of extract after ig administration to rats (50 mg/kg) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

容积,表明虎杖苷可能与组织大量结合,而与血浆蛋白结合较少。组织分布研究结果也证实了这一推测。

4.2 组织分布:药物在体内的分布与药理作用有密切关系,组织分布决定了药效的强弱和作用的持续时间。大鼠 ig 虎杖有效部位后,经血液循环流经组织而分布于各组织中。组织分布实验研究发现,随着时间的变化,各组织中的药量呈动态分布,给药后 10 或 30 min 时各组织中的药量即达到最高,然后逐渐下降。大鼠 ig 虎杖苷后,以脾脏、心脏、肺中虎杖苷的量最高,这可能与心脏、脾脏中血管丰富,血流量大有关。在给药后 30 min 虎杖苷在脑组织中分布也较丰富,可见虎杖苷经一定时间可透过血脑屏障,

验证了虎杖苷可对一些因素引起的脑损伤起到保护作用^[2]。虎杖苷在睾丸中也有分布,10 min 即达峰浓度,这显示虎杖苷也可通过血睾屏障,因此虎杖苷对生殖器官的作用在今后的临床研究中需要引起高度的重视,监测其不良反应。另外,在研究药物体内分布的同时,还应探索其药理作用的本质,尤其是对某些在体内发生转化的药物,应将其分布与结构转化及作用机制研究结合进行,从而扩大药物的用途,提高药物作用的选择性,并可以加强对药物不良反应的防范。

4.3 在组织检测当中未检测到虎杖苷的代谢物,在各组织中的代谢产物还有待采用灵敏度更高的检测仪器进行研究。

4.4 本实验首次研究了虎杖苷在大鼠体内的组织分布,色谱分离良好,无其他色谱峰的干扰。采用 RP-HPLC 法测定组织匀浆中虎杖苷的质量浓度,样品预处理方法简便快速,方法专属性强,结果准确。

References:

[1] Lin J H, Li X H, Tang Y N, et al. HPLC Determination and pharmacokinetic study of polydatin in pig [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(5): 325-328.
 [2] Tian J W, Yang J X, Fu F H, et al. Protective effect of polydatin against rat cortex mitochondria injury induced by ·OH [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(11): 1287-1289.

黄芩苷对神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤的保护作用

朱陵群¹, 李伟华², 王硕仁¹, 牛福玲¹, 崔巍¹, 李澎涛³

(1. 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700; 2. 北京佑安医院, 北京 100054; 3. 北京中医药大学 基础医学院, 北京 100029)

摘要:目的 观察黄芩苷对神经细胞缺氧缺糖-再灌注损伤的保护作用,在细胞水平阐明黄芩苷治疗脑缺血-再灌注损伤的作用机制。方法 选用 SH-SY5Y 神经细胞,采用缺氧-复氧结合缺糖-复糖的方法,对其进行攻击,模拟人体神经细胞的缺血-再灌注损伤,观察黄芩苷对此损伤的治疗作用。结果 缺氧、缺糖 8 h 结合复氧、复糖 12 h 对神经细胞可造成明显损伤,导致 SH-SY5Y 细胞线粒体的活性下降,凋亡率明显上升;而黄芩苷可以显著减轻上述损伤。结论 黄芩苷对缺氧、缺糖-再灌注损伤的神经细胞有保护作用。

关键词:黄芩苷; SH-SY5Y; 缺氧缺糖-再灌注损伤

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2007)02-0238-04

Protection of baicalin on oxygen-glucose deprivation and reperfusion injury in neurons

ZHU Ling-qun¹, LI Wei-hua², WANG Shuo-ren¹, NIU Fu-ling¹, CUI Wei¹, LI Peng-tao³

(1. The Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Dongzhimen Hospital, Beijing University

收稿日期:2006-04-28

基金项目:国家重点基金研究发展规划(973)项目(G1999054404)

作者简介:朱陵群(1962—),男,湖南长沙人,主任医师,研究员,硕士生导师,主要从事中西医结合防治脑血管疾病的临床与应用基础研究及进行中药新药开发、设计、药理(药效)的研究。

Tel: (010) 84013196 13661276736 E-mail: lingqunzh@vip.sina.com