

· 药物代谢 ·

葡萄内酯在大鼠体内的组织分布

叶喜德¹, 许小强², 张建康³, 马琳⁴, 黄兆胜⁵, 欧阳辉^{6*}, 杨武亮^{1*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 深圳市罗湖区中医院, 广东深圳 518001;

3. 江西中医药高等专科学校, 江西抚州 344000; 4. 抚州市妇幼保健院, 江西抚州 518001;

5. 广州中医药大学, 广州 510006; 6. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的:探讨葡萄内酯软胶囊中药物在大鼠体内的组织分布情况。方法:采用大鼠灌胃给药法,依据大鼠灌胃给药后药物浓度-时间曲线,确定大鼠注射给药后于4个时间点依次采取组织样品,取各空白组织匀浆液,建立各组织中药物的标准曲线,计算该组织样品中葡萄内酯的含量,同时制备高、中、低浓度双样本质控(QC)样品,用以判断该批样品结果的可靠性。数据采用Analyst 1.6软件分析。结果:大鼠按 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药后,大鼠灌胃给药30 min时,葡萄内酯在心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠和肌肉中浓度达峰值。服药120 min时,小肠中葡萄内酯显著减少,脂肪和血液中药物浓度增加较为明显。6 h时除脑外,各脏器药物浓度均大幅度下降,小肠中药物浓度最高。8 h时各主要脏器药物浓度已显著降低。结论:灌胃葡萄内酯软胶囊内容物后能快速分布于大鼠各主要组织中,其中胃肠道的药物浓度一直较高,其他组织以肝脏、肺中药物浓度较高。脑组织中药物浓度一直维持在较高水平,这可能与葡萄内酯软胶囊对老年痴呆的活性靶向性存在一定的相关性。

[关键词] 葡萄内酯; 软胶囊; 组织分布; 药-时曲线; 灌胃给药

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240069

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1034.004.html>

[网络出版时间] 2015-10-28 10:34

Tissue Distribution of Auraptene in Rats YE Xi-de¹, XU Xiao-qiang², ZHANG Jian-kang³, MA Lin⁴, HUANG Zhao-sheng⁵, OUYANG Hui^{6*}, YANG Wu-liang^{1*} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Luohu Hospital of Chinese Medicine, Shenzhen 518001, China; 3. Jiangxi Traditional Chinese Medical College, Fuzhou 344000, China; 4. Fuzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Fuzhou 344000, China; 5. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 6. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate tissue distribution of auraptene in rats. **Method:** Rat intragastric administration method was used. The content of auraptene in tissue sample was calculated after determining four time points with intragastric administration and taking tissue samples successively by establish a standard curve for drugs in various tissues. Meanwhile, two sample quality control (QC) sample with high, medium and low concentrations were done for judging reliability of results of this batch of samples. Data were analyzed by Analyst 1.6 software. **Result:** With gastric administration by $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, auraptene was rapidly distributed in different tissues including heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach, small intestine and muscle after 30 min. The

[收稿日期] 20150730(005)

[基金项目] 江西省高等学校教学改革研究省级课题(JXJG-14-12-19);江西省卫生厅中医药科研基金项目(2013A031);江西中医药大学基金项目(ZX1014)

[第一作者] 叶喜德,博士,讲师,从事中药化学成分研究,Tel:0791-87118995,E-mail:552376722@qq.com

[通讯作者] * 欧阳辉,博士,讲师,从事中药药效研究,Tel:0791-87119652,E-mail:huiouyang@163.com;

* 杨武亮,教授,博士生导师,从事中药成分分析研究,Tel:0791-87118995,E-mail:997926164@qq.com

concentration of auraptene in small intestine significantly decreased by 120 min, while drug concentrations in fat and blood mainly increased. The concentration of drug for other issues beside brain by 6 h were dropped greatly and then drug concentration of all main issues decreased significantly at 8 h. **Conclusion:** Auraptene soft capsule can be rapidly distributed in main tissues of rats after gastric administration, drug concentration in gastrointestinal tract is always high, its concentrations in liver and lung are higher than other tissues. In addition, the concentration of auraptene in brain tissue remains at a high level, which may be related to active targeting of auraptene soft capsule on senile dementia.

[**Key words**] auraptene; soft capsule; tissue distribution; drug concentration-time curve; intragastrical administration

葡萄内酯是一种从枳壳药材中提取分离得到的无色针状结晶化合物^[1],熔点 52 ~ 54 °C, 365 nm 紫外灯下显蓝色荧光,结构式见图 1。近年研究表明,葡萄内酯能促使乙酰胆碱释放,具有促胃肠运动作用,可增强胃肠平滑肌收缩力,促进胃肠排空和转运^[2],并能抑制胆碱脂酶分泌而达到改善机体学习记忆功能的目的^[3]。葡萄内酯的这种抑制胆碱酯酶活性,是防治老年痴呆的重要作用机制^[4]。在目前用于防治老年痴呆药物中,化学药物占据多数,且毒副作用明显,对机体损害较大,临床应用受到了很大限制^[5]。因此,从天然产物中寻找此类药物,以达到防治痴呆的目的,是当前研究的热点。前期研究显示葡萄内酯可提高受试动物学习记忆能力,且安全用药范围大,提示其作为老年痴呆新药的开发具有重要意义^[6-9]。

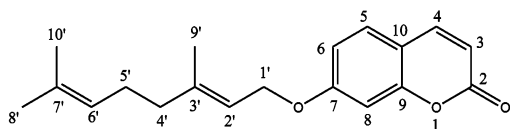


图 1 葡萄内酯结构式

Fig.1 Structural formula of auraptene

然而,由于葡萄内酯极性较小、水溶性较差,在一定程度上会影响其口服吸收。因此,选择合适的剂型,改善其体内吸收过程,提高药效并明确其机制是深入研究葡萄内酯亟需解决的问题。软胶囊是目前较为成熟的一种剂型,主要适用于油状性的脂溶性化合物制备,有利于剂量小、难溶于水的脂溶性化合物及在消化道不易吸收的药物成型^[10]。药物通过制备成软胶囊后,不仅可以减少过多的辅料和因加热过程时有可能引起的成分破坏,还可减少其他如空气、湿度、重金属等因素造成对药物性质的影响,有利于提高药物稳定性^[11]。葡萄内酯的化学性质就符合软胶囊制备成型特点。按照药理学中受体理论,药物发挥效应是与相应组织中受体结合而

产生的。因此,研究药物在组织中的分布有利于阐明药物在各组织的含量、药物蓄积情况及代谢规律,为推测药物在不同组织发挥作用的物质基础分析提供参考。本实验拟建立 LC/MS 测定葡萄内酯在组织中含量^[12],并对大鼠灌胃葡萄内酯软胶囊后肝、心、脾、肺、肾、脑、胃等主要组织进行研究,阐明该制剂在大鼠体内组织中的分布及药物浓度随时间的变化规律。

1 材料

Q-trap 4500 型三重四级杆线性离子阱质谱联用仪和 Ekspert UltraLC 100-XL 型超高效液相色谱仪(美国 AB SCIEX 公司),Sorvall Legend Micro 17R 型离心机(德国赛默飞世尔公司),MTV-100 型多管漩涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司),PT-2500E 型匀浆机(上海斯高勒生物科技有限公司),MTN-28000 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),Milli-Q 系统纯化水(美国 Millipore 公司),BT25S 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司)。葡萄内酯软胶囊(每粒含葡萄内酯 5 mg,大豆油 0.25 mL,粒重 0.23 g,自制),孕酮(内标,中国食品药品检定研究院,批号 140608-100327),乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠,由苏州市工业园区爱尔麦特科技有限公司提供,合格证号 SCXK(苏)2009-0001。

2 方法与结果

2.1 组织分布考察 选用 21 只 SD 大鼠,随机取 1 只不给药处死,依次取脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脂肪、肌肉和生殖器共 11 种组织,作为空白样品。其余 20 只随机分成 4 组,按剂量 100 mg·kg⁻¹灌胃给予葡萄内酯软胶囊内容物溶液。给药前大鼠禁食 12 h,自由饮水,分别于大鼠灌胃给药后 30, 120, 360, 480 min 从眼眶静脉丛取血 200 μL,装于

1.5 mL 离心管中,并立即处死,取各组织样品,用生理盐水洗净,用滤纸吸干,将各组织剪碎约取 0.2 g (不足 0.2 g 的取全部,精密称定)置于匀浆管,按组织-水(1:3)的比例加水匀浆处理,匀浆液于 -40 °C 保存待测。

2.2 样品的处理和分析 方法学考察按照《生物样品定量分析指导原则》进行优化。取大鼠组织匀浆液 100 μL 置于 1.5 mL 离心管中,加内标溶液(10 mg·L⁻¹孕酮)30 μL,混合,加入乙酸乙酯 500 μL,涡旋震荡 5 min,离心 10 min(13 000 r·min⁻¹,下同),取上清液至另一 1.5 mL 离心管中,加入乙酸乙酯 500 μL,涡旋震荡 5 min,离心 10 min,合并 2 次提取液,N₂ 吹干,残渣加甲醇 100 μL 复溶,离心 5 min,取上清液 5 μL 进行 LC/MS 分析^[13]。取各空白组织匀浆液按上述方法处理,建立各组织中葡萄内酯的标准曲线,见表 1。

表 1 葡萄内酯在不同组织中的标准曲线和线性范围
Table 1 Regression equation and linearity range of auraptene in different tissue of rats

组织	线性方程	r
心	$Y = 8.21 \times 10^{-4} X + 7.76 \times 10^{-4}$	0.997 0
肝	$Y = 8.99 \times 10^{-4} X + 6.44 \times 10^{-4}$	0.991 2
脾	$Y = 6.35 \times 10^{-4} X + 1.57 \times 10^{-4}$	0.998 8
肺	$Y = 5.53 \times 10^{-4} X + 7.07 \times 10^{-4}$	0.991 3
肾	$Y = 6.88 \times 10^{-4} X + 3.15 \times 10^{-4}$	0.991 7
脑	$Y = 7.07 \times 10^{-4} X + 5.60 \times 10^{-4}$	0.997 9
胃	$Y = 8.86 \times 10^{-4} X + 3.60 \times 10^{-4}$	0.995 5
脂肪	$Y = 7.95 \times 10^{-4} X + 4.26 \times 10^{-4}$	0.991 1
肌肉	$Y = 5.65 \times 10^{-4} X + 3.87 \times 10^{-4}$	0.991 5
生殖腺	$Y = 8.69 \times 10^{-4} X + 4.45 \times 10^{-4}$	0.991 4
小肠	$Y = 5.22 \times 10^{-4} X + 4.29 \times 10^{-4}$	0.991 5

注:线性范围均为 0.02 ~ 2 mg·L⁻¹。

2.3 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(2.0 mm × 50 mm,5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 0.8 min,90% A;0.8 ~ 1.2 min,90% ~ 10% A;1.2 ~ 3.6 min,10% A;3.6 ~ 4.2 min,10% ~ 90% A;4.2 ~ 5.0 min,90% A),流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 5 μL。

2.4 质谱条件 离子源为电喷雾离子化(ESI),离子喷射电压 5.5 kV,离子源温度 600 °C,辅助气体 1,2(N₂)流速均为 0.345 MPa,离子检测方式多反应监测(MRM),离子极性正离子。检测离子对为葡萄内酯 m/z 299.3 ~ 162.9,去簇电压(DP)120 V,碰撞

能量(CE)30 eV;孕酮 m/z 315.2 ~ 96.9,DP 150 V,CE 30 eV。

2.5 精密度与准确度 取大鼠空白组织 100 μL,按 2.2 项下条件配制定量下限、高、中、低 4 个质量浓度的葡萄内酯对照品溶液(0.02,0.05,1.00,1.60 mg·L⁻¹)作为质量控制样品(n=5),按样品处理方法处理,量取 5 μL 连续进样 3 d,并与当天的标准曲线同时进行,计算分析方法的准确度与精密度。日内、日间考察的定量下限要求 RSD ≤ 20%,相对偏差(RE)需在 ± 20% 内,低、中、高质量浓度样品的 RSD ≤ 15% 及 RE 在 ± 15% 内。结果表明该方法精密度好、准确度高。

2.6 回收率 取大鼠空白组织,按样品处理方法处理,分别制备定量下限、低、中、高 4 个质量浓度(0.02,0.05,1.00,1.60 mg·L⁻¹)的样品(n=5)。另取大鼠空白组织,不加入葡萄内酯,按样品处理方法进行处理,N₂ 吹挥干溶剂后加入葡萄内酯对照品溶液,使其终质量浓度分别为 0.02,0.05,1.00,1.60 mg·L⁻¹(n=5)。以同一质量浓度 2 种不同处理方法进样分析得到的峰面积比值,计算提取回收率均 > 90%。

2.7 稳定性 配置定量下限、低、中、高 4 个质量浓度组织样品(n=3),分别考察上述样品在反复冻融 3 次后不受影响,样品在 -4 °C 条件下放置 12 h 稳定,样品在 -40 °C 条件下放置 1 个月稳定以及样品放置进样盘上放置 48 h 稳定。

2.8 数据处理 数据采用 Analyst 1.6 软件处理,不同时间点各组织匀浆中葡萄内酯含量见表 2。大鼠按 100 mg·kg⁻¹灌胃葡萄内酯软胶囊内容物溶液后,灌胃 30 min 后各组织中药物浓度顺序为小肠 > 胃 > 肝脏 > 肺 > 脂肪 > 肾脏 > 脾脏 > 骨骼肌 > 脑 > 血浆 > 心脏 > 生殖腺;灌胃 120 min 后各组织中药物浓度顺序为小肠 > 脂肪 > 胃 > 肝脏 > 肺 > 血浆 > 脑 > 骨骼肌 > 心脏 > 脾脏 > 肾脏 > 生殖腺;灌胃 360 min 后各组织中药物浓度顺序为小肠 > 胃 > 脑 > 脂肪 > 肝脏 > 肺 > 血浆 > 脾脏 > 生殖腺 > 肾脏 > 心脏 > 骨骼肌;灌胃 480 min 后各组织中药物浓度顺序为小肠 > 脂肪 > 脑 > 肝脏 > 胃 > 肺 > 骨骼肌 > 肾脏 > 心脏 > 脾脏 > 生殖腺 > 血浆。大鼠灌胃给药 30 min 时,葡萄内酯在心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠和肌肉中浓度达峰值;小肠中葡萄内酯质量浓度显著高于其他组织,生殖腺中最低。服药 120 min 时,小肠中葡萄内酯显著减少,增加的以脂肪和血液为主,而小肠中药物浓度仍最高,脂肪和胃中药物浓

度次之。6 h 时除脑外,各脏器药物浓度均大幅度下降,小肠中药物浓度最高。8 h 时各主要脏器药

物浓度已显著降低,其中心、脾、生殖腺和肾中葡萄内酯浓度在大鼠灌胃后处于较低水平。

表 2 大鼠灌胃给予葡萄内酯软胶囊后各组织中药物质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Concentration of auraptene in different tissue after intragastrical administration of auraptene soft capsule in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

ng · g⁻¹

组织	30 min	120 min	360 min	480 min
心	842.5 ± 145.20	643.6 ± 189.58	232.1 ± 72.54	92.6 ± 15.95
肝	6 108.5 ± 1 687.26	2 872.9 ± 138.48	1 501.8 ± 184.86	449.9 ± 84.42
脾	976.2 ± 209.43	516.2 ± 85.009	327.5 ± 31.13	60.2 ± 8.43
肺	4 853.7 ± 1 555.10	2 568.4 ± 237.91	589.8 ± 50.99	184.0 ± 43.64
肾	1 013.0 ± 257.32	485.0 ± 56.45	247.2 ± 20.02	153.3 ± 23.52
脑	917.5 ± 182.01	1 355.7 ± 194.28	2 509.9 ± 170.32	541.8 ± 90.42
胃	9 200.7 ± 2 217.81	5 231.0 ± 582.95	2 985.6 ± 621.33	401.7 ± 183.10
脂肪	4 071.4 ± 828.61	5 885.4 ± 1 081.8	2 386.6 ± 348.27	597.6 ± 272.49
肌肉	934.1 ± 205.39	913.4 ± 107.08	189.1 ± 104.70	165.5 ± 222.96
生殖腺	187.8 ± 32.54	276.6 ± 93.971	247.9 ± 189.23	56.9 ± 23.56
小肠	93 924.7 ± 21 387.39	27 019.0 ± 5 547.00	19 275.4 ± 30 402.28	2 147.9 ± 485.74
血浆	897.2 ± 185.40	2 065.5 ± 522.22	329.5 ± 192.00	30.6 ± 6.50

3 讨论

药物在机体组织中分布是药代动力学研究的重要内容^[14]。通过研究药物在不同组织器官的分布情况,有利于确定药物的靶点,揭示其发挥生物活性的作用机制,以评价其药效活性。这对于开展药物毒理学研究、新药安全性评价等方面具有重要意义。

前期实验发现大鼠灌胃葡萄内酯后血药浓度个体差异较大,各给药浓度的个体达峰时间和达峰浓度变异很大,提示药物灌胃吸收呈不规则性。本文通过给大鼠灌胃(100 mg · kg⁻¹)葡萄内酯软胶囊内容物溶液,得到 4 个不同时间节点葡萄内酯在各组织中的药物浓度。灌胃给药 30 min 后,药物已快速分布各主要组织,且在多数组织中浓度已达峰值。其中胃肠道药物浓度相对较高,其他组织以肝脏、肺中药物浓度较高。给药 2 h 后,脂肪中药物浓度一直维持在较高的水平,这有可能与药物剂型、溶解性能有关。值得注意的是,脑组织中药物浓度一直维持在较高水平,这与葡萄内酯软胶囊对老年痴呆的活性靶向性可能存在相关性。而葡萄内酯在生殖腺中含量很低,提示其对生殖系统的影响甚少。给药 8 h 后,各组织中葡萄内酯含量均有明显下降趋势,与峰值对比,大多数低于各组织峰值的 10%,说明该药物在上述组织中不容易蓄积。

[3] 张普照,黎艳刚,杨武亮,等. 葡萄内酯和马尔敏的合成及活性研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(8):1851-1853.

[4] 方立,陈瑶,张奕华. 抗阿尔茨海默病的胆碱酯酶抑制剂研究进展[J]. 药学进展,2009,33(7):289-295.

[5] 孙磊,杨莹,窦彩艳. 阿尔兹海默病治疗的研究进展[J]. 医学信息,2010,5(7):1969-1970.

[6] 叶喜德,黄兆胜,杨武亮,等. 葡萄内酯的安全性药理学研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):522-526.

[7] 张瑜,陈海芳,杨武亮,等. 葡萄内酯对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆的影响及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(5):498-501.

[8] 陈海芳,骆利平,杨武亮,等. 葡萄内酯对脑缺血致血管性痴呆大鼠的保护作用[J]. 中国新药杂志,2012,21(11):1210-1213.

[9] 涂明珠,肖移生,杨武亮,等. 枳壳活性成分对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 生长的影响[J]. 江西中医学院学报,2010,22(3):41-43.

[10] 黄方言,黄晴. 现代实用中药新剂型新技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2001,214-217.

[11] 黄敏,张钧寿,谢跃进. 软胶囊剂稳定性研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2000,31(3):137-141.

[12] 杨振东,张琪,马博,等. LC-MS/MS 同时测定曲美布汀和活性代谢物在 Beagle 犬体内的血药浓度及其药代动力学研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(8):1351-1356.

[13] 于斌,梁芳,黄光玉,等. LC-MS-MS 研究白藜芦醇在大鼠胆汁中的代谢[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):116-119.

[14] 曾宇. 当归芍药散抗衰老活性的药效学和药代动力学研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.

[参考文献]

[1] 叶喜德,黄兆胜,杨武亮,等. 枳壳中葡萄内酯提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(9):2136-2138.

[2] 徐欢,陈海芳,杨武亮,等. 枳实、枳壳的化学成分及胃肠动力研究概述[J]. 江西中医学院学报,2009,21(1):42-43.

[责任编辑 刘德文]