

凝胶色谱法测定麦冬多糖 MDG-1 在大鼠胃肠道含量变化

谢华通¹, 王硕¹, 阮克峰¹, 冯怡¹, 徐德生^{2*}

(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:探讨口服麦冬多糖 MDG-1 后在胃肠道内的变化。方法:采用异硫氰酸荧光素(FITC)对麦冬多糖 MDG-1 进行标记,测定取代度。采用荧光凝胶色谱法(HPGPC)对消化道内含量进行测定。胃内含量变化测定:SD 雄性大鼠随机分成 6 组,其中 5 组分别口服给予不同剂量 F-MDG-1,空白组给予水,在 1 h 时测定含量;另取 SD 雄性大鼠随机分成 6 组,其中 5 组分别经口给予相同剂量 F-MDG-1,空白组给予水,分别在 0,1,2,4 h 时测定含量。小肠道内含量测定:SD-雄性大鼠分成 4 组,空白组 1 组及给药组 3 组,经胃幽门部注射给药后立即分别结扎胃幽门部及小肠末端,空白组给予水适量,给药组给予 F-MDG-1 溶液适量,分别在 1,2,4 h 测定内容物内 F-MDG-1 含量。大肠内含量测定:SD-雄性大鼠分成 4 组,空白组 1 组及给药组 3 组,每组 6 只,给药方法:经小肠末端部注射给药后立即分别结扎小肠末端及大肠末端近肛门部。空白组给予水适量,给药组给予 F-MDG-1 溶液适量,分别在 1,2,4 h 测定大肠内容物内 F-MDG-1 含量。结果:给予相同剂量的 F-MDG-1,随着药物在胃内滞留时间的延长,其浓度下降。而在给予不同浓度 F-MDG-1 后,在 1 h 时测得浓度占给药量的百分比随着给药剂量的增加而增加;但将 pH 调 7.2 后,其含量未变化。分别单次给予小肠、大肠 F-MDG-1 后,随着药物在肠道内滞留时间的延长,其含量逐渐降低。结论:采用 FITC 对 MDG-1 进行标记,并采用荧光色谱法对 MDG-1 在胃肠道内含量变化进行研究是可行的。MDG-1 在胃内不分解,其主要代谢部位在肠道,其原因可能是肠道内环境及细菌共同作用的结果。

[关键词] 麦冬多糖; MDG-1; 异硫氰酸荧光素; 凝胶色谱法; 胃肠道

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0139-07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1203.011.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 12:03

[收稿日期] 20120219(010)

[第一作者] 谢华通,博士,从事中药大分子组分生物活性研究,Tel:021-58950297-801,E-mail:xiehuatong@schu.com

[通讯作者] *徐德生,Tel:021-53825761,E-mail:xudes1953@126.com

- [6] Li Y J, Yao M C, Cheng S. Quantitative determination of spinosin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(4):1169.
- [7] 姜宇,何群,赵碧清,等. 秦皮甲素大鼠肠吸收动力学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):110.
- [8] 陆慧,贾晓斌,韦英杰,等. 灵芝三萜表观油水分配系数的测定及其在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):12.
- [9] 玉凤,戴岳,孟庆玉,等. 东莨菪素大鼠在体胃、小肠吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15):1890.
- [10] Zhao Y H, Abraham M H, Le J, et al. Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption[J]. Eur J Med Chem, 2003, 38(3):233.
- [11] Varma M V, Perumal O P, Panchagnula R. Functional role of P-glycoprotein in limiting peroral drug absorption: optimizing drug delivery[J]. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10(4):367.
- [12] Morris M E, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters[J]. Life Sci, 2006, 78(18):2116.
- [13] 王亚之,欧喜笑,郑颖. 外排转运体和代谢酶与黄酮的相互作用及其对黄酮肠吸收影响的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(10):1659.
- [14] Ingolf Cascorbi. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs[J]. Pharmacol Ther, 2006, 112(2):457.
- [15] Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, et al. Variability in mRNA expression of ABC-and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(4):291.

[责任编辑 邹晓翠]

Research on Contents of Radix *Ophiopogon Japonicas* Polysaccharides MDG-1 Changing in Rrats Gastrointestinal Tract by HPGPC

XIE Hua-tong¹, WANG Shuo¹, RUAN Ke-feng¹, FENG Yi¹, XU De-sheng^{2*}

(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 change after oral Radix *Ophiopogon Japonicas* polysaccharides MDG-1 in rats by high performance gel permeation chromatograph (HPGPC). **Method:** Labeling the MDG-1 and detecting replacement of fluoresceiniso thiocyanate (FITC) then using the HCGPC was in order to detect the contents of MDG-1 in stomach, small intestine, large intestine. To the various parts of the gastrointestinal tract, the stomach were given different doses of F-MDG-1 after pylorus ligation, then suture abdominal while contents were immediately harvested at times 1 h postdose; the stomach were given doses of F-MDG-1 after pylorus ligation, then suture abdominal while contents were immediately harvested at predefined times. The small intestine near the bottom of the cecum were ligated after small intestine were given F-MDG-1 from duodenum near the pylorus then suture abdominal while contents were harvested at predefined times; the large intestine near the anus were ligated after the large intestine were given F-MDG-1 from end of the small intestine near the cecum then suture abdominal while contents were harvested at predefined times, all these contents stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. **Result:** The F-MDG-1 in rats stomach following oral administration at different doses of F-MDG-1 after pylorus ligation were described with a degradation model and indicated that F-MDG-1 increases the decomposition along with the dosage to reduce in the stomach, while after oral the same dose indicated that F-MDG-1 increases the decomposition along with the time, but the determination result showed that the content unchanged after pH was adjusted to be neutrality (7.2). The small intestine and the large intestine metabolite process indicated that decomposition of F-MDG-1 increased along with time. **Conclusion:** The combination of the FITC prelabeling method with the highperformance gel permeation chromatography was confirmed and tested and was feasible. This methodology should be helpful to other polysaccharides research in gastrointestinal tract. In this study, F-MDG-1 was not decomposition in stomach and mainly metabolism in the intestinal tract as a result of effects of gastrointestinal tract condition and bacterium together.

[Key words] Radix *Ophiopogon Japonicas* polysaccharides; MDG-1; FITC; high performance gel permeation chromatography (HPGPC); gastrointestinal tract

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根,具养阴生津、润肺清心的功效,用于肺燥干咳,阴虚癆嗽,喉痹咽痛,津伤口渴,内热消渴,心烦失眠,肠燥便秘。麦冬多糖 MDG-1 是从麦冬中分离纯化得到的均一相对分子质量的 β -D-果聚糖,前期药理学研究表明,口服麦冬多糖 MDG-1 能够改善糖尿病 (DM) 大鼠的多食、多饮及多尿症状,且具有一定的降血糖作用,其作用机制可能涉及通过抑制白细胞介素 (Leptin) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 通路^[1-2],起到治疗糖尿病的作用。

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^[3]。鉴于肠道内存在物质的多样性,如含有大量内源性物质、其他多糖以及多糖的连接方式的多样性、结构的复杂性等因素,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),观察 MDG-1 在胃肠道内的含量变化,探讨麦冬多糖 MDG-1 口服降糖作用的机制,为进一步

新药开发提供依据,并为如何研究多糖类药物口服后在胃肠道内变化提供实验参考。

1 材料与方 法

1.1 动物 SD 大鼠,体重(220 ± 20) g,雄性,由中国科学院上海动物所动物中心提供。动物生产许可证号 SCXK(沪)2007-0005。饲养于 SPF 级动物房,室温(23.0 ± 2) °C,相对湿度(55 ± 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(中国药品生物制品检定所),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。F4500 型荧光分光光度计(日本 Hitachi),Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),G1321A 型荧光检测器(美国 Agilent 公司),Waters 2414 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Waters 410 型示差检测器(美国 Waters 公司);色谱柱:Shodex Sugar ks-802 型(日本昭和电工);XW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),DK-S24 型电热恒温水浴锅(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 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 滴吡啶的二甲亚砜溶液,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 μL,加塞密封,旋涡混合器混匀,放入 95 °C 水浴中恒温反应一段时间后,取出,冷却至室温,加入 45 mL 氯化钠饱和和无水乙醇,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。向沉淀中加入 50 mL 氯化钠饱和和无水乙醇,超声并涡旋使标记多糖沉淀均匀分散于氯化钠饱和的无水乙醇中,离心弃上层醇洗液,即为 1 次醇洗。经如此反复醇洗 9 次后,将沉淀冷冻干燥即得 F-MDG-1。所得标记物显黄绿色荧光,易溶于水。

1.4 荧光标记产物荧光光谱 取荧光标记产物 F-MDG-1,溶解于纯水中,对其激发波长和发射波长进行扫描。

1.5 荧光标记成功与否判断 将 MDG-1 与 F-MDG-1 混合物按照以下色谱条件进样,比较色谱图。荧光光谱条件:色谱柱 Shodex Sugar ks-804,

Shodex Sugar ks-802;流动相水;流速 0.5 mL·min⁻¹;荧光检测波长:激发波长 495 nm,发射波长 515 nm;柱温 30 °C。

1.6 荧光标记产物取代度的测定。

1.6.1 荧光光谱条件 激发波长 495 nm,发射波长 515 nm。

1.6.2 FITC 标准曲线的绘制 精密称取 FITC 6.0 mg,加入 6 mL 无水乙醇溶解,然后用纯水稀释,配制成 6 mg·L⁻¹ 的 FITC 溶液,作为标准贮备液。将贮备液逐级稀释为 0.05, 0.125, 0.5, 1.5, 3, 6 mg·L⁻¹ 的标准液。荧光分光光度计测定荧光响应值,以荧光值为纵坐标,质量浓度为横坐标,进行线性回归,计算标准曲线。

1.6.3 F-MDG-1 溶液的配制 精密称取 3 个批次的 F-MDG-1,配制成约 12 mg·L⁻¹ 的溶液,荧光分光光度计测定荧光响应值,依据标准曲线计算溶液中 F-MDG-1 浓度。

1.7 荧光标记物 F-MDG-1 的高效凝胶渗透色谱分析

1.7.1 色谱条件 色谱柱 Shodex Sugar ks-804, Shodex Sugar ks-802(日本昭和电工),流动相水,流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 20 μL。

1.7.2 标准曲线的制备 分别称取右旋糖苷相对分子质量对照品(D0-D8)约 10 mg,加入适量纯水配制成约 10 g·L⁻¹ 的标准溶液,进样。以 10 g 相对分子质量为纵坐标,保留时间为横坐标,进行标准曲线的拟合。

1.7.3 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·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。

1.7.4 胃肠道内容物的荧光测定 取健康大鼠胃及肠道内容物各约 1 g,分别用适量水充分稀释振摇后过滤。残渣继续用水稀释振摇,如此重复 3 次后合并滤液。滤液备用,待分析。

1.8 MDG-1 胃内含量变化研究

1.8.1 测定胃内 MDG-1 含量与代谢行为相关性的给药方法及内容物样品处理 SD 雄性大鼠分成 6 组,空白组 1 组及给药组 5 组,每组 5 只。给药前 12 h 禁食不禁水。分别结扎胃幽门部后,空白组经口给予水适量,给药组经口给予 F-MDG-1,分别为 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 mg,在 1 h 时取出大鼠的胃,将内容物取出,并冲洗胃壁,合并。将合并物用纯水充分洗涤后过滤,合并滤液 -20 °C 放置。测定前将

溶液解冻,稀释至一定体积,0.25 μm 滤膜过滤后
进样。

**1.8.2 测定胃内 MDG-1 时间与代谢行为相关性的
给药方法及内容物样品处理** SD 雄性大鼠分成 6
组,空白组 1 组及给药组 5 组,每组 5 只。给药前
12 h 禁食不禁水。分别结扎胃幽门部后,空白组经
口给予水适量,给药组经口给予 F-MDG-1 2.12 mg,
分别在 0,1,2,4 h 时取出大鼠的胃,将内容物取出,
并冲洗胃壁,合并。将合并物用纯水充分洗涤后过
滤,合并滤液 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置。测定前将溶液解冻,稀
释至一定体积,0.25 μm 滤膜过滤后进样。

1.8.3 色谱条件 色谱柱 Shodex Sugar ks-802 (日
本 昭和电工),流动相水,流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温
35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

1.8.4 方法专属性考察 取禁食 12 h 后大鼠空白
胃内容物,分别取相等质量的胃内容物 2 份,分别加
入纯水及一定浓度的 F-MDG-1,配置成空白胃内容
物溶液、含 F-MDG-1 的胃内容物溶液,在 1.8.3 色
谱条件下,测得各样品的 HPLC。

1.8.5 胃内容物样品标准工作曲线的制备 精密
称取 F-MDG-1 2.00 mg,以空白胃液为溶剂,配制成
2.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00, 500.00
 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列浓度,进样后记录胃内容物样品的峰面
积,以药物浓度 (C) 为横坐标,峰面积 (Y) 纵坐标,
用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归计算,求得直线
回归方程。

1.9 MDG-1 肠道内含量变化研究

1.9.1 小肠给药方法及内容物样品处理 SD 雄性
大鼠分成 4 组,空白组 1 组及给药组 3 组,每组 6
只。给药前 12 h 禁食不禁水。给药方法:经胃幽门
部注射给药后立即分别结扎胃幽门部及小肠末端。
空白组给予水适量,给药组给予 F-MDG-1 溶液适
量,分别在 1,2,4 h 取出结扎部分,将内容物取出,
并冲洗小肠壁,合并。将合并物用纯水充分洗涤后
过滤,合并滤液 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置。测定前将溶液解冻,
稀释至一定体积,0.25 μm 滤膜过滤后进样。

1.9.2 大肠给药方法及内容物样品处理 SD 雄性
大鼠分成 4 组,空白组 1 组及给药组 3 组,每组 6
只。给药前 12 h 禁食不禁水。给药方法:经小肠末
端部注射给药后立即分别结扎小肠末端及大肠末端
近肛门部。空白组给予水适量,给药组给予 F-
MDG-1 溶液适量,分别在 1,2,4 h 取出结扎部分,将
内容物取出,并冲洗大肠壁,合并。将合并物用纯水
充分洗涤后过滤,合并滤液 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置。测定前将

溶液解冻,稀释至一定体积,0.25 μm 滤膜过滤后
进样。

1.9.3 检测色谱条件 色谱柱 Shodex Sugar ks-802
(日本昭和电工),流动相水,流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱
温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

1.9.4 方法专属性考察 取禁食 12 h 后大鼠空白
肠内容物,取相等质量的肠内容物 2 份,分别加入纯
水及一定浓度的 F-MDG-1,配置成空白小肠内容物
溶液、含 F-MDG-1 的小肠内容物溶液,在上述色谱
条件下,测得各样品的 HPLC。

1.9.5 肠道内容物样品标准工作曲线的制备 精
密称取 F-MDG-1 2.00 mg,以空白肠液为溶剂,配制
成 2.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00, 500.00
 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列浓度,记录肠内容物样品的峰面积,以
药物浓度 (C) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,用加
权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归计算,求得直线回归
方程。

1.10 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计软件
分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有显著性
差异。

2 结果

2.1 麦冬多糖 MDG-1 的荧光标记产物荧光光谱
见图 1,2。由图可见,F-MDG-1 的最大荧光激发波
长和发射波长分别为 497,521 nm,但在实际测定过
程中发现,当激发波长为 495 nm,发射波长为 515
nm 时,峰形最为标准,干扰最小。因此最后选择 $ex/$
 em 为 495 nm/515 nm。

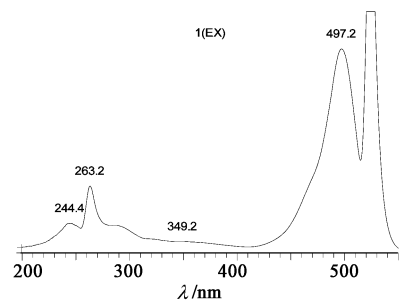


图 1 F-MDG-1 的激发光谱

2.2 荧光标记与否的判断 F-MDG-1 在液相条件
下荧光响应值明显,而 MDG-1 未见荧光响应,显示
标记成功。见图 3。

2.3 荧光标记产物取代度的测定

2.3.1 FITC 标准曲线 记录 FITC 的荧光响应值,
以 FITC 浓度 (X) 为横坐标,响应值 (Y) 纵坐标,进行
线性回归,求工作曲线。拟合方程为 $Y = 1486.1X +$
 225.31 ($r = 0.9975$)。根据标准曲线,FITC 的线性浓

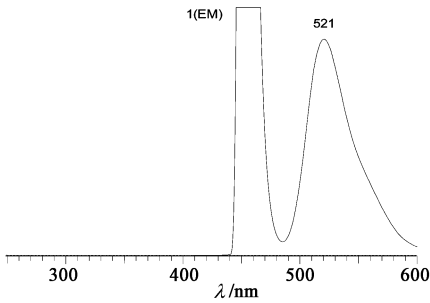


图2 F-MDG-1 的发射光谱

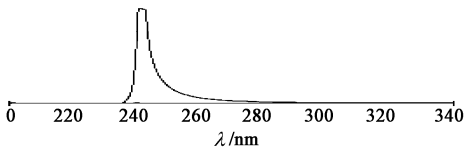


图3 MDG-1 与 F-MDG-1 混合物荧光光谱

度为 0.05 ~ 6 mg·L⁻¹。

2.3.2 取代度计算 MDG-1 相对分子质量以 3 400 计算, FITC 相对分子质量以 389.89 计算。不同批次 F-MDG-1 取代度结果见表 1。结果显示, 平均取代度 FITC-MDG-1 为 1.33 mol:1 mol。取代度(*d. s*) 公式如下: $d. s = 3\ 400C_1 / [389.89(C_1 - C_2)]$ 。式中 C_1 为 F-MDG-1 的初始浓度; C_2 为经标准曲线测定后的 F-MDG-1 溶液浓度。

表1 FITC-MDG-1 的取代度($n=3$)

F-MDG-1 批号	取代度	平均取代度	SD
20091003	1.366 1		
20100109	1.203 5	1.3300	0.1129
20100402	1.420 6		

2.4 麦冬多糖 MDG-1 的高效凝胶渗透色谱

2.4.1 相对分子质量标准曲线 以 log 相对分子质量为纵坐标, 保留时间为横坐标, 进行曲线五阶拟合, 所得拟合方程即为标准工作曲线, 曲线方程为

$$\text{LogMP} = s - 5.09e + 002\hat{T}1 + 2.22e + 001\hat{T}2 - 4.82e - 001\hat{T}3 + 5.20e-003\hat{T}4 - 2.23e-005\hat{T}5 \quad (R = 0.999\ 7)$$

由结果可知, 此曲线相关性良好。

2.4.2 标记前后相对分子质量测定结果 MDG-1 和 F-MDG-1 分别进样后, 记录保留时间。按照相对分子质量标准工作方程计算相对分子质量, 结果显示, 标记前后相对分子质量发生明显变化, MDG-1 相对分子质量为 2 916, F-MDG-1 为 3 173, 结果标明 FITC 成功标记到 MDG-1 上。见图 4, 5。

2.4.3 胃肠道内容物的荧光光谱分析 按照 F-MDG-1 的荧光光谱条件分别进样。结果显示, 在此液相条件下, 胃及肠道内容物的水溶液均无荧光

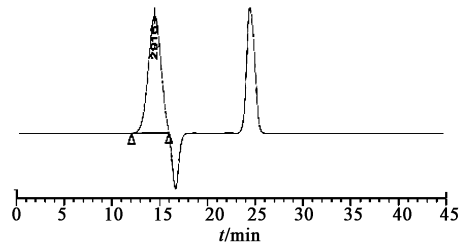


图4 MDG-1 相对分子质量测定

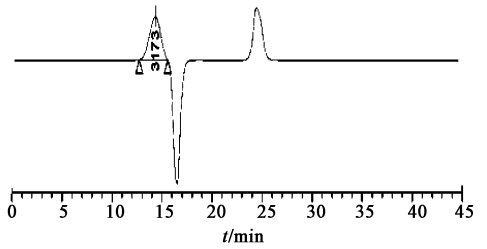


图5 F-MDG-1 相对分子质量测定

响应。

2.5 MDG-1 胃内含量变化

2.5.1 专属性考察 胃内容物内源性物质不干扰 F-MDG-1 的测定。

2.5.2 胃内容物样品标准工作曲线 以药物浓度 C 为横坐标, 峰面积 Y 纵坐标, 用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归计算, 求得直线回归方程 $Y = 2\ 939.7C + 18.887$ ($r = 0.999\ 5$)。根据标准曲线, FITC-MDG-1 的线性范围为 0.02 ~ 5 μg。

2.5.3 方法精密度和回收率测定 F-MDG-1 胃内容物方法的精密度及回收率测定结果显示良好, 见表 2。

表2 方法精密度和回收率测定($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	日间精密度 /%	日内精密度 /%
5	97.8 ± 2.4	2.4	2.0
50	98.5 ± 3.2	3.1	4.2
200	101.8 ± 2.7	1.3	2.3

2.5.4 药时曲线 大鼠口服方式给予 F-MDG-1 (2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 mg) 1 h 后, 结果显示随着给药剂量的增加, MDG-1 在胃内的分解逐渐减少, 增加至 12.5 mg 以后, 含量无变化, 测定结果见表 3, 测定曲线见图 6。大鼠口服方式给予 F-MDG-1 的量为 2.12 mg, 分别在 0, 1, 2, 4 h 取出胃内容物测定含量, 结果显示随着时间的延长, 测得量逐渐减少, 结果见表 4, 曲线见图 7。

2.5.5 pH 变化对胃内 F-MDG-1 含量测定影响 将经口给予 F-MDG-1 (2.12 mg) 后分别在 0, 1, 2, 4 h 取出的胃内容物 pH 调节为 7.2 后测定含量, 结果显示含量未见明显变化。结果见表 5。

表 3 不同给药剂量胃内容物含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

给药量/mg	测得量/mg
2.5	1.558 ± 0.059
5.0	3.549 ± 0.131
7.5	6.114 ± 0.288
10.0	9.577 ± 0.264
12.5	12.6 ± 0.151

表 4 不同给药时间胃内容物含量测定

时间	测得量/mg	占给药量百分比/%
0 h	1.993	94.00
1 h	1.494	70.47
2 h	1.322	62.36
4 h	0.849	45.00

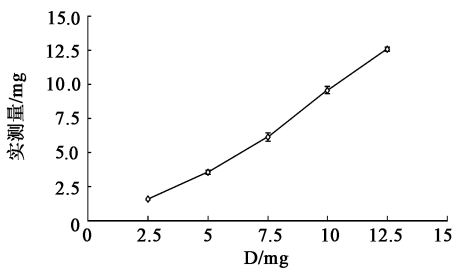


图 6 给药后不同给药剂量胃内容物含量测定曲线

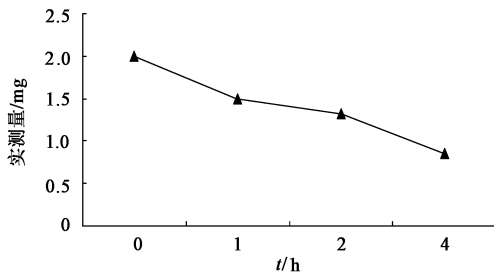


图 7 给药后不同时间胃内容物含量变化曲线

表 5 不同给药时间胃内容物调节 pH 至中性后含量测定

时间/h	测得量/mg	占给药量比/%
0	1.993	94.00
1	2.105	99.29
2	2.02	95.28
4	2.129	100.4

2.6 MDG-1 肠道内含量变化

2.6.1 方法专属性考察 结果表明,肠内容物内源性物质不干扰 F-MDG-1 的测定。

2.6.2 肠道内容物样品标准工作曲线 记录肠内容物样品的峰面积,以药物浓度 (C) 为横坐标,峰面积 (Y) 纵坐标,用加权 ($1/c^2$) 最小二乘法进行回归计算,求得直线回归方程 $Y = 1\ 320C + 22.528$ ($r = 0.999\ 9$)。根据标准曲线, FITC-MDG-1 的线性范围为 $0.02 \sim 5\ \mu\text{g}$ 。

2.6.3 方法精密性与回收率测定 F-MDG-1 肠道内容物方法的精密性及回收率良好,测定结果见表 6。

表 6 方法精密性和回收率测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加入量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	日间精密性 /%	日内精密性 /%
5	93.5 ± 3.8	2.0	2.5
50	102.7 ± 3.9	4.6	3.8
200	96.5 ± 1.7	6.4	5.7

2.6.4 小肠内含量变化药时曲线 给予 F-MDG-1 后在 1, 2, 4 h 含量随着时间的延长,在小肠道测得的 MDG-1 的量逐渐减少,由初始的 2.12 mg 减少至 0.61 mg,提示其在小肠内被分解。测定结果见表 7,变化曲线见图 8。

表 7 不同给药时间小肠内容物含量测定 ($\bar{x} \pm s$)

t/h	测得量/mg	t/h	测得量/mg
0	2.12	1	1.14 ± 0.15
2	0.78 ± 0.11	4	0.61 ± 0.10

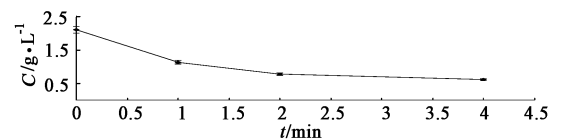


图 8 给药后不同时间小肠内容物含量变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.6.5 MDG-1 大肠内含量变化药时曲线 给予 F-MDG-1 后在 1, 2, 4 h 含量随着时间的延长,在大肠内测得的 MDG-1 的量逐渐减少,分别为 2.12, (0.68 ± 0.17), (0.61 ± 0.18), (0.36 ± 0.08) mg,提示其在大肠内被分解。测定结果见表 8,变化曲线见图 9。

表 8 不同给药时间大肠内容物含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

t/h	测得量/mg	t/h	测得量/mg
0	2.12	1	0.68 ± 0.17
2	0.61 ± 0.18	4	0.36 ± 0.08

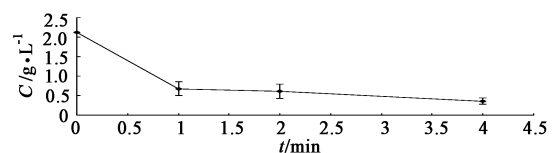


图 9 给药后不同时间大肠内容物含量变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

与蛋白质和核酸相比,多糖的结构更复杂易变,主要分为一级、二级、三级、四级结构。多糖中的残基较多,每个残基都可能和其他基团相连接,因此糖苷键具有多种连接方式;且单糖具有 α, β 两种构型^[4-5],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^[6-7],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相对分子质量多糖,经糖组分分析,红外吸收光谱、核磁共振光谱分析及甲基化反应确定:MDG-1 的峰间相对分子质量为5 000,重均相对分子质量为4 800(M_w),数均相对分子质量(M_n)3 400。属于 β -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 α -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,鉴于MDG-1为均一多糖混合物,无法测定其连接位置,但就结构而言,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 :497 nm/521 nm处有最大激发波长,但经反复试验后发现, em 在515 nm处图形清晰,符合荧光图谱的最优选择标准,故选择515 nm处为发射波长。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。

选用了不同浓度及不同pH的PBS缓冲液,但结果显示,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,分析原因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。为使电离度降到最低从而排除干扰,对样品进行了初步处理后再对其中带电荷物质进行沉淀,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,在考察过程

中发现,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。最后采用纯水作为液相色谱中的流动相。

在灌胃给予大鼠MDG-1后,对其代谢行为进行了研究。结果显示,给予相同剂量的F-MDG-1(2.12 mg),随着药物在胃内驻留时间的延长,其浓度由0 h的99.65%下降到42.45%。而在给予不同质量(2.5,5.0,7.5,10,12.5 mg)F-MDG-1后,在1 h时测得浓度占给药量的百分比随着给药剂量的增加而增加,在给予12.5 mg后1 h测定结果显示几乎不降解。由于胃液呈强酸性,而F-MDG-1上带有的FITC在酸性条件下其荧光反应值下降,导致测定结果偏低。在体外实验中曾将F-MDG-1加入人工胃液中,显示荧光响应值降低,而在加入NaOH溶液中和HCl后,其荧光响应值上升至正常水平。本试验中将经测定后的含F-MDG-1的胃内容物pH调节为中性(pH 7.2)后测定,含量未见明显变化,结果提示,F-MDG-1在胃内不受环境及蛋白酶的影响,在胃内不被分解。

分别单次给予小肠、大肠F-MDG-1后,在4 h后测得量均减少,结果表明,MDG-1在肠道内分解,其主要代谢部位在大肠,但具体影响其代谢行为的影响因素还不明确,其原因可能是由于肠道内的环境及细菌共同作用的结果。

[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] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,2006.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.

[责任编辑 邹晓翠]