

高效液相色谱法测定桔梗多糖对桔梗皂苷 D 在大鼠体内药物代谢动力学参数的影响

任蓉蓉¹,陈青青¹,张青青¹,杨 晔^{1,2,3},尹登科^{1,2,3}

(1. 安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;2. 新安医学教育部重点实验室,安徽 合肥 230012;

3. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 考察桔梗多糖(*Platycodon grandiflorum* polysaccharides, PGP)对桔梗皂苷 D(platycodin D, PD)在大鼠体内药物代谢动力学参数的影响,为桔梗的临床应用提供实验依据。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为 PD 组,PD+PGP 低、中、高剂量组(PD-PGP-L、PD-PGP-M、PD-PGP-H 组),灌胃给药后在各时间点眼眶取血,采用高效液相色谱法测定给药后 PD 的血药浓度变化,由 DAS 2.1 软件拟合药物代谢动力学参数。结果 与 PD 组比较,各 PD-PGP 实验组均显著缩短 PD 的达峰时间($P < 0.05$),并显著提高峰浓度($P < 0.05$)以及药时曲线下面积($P < 0.05$)。结论 PGP 能够显著改变 PD 口服后的药物代谢动力学参数。

[关键词]桔梗皂苷 D;桔梗多糖;高效液相色谱法;血药浓度;药物代谢动力学

[中图分类号]R969.1 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2021.04.021

桔梗为桔梗科植物桔梗 [*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.] 的干燥根,常以“桔梗汤”或“桔梗水提液”给药,其主要活性成分为三萜皂苷^[1]。现代药理学研究显示,桔梗具有祛痰止咳^[6]、抗肿瘤^[2]、抗炎症^[5]、保肝^[4]、降糖降脂和调节免疫^[3]等多种药理活性,其中桔梗皂苷 D(platycodin D, PD)被认为是主要的有效成分。但 PD 口服生物利用度低^[7-9],相关的体内药物代谢动力学研究也较少。

“桔梗汤”或“桔梗水提液”在水煎煮过程中使桔梗多糖 (*Platycodon grandiflorum* polysaccharides, PGP) 成分溶出,PGP 与小分子活性成分 PD 一同服下。目前关于桔梗的研究主要集中在其小分子活性成分 PD,对于 PGP 主要集中在提取、抗氧化等方面^[10],很少有研究关注 PGP 是否在“桔梗汤”或“桔梗水提液”发挥药效时起到一定作用。本研究通过大鼠灌胃模型,探究 PGP 对 PD 口服吸收过程中可能产生的影响。本研究对于探讨多糖与小分子的协同作用以及提高药物疗效和安全性,指导新药开发均具有重要意义。

基金项目:国家自然科学基金项目(81874348);安徽省自然科学基金项目(1908085J29)

作者简介:任蓉蓉(1993-),女,硕士研究生

通信作者:杨晔(1982-),女,博士,教授, Y. Yang@ahcm.edu.cn

1 材料与试剂

1.1 药品与试剂 PGP(批号 DST191105-178,纯度 $\geq 98.0\%$)、PD(批号 DST191103-015,纯度 $\geq 98.0\%$):成都德思特生物技术有限公司;水为超纯水;乙腈、甲醇(色谱纯):瑞典 Oceanpak 公司;其余试剂(分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验动物及分组 健康 SD 大鼠 24 只,SPF 级,雌雄各半,体质量(200 ± 25)g,由安徽医科大学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(皖)2017-001]提供。常规饲养,自由饮食饮水,饲养环境温度 $18 \sim 26^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(55 \pm 5)\%$,研究所涉及的动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准。大鼠实验前禁食 12 h,可自由饮水。将实验大鼠随机分为 PD 组,PD+PGP 低、中、高剂量组(PD-PGP-L、PD-PGP-M、PD-PGP-H 组),每组 6 只。

1.3 仪器 Vortex-genie 涡旋混合器:美国 Scientific Industries;Milli-Q 超纯水器:美国 Millipore 公司;Centrifuge 台式高速离心机:上海东兢电子有限公司;BP212D 型电子天平:德国 Sartorius 公司;LC-20ADXR 液相色谱仪:日本岛津公司。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);流动相:乙腈-水(25:75,V/V);流速:1.0 mL/min;柱温: 30°C ;进样量:10 μL ;检测波长:206 nm。

2.1.2 标准添加对照品的制备 精密称取 PD 对

照品 10.0 mg,以甲醇溶解并定容至 10 mL,得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取上述储备液 10 μ L,加入 100 μ L 空白大鼠血浆中,加入甲醇 400 μ L,涡旋除蛋白 5 min,15 000 r/min 离心 15 min,取上清,置氮气干燥仪下挥去溶剂,残渣加 100 μ L 乙腈复溶,即得。供试品溶液的制备方法:精密吸取含药血浆 100 μ L,自“加入甲醇”起,按照标准添加溶液对照品制备方法处理样品,即得。

2.1.3 专属性考察 分别考察大鼠空白血浆、空白血浆加 PGP、空白血浆加 PD 对照品以及 PD-PGP-H 组给药 30 min 后大鼠血浆样品,每组 6 份,按照“2.1.2”项下血浆样品处理操作,得到相应的色谱图(见图 1)。结果表明,PD 保留时间为 8.53 min,血浆中内源性物质对 PD 的测定无干扰。

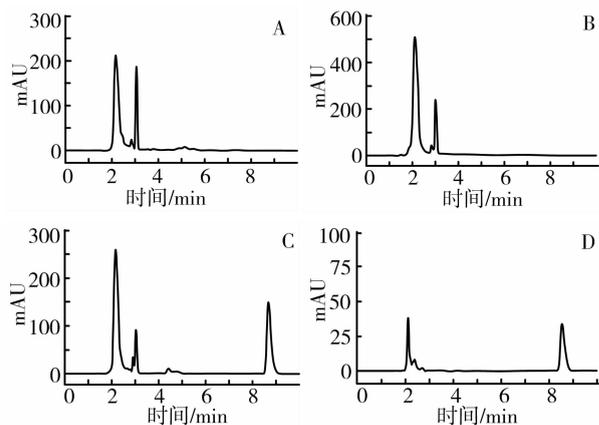


图 1 空白血浆(A)、PGP 血浆样品(B)、PD 对照品血浆样品(C)、PD-PGP-H 组含药血浆样品(D)色谱图

2.1.4 定量限确定 取 100 μ L 空白血浆,加入 PD 对照品溶液,按“2.1.2”项下血浆样品处理方法进行操作。当色谱峰信噪比(S/N)=10 时,得定量限为 5 μ g/mL(准确度为 95.53%,RSD=3.05%, $n=6$);当色谱峰的 S/N=3 时,最低检测限为 2 μ g/mL。

2.1.5 标准曲线及线性范围确定 取标准品储备液,以空白大鼠血浆配制浓度分别为 0、5、10、20、40、80、100 μ g/mL 的 PD 标准血浆样品,按照“2.1.2”项下血浆样品处理操作,以样品浓度(ρ)为横坐标,样品的峰面积(A)为纵坐标,最小二乘法计算回归方程。测得回归方程为 $A = 10\ 906\rho - 5\ 534.8$ ($r^2 = 0.999\ 3$),说明 PD 在 5~100 μ g/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.1.6 回收率考察 精密移取空白血浆 100 μ L,分别加入低、中、高 3 种浓度(5、50、100 μ g/mL)的

PD 溶液各 10 μ L,各浓度样品平行 6 组,按“2.1.2”项下血浆样品处理操作,10 μ L 进样分析。经计算,PD 低、中、高 3 个浓度样品的回收率分别为 (103.60 \pm 2.60)%、(96.33 \pm 2.29)%、(100.74 \pm 2.10)%,RSD 分别为 2.51%、2.38%、2.09%,符合生物样品分析原则要求的回收率。

2.1.7 日内及日间精密度考察 精密移取空白血浆 100 μ L,分别加入低、中、高 3 种浓度的 PD 溶液(5、50、100 μ g/mL)各 10 μ L,各浓度样品平行 5 组,按“2.1.2”项下血浆样品处理操作,10 μ L 进样分析。3 种浓度溶液均 1 日内重复进样 6 次,测定日内精密度,连续进样 6 d,测定日间精密度。实验结果显示,低、中、高 3 种浓度 PD 溶液的日内精密度 RSD 分别为 3.10%、2.94%、2.41%,日间精密度 RSD 分别为 2.23%、2.81%、2.34%,符合生物样品分析原则要求。

2.1.8 稳定性实验 精密移取空白血浆 100 μ L,加入低、中、高 3 种浓度(5、50、100 μ g/mL)的 PD 溶液各 10 μ L,各浓度样品平行 5 组,按“2.1.2”项下血浆样品处理操作,分别进行室温长期放置、反复冻融 3 次和 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存 2 周后,10 μ L 进样分析,并考察稳定性。结果显示低、中、高 3 种浓度稳定性的 RSD 分别为 3.62%、4.31%、1.43%,结果表明 PD 在上述条件下稳定性良好,符合生物样品分析原则。

2.2 动物实验 PD 组灌胃液的制备:精密称取 PD,用生理盐水溶解并定容,得 2 mg/mL 的 PD 灌胃溶液。另精密称取 3 种不同质量的 PGP,溶解于上述 PD 溶液中,调节 PGP 浓度至 2、4、8 mg/mL,即得 PD-PGP-L 组、PD-PGP-M 组、PD-PGP-H 组灌胃液。大鼠的灌胃容积为 10 mL/kg。PD 组只灌胃 2 mg/mL 的 PD,PD-PGP-L、PD-PGP-M 与 PD-PGP-H 组分别灌胃 2 mg/mL 的 PD 和 2、4、8 mg/mL 的 PGP。给药后 5、10、15、30、45、60、90、120、180、240、360 min,从眼眦取血 0.5 mL,置于经肝素处理的 EP 管中,3 000 r/min 离心 10 min,收集血浆。

2.3 数据处理 测得各时间点的平均血药浓度(ρ)-时间(t)数据,代入 DAS 2.1 软件,选择合适的房室模型,进行药物代谢动力学参数的计算。采用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行分析,数据以“均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.4 PD 血药浓度-时间曲线 大鼠单剂量灌胃 PD 或 PD+PGP 所得的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

2.5 灌胃 PD 的主要药物代谢动力学参数 将计算所得的血药浓度-时间数据,采用 DAS 2.1 软件进行拟合(二室模型,权重系数为 1),进而计算药物代谢动力学参数(见表 1)。结果表明,PD+PGP 灌胃后大鼠体内的药物代谢动力学参数发生了显著改变。与 PD 组相比,各 PD-PGP 实验组 PD 的达峰时间均显著缩短,峰浓度均显著提高,血药浓度-时间曲线下面积显著增加($P < 0.05$)。此外,PD-PGP-M 组的清除率显著减小($P < 0.05$)。

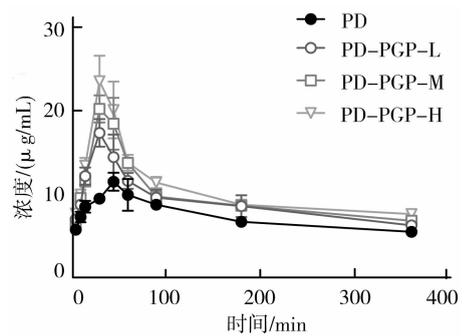


图 2 PD 在大鼠体内血药浓度-时间曲线($n=6, \bar{x} \pm s$)

表 1 PGP 对 PD 药物代谢动力学参数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$c_{\max}/$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$t_{\max}/$ min	$\text{AUC}_{0-t}/$ [$\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$]	$\text{AUC}_{0-\infty}/$ [$\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$]	$t_{1/2}/$ min	CL/ [$(\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg}))$]
PD	6	12.08 \pm 0.75	48.75 \pm 7.50	2 607.10 \pm 37.76	3 848.65 \pm 366.13	223.88 \pm 36.15	0.30 \pm 0.06
PD-PGP-L	6	17.96 \pm 1.20*	33.75 \pm 7.50*	3 230.97 \pm 300.78*	5 576.86 \pm 1 334.98	281.43 \pm 72.84	0.24 \pm 0.12
PD-PGP-M	6	21.42 \pm 1.28*	33.75 \pm 7.50*	3 444.80 \pm 103.21*	8 173.96 \pm 377.04*	479.74 \pm 141.58*	0.13 \pm 0.06*
PD-PGP-H	6	25.09 \pm 0.52*	33.75 \pm 7.50*	3 732.20 \pm 28.84*	6 046.68 \pm 2 752.93	269.35 \pm 210.86	0.24 \pm 0.06

注: $t_{1/2}$ 为半衰期; t_{\max} 为达峰时间; c_{\max} 为最大血药浓度; AUC_{0-t} 为 0 到最后一个时间点的血药浓度-时间曲线下面积; $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 0 到无穷大时间点的血药浓度-时间曲线下面积;CL:清除率;与 PD 组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

中药大多采用水煎煮口服的给药方式,可溶性多糖可在水煎煮过程中溶解在汤剂中。多糖大分子的生理药理活性近年来受到了越来越多的关注,被发现具有免疫调节、抗肿瘤、延缓衰老、降血糖、抗病毒、抗炎等多种生物活性^[11-14]。当桔梗以水煎煮(桔梗汤或桔梗水提液)口服的给药方式,可溶性多糖在中药水煎液中与小分子活性成分 PD 一同服下进入胃肠道。由于人体缺乏多糖水解酶,大部分多糖不能被人体直接消化和吸收。研究^[15-16]证实,中药多糖被作为肠道菌群代谢底物,与肠道菌群相互作用时产生一些其他的生物活性物质对药物的体内过程产生影响。此外,研究^[17-19]证实,PGP 可以诱导 T 细胞以及巨噬细胞的增殖,显著促进相关细胞因子的分泌。细胞因子的产生会对肠上皮的通透性产生影响,进而影响药物在体内的代谢。本研究结果显示,PGP 能够显著缩短 PD 的达峰时间,显著减小清除率,提高最大药物浓度以及增大血药浓度-时间曲线下面积。由此推测,PGP 与小分子活性物质 PD 一同服下后,一方面可能与肠道菌群发生相互作用,另一方面可能直接影响相关效应因子的分泌,进而对 PD 的体内药物代谢动力学参数产生影响。PGP 影响 PD 在大鼠体内药物代谢动力学参数的具体机制将是下一步研究的方向和重点内容。

参考文献:

[1] 李盈,王举涛,桂双英,等.桔梗的化学成分及药理作用研究进展[J].食品与药品,2016(1):72-75.

- [2] YIM N H, HWANG Y H, LIANG C, et al. A platycoside-rich fraction from the root of *Platycodon grandiflorum* enhances cell death in A549 human lung carcinoma cells via mainly AMPK/mTOR/AKT signal-mediated autophagy induction[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194:1060-1068.
- [3] NOH E M, KIM J M, LEE H Y, et al. Immuno-enhancement effects of *Platycodon grandiflorum* extracts in splenocytes and a cyclophosphamide-induced immunosuppressed rat model[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):322.
- [4] 魏建波,刘琴,赵秋枫.桔梗皂苷-D 对大鼠肝纤维化的干预作用及部分机制研究[J].中华中医药学刊,2014, 32(3):570-572.
- [5] 陈尘,张满云,孙荏苒,等.桔梗皂苷胶囊对慢性支气管炎小鼠肺组织中抗氧化酶活性和自由基浓度的影响[J].中国中医药科技,2010,17(4):323-324.
- [6] 于维颖,祝红杰.桔梗治疗支气管哮喘的药理机制研究[J].中医药学报,2012,40(3):38-40.
- [7] ZHAN Q, ZHANG F, GAO S H, et al. An HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of platycodin D in rat plasma and its application to the pharmacokinetics of Platycodi Radix extract[J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(2):154-160.
- [8] 王娟.桔梗皂苷 D 的药代动力学研究[D].南京:南京中医药大学,2012.
- [9] 邓杏好,谭梅英,张维彬.桔梗皂苷 D 的大鼠血浆药代动力学研究[J].按摩与康复医学,2018,9(11):49-51.
- [10] 董增,曹稳根,段红,等.桔梗多糖提取、分离纯化以及

- 生物活性研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8):3534-3539.
- [11] 徐海军, 方予, 汪俊涛, 等. 霍山石斛多糖对小鼠的双向免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(8):731-736.
- [12] 姜宏伟. 无花果叶多糖提取及其抗肿瘤活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- [13] 潘勇, 黄永毅, 徐灵源, 等. 桑枝多糖通过调节肠道菌群降血糖的作用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(1):7-10.
- [14] 谷仿丽, 黄仁术, 何晓梅. 霍山石斛多糖对溃疡性结肠炎小鼠的抗炎作用[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(14):176-177, 237.
- [15] ZHOU S S, XU J, ZHU H, et al. Gut microbiota-involved mechanisms in enhancing systemic exposure of ginsenosides by coexisting polysaccharides in ginseng decoction[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22474.
- [16] SHEN H, GAO X J, LI T, et al. Ginseng polysaccharides enhanced ginsenoside Rb1 and microbial metabolites exposure through enhancing intestinal absorption and affecting gut microbial metabolism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216:47-56.
- [17] ZHAO X, WANG Y, YAN P, et al. Effects of Polysaccharides from *Platycodon grandiflorum* on immunity-enhancing activity *in vitro* [J]. *Molecules*, 2017, 22(11):1918.
- [18] 郑丕苗. 桔梗多糖结构鉴定及其对鸡腹腔巨噬细胞免疫活性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [19] 王玉格. 桔梗多糖的纯化鉴定及其对鸡外周血淋巴细胞的免疫调节活性[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.

(收稿日期:2020-08-22)

Effect of *Platycodon grandiflorum* Polysaccharides on the Pharmacokinetic Parameters of Platycodin-D in Rats: An Analysis by High-performance Liquid Chromatography

REN Rong-rong¹, CHEN Qing-qing¹, ZHANG Qing-qing¹, YANG Ye^{1,2,3}, Yin Deng-ke^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Hefei 230012, China; 3. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharides (PGP) on the pharmacokinetic parameters of platycodin-D (PD) in rats and to provide experimental data for clinical application of *Platycodon grandiflorum*. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into PD group and PD+PGP groups with low, medium, and high doses of PGP (PD-PGP-L, PD-PGP-M, and PD-PGP-H groups). After oral administration, blood was taken from the eye canthus at each time point, and the plasma concentration of PD was determined by high-performance liquid chromatography. Pharmacokinetic parameters were fitted using DAS 2.1 software. **Results** Compared with the PD group, PD in the PD-PGP-L, PD-PGP-M, and PD-PGP-H groups had significantly reduced time to peak ($P < 0.05$) and significantly increased peak concentration ($P < 0.05$) and area under the concentration-time curve ($P < 0.05$). **Conclusion** PGP can significantly change the pharmacokinetic parameters of PD after oral administration.

[Key words] Platycodin-D; *Platycodon grandiflorum* polysaccharides; High-performance liquid chromatography; Plasma concentration; Pharmacokinetics