

# 大鼠口服二苯乙烯苷及其 $\beta$ -环糊精包合物的组织分布研究

王萌<sup>1</sup>, 任晓亮<sup>2\*</sup>, 欧阳慧子<sup>2</sup>, 王贵芳<sup>2</sup>, 戚爱棣<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

**[摘要]** **目的:**通过对大鼠分别灌胃给予二苯乙烯苷(THSG)单体及其 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)包合物,研究THSG在大鼠主要8种脏器组织中的含量-时间分布。**方法:**首先将给药后15,30,60 min各组织样品取出后处理,随后采用高效液相-紫外法(HPLC-UV)测定生物样品中THSG含量。**结果:**THSG在多个组织中均能被检测到,证明其体内组织分布较为广泛,THSG- $\beta$ -CD包合物对大鼠灌胃给药后,虽然THSG的血药浓度较给予同剂量的THSG单体有显著增加,但在脾脏、肺、脑、胰腺中的分布并无显著差异;而在心脏、肾脏、脂肪组织中的分布则表现出含量达峰时间延后的特点。**结论:** $\beta$ -CD的包合作用仅改变了药物在组织中的达峰时间,并不会造成药物在组织中的蓄积。

**[关键词]** 二苯乙烯苷; 何首乌;  $\beta$ -环糊精; 组织分布

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0098-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014040098

## Study on Tissue Distribution of Stilbene Glycoside (THSG) and its $\beta$ -cyclodextrin Inclusion

WANG Meng<sup>1</sup>, REN Xiao-liang<sup>2\*</sup>, OUYANG Hui-zi<sup>2</sup>, WANG Gui-fang<sup>2</sup>, QI Ai-di<sup>2</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** The tissue distribution characteristics of stilbene glycoside (THSG) and its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion in 8 tissues after oral administration to rats were studied. **Method:** The samples of 8 different tissues were collected at 15, 30, 60 min, respectively. The content of THSG was determined by HPLC-UV. **Result:** The HPLC-UV method established was available for analysis of THSG in tissues and met the requirements of biological sample analysis. There was no significant difference of THSG concentration in the spleen, lung, brain

**[收稿日期]** 20130415(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81102732);高等学校博士学科点专项科研基金项目(新教师类)(20111210120006)

**[第一作者]** 王萌,助理研究员,从事药物分析及药剂学研究,E-mail:mengwangr@163.com

**[通讯作者]** \*任晓亮,Tel:022-59596221,E-mail:xiaoliang\_ren@sina.com

[6] 史伟国,张玉,杜永强,等. 赤芍中芍药苷的匀浆提取工艺优化[J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(2):59.

[7] Zhang T H, Meng P, Kou M, et al. Rapid and sensitive UPLC-MS-MS for the determination of trimetazidine in human plasma[J]. Chromatographia, 2010, 71(11/12):1101.

[8] 刘英慧,陈晓玲,黄琪,等. 高效液相色谱法测定樺木叶中没食子酸的含量[J]. 中南药学, 2012, 10(1):33.

[9] 鲍天冬,李玉洁,杨庆,等. LC/MS测定大鼠灌胃黄

连提取物后血浆中小檗碱、巴马汀及其药物动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):186.

[10] KIM Y H, JEONG D W, KIM Y C, et al. Pharmacokinetics of baicalein, baicalin and wogonin after oral administration of a standardized extract of *Scutellaria baicalensis*, PF-2405 in rats[J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(2):260.

[责任编辑 邹晓翠]

and pancreas between THSG group and  $\beta$ -CD-THSG complex group. However, the concentration of THSG in the tissues materials of heart, kidneys and fat was higher by given  $\beta$ -CD-THSG complex. In addition,  $t_{\max}$  of THSG in tissues was delayed by given  $\beta$ -CD-THSG complex, which was observed obviously in heart, liver, spleen and fat tissue. **Conclusion:**  $\beta$ -CD inclusion only changed the  $t_{\max}$  of THSG in the tissues, and will not cause the accumulation in the tissues.

[**Key words**] stilbene glycoside (THSG); *Polygonum multiflorum*;  $\beta$ -cyclodextrin; tissue distribution

何首乌蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的根与根茎,其特有成分二苯乙烯苷(THSG),即2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(2,3,5,4-tetrahydroxyl-diphenylethylene-2-O-glucoside),是其主要活性单体成分和质控指标成分<sup>[1]</sup>,具有降血脂、抗肿瘤活性、抗氧化、免疫调节、保肝等多种药理作用<sup>[2-4]</sup>。

笔者前期研究发现,THSG化学稳定性较差,在强酸、强碱、光照条件下均迅速降解<sup>[5-6]</sup>。为了增加其稳定性,保证其用药的安全性和有效性,笔者制备了THSG- $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)包合物,考察了 $\beta$ -CD改性后的THSG体外稳定性,并在此基础上进行了生物利用度比较试验,发现较单体药物均有较大程度的改善和提高<sup>[7-8]</sup>;但 $\beta$ -CD对药物体内组织分布的影响罕见报道,因此本试验对THSG及其 $\beta$ -CD包合物的组织分布特征加以研究,以期揭示 $\beta$ -CD的包合作用对药物体内分布特征的影响<sup>[9]</sup>。

## 1 材料

**1.1 药物** THSG对照品(批号110844-200606)及黄芩苷对照品(批号110715-200212)均购自中国药品生物制品检定所;THSG粉末(自制,采用硅胶柱色谱分离、重结晶纯化制得,TLC显示为单一斑点,DAD显示为单一化合物峰,HPLC测定其纯度 $\geq 96\%$ )。

**1.2 动物** Wistar大鼠,体重(250 $\pm$ 20)g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号0063136。

**1.3 仪器** Waters 600E型高效液相色谱系统(美国Waters公司),AX205型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),N-EAVP™ 111型氮吹仪(美国Organomation公司),ALLEGRA X-15R型台式离心机(美国Beckman公司),XW-80A微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),超纯水系统(美国Millipore公司),玻璃组织匀浆器(天津双吉仪器有限公司)。

**1.4 试剂** 生理盐水(中国大冢制药有限公司), $\beta$ -CD(孟州市华兴生物化工有限责任公司),甲醇(色谱纯)及乙腈(色谱纯)。超纯水(美国Millipore

超纯水系统)。

## 2 方法

**2.1 包合物的制备**  $\beta$ -CD用水反复重结晶2次,干燥后称取适量溶于蒸馏水配成9.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的 $\beta$ -CD储备液。取 $\beta$ -CD储备液300 mL置于500 mL圆底烧瓶中,持续搅拌下逐渐加入1.0 g THSG粉末,10 $^{\circ}$ C下避光搅拌6 h,4 $^{\circ}$ C静置过夜后减压回收溶剂得包合物粉末,用少量乙醇洗涤后真空干燥,即得到棕褐色包合物,经热重分析-差示量热分析证实了THSG- $\beta$ -CD包合物的形成,采用紫外光谱分析<sup>[10]</sup>,计算得包合物的包合比为1:1,HPLC测定该包合物中THSG含量为30.9%。

**2.2 对照品的配制** 精密称取二苯乙烯苷对照品适量于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解,得1 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>二苯乙烯苷储备液,将该溶液以甲醇稀释,得到系列质量浓度的对照品溶液。

精密称取黄芩苷对照品适量于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解,配成140.0 mg $\cdot$ L的黄芩苷储备液。用甲醇稀释成14 mg $\cdot$ L的内标溶液。

**2.3 生物样品的收集** 将30只大鼠随机分为2组,每组15只,分别灌胃给予THSG及其 $\beta$ -CD包合物(以THSG计均为75 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>),给药前禁食12 h,自由饮水。每个受试组15只大鼠随机分成A,B,C 3组,根据前期药代动力学研究结果,THSG给药后约30 min血药浓度达峰,组织分布研究通常于达峰点及前后各取一时间点,本实验于给药后15,30,60 min后取材(每个时间点5只),血浆样品加入肝素抗凝,立即离心后分取血浆,于-20 $^{\circ}$ C储存备用,测定前室温解冻;各组织立即匀浆,匀浆液储存于-20 $^{\circ}$ C备用,使用前室温解冻并涡旋混匀。

**2.4 生物样品的处理** 大鼠全血加肝素抗凝,4 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心10 min后分取上层血浆250  $\mu$ L,精密加入14 mg $\cdot$ L的黄芩苷内标溶液50  $\mu$ L,涡旋10 s,加入0.2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的盐酸溶液50  $\mu$ L,涡旋1 min,再加入甲醇750  $\mu$ L,涡旋3 min后14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心10 min。取上清液,氮气吹干后,100  $\mu$ L流动相复溶,14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清液

### 10 $\mu\text{L}$ 进样分析。

大鼠股动脉放血处死,血样按照上述方法处理,解剖后取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、胰腺、脂肪组织,以生理盐水漂洗除去残留血液,以滤纸吸干表面水分。对于  $>1\text{ g}$  的组织取  $1\text{ g}$ ,对于  $<1\text{ g}$  的组织取实际量,称重并记录各组织实际取材质量。按组织:生理盐水 ( $1\text{ g}:2\text{ mL}$ ) 的比例加入生理盐水,于玻璃匀浆器中充分匀浆,精密加入  $14\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的黄芩苷内标溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,涡旋  $10\text{ s}$ ,加入  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,涡旋  $1\text{ min}$ ,再加入萃取液(甲醇-乙酸乙酯  $1:1$ )  $750\text{ }\mu\text{L}$ ,涡旋  $3\text{ min}$  后  $14\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$ 。取上清液,氮气吹干后,  $100\text{ }\mu\text{L}$  流动相复溶,  $14\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10\text{ min}$ ,取上清液  $10\text{ }\mu\text{L}$  进样分析。

**2.5 分析方法** Waters Symmetry Shield<sup>TM</sup> RP18 色谱柱 ( $3.9\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-水-磷酸 ( $25:75:0.05$ ),流速  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长  $320\text{ nm}$ ,柱温  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,以黄芩苷为内标 (IS),采用内标法测定。

## 3 结果

### 3.1 分析方法的验证

**3.1.1 专属性试验** 取空白的大鼠各组织样品,按 2.4“生物样品的处理”项下方法处理并分析,获得空白样品色谱图。由图 1 可知,在选定色谱条件下,THSG 与内源性物质均分离良好。

**3.1.2 线性关系考察** 取 9 种空白生物样品,分别加入 THSG 对照品溶液适量,配制成系列浓度的样品,按 2.4“生物样品的处理”项下方法处理并分析,以 THSG 色谱峰面积为纵坐标,样品溶液浓度为横坐标作图,进行线性回归,得回归方程,结果见表 1。

表 1 THSG 生物样品线性关系考察

生物样品	回归方程	R	线性范围
心	$Y=0.1662X+0.0040$	0.9961	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
肝	$Y=0.2220X+0.0026$	0.9981	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
脾	$Y=0.2741X+0.0567$	0.9915	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
肺	$Y=0.1520X+0.0490$	0.9691	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
肾	$Y=0.2183X+0.0286$	0.9977	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
脑	$Y=0.1098X+0.0989$	0.9928	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
胰	$Y=0.1738X+0.120$	0.9991	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
脂肪	$Y=0.2364X+0.1212$	0.9902	$0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
血浆	$Y=0.2060X+0.3753$	0.9981	$0.4\sim 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

样品质量分数在  $0.2\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,峰面积比值  $A_s/A_i$  与 THSG 在各生物样品中的浓度线性关系良好。

**3.1.3 精准度及回收率试验** 取 9 种空白的生物样品,加入 THSG 对照品适量,制成高、中、低 3 个不同浓度样品,每个浓度 6 份,分别按 2.4 项下方法处理并分析,进行精准度和回收率考察。结果表明方法的回收率、日内精准度和日间精准度均符合生物样品分析要求,结果见表 2。

表 2 THSG 在不同生物样品中的回收率及精密度 %

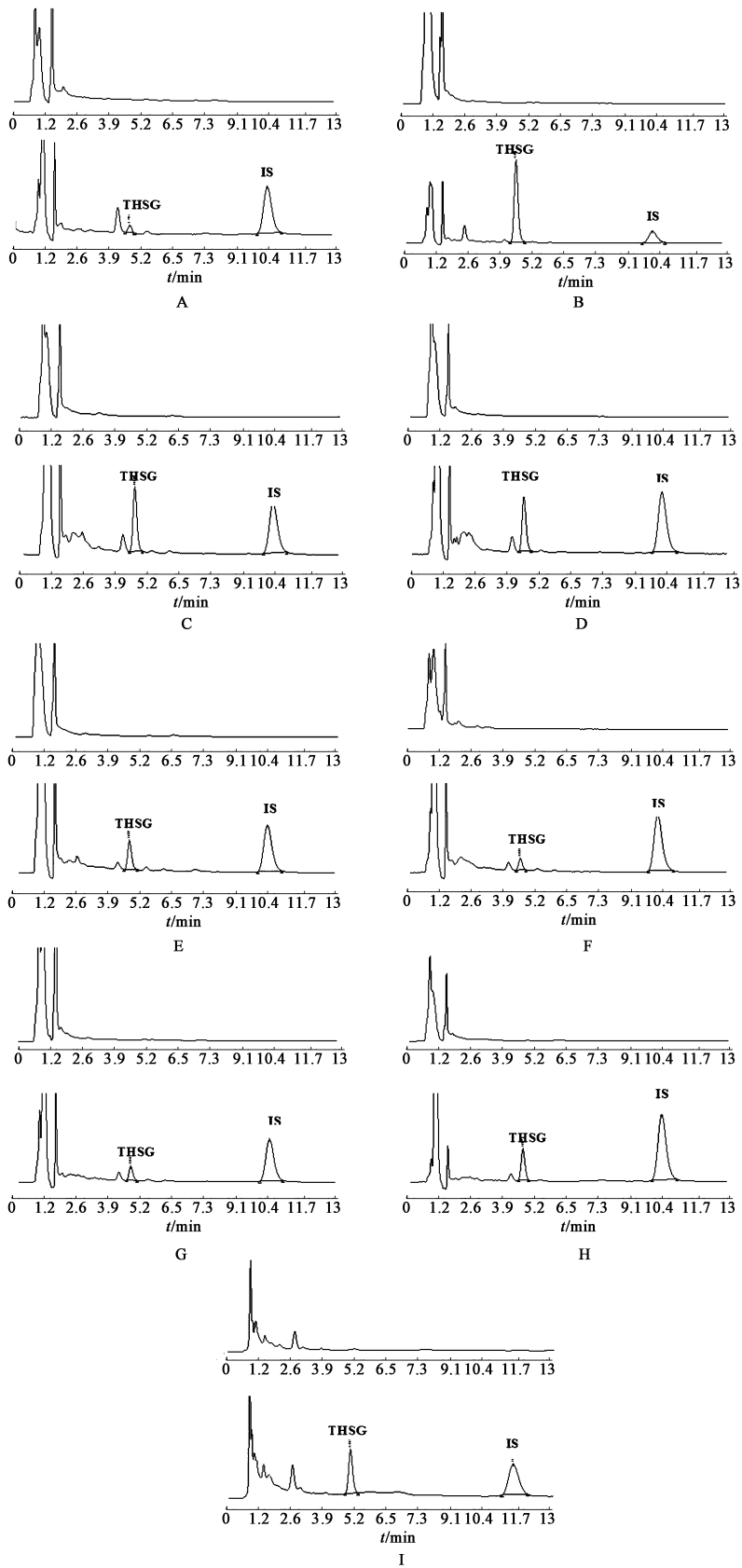
生物样品剂量	回收率		精密度 RSD		
	日内 (n=6)	日间 (n=18)	日内 (n=6)	日间 (n=18)	
心	低	84.3~96.6	89.4	2.1~4.9	3.0
	中	84.7~96.7	89.2	3.0~5.1	4.3
	高	103.6~113.4	108.1	3.8~5.4	3.9
肝	低	97.6~111.4	103.8	1.0~8.3	7.7
	中	92.7~109.6	103.9	5.2~5.9	5.9
	高	101.7~107.6	104.8	2.0~2.5	2.0
脾	低	94.5~119.8	107.5	8.2~11.1	9.0
	中	86.6~113.8	94.8	1.6~10.7	10.6
	高	86.3~96.2	92.2	1.1~4.6	1.3
肺	低	102.9~113.8	107.5	2.2~4.4	4.2
	中	95.2~113.1	106.9	6.4~8.6	6.6
	高	86.4~113.2	94.6	9.6~11.1	9.7
肾	低	102.6~113.1	105.5	3.1~6.2	3.5
	中	90.5~107.8	98.2	7.6~9.5	7.7
	高	94.3~108.9	101.9	5.3~5.8	5.5
脑	低	80.4~118.9	96.8	12.3~14.9	12.4
	中	85.5~91.5	87.9	3.1~7.7	6.7
	高	94.7~108.3	102.8	0.9~4.8	1.9
胰	低	93.3~102.6	96.6	3.1~5.7	4.3
	中	98.0~110.0	104.6	0.8~5.5	1.4
	高	86.5~107.7	96.4	4.3~9.2	7.5
脂肪	低	97.8~109.3	104.6	4.1~14.5	5.7
	中	89.7~109.8	99.6	7.3~11.9	7.9
	高	85.2~114.5	101.1	0.8~11.8	6.8
血浆	低	87.7~95.1	91.6	1.9~4.9	4.0
	中	94.0~95.8	95.0	2.9~4.6	3.6
	高	107.0~108.7	108.0	1.1~2.8	1.9

**3.2 组织分布试验** 测定各种大鼠组织生物样品,将峰面积代入 3.1.2 项下工作曲线定量,大鼠灌胃 THSG 及  $\beta\text{-CD}$  包合物后不同时间各组织中药物浓度及组织分布试验结果见图 2。

## 4 讨论

本实验首次采用组织分布的研究方法分析了  $\beta\text{-CD}$  的改性作用对药物口服后体内过程的影响。

结果表明,血浆浓度在  $0.4\sim 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,各组织

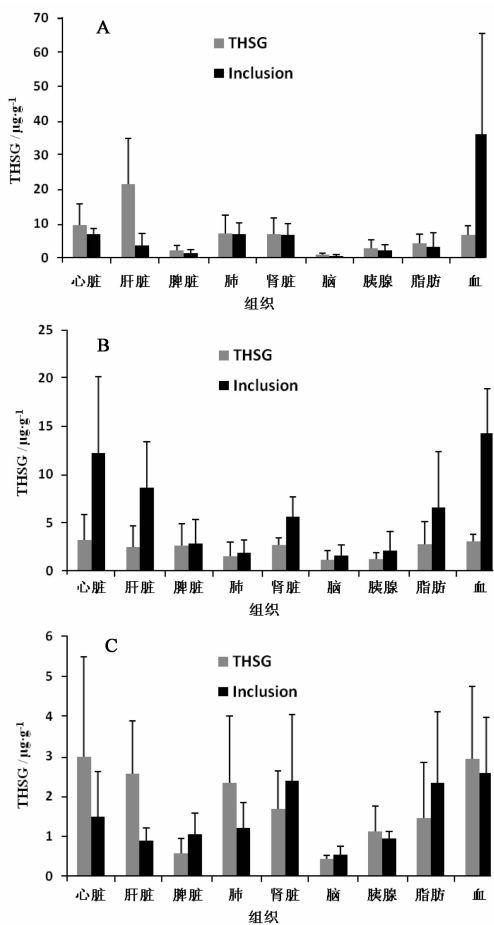


A. 心脏;B. 肝脏;C. 脾脏;D. 肺;E. 肾脏;F. 脑;G. 胰腺;H. 脂肪;I. 血浆

图1 大鼠各组织 HPLC

在健康大鼠上的研究表明, $\beta$ -CD 的改性作用可以显著提高灌胃给药后 THSG 的血药浓度,对心脏、

肝脏、肾脏、脂肪组织中 THSG 的分布也有影响,对脾脏、肺、脑、胰腺中 THSG 的分布并无显著影响。



A. 给药后 15 min; B. 给药后 30 min; C. 给药后 60 min

图 2 大鼠灌胃 THSG 及其  $\beta$ -CD 包合物各组织中 THSG 浓度分布 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

从 THSG 在各脏器的分布来看,  $\beta$ -CD 的改性作用对于灌胃给予药物在组织中的分布影响, 除了可以提高药物在部分脏器中的浓度外, 主要体现在药物浓度达峰时间的延后上, 该特点在心脏、肝脏、脾脏、脂肪等组织中相当明显。这可以被解释为 THSG 向各组织中分布的速率较慢,  $\beta$ -CD 的改性作用较大程度的提高了血药浓度, 在 30 min 时仍可保持药物从血中向组织中分布, 使得达峰时间延后。而灌胃给予 THSG 单体后, THSG 在血中浓度下降较快, 30 min 时药物已开始从分布到各脏器中较快的清除, 故在各脏器中的达峰时间与血浆中基本一致。

大鼠灌胃给予  $\beta$ -CD 改性后的 THSG, 在心脏、肝脏等血流量比较丰富的脏器中, THSG 的含量较高, 这被认为是受血中 THSG 含量增加的影响。特别值得注意的是, 在脂肪组织和脑组织中, THSG 的含量亦有增加。目前 THSG 被证明具有良好的降脂及预防治疗脑病的药理活性, 脂肪组织和脑组织作

为其可能的作用靶点, 其药物浓度可经  $\beta$ -CD 的改性作用提高, 这对 THSG 制剂学研究及其在降脂及脑组织病变治疗的临床应用提出了启示和理论基础。

对大鼠灌胃给予  $\beta$ -CD 改性后的 THSG, 在各组织中 60 min 均开始消除, 表现为组织中药物浓度开始下降, 并无明显的蓄积现象。此研究结果证明了  $\beta$ -CD 的改性作用在提高药物生物利用度的基础上, 并不会对药物在体内造成明显的蓄积, 进一步证明  $\beta$ -CD 作为药用辅料是较为安全的。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [2] 孙欣, 顾宜, 李晓峰, 等. 二苯乙烯苷对抗 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(24): 2910.
- [3] Hou Y, Yang Q, Zhou L. Tetrahydroxystilbene glucoside improves learning and (or) memory ability of aged rats and may be connected to the APP pathway [J]. Canadian J Physiol Pharmacol, 2011, 89(11): 801.
- [4] Han X, Ling S, Gan W, et al. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside ameliorates vascular senescence and improves blood flow involving a mechanism of p53 deacetylation [J]. Atherosclerosis, 2012, 225(1): 76.
- [5] Ren X L, Wang G F, Wang M, et al. Kinetics and Mechanism of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside (THSG) degradation in aqueous solutions. [J]. J Pharm Biomed Ana, 2011, 55(1): 211.
- [6] 王贵芳, 任晓亮, 欧阳慧子, 等. 化学动力学法研究四种光源对二苯乙烯苷稳定性的影响[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 458.
- [7] 欧阳慧子, 任晓亮, 王强, 等. 二苯乙烯苷及其  $\beta$ -环糊精包合物在大鼠体内药代动力学研究[J]. 天津中医药大学学报, 2011, 30(3): 165.
- [8] 任晓亮, 欧阳慧子, 王贵芳, 等. 二苯乙烯苷  $\beta$ -环糊精包合物的制备及其稳定性研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 195.
- [9] Lv G, Lou Z, Chen S. Pharmacokinetics and tissue distribution of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside from traditional Chinese medicine Polygonum multiflorum following oral administration to rats [J]. Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 449.
- [10] 何仲贵. 现代药物制剂技术丛书——环糊精包合物技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

[责任编辑 邹晓翠]