



· 制剂与炮制 ·

# 人参皂苷 $R_{g_1}$ 经 PEG 修饰前后的组织分布研究

刘梅, 王莉, 胡凯莉, 奉建芳\*

(上海中医药大学 穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:探讨人参皂苷  $R_{g_1}$  经 PEG 修饰后在小鼠的组织靶向分布情况。方法:取 SD 小鼠随机分为 2 组,分别给予尾静脉注射  $R_{g_1}$  和 PEG- $R_{g_1}$ ,于不同时间点取血并取各组织脏器,采用 UPLC 对样品中指标成分人参皂苷  $R_{g_1}$  进行含量测定,计算  $R_{g_1}$  在各组织分布的靶向系数,观察比较 2 组在小鼠体内的组织靶向分布情况。结果:人参皂苷  $R_{g_1}$  组在小鼠体内各组织分布的 AUC 大小顺序为肝、肾、肺、心、脾,肝靶向系数为 2.01;PEG 修饰组在小鼠体内各组织的 AUC 大小顺序为肾、肝、肺、心、脾,肝靶向系数为 9.21。结论:PEG 修饰后, $R_{g_1}$  对肝组织的靶向选择性增强,同时对肾、肺组织的靶向选择性也得到增强。

**[关键词]** 人参皂苷  $R_{g_1}$ ; PEG 修饰; 组织分布

人参皂苷  $R_{g_1}$  (ginsenoside  $R_{g_1}$ ,  $R_{g_1}$ ) 是人参的主要活性成分,现代药理学的研究表明其对心血管、神经及免疫系统有广泛的药理作用<sup>[1]</sup>,但因其口服生物利用度较低,影响了药效的发挥<sup>[2]</sup>。随着新的材料、新制剂技术的不断研究深入,人参皂苷  $R_{g_1}$  靶向给药制剂受到研究人员的关注<sup>[3-4]</sup>,靶向给药制剂在提高病灶药物浓度或降低药物的用量,改善难溶性化合物的溶解度及生物利用度等方面有其独特优势<sup>[5-6]</sup>。

哺乳动物的肝实质细胞上存在一类半乳糖 (H-Gal) 受体,可以专一性识别结合以非还原半乳糖或 *N*-己酰半乳糖为末端的糖蛋白。H-Gal 受体介导的专一性识别结合和包吞过程可以把配体上连接的各种药物或基因等定向转运到肝细胞内,从而达到肝靶向,并减少对其他组织的不良反应。苷类成分在体内常被水解或代谢,在胃肠道中主要受细菌、胃肠道分泌液等的影响,吸收进入体内后则可能与血浆蛋白结合或在肝中被代谢。如人参皂苷  $R_{g_1}$  在胃内被分解为  $R_{h_1}$ ;人参皂苷  $R_{b_1}$ ,  $R_{b_2}$  在胃内被分解为  $R_{b_1}$ ,  $R_{b_2}$  的 C-24 羟基化产物与过氧化物。设想如果苷类成份能以整体形式进入体内,则可能通过其结构中的糖配基分布于肝组织中。因此,本研究运用 PEG 修饰人参皂苷  $R_{g_1}$  (PEG- $R_{g_1}$ ) 在改善

$R_{g_1}$  在体内的稳定性,保护其糖配基不受破坏,在此基础上考察经 PEG 修饰后人参皂苷  $R_{g_1}$  在小鼠体内各组织分布情况,旨在为人参皂苷  $R_{g_1}$  整体进入体内后的肝靶向性提供实验依据。

## 1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 系统(美国 Waters); XW-80A 旋涡混合器(上海精科); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); DC-12 氮吹仪(上海安谱科学仪器厂)。

$R_{g_1}$  (中国食品药品检定研究院,批号 110703-200726), PEG- $R_{g_1}$  (自制); 甲醇,乙腈(色谱纯, Burdick&Jackson); 超纯水(Milli-Q 超纯水系统); 磷酸(分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司)。

SPF 级雄性昆明小鼠,体重(26 ± 3) g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

## 2 方法

### 2.1 动物分组与处理

取昆明小鼠 90 只,随机分为 2 组,每组 45 只,分别尾静脉注射  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} R_{g_1}$  和  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PEG- $R_{g_1}$  生理盐水溶液各 0.1 mL。分别于给药后 5, 15, 30 min, 1, 4 h 摘眼球取血处死。全血置 1.5 mL 肝素化离心管中,静置 0.5 h 后,  $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,吸取上层血浆,置 0.5 mL 离心管中,放在 -80 °C 冰箱保存。小鼠摘眼球取血处死后立即解剖,迅速取肝、肾、脾、肺、心组织,生理盐水洗去表面污血,滤纸吸干,然后分别用锡纸包好,标号,放在 -80 °C

[稿件编号] 20111219006

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873445)

[通信作者] \* 奉建芳, 研究员, 博士生导师, E-mail: fjf@shutem.edu.cn

[作者简介] 刘梅, 助理研究员, E-mail: lmcao@hotmail.com



冰箱保存。

## 2.2 小鼠血浆及组织样品处理

从冰箱中取出小鼠心、肝、脾、肺、肾、血浆样品，组织分别称重，1:5生理盐水匀浆，血浆室温融解。吸取血浆、心、肝、脾、肺、肾组织匀浆200 mL于1.5 mL离心管中，加入乙腈-甲醇(1:1)500 mL，涡旋混合2 min后，1万 r·min<sup>-1</sup>离心5 min，上清40℃氮气吹干；残渣以20%乙腈400 μL溶解，涡旋2 min，1万 r·min<sup>-1</sup>离心15 min后分析。

## 2.3 UPLC测定生物样品中Rg<sub>1</sub>的含量

**2.3.1 UPLC色谱分析条件** Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)，Waters ACQUITY UPLC BEH VanGuard保护柱(2.1 mm×5 mm, 1.7 μm)；流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>；柱温40℃；检测波长203 nm；进样量10 μL；流动相0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)，梯度洗脱程序见表1。

表1 人参皂苷Rg<sub>1</sub> UPLC梯度洗脱程序

Table 1 UPLC gradient program of Rg<sub>1</sub>

t/min	A/%	Curve
0	79	6
8	79	6
11	0	6
13	0	6
14	79	6
16	79	1

**2.3.2 色谱条件专属性试验** 含Rg<sub>1</sub>的血浆、组织样品溶液：取空白血浆180 μL，加入50 mg·L<sup>-1</sup>Rg<sub>1</sub>溶液20 μL，按2.2项下血样、组织样品处理方法处理，取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积。

空白血浆溶液：取空白血浆、组织180 μL，按2.2项下血样处理方法处理，取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积。

**2.3.3 Rg<sub>1</sub>体内标准曲线制备** Rg<sub>1</sub>血浆标准曲线：移取180 μL空白血浆8份，分别精密加入3.234, 6.469, 12.938, 25.875, 51.75, 103.5, 207 mg·L<sup>-1</sup>Rg<sub>1</sub>系列标准液，按2.2项下方法处理。取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积，以峰面积对浓度进行线性回归，得标准曲线方程。

Rg<sub>1</sub>肝组织标准曲线：移取180 μL空白肝组织匀浆7份，分别精密加入3.234, 6.469, 12.938,

25.875, 51.75, 103.5 mg·L<sup>-1</sup>Rg<sub>1</sub>系列标准液，按2.2项下方法处理。取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积，以峰面积对浓度进行线性回归，得标准曲线方程。

Rg<sub>1</sub>肾、肺组织标准曲线：移取180 μL空白肾、肺组织匀浆7份，分别精密加入3.234, 6.469, 12.938, 20.7, 25.875, 51.75 mg·L<sup>-1</sup>Rg<sub>1</sub>系列标准液20 μL，按2.2项下方法处理。取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积，以峰面积对浓度进行线性回归，得标准曲线方程。

Rg<sub>1</sub>脾、心组织标准曲线：移取180 μL空白脾、心组织匀浆7份，分别精密加入2.588, 5.175, 6.469, 10.35, 12.94 mg·L<sup>-1</sup>Rg<sub>1</sub>系列标准液，按2.2项下方法处理。取10 μL按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积，以峰面积对浓度进行线性回归，得标准曲线方程。

**2.3.4 精密度考察** 按“Rg<sub>1</sub>体内标准曲线制备”项下操作，制备Rg<sub>1</sub>低、中、高3个浓度的血浆与肝、肾组织样品，每个浓度分别平行制备5个样本，按2.3.1项下色谱条件每天分别进样5次，考察日内精密度；1周内测定5 d，考察日间精密度。

**2.3.5 方法回收率考察** 精密移取空白血浆、肝、肾、心组织匀浆180 μL，分别精密加入Rg<sub>1</sub>标准溶液使血浆、肝浆、肾浆中药物浓度为低、中、高3个理论浓度，按2.2项下体内样品处理方法处理。取上述各溶液各10 μL按2.3.1项下色谱条件进样分析，记录Rg<sub>1</sub>的峰面积，分别采用血浆、肝浆、肺浆、脾浆的标准曲线求算实际浓度，计算方法回收率。

**2.3.6 样品测定** 取各组小鼠心、肝、脾、肺、肾组织、血浆样品按2.3.1项下色谱条件进行UPLC分析，记录峰面积。

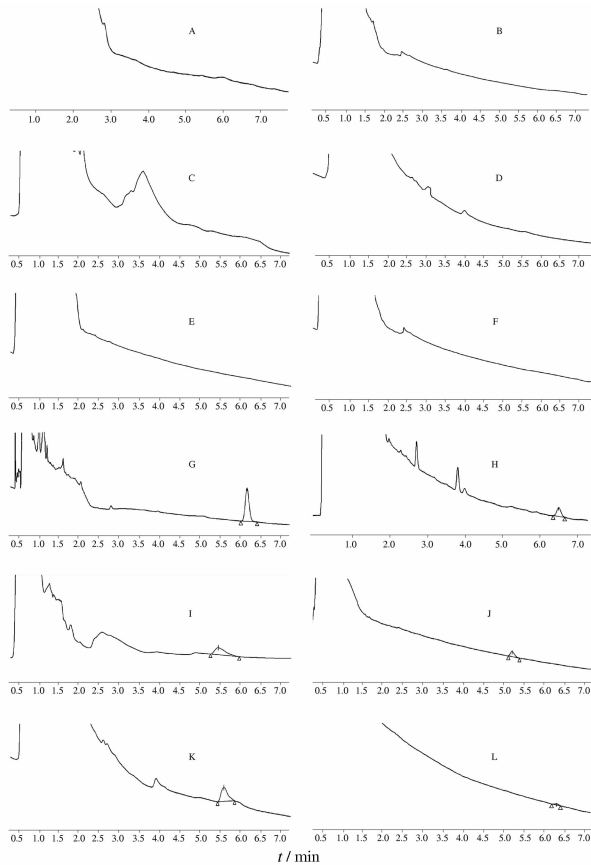
## 3 结果

### 3.1 色谱条件专属性试验

专属性试验结果见图1。空白血浆及心、肝、脾、肺、肾组织匀浆中内源性物质对Rg<sub>1</sub>测定均无干扰，色谱条件专属性良好。

### 3.2 Rg<sub>1</sub>体内标准曲线制备

Rg<sub>1</sub>体内标准曲线方程分别为Y<sub>血浆</sub> = 3 042.9 X - 153.85, r = 0.999 8, 线性范围0.323 4 ~ 20.7 mg·L<sup>-1</sup>; Y<sub>肝</sub> = 3 161.9 X - 271.21, r = 0.999 7, 线性范围0.323 4 ~ 10.35 mg·L<sup>-1</sup>; Y<sub>肾</sub> = 3 256.5 X - 160.48, r = 0.999 7, 线性范围0.323 4 ~ 5.175



A. 空白血浆; B. 空白心组织; C. 空白肝组织; D. 空白肾组织; E. 空白肺组织; F. 空白脾组织; G. 含药血浆标准样品; H. 含药心组织样品; I. 含药肝组织样品; J. 含药肾组织样品; K. 含药肺组织样品; L. 含药脾组织样品。

图1 空白与含药生物样品 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of blank sample and the samples contained  $R_{g_1}$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $Y_{\text{肺}} = 3\ 232.6X - 172.08$ ,  $r = 0.999\ 8$ , 线性范围  $0.323\ 4 \sim 5.175\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $Y_{\text{脾}} = 3\ 113.2X - 189.58$ ,  $r = 0.999\ 7$ , 线性范围  $0.258\ 8 \sim 1.294\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $Y_{\text{心}} = 3\ 283.6X - 192.76$ ,  $r = 0.999\ 6$ , 线性范围  $0.258\ 8 \sim 1.294\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.3 方法精密度考察

方法回收率精密度结果见表2, 精密度试验表明日内与日间精密度  $RSD < 5\%$ , 均符合要求。

### 3.4 方法回收率考察

方法回收率结果见表3。回收率结果表明回收率在  $85\% \sim 115\%$ , 符合要求。

### 3.5 小鼠尾静脉注射 $R_{g_1}$ 和 PEG- $R_{g_1}$ 后血浆及组织中的靶向效率

表2  $R_{g_1}$  体内精密度考察

Table 2 Precision of  $R_{g_1}$  in vivo

组织	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	日间精密度 RSD/%	日内精密度 RSD/%
血浆	0.313 3	3.4	2.1
	1.253 1	3.2	3.9
	10.025	3.8	1.3
肝	0.313 3	2.1	2.5
	1.253 1	1.9	1.1
	5.012 5	1.5	1.2
肾	0.313 3	2.3	3.1
	1.253 1	1.3	1.2
	5.012 5	1.3	1.4

表3  $R_{g_1}$  体内 UPLC 分析方法回收率考察

Table 3 Recoveries of  $R_{g_1}$  in vivo

组织	加样量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	测得值/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
血浆	10.025	9.122	90.99
	1.253 1	1.345 9	107.4
	0.313 3	0.333 4	106.4
肝	5.012 5	4.879 9	97.36
	1.253 1	1.145 2	91.39
	0.313 3	0.271 4	86.63
肾	5.012 5	4.885 6	97.47
	1.253 1	1.135 4	90.61
	0.313 3	0.286 9	91.57

靶向效率  $te = AUC_{\text{组织}} / AUC_{\text{血浆}}$ , 表示所测组分对靶器官的选择性,  $te > 1$  则该组分对靶器官有选择性,  $te$  越大, 选择性越强。计算  $R_{g_1}$  在血浆及各组织中分布的 AUC 及在各组织中的靶向效率, 结果见图2。经 PEG 修饰后,  $R_{g_1}$  对各组织的靶向系数均大于未修饰  $R_{g_1}$  的靶向系数, 且均  $> 1$ , 表明 PEG 修饰后对组织的靶向选择得到了增强, 其中对肾组织的靶向性最强。

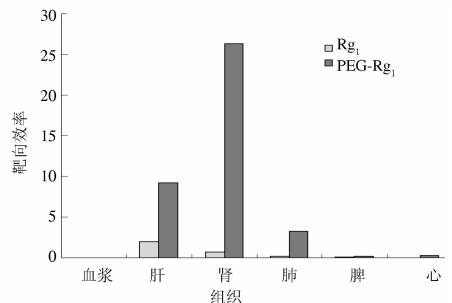


图2 小鼠尾静脉注射 PEG- $R_{g_1}$  后血浆及组织中的靶向效率  
Fig. 2 Targeting efficiency of  $R_{g_1}$  in rat plasma and tissue after intravenous injection of PEG- $R_{g_1}$



#### 4 讨论

PEG-Rg<sub>1</sub> 在小鼠体内各组织的 AUC 大小顺序为肾、肝、肺、心、脾, 肝靶向系数为 9.21, 肾靶向系数为 26.31, 肺靶向系数为 3.31, 表明 PEG-Rg<sub>1</sub> 对肝、肾、肺组织都有靶向选择性。而人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 只有肝靶向系数为 1.628 > 1, 可以得出结论, 与 PEG 修饰之前相比, PEG-Rg<sub>1</sub> 对肝组织的靶向选择性增强的同时, 对肾、肺组织的靶向选择性也得到增强, 且对肾组织的靶向选择性最强。

聚乙二醇是中性、无毒且具有独特理化性质和良好的生物相容性的高分子聚合物, 也是经 FDA 批准的极少数能作为体内注射药用的合成聚合物之一。当其耦联到药物表面时, 可以将自身优良性质赋予修饰后的药物分子, 如可以有效地解决药物制剂中提高药物的水溶性, 降低毒副作用, 延长药物在血液中的半衰期, 提高靶向性和增加疗效等难题, 目前关于 PEG 修饰是研究的热点, 本课题组以人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 为

模型药物, 通过 PEG 的修饰, 提高药物向靶点输送过程中的稳定性, 经静脉注射后, 在血液中循环, 可有效地靶向身体其他组织和器官, 释放药物, 发挥疗效, 为研制人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 靶向性制剂进行了有益探索。

#### [参考文献]

- [1] 王海南. 人参皂苷药理研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(11): 1201.
- [2] 李昊, 孙建国, 谢海棠, 等. 大鼠肠管外翻模型对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 吸收机制的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 510.
- [3] 梁平, 张旋, 吴琳, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 脂质体的制备及稳定性研究[J]. 昆明医学院学报, 2009, 30(1): 6.
- [4] 罗德凤, 叶建涛, 张毅珊, 等. 人参皂苷 R<sub>d</sub> 固体脂质纳米粒的体外释放和大鼠的在体吸收[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 923.
- [5] 石森林, 吴瑾瑾, 戴文芸, 等. 灯盏乙素麻醉大鼠鼻腔给药脑内靶向性评价[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2453.
- [6] 周韶华, 肖小河, 袁海龙, 等. 新型给药系统及其在中药制剂中的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 589.

## Tissue distribution of ginsenoside Rg<sub>1</sub> before and after modification by PEG

LIU Mei, WANG Li, HU Kaili, FENG Jianfang\*

(Murad Research Center for Traditional Chinese Medicine Modernization, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate targeted distribution of ginsenoside Rg<sub>1</sub> in mice tissues before and after modification by the PEG. **Method:** SD mice were randomly divided into two groups and given Rg<sub>1</sub> and PEG-Rg<sub>1</sub> by intravenous injection respectively. Their samples of blood and organ tissues were taken at different time points. The content of Rg<sub>1</sub> in samples were determined by UPLC and used as indicator to observe the targeted distribution of Rg<sub>1</sub> in mice tissues. **Result:** The AUC of ginsenoside Rg<sub>1</sub> in tissues of the Rg<sub>1</sub> group were in the order of liver, kidney, lung, heart and spleen, with the liver targeting coefficient was of 2.01. While the AUC of ginsenoside Rg<sub>1</sub> in tissues of the PEG-modified group were in the order of the kidney, liver, lung, heart, spleen, with the liver targeting coefficient was of 9.21. **Conclusion:** PEG modified Rg<sub>1</sub> can increase Rg<sub>1</sub>'s targeting selectivity to the liver, kidney and lung in mice.

[Key words] ginsenoside Rg<sub>1</sub>; PEG-modified; distribution in organs

doi:10.4268/cjmm20121212

[责任编辑 马超一]