

# 荧光凝胶色谱法测定大鼠单次口服 麦冬多糖 MDG-1 排泄变化

谢华通<sup>1</sup>, 王硕<sup>1</sup>, 阮克峰<sup>1</sup>, 冯怡<sup>1</sup>, 徐德生<sup>2\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学曙光医院, 上海 200003)

**[摘要]** 目的:探讨单次口服麦冬多糖 MDG-1 后排泄量的变化。方法:采用异硫氰酸荧光素(FITC)对麦冬多糖 MDG-1 进行标记(F-MDG-1),测定取代度。采用高效凝胶色谱法(HPGPC)对粪便及尿液内 MDG-1 含量进行测定。SD-雄性大鼠,给药组按照 300 mg·kg<sup>-1</sup>给予 F-MDG-1,空白组给予纯水,分别在 0, 4, 12, 24, 48, 72 h 收集尿液及粪便。测定含量。结果:在单次给予 F-MDG-1 量 300 mg·kg<sup>-1</sup>后,尿液中含量测定在 12 h 时达到最大排泄量 0.808 7 mg,而后逐渐减少,至 72 h 最低 0.105 3 mg;在粪便测定中在 12 h 达到最大排泄量为 21.332 4 mg,而后逐渐减少,至 72 h 最低 0.506 5 mg。结论:采用 FITC 对 MDG-1 进行标记,并采用荧光色谱法对 MDG-1 在排泄物内的含量变化进行研究是可行的。MDG-1 基本不被人体吸收,其主要经粪便排泄。

**[关键词]** 麦冬多糖; 均一分子量多糖; 异硫氰酸荧光素; 高效凝胶色谱法; 尿液; 粪便

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0152-05

**[收稿日期]** 20120329(009)

**[第一作者]** 谢华通, 博士研究生, 从事中药大分子组分生物活性研究, E-mail: xiehuatong@sohu.com

**[通讯作者]** \* 徐德生, 博士生导师, Tel: 021-53825761, E-mail: Xudes1953@126.com

- [5] Dan C, Wake K. Modes of endocytosis of latex-particles in sinusoidal endothelial and kupffer cells of normal and perfused rat-liver[J]. Cell Res, 1985, 158: 75.
- [6] LEE K J, KIM J R, LEE C H. Effect of 2-methylaminoethyl-4, 4'-dimethoxy-5, 6, 5', 6'-dimethylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid-2'-carboxylate monohydrochloride (DDB-S) on indocyanine green (ICG) clearance in rats [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (1): 115.
- [7] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (16): 212.
- [8] 瞿叶清, 陈军, 林爱华, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 143.
- [9] WANG S N, DENG Y H, XU H, et al. Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 62(1): 32.
- [10] 冷静, 邹亮, 胡一冰, 等. 中药引经理论与药物靶向性的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (13): 277.
- [11] Minn A J, Gupta G P, Siegel P M, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung [J]. Nature, 2005, 436 (7050): 518.
- [12] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008, 451 (7175): 147.
- [13] Jia Liu, Hongxia Li, Daquan Chen, et al. In vivo evaluation of novel chitosan graft polymeric micelles for delivery of paclitaxel [J]. Drug Delivery, 2011, 18 (3): 181.
- [14] 陈军, 苏璇, 蔡宝昌. 马钱子总生物碱脂质体的含量与包封率测定[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20 (3): 249.

[责任编辑 邹晓翠]

## Determination of Contents after single Oral Ophiopogonis Radix Polysaccharides MDG-1 in Rat Urine and Faeces by HPGPC

XIE Hua-tong<sup>1</sup>, WANG Shuo<sup>1</sup>, RUAN Ke-feng<sup>1</sup>, FENG Yi<sup>1</sup>, XU De-sheng<sup>2\*</sup>

(1. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Ministry of Education, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China;

2. Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200003, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the contents after single oral one kind of homogeneous molecular weight polysaccharide (MDG-1) extracted from Ophiopogonis Radix in rat urine and faeces by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). **Method:** Labeling the MDG-1 (F-MDG-1) and detecting replacement of fluorescein isothiocyanate (FITC) then the HPGPC was used to detect the contents of MDG-1 in urine and faeces after single oral administration. The rats were given F-MDG-1 at doses of 300 mg · kg<sup>-1</sup> then urine and faeces were collected at predefined time points (0, 4, 12, 24, 48, 72 h postdose; n = six per time point) then stored at -20 °C to be analyzed. **Result:** The F-MDG-1 in rats urine was described with the max 0.808 7 mg at 12 h and a degradation model to the lowest 0.1053 mg at 72 h. The F-MDG-1 in rats faeces was described with the max 21.332 4 mg in 12 h and a degradation model to the lowest 0.506 5 mg at 72 h. **Conclusion:** The combination of the FITC prelabeling method with the HPGPC is confirmed and tested and feasible. This methodology should be helpful to other polysaccharides research in rat urine and faeces. In this study, F-MDG-1 was absorbed hardly and the main excretion way is through faeces.

**[ Key words ]** Ophiopogonis Radix polysaccharides; homogeneous molecular weight polysaccharide; fluorescein isothiocyanate; high performance gel permeation chromatography; urine; faeces

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 (*Ophiopogon Japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.) 的干燥块根。麦冬多糖 MDG-1 是从麦冬多糖中分离纯化得到的均一相对分子质量的  $\beta$ -D-果聚糖, 药理学研究表明, 口服麦冬多糖 MDG-1 具有一定的降血糖作用, 其作用机制可能涉及通过抑制 Leptin 和 TNF- $\alpha$  通路<sup>[1-2]</sup>, 起到治疗糖尿病的作用。在对 MDG-1 注射给药的研究中发现, MDG-1 以原型排出<sup>[3]</sup>, 注射后在体内无代谢降解。因此 MDG-1 口服后在排泄物中的含量变化对其作用机制的研究是十分必要的。

常用于多糖药动学分析的定量方法有免疫学法、生物检定法、同位素示踪法、色谱法等<sup>[4]</sup>。鉴于尿液及粪便内物质的多样性: 含大量内源性物质、离子或其他多糖等, 且多糖种类繁多, 其连接方式多样, 结构复杂, 而常用的免疫学法、生物检定法无专属性, 不能同时测定代谢产物, 操作繁琐, 无法检定 MDG-1。因此有必要建立一种灵敏度更高, 专属性强, 能排除内源性干扰, 有效识别尿液及粪便中原形药物和降解产物的微量分析方法。本研究旨在通过采用荧光凝胶色谱法 (HPGPC), 建立合适的分析方

法, 观察单次口服 MDG-1 后在粪便及尿液中的含量变化, 探讨 MDG-1 其口服降糖作用的机制, 为进一步新药开发提供依据; 并为多糖类药物口服后在排泄物中的测定提供参考。

### 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠, 体重 (220  $\pm$  20) g, 雄性, 由中科院上海动物所动物中心提供。许可证号 SCXK (沪) 2007-0005,。饲养于 SPF 级动物房, 室温 (23.0  $\pm$  2) °C, 相对湿度 (55  $\pm$  5) %, 光照采用 12 h 明暗交替。进场适应性饲养 1 周。

**1.2 药物和仪器** 相对分子质量均一的 MDG-1 (自制, 纯度 > 98%), 异硫氰酸荧光素 (FITC) (美国 Sigma), 右旋糖苷相对分子质量 D0-D8 (中国生物制品药品检定所), 二甲亚砜 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), 吡啶 (上海试剂一厂, 分析纯), 二丁基二月桂酸锡 (国药集团化学试剂有限公司, 化学纯)。其他试剂均为化学纯。F-4500 荧光分光光度计 (日本 Hitachi), Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), G1321A 荧光检测器 (美国 Agilent 公司), Waters 2414 高效液相色谱仪 (美国

Waters 公司), Waters 410 示差检测器(美国 Waters 公司), Shodex Sugar ks-804, Shodex Sugar ks-802 色谱柱(日本昭和电工), XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏设备有限公司), 80-2 型离心沉淀机(上海手术器械厂), SK5200H 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司), 大鼠代谢笼(苏州冯氏实验动物仪器厂)。

**1.3 统计学处理** 数据采用 SPSS 17.0 统计软件及中国药理学学会 DAS 2.1.1 统计软件分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**2 方法与结果**

**2.1 MDG-1 标记产物的制备** 取麦冬多糖 MDG-1 0.5 g 于具塞试管中, 加入 5 mL 含 5 滴吡啶的二甲亚砷溶液, 加塞密封, 超声使多糖溶解。精密加入异硫氰酸荧光素(FITC) 0.05 g 和二丁基二月桂酸锡 10  $\mu$ L, 密封, 95  $^{\circ}$ C 水浴中恒温反应后, 取出, 冷却至室温, 加入 45 mL 氯化钠饱和无水乙醇, 离心弃去上清液, 所得沉淀即为 FITC 荧光标记的麦冬多糖粗品。沉淀经反复醇洗 9 次后, 将沉淀冷冻干燥即得 F-MDG-1。所得标记物应显黄绿色荧光, 易溶于水。取代度为  $(1.33 \pm 0.11)$  mol。

**2.2 荧光标记物 F-MDG-1 的高效凝胶渗透色谱分析**

**2.2.1 色谱条件** Shodex Sugarks-804 色谱柱, Shodex Sugarks-802(日本昭和电工), 流动相水, 流速 0.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ , 柱温 35  $^{\circ}$ C。进样量 20  $\mu$ L

**2.2.2 标准曲线的制备** 分别称取右旋糖苷分子量对照品(D0-D8)约 10 mg, 加入适量纯水配制成约 10 g $\cdot$ L $^{-1}$ 的标准溶液, 进样。以相对分子质量的对数(log)为纵坐标, 保留时间为横坐标, 进行标准曲线的拟合。

**2.2.3 溶液的配制** 称取 MDG-1 与 F-MDG-1 各约 10 mg, 分别配制成约为 10 g $\cdot$ L $^{-1}$ 的溶液, 进样测定, 将保留时间带入标准分子量方程, 计算相对分子质量。

**2.2.4 麦冬多糖 MDG-1 的高效凝胶渗透色谱**

**2.2.4.1 相对分子质量标准曲线的制备** 以 log 相对分子质量为纵坐标, 保留时间 T(min)为横坐标, 进行曲线 5 阶拟合, 所得拟合方程即为标准工作曲线(s 为常数), 曲线方程为:

$$\text{LogMP} = s - 5.09e + 002T^1 + 2.22e + 001T^2 - 4.82e - 001T^3 + 5.20e - 003T^4 - 2.23e - 005T^5, R = 0.9997, \text{由结果可知, 此曲线相关性良好。曲线见图 1。}$$

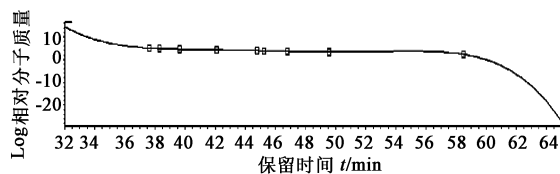


图 1 相对分子质量标准曲线

**2.2.4.2 标记前后分子量测定结果** MDG-1 和 F-MDG-1 分别进样后, 记录保留时间。按照分子量标准工作方程计算分子量, 结果显示, 标记前后分子量发生明显变化, MDG-1 分子量为 2 916, F-MDG-1 为 3 173, 结果标明 FITC 成功标记到 MDG-1 上。见图 2, 图 3。

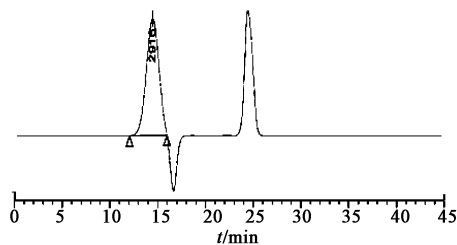


图 2 MDG-1 相对分子质量

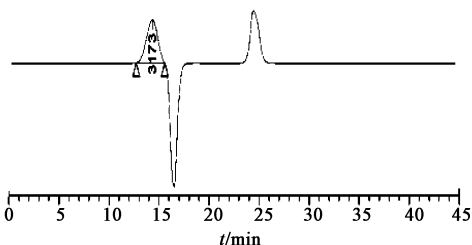


图 3 F-MDG-1 相对分子质量

**2.3 给药方法及样品处理** SD 雄性大鼠分成 2 组, 空白组及给药组, 每组 6 只。给药前 12 h 禁食不禁水, 给药后正常饮食。空白组给予纯水, 给药组按照 300 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  给予 F-MDG-1, 分别在 0, 4, 12, 24, 48, 72 h 收集尿液及粪便。尿液经过滤后 -20  $^{\circ}$ C 放置。测定前将尿液解冻后稀释至一定体积, 过滤后进样。粪便收集后阴干置于 -20  $^{\circ}$ C 密封放置, 测定前将粪便解冻, 研磨成细粉, 纯水多次洗涤后合并滤液并稀释至一定体积, 过滤后进样。

**2.4 荧光凝胶色谱分析方法的建立**

**2.4.1 色谱条件** Shodex Sugar ks-802 色谱柱(日本昭和电工); 流动相水; 流速 0.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 荧光检测波长: 激发波长 495 nm, 发射波长 515 nm。柱温 35  $^{\circ}$ C; 进样量 20  $\mu$ L。

**2.4.2 方法专属性考察** 取相同体积大鼠空白尿液 2 份, 分别加入纯水及一定浓度的 F-MDG-1, 配置成空白尿液、含 F-MDG-1 的尿液, 另取同质量大鼠

空白粪便 2 份,尿液及粪便均按 2.3 法处理后进样。在上述色谱条件下,测得各样品的 HPLC 色谱图。结果显示空白尿液及粪便对结果均无干扰。尿液与 F-MDG-1 图谱,粪便与 F-MDG-1 图谱分别见图 4, 图 5。

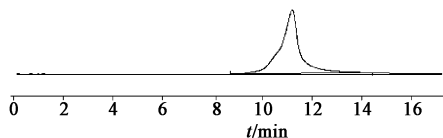


图 4 尿液与 F-MDG-1 混合图谱

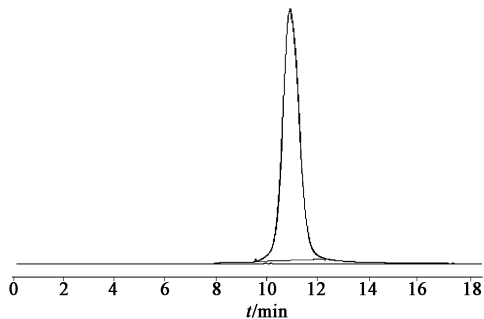


图 5 粪便与 F-MDG-1 混合图谱

**2.4.3 尿液中样品标准曲线的制备** 精密称取 F-MDG-1 为 3.20 mg,以空白尿液为溶剂,配制成 2.5,5.0,10.0,25.0,50.0,100.0,400 mg·L<sup>-1</sup> 系列浓度,记录尿液中样品的峰面积,以药物浓度 C 为横坐标,峰面积 Y 纵坐标,用加权(1/c<sup>2</sup>)最小二乘法进行回归计算,求得的直线回归方程为 Y = 1 788.5C + 14.559 (r = 0.999 8)。根据标准曲线, FITC-MDG-1 的线性浓度范围为 0.025 ~ 4 μg。

**2.4.4 粪便中样品标准曲线的制备** 精密称取 F-MDG-1 为 2.80 mg,以空白粪便溶液为溶剂,配制成 2.5,5.0,10.0,25.0,50.0,100.0,400 mg·L<sup>-1</sup> 系列浓度,记录粪便中样品的峰面积,以药物浓度 C 为横坐标,峰面积 Y 纵坐标,用加权(1/c<sup>2</sup>)最小二乘法进行回归计算,求得的直线回归方程为 Y = 1 788.5C + 14.559 (r = 0.999 8)。根据标准曲线, FITC-MDG-1 的线性浓度范围为 0.025 ~ 4 μg。

**2.5 方法精密性与回收率测定** F-MDG-1 尿液含量方法的精密性及回收率测定结果见表 1,在粪便中 F-MDG-1 的精密性及回收率见表 2。

**2.6 药时曲线** 单次给予 F-MDG-1 后在 0, 4,12, 24,48,72 h 时尿液中含量测定结果见表 3,变化曲线见图 6;粪便中含量测定结果见表 4,变化曲线见图 7。

表 1 尿液中 F-MDG-1 测定方法精密度和回收率测定( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

加入量 /mg·L <sup>-1</sup>	回收率 /%	日间精密度 /%	日内精密度 /%
5	104.6 ± 3.1	3.5	3.1
50	99.6 ± 4.3	7.7	7.3
200	91.7 ± 4.2	6.4	6.5

表 2 粪便中 F-MDG-1 测定方法精密度和回收率测定( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

加入量 /mg·L <sup>-1</sup>	回收率 /%	日间精密度 /%	日内精密度 /%
5	103.5 ± 5.2	4.7	5.2
50	101.3 ± 2.3	3.4	5.3
200	90.5 ± 4.4	3.0	2.6

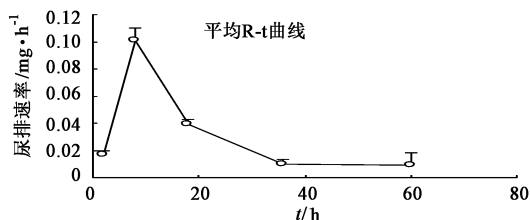


图 6 尿液内 F-MDG-1 含量变化曲线

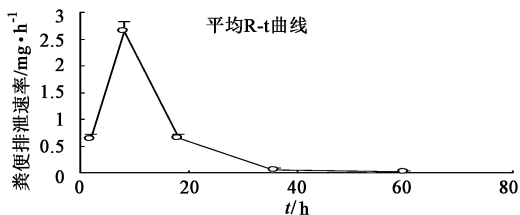


图 7 粪便内 F-MDG-1 含量变化曲线

表 3 给药后不同时间尿液中 F-MDG-1 含量测定( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

时间/h	0~4	4~12	12~24	24~48	48~72
含量/mg	0.064 0 ± 0.012	0.808 7 ± 0.070 3	0.469 2 ± 0.051 7	0.263 0 ± 0.098 0	0.105 3 ± 0.026 7

表 4 给药后不同时间粪便内容物中 F-MDG-1 含量测定( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

时间/h	0~4	4~12	12~24	24~48	48~72
含量/mg	2.470 7 ± 0.373 1	21.332 4 ± 1.488 3	7.934 0 ± 0.863 6	1.414 0 ± 0.536 44	0.506 5 ± 0.142 4

### 3 讨论

**3.1** 关于荧光标记 与蛋白质和核酸相比,多糖的结构更复杂易变,残基较多,糖苷键具有多种连接方式;且单糖具有  $\alpha$ 、 $\beta$  两种构型<sup>[5,6]</sup>,因此多糖结构的测定较为困难。目前主要采用化学分析法,IR,UV,GC-MS/MS,LC-MS/MS,EMI-MS,FAB-MS,NMR,CE,CD,AFM,X-射线单晶衍射等方式进行测定,但是很难做到像小分子单一化合物一样达到自动化、微量化和标准化。国内目前对多糖在血液中的含量测定采用了荧光标记的方法<sup>[3,7-9]</sup>,但将这一方法应用至胃肠道领域尚未见报道。

MDG-1 作为从麦冬中分离出的均一分子量多糖,属于  $\beta$ -D-果聚糖,以 2 $\rightarrow$ 1 连接的呋喃型果糖为主,平均每 2.8 个主链残基上有一个 Fruf(2 $\rightarrow$ 6) Fruf(2 $\rightarrow$ 分支,其还原端与  $\alpha$ -D-Glc 相连。异硫氰酸荧光素(FITC)在碱性条件下经催化与 MDG-1 相结合,就结构而言,FITC 极有可能连接在 MDG-1 的末端醇羟基上。MDG-1 在荧光标记前,无荧光激发,经标记后则在 EX/EM:495 nm/515 nm 处有最优荧光图谱。试验中还发现,在预柱+多糖柱模式下,单独对 FITC 经多糖柱进行荧光测试,并无荧光激发,提示 FITC 被预柱和多糖柱吸附,由此点可判断 MDG-1 是否被标记上,同时也为以后测试结果的准确性提供了良好保障:未完全反应的 FITC 及 MDG-1 不会对结果产生影响,保证了试验的准确性。

### 3.2 在尿液及粪便中含量变化

**3.2.1** 测定条件 预试验选用了不同浓度及不同 pH 值的 PBS 缓冲液,但是结果显示,在对空白样品提取液进行测定时,均有不同程度的干扰,产生的噪音较大,从而导致测定结果中误差值较大;同时,针对不同浓度、不同批次的空白样品液,其产生的噪音大小也不尽相同,无规律性可循。可能是空白样品中含大量电荷物质,在 PBS 中产生了电离,不同浓度不同批次的样品其电离度不同,因而产生了噪音。因此对样品进行初步处理并对其采用不同的沉淀方法如 Sevag 法,醇沉法以及无机盐沉淀法等,结果显示 Sevag 法不能完全去除干扰,醇沉法中多糖的损失率较大,最大时达到 60%,而无机盐沉淀法由于加入的无机盐量过大,难以去除,易对实验结果产生干扰。采用 Tris 液做流动相,结果显示相同的样品重复性不好,同时对色谱柱的伤害较大。最后在对多种流动相进行考察之后,确定选择纯水作为流动

相,其干扰较小;在空白样品中加入 F-MDG-1 后,其分离程度较好,精密度、加样回收率以及重复性均良好;在对样品进行的冷冻复融试验中,其结果满意。

**3.2.2** MDG-1 在尿液及粪便中的含量代谢特征 在口服给予大鼠 MDG-1 后,对其代谢行为进行了研究。结果显示,在单次给予 F-MDG-1 量 300 mg·kg<sup>-1</sup>后,以大鼠均重 220 g 计算,尿液中含量测定在 12h 时达到最大排泄量 0.808 7 mg,而后逐渐减少,至 72 h 最低 0.105 3 mg,从尿液中累计排出量仅占总给药量 2.59%,提示 F-MDG-1 自肠道进入体内后有蓄积;在粪便测定中在 12h 达到最大排泄量为 21.332 4 mg,而后迅速减少至 7.934 mg,再次逐渐减少,至 72 h 最低 0.506 5 mg,自粪便中排泄量为总给药量的 46.36%。结果提示,F-MDG-1 口服给药后,几乎不被人体吸收,主要经粪便排泄。

本文所建立的方法准确、灵敏,可用于尿液及粪便中 MDG-1 的测定。

### [参考文献]

- [1] 徐德生,冯怡,林晓,等. 麦冬多糖 MDG-1 的分离纯化和结构分析[J]. 药学学报,2005,40(7):636.
- [2] 王硕,冯怡,徐德生,等. 麦冬多糖 MDG-1 对内皮细胞瘦素表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(2):160.
- [3] 卢智玲,林晓,冯怡,等. 高效凝胶色谱法测定大鼠血浆中麦冬多糖 MDG-1 的含量[J]. 中国药师,2008,11(7):768.
- [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 浙江大学出版社,2006.
- [5] Bohn J A, Bemiller J N. 1,3-beta-glucans as biological response: A review of structure-functional activity relationships[J]. Carbohydr Polym,1995,28(1):3.
- [6] 邹建华. 国外对多糖的抗肿瘤作用研究简况[J]. 国外医学:中医中药分册,1991,13(6):321.
- [7] 郑年新,姚新生. 六味地黄多糖在小鼠体内的吸收[J]. 中国药理学通报,2000,16(4):403.
- [8] Volpi, Nicola, Separation of capsular polysaccharide-K4- and defructosylated-K4-derived disaccharides by high-performance liquid chromatography and postcolumn derivatization with 2-cyanoacetamide and fluorimetric detection[J]. Anal biochem,2008,330(2):359.
- [9] 高其品,陈慧群,王坤,等. 银耳多糖在大鼠体内的吸收、分布和消除[J]. 中国药理学杂志,37(3):205.

[责任编辑 聂淑琴]