

醋柴胡多糖分级醇沉 及其对拉米夫定药代动力学及组织分布的影响

赵亚¹, 刘丽娟¹, 盈世敏¹, 刘志芬¹, 吴亚运^{1,2}, 赵瑞芝^{1,2}

(1. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证重点实验室, 广东 广州 510006;

2. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要:目的 探讨分级醇沉醋柴胡多糖(Vinegar-baked Radix Bupleuri polysaccharide, VBCP)部位对抗乙肝药拉米夫定药代动力学及组织分布的影响。方法 采用分级醇沉法对醋柴胡多糖进行分离,采用苯酚-硫酸法测定糖含量,二喹啉甲酸(Bicinchoninic Acid, BCA)法测定蛋白含量,高效凝胶渗透色谱法测定分子量,高效液相色谱测定单糖组成以及红外光谱进行多糖特征基团鉴定。然后采用高效液相色谱法对单用拉米夫定及联用拉米夫定与醋柴胡多糖分级醇沉部位灌胃后不同时间点拉米夫定在血浆和组织中浓度进行测定,并采用药代动力学软件(DAS 2.0)进行药代动力学参数计算,采用统计分析软件(SPSS 20.0)对药代主要参数和组织浓度差异进行比较。结果 醋柴胡多糖40%醇沉部位(VBCP-40),60%醇沉部位(VBCP-60)和80%醇沉部位(VBCP-80)糖含量分别为65.53%、66.42%、54.86%;蛋白质含量分别为9.836%、6.214%、8.744%。3种多糖的分子量随着醇浓度的增大而减小,其均由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成,但比例相差较大。红外光谱显示其均有典型的多糖特征峰。药代动力学结果显示与单用组相比,VBCP-60和拉米夫定联用组药时曲线下面积(Area under the concentration-time curve, AUC)₀₋₉、AUC_{0-∞}、Concentration(C)_{max}显著升高,清除率(plasma clearance, CL_Z/F)显著降低。组织分布研究结果显示VBCP-60和VBCP-80可增加拉米夫定在肝脏中浓度;同时VBCP-80可降低其在肾脏中的浓度。结论 分级醇沉可实现醋柴胡多糖的初步分离纯化。VBCP-60和VBCP-80可增加拉米夫定在效应器官肝脏中的分布,可能是联用拉米夫定增效的活性部位。

关键词:醋柴胡多糖;分级醇沉;拉米夫定;药代动力学;组织分布

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2025)12-0026-08

Ethanol Fractional Precipitation of Vinegar-Baked Chaihu(Radix Bupleuri) Polysaccharides and Their Effects on Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Lamivudine

ZHAO Ya¹, LIU Lijuan¹, YING Shimin¹, LIU Zhifen¹, WU Yayun^{1,2}, ZHAO Ruizhi^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated

Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

Abstract: *Objective* To investigate the ethanol fractional precipitation of vinegar-baked Chaihu(Radix Bupleuri) polysaccharides (VBCP) and their effects on pharmacokinetics and tissue distribution of lamivudine. *Methods* The ethanol fractional precipitation was used to separate vinegar-baked Chaihu(Radix Bupleuri) polysaccharides. The phenol sulfuric acid method was used to determine the molecular weight, and the bicinchoninic acid(BCA) method was used to determine the protein content. The high performance gel permeation chromatography was used to determine the molecular weight, the high performance liquid chromatography was used to determine the monosaccharide composition, and the infrared spectrum was used to identify the characteristic groups of polysaccharide. Then, high-performance liquid chromatography was used to determine the concentration of lamivudine

基金项目:国家自然科学基金项目(82074086, 82173981, 81573612)

作者简介:赵亚(1982-),女,湖南衡阳人,副研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药多糖药效物质基础和药代动力学。

通讯作者:赵瑞芝(1968-),女,陕西兴平人,研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:中药多糖药效物质基础和中药制剂。E-mail: 13610241754@163.com。

in plasma and tissue at different time points after oral administration of lamivudine and lamivudine + VBCPs. The pharmacokinetic parameters were calculated using DAS2.0 software, and the differences in pharmacokinetic parameters and tissue concentrations were compared using SPSS 20.0. **Results** The sugar contents of VBCP-40, VBCP-60, and VBCP-80 were 65.53%, 66.42% and 54.86%, respectively. The protein contents were 9.836%, 6.214% and 8.744%, respectively. The molecular weight of three polysaccharides decreased with increasing alcohol concentration, and they were all composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose, but the proportions varied greatly. The infrared spectrum shows that all of them had typical polysaccharide characteristic peaks. The results of pharmacokinetic study showed that compared with the lamivudine group, the combination group of VBCP-60 and lamivudine significantly increased area under the concentration-time curve (AUC_{0-9} , $AUC_{0-\infty}$) and C_{max} , while decreased plasma clearance (CL_z/F). The results of tissue distribution study showed that VBCP-60 and VBCP-80 could increase the concentration of lamivudine in the liver; meanwhile, VBCP-80 could reduce its concentration in the kidneys. **Conclusion** Ethanol fractional precipitation can achieve the preliminary separation and purification of VBCP. VBCP-60 and VBCP-80 can increase the distribution of lamivudine in the liver, the anti-HBV effector organ of lamivudine, so they may be the active fractions for enhancing the efficacy of lamivudine.

Keywords: vinegar-baked Chaihu (Radix Bupleuri) polysaccharide; ethanol fractional precipitation; lamivudine; pharmacokinetics; tissue distribution

病毒性肝炎是全球范围内重要的公共卫生问题,可逐步发展为肝硬化,甚至肝癌等更严重的肝病。中国是病毒性感染负担最重的国家,而其中乙病毒感染为最主要的病毒性肝炎感染类型,占比70%以上^[1]。目前核苷类似物是首选的抗乙肝病毒的药物,其中拉米夫定因其疗效最好,且毒性较低,其毒性是同类药物齐多夫定的十分之一左右^[2],而被广泛应用于临床。然而长期单一使用拉米夫定易引发耐药突变的不良反应。虽然与其他核苷类似药联用可在一定程度上解决该问题,但是同时又带来了交叉耐药和多重耐药等新的不良反应^[3]。因此急需寻找新的更安全有效的联用药物。

柴胡是我国传统中药,具有抗炎、解热、镇痛、保肝利胆、抗肝纤维化、调节免疫、抗肿瘤等药理作用^[4],柴胡醋制后专入肝经,主要用于肝脏相关疾病^[5-6]。前期研究显示醋柴胡的主要活性成分醋柴胡多糖与拉米夫定体外联用可通过增加拉米夫定的摄取发挥抗乙肝病毒增效作用^[7],而醋柴胡多糖在体内发挥该作用的前提是醋柴胡多糖提高拉米夫定在靶组织肝脏中的浓度,但是醋柴胡多糖是否影响拉米夫定的体内过程从而发挥增效作用尚不清楚。此外醋柴胡多糖并非单一多糖组分,多糖最佳活性组分难以确定,为后续醋柴胡多糖联用增效的物质基础和机制研究带来了困难。因此本研究采用分级醇沉法对醋柴胡多糖进行分离,得到不同醇沉部位并进行理化性质表征,然后对醋柴胡多糖不同醇沉部位联用拉米夫定药代动力学和组织分布进行研究,通过体内过程明确醋柴胡多糖联用拉米夫定增效的机制,并筛选出活性醇沉部位,为醋柴胡多糖联用拉米夫定增效作用提供科学依据,并为醋柴胡多糖的进一步开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

醋柴胡(产地:湖北,批号:210802691,厂家:康美药业股份有限公司);拉米夫定(含量 $\geq 98\%$ 、MB1889),齐多夫定(含量 $\geq 98\%$ 、MB1766)均由大连美仑提供;甲醇(色谱级,天津四友);乙腈(色谱级,迪马);乙酸(色谱纯,天津富宇精细化工

剂公司);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, PMP,批号:B2217151,厂家:上海阿拉丁生化科技有限公司);三氟乙酸(批号:C14724103,厂家:上海麦克林生化科技有限公司);BCA试剂盒(批号:XE351686;厂家:ThermoScientific);其他试剂均为分析级及以上试剂。

Agilent 1200 高效液相色谱仪配VWD检测器(美国安捷伦公司);IKA 涡旋振荡仪(GENIUS3,德国);超低温冰箱(NEW BRUNSWICK 英国);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司);电子分析天平(BT-125D);液相色谱仪(安捷伦 1260);紫外可见分光光度计(U-2910);傅里叶变换红外光谱仪(Spectrum Two);电位粒径分析仪(布鲁克海文)。

SD大鼠,96只,雄性,体质量250~300g,广东省实验动物中心提供,生产许可证号:00158008,动物合格证号:44007200034212。动物实验经广州中医药大学第二附属医院动物伦理委员会批准(批准号:2017023)。

1.2 方法

1.2.1 醋柴胡多糖的提取及乙醇分级醇沉分离 按课题组前期方法^[8]进行提取醋柴胡总多糖,然后称取醋柴胡总多糖150g,用150mL纯水溶解后,加入一定量95%乙醇使乙醇的质量分数达到40%,充分搅拌后置于4℃冰箱中静置24h,3000 r·min⁻¹,离心15min,分别收集沉淀和上清液I,沉淀干燥后得40%醇沉组分(VBCP-40)。向上清液I中继续缓慢补加乙醇至质量分数为60%,4℃静置24h,3000 r·min⁻¹,离心15min,分别收集沉淀和上清液II,沉淀干燥后得60%醇沉组分(VBCP-60)。同法,向上清II中继续缓慢补加乙醇至质量分数为80%,弃去上清液III,得到80%醇沉组分(VBCP-80),分别计算各组分得率(%)。

1.2.2 醋柴胡多糖不同醇沉部位理化性质表征 (1)糖含量测定和蛋白含量测定:糖含量测定采用苯酚-硫酸法以D-葡萄糖为标准品进行测定,蛋白含量测定采用BCA法进行测定。

(2) 分子量测定:分别称取 VBCP-40, VBCP-60, VBCP-80 适量,用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 制成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。另取不同分子量的右旋糖酐标准品(3690、2370、1740、1190、680、550、220、95、60 kDa), 同法操作。采用配有示差折光检测器的高效液相色谱仪进行测定,色谱柱为 TSKgel GMPWxL 柱($7.8 \text{ mm} \times 30 \text{ cm}, 13 \mu\text{m}$), 流动相为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测器温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。测定完成后,各多糖样品分子量通过 GPC 软件计算得到。

(3) 单糖组成测定:分别准确称取 5 mg VBCP-40, VBCP-60, VBCP-80, 溶于 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氟乙酸溶液后转移到装有磁珠的 25 mL 圆底单口烧瓶中,将瓶内空气置换为 N_2 后,在 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 油浴条件下密闭水解 6 h 。反应结束后,放冷至室温,用旋转蒸发器减压旋干后加入 3 mL 甲醇溶液,除去残留的三氟乙酸,重复 5 次以上至轻嗅无三氟乙酸味,封口 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。将样品用 $600 \mu\text{L}$ 超纯水复溶,超声溶解 10 min ,移液枪准确吸取粗多糖样液 $400 \mu\text{L}$ 于 2 mL 的 EP 管中,加入 $200 \mu\text{L}$ $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液混匀后加入 $200 \mu\text{L}$ $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶于甲醇的 PMP 溶液,涡旋混匀,在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴条件下反应 100 min 。反应结束后,放冷至室温,再加入 $200 \mu\text{L}$ $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 混匀中和反应体系。加入氯仿涡旋混匀, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,保留水层,再加入等体积的氯仿萃取两次,取水相过 $0.22 \mu\text{m}$ 水系滤膜后上高效液相色谱仪进行分析。另取各单糖标准品同法操作。液相色谱条件:色谱柱为 DiamonsilC18 柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相为磷酸盐缓冲液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 6.83$): 乙腈 = $83 : 17$;柱温: $37 \text{ }^\circ\text{C}$,进样体积: $20 \mu\text{L}$,检测波长: 254 nm 。

(4) 红外光谱分析:取微量醋柴胡多糖样品轻轻点于傅里叶变换红外光谱仪的硒化锌晶体表面按压后进行扫描,波数范围为 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 。

(5) 粒径和电位测定:准确称取醋柴胡多糖样品 2 mg ,溶于 2 mL 的蒸馏水中,充分混匀,过 $0.8 \mu\text{m}$ 的水系滤膜,使用电位粒径分析仪测定其粒径和电位。

1.2.3 血药浓度和组织分布测定方法的建立 (1) 色谱条件:色谱柱 Hibar RP-18($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),检测器 DAD,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,流动相(血药浓度): $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液(A)(乙酸调 pH 值 3.5) - 甲醇(B) - 乙腈(C)梯度洗脱($0 \text{ min}, 10\% \text{ B}; 0 \sim 12 \text{ min}, 10\% \text{ B} - 10\% \text{ B}65\% \text{ C}; 12 \sim 14 \text{ min}, 10\% \text{ B}65\% \text{ C} - 10\% \text{ B}65\% \text{ C}$);流动相(组织分布):水(A) - 甲醇(B) - 乙腈(C)梯度洗脱($0 \text{ min}, 10\% \text{ B}; 0 \sim 8 \text{ min}, 10\% \text{ B} - 10\% \text{ B}6\% \text{ C}; 8 \sim 14 \text{ min}, 10\% \text{ B}6\% \text{ C} - 20\% \text{ B}10\% \text{ C}; 14 \sim 20 \text{ min}, 20\% \text{ B}10\% \text{ C} - 20\% \text{ B}10\% \text{ C}$),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 276 nm ,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

(2) 给药和样品的采集:血浆样品:24 只 SD 雄性大鼠,适应性饲养 1 周,随机分为 4 组,每组 6 只。给药前禁食 12 h ,自由饮水,分别灌胃给予拉米夫定($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + VBCP-40($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定 + VBCP-60($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定 + VBCP-80($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),于

给药前及给药后 $5, 10, 20, 40 \text{ min}$ 和 $1, 2, 4, 6, 9 \text{ h}$ 采血,置于 1.5 mL 肝素钠离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上层血浆,保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,待测。

组织样品:72 只 SD 雄性大鼠,适应性饲养 1 周,随机分为 4 组,每组 18 只。给药前禁食 12 h ,自由饮水,分别灌胃给予拉米夫定($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + VBCP-40($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定 + VBCP-60($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、拉米夫定 + VBCP-80($540 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),于给药前及给药后 $20, 40 \text{ min}$ 和 4 h 处死大鼠,解剖采集心、肝、脾、肺和肾组织,剔除筋膜, 0.9% 氯化钠溶液洗净,滤纸滤干,保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,待测。

(3) 样品的处理:血浆样品:血浆 $100 \mu\text{L}$,加入内标齐多夫定($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $100 \mu\text{L}$,涡旋混匀,加入 1 mL 甲醇,涡旋 1 min , $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上清液, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴、 N_2 挥干, $100 \mu\text{L}$ 流动相复溶,涡旋 1 min , $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min ,取上清液, $10 \mu\text{L}$ 进样分析。

组织样品:精密称取组织 0.1 g ,加入 10 倍量的 0.9% 氯化钠溶液匀浆,离心 10 min ,取上清液, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。取组织匀浆液 $100 \mu\text{L}$,按血浆样品同法进行后续处理。

(4) 对照品溶液的制备:精密称取拉米夫定、齐多夫定对照品,用甲醇配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,贮存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$,备用。

(5) 方法学考察:① 专属性考察:取大鼠空白血浆和空白组织匀浆,加对照品和内标溶液的空白大鼠血浆和组织匀浆及大鼠口服给药后的血浆和组织匀浆,按“1.2.3(3)”项下样品处理方法进行处理并进样分析得到分析色谱图。

② 标准曲线与定量下限:取空白血浆或组织匀浆 $100 \mu\text{L}$,加入拉米夫定系列标准溶液,配制相当于拉米夫定($0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的血浆样品,按“1.2.3(3)”项下方法处理样品并进样分析,以拉米夫定与齐多夫定的峰面积比(Y)与血浆和组织匀浆中浓度(X)进行线性回归计算,得到回归方程。线性范围中最低浓度为定量下限。

③ 准确度和精密性:空白血浆或组织匀浆 $100 \mu\text{L}$,分别加入定量下限、低、中、高 4 个质量浓度($0.312, 0.625, 2.5, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为拉米夫定的质控样品,按“1.2.3(3)”项下方法处理样品,上机测定后利用“1.2.3(5)②”项下方法所得随行标准曲线计算精密性和准确度。

④ 提取回收率:空白血浆或组织匀浆 $100 \mu\text{L}$,分别加入定量下限、低、中、高 4 个质量浓度($0.312, 0.625, 2.5, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为拉米夫定的质控样品,按“1.2.3(3)”项下方法处理样品,上机测定的峰面积与相应浓度的对照品溶液进样所得峰面积的比值计算得提取回收率。

⑤ 稳定性试验:空白血浆或组织匀浆 $100 \mu\text{L}$,分别加入低、中、高 3 个质量浓度($0.625, 2.5, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为拉米夫定的质控样品,分别考察质控样品室温放置 24 h 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 48 h 、3 次冷冻-解冻循环后,然后按“1.2.3(3)”项下方法处理样品并进行测定稳定性。

1.2.4 数据分析 采用 DAS 2.0 软件按非房室模型计算药动力学参数,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS

20.0 进行组间差异分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 醋柴胡多糖不同醇沉部位理化性质

2.1.1 得率、糖含量和蛋白质测定 醋柴胡多糖不同醇沉部位 VBCP-40、VBCP-60、VBCP-80 的得率分别为 1.51%、1.00%、1.05%；糖含量分别为 65.53%、66.42%、54.86%；蛋白质含量分别为 9.836%、6.214%、8.744%。

2.1.2 分子量测定 醋柴胡多糖不同醇沉部位的分子量如插页图 1 所示, 3 个醇沉部位均呈现出宽分子量峰, 其中 VBCP-40 主峰出峰时间为 17.627 min, 分子量为 43.858 kDa；VBCP-60 主峰出峰时间为 18.334 min, 分子量为 19.396 kDa 以及 VBCP-80 主峰出峰时间为 20.000 min, 分子量为 1.473 kDa。可见不同浓度醇沉对醋柴胡多糖可按分子量进行初步的分离。

2.1.3 单糖组成分析 醋柴胡多糖不同醇沉部位 VBCP-40、VBCP-60、VBCP-80 的单糖组成如图 2 所示, VBCP-40 的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, 相对摩尔比为 1.79 : 3.35 : 0.19 : 23.37 : 25.93 : 8.45 : 36.91, 以半乳糖醛酸、葡萄糖和阿拉伯糖为主。VBCP-60 的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, 相对摩尔比为 1.02 : 3.19 : 1.23 : 8.46 : 21.76 : 21.12 : 43.21, 以葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖为主。VBCP-80 的单糖组成为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛

酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖, 相对摩尔比为 3.00 : 1.36 : 0.84 : 3.51 : 7.30 : 19.57 : 64.40, 以葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖为主。

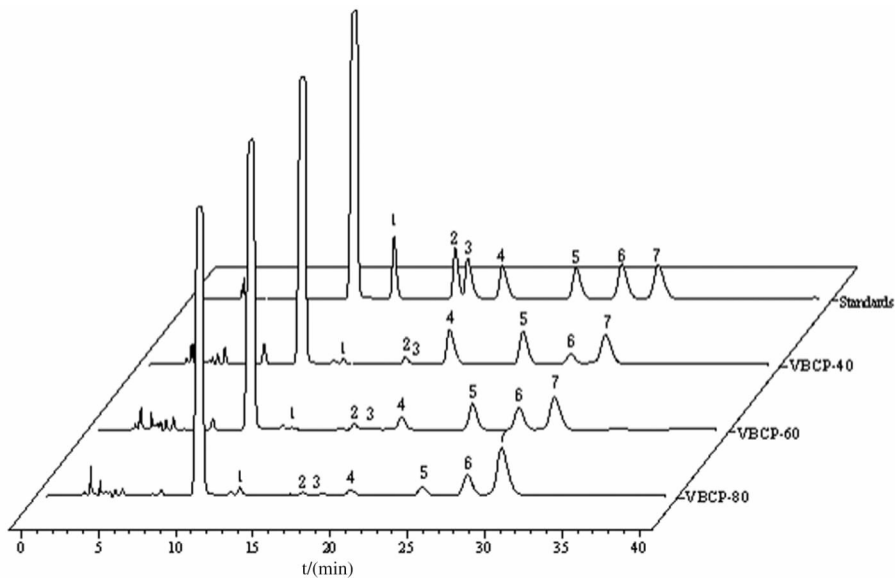
2.1.4 红外光谱分析 如插页 I 图 3 所示 VBCP-40、VBCP-60 和 VBCP-80 均呈现出典型的多糖图谱。在 $3200 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ 处有一个强而宽的 O-H 拉伸振动带, 吸收峰出现在 2938 cm^{-1} 区域是由于 C-H 拉伸振动造成的。吸收峰位于 1739 cm^{-1} 附近主要归因于糖醛酸的存在。强吸收峰位于 $1600 \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 则证实了 C=O 的特征不对称拉伸。信号峰值在 $800 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 可视为碳水化合物指纹区。图中峰值位置位于 $1000 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 的信号峰则是由 C-O 的弯曲振动产生。弱吸收峰即位于 888 cm^{-1} 和 831 cm^{-1} 附近的吸收峰则证实 3 种醇沉粗多糖同时含有 β - 和 α - 型两种糖苷键。

2.1.5 粒径和电位分析 VBCP-40、VBCP-60 及 VBCP-80 的粒径分别是 $(409.62 \pm 7.21) \text{ nm}$ 、 $(251.74 \pm 3.36) \text{ nm}$ 及 $(151.82 \pm 3.28) \text{ nm}$ (图 4), 电位分别为 $(-16.19 \pm 1.44) \text{ mV}$ 、 $(-14.84 \pm 2.54) \text{ mV}$ 和 $(-11.48 \pm 2.28) \text{ mV}$ 。

2.2 方法学考察

2.2.1 方法专属性 专属性结果如图 5 所示, 血浆和组织中内源性物质和其他物质均不干扰拉米夫定的测定, 表明血浆和组织样品的定量分析方法专属性均良好。

2.2.2 标准曲线和定量下限 拉米夫定在血中的标准曲线方



注: 1. 甘露糖。2. 鼠李糖。3. 葡萄糖醛酸。4. 半乳糖醛酸。5. 葡萄糖。6. 半乳糖。7. 阿拉伯糖。

图 2 标准品和 3 个醇沉多糖部位单糖组成液相色谱图

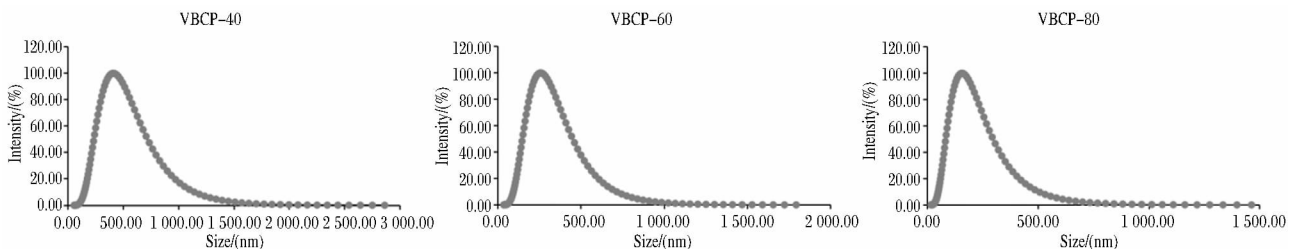
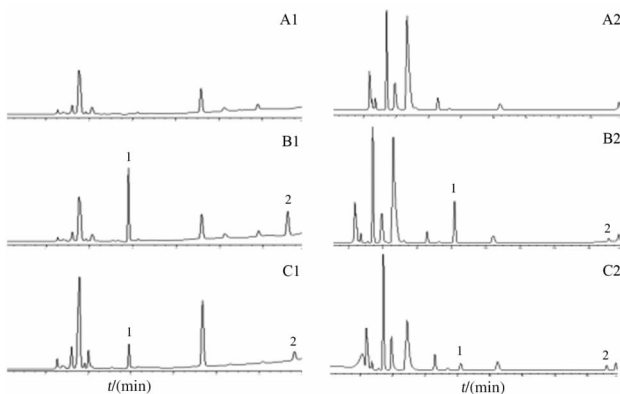


图 4 3 个醇沉多糖部位粒径分布

表1 大鼠组织中拉米夫定准确度、精密性、回收率、稳定性结果

| 组织 | 药物浓度/ (mg · L ⁻¹) | 回收率/(%) | 精密性/(%) | | 准确度/(%) | 稳定性(RSD)/(%) | | |
|----|----------------------------------|---------------|---------|------|---------------|--------------|-----------|----------|
| | | | 日内 | 日间 | | 常温 24 h | 4 °C 48 h | 反复冻融 3 次 |
| 肝 | 0.312 | 106.00 ± 7.97 | 3.08 | 1.94 | 82.09 ± 3.08 | 2.60 | 2.72 | 1.88 |
| | 0.625 | 107.70 ± 3.74 | 3.81 | 1.46 | 90.68 ± 3.81 | 2.60 | 2.73 | 3.00 |
| | 2.5 | 102.10 ± 5.32 | 4.32 | 0.78 | 98.89 ± 4.32 | 7.33 | 6.75 | 4.17 |
| | 20 | 96.89 ± 5.07 | 2.90 | 1.64 | 101.20 ± 2.90 | 3.05 | 3.47 | 2.85 |
| 心 | 0.312 | 110.40 ± 3.49 | 6.00 | 4.62 | 93.86 ± 6.00 | 4.10 | 5.49 | 5.15 |
| | 0.625 | 102.10 ± 1.69 | 3.74 | 2.09 | 98.68 ± 3.74 | 1.95 | 2.56 | 1.26 |
| | 2.5 | 104.60 ± 4.05 | 1.34 | 0.95 | 101.20 ± 1.34 | 1.29 | 1.48 | 0.90 |
| | 20 | 95.12 ± 1.82 | 6.14 | 0.78 | 92.66 ± 6.14 | 5.68 | 5.60 | 5.05 |
| 脾 | 0.312 | 109.80 ± 3.17 | 2.39 | 1.90 | 83.48 ± 2.39 | 2.31 | 2.42 | 2.04 |
| | 0.625 | 107.80 ± 4.31 | 3.71 | 0.90 | 88.36 ± 3.71 | 0.91 | 1.72 | 0.59 |
| | 2.5 | 109.03 ± 4.10 | 4.30 | 0.22 | 103.13 ± 4.3 | 3.30 | 4.10 | 2.97 |
| | 20 | 93.94 ± 3.68 | 4.16 | 0.88 | 90.57 ± 4.16 | 2.09 | 2.55 | 1.3 |
| 肺 | 0.312 | 88.26 ± 3.39 | 4.11 | 2.72 | 93.88 ± 4.11 | 7.06 | 5.24 | 4.25 |
| | 0.625 | 96.00 ± 2.18 | 3.62 | 1.56 | 96.09 ± 3.62 | 6.74 | 5.32 | 2.28 |
| | 2.5 | 93.20 ± 3.69 | 4.00 | 0.83 | 100.03 ± 4.00 | 3.69 | 2.42 | 1.99 |
| | 20 | 88.21 ± 1.66 | 1.82 | 1.83 | 97.06 ± 1.82 | 2.29 | 3.54 | 1.47 |
| 肾 | 0.312 | 109.66 ± 5.05 | 0.72 | 4.88 | 118.96 ± 0.72 | 0.81 | 2.49 | 3.74 |
| | 0.625 | 103.65 ± 2.10 | 5.14 | 3.77 | 101.91 ± 5.14 | 1.18 | 1.07 | 0.90 |
| | 2.5 | 93.26 ± 1.85 | 2.57 | 2.39 | 95.95 ± 2.57 | 95.88 | 2.19 | 2.62 |
| | 20 | 93.86 ± 0.63 | 1.41 | 0.43 | 99.50 ± 1.41 | 1.43 | 1.69 | 1.14 |



注: A1. 空白血浆; B1. 空白血浆加对照品; C1. 大鼠灌胃拉米夫定后 40 min 血药图谱; A2. 空白肝脏; B2. 空白肝脏加对照品; C2. 大鼠灌胃拉米夫定后 40 min 肝中分布图谱; 1. 拉米夫定; 2. 齐多夫定。

图5 大鼠血浆中或肝中拉米夫定测定代表性色谱图

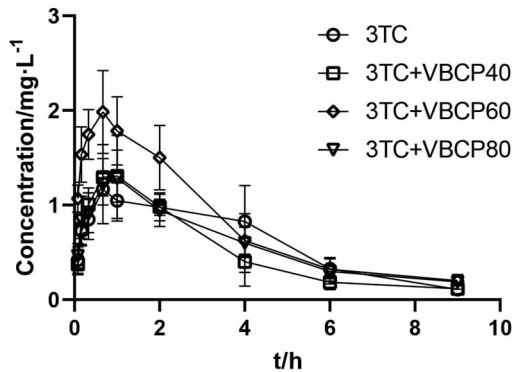
程为 $Y = 0.837X - 0.036$, $R^2 = 0.999$, 定量下限为 $0.312 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。拉米夫定在各组织中的标准曲线方程分别为: 肝: $Y = 0.627X + 0.068$, $R^2 = 0.997$; 心: $Y = 0.650X + 0.016$, $R^2 = 0.999$; 脾: $Y = 0.823X + 0.057$, $R^2 = 0.999$; 肺: $Y = 0.717X + 0.013$, $R^2 = 0.997$; 肾: $Y = 0.625X - 0.016$, $R^2 = 0.999$; 定量下限均为 $0.312 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 准确度、精密性、提取回收率和稳定性试验 血中拉米夫定准确度定量下限在 114% ~ 116%, 低、中、高浓度在 99% ~ 110%; 考察了 1 d 内不同的放置时间精密性, 结果显示血中拉米夫定低、中、高浓度日内和日间精密度的 RSD 均小于 8.5%; 拉米夫定在血中定量下限、低、中、高浓度的提取回收率在 94% ~ 98%; 以上结果显示其准确度、精密性和回收率均符

合生物样本测定方法要求。血浆质控样品在室温放置 24 h、4 °C 放置 48 h、3 次冷冻-解冻循环的稳定性实验结果显示 RSD 均小于 8%, 表明样品在以上条件下均稳定。各组织中拉米夫定的准确度、精密性、回收率、稳定性结果见表 1, 均符合生物样本测定方法要求。

2.3 药代动力学研究

醋柴胡多糖不同醇沉部位对拉米夫定药动学的影响结果见图 6 和表 2。结果显示与拉米夫定(Lamivudine, 3TC)单用组比较, 此外与 VBCP60 联用后药代动力学参数 AUC_{0-9} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著增加, 平均滞留时间 (Mean Residence Time, MRT)₀₋₉、 CL_z/F 均显著降低。与 VBCP40 和 VBCP80 联用后, 除与 VBCP40 联用 MRT₀₋₉ 显著降低外, 其余参数均无显著性变化。

图6 各组 SD 大鼠灌服拉米夫定以及拉米夫定 + 不同醇沉多糖部位后体内的平均药物浓度-时间曲线图 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

2.4 组织分布研究

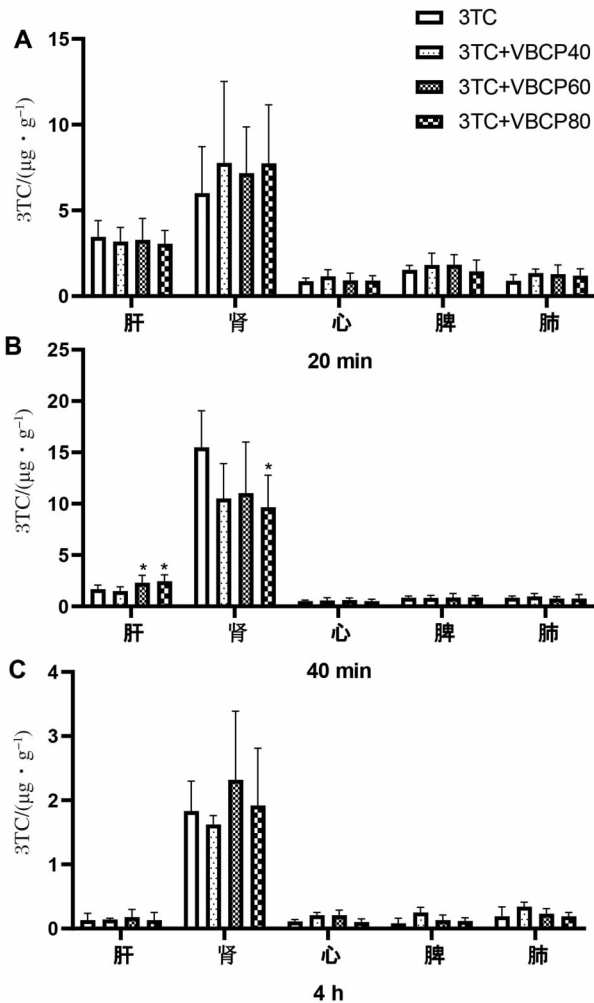
醋柴胡多糖不同醇沉部位对拉米夫定组织分布的影响结

表 2 各组大鼠主要药代动力学参数($n=6, \bar{x} \pm s$)

| 参数 | AUC ₀₋₉ / | AUC _{0-∞} / | T _{max} / | C _{max} / | MRT ₀₋₉ / | V _z /F/ | CL _z /F/ |
|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--|
| | (mg·h·L ⁻¹) | (mg·h·L ⁻¹) | (h) | (mg·L ⁻¹) | (h) | (L·kg ⁻¹) | (L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹) |
| 3TC 组 | 5.51 ± 1.07 | 5.80 ± 1.01 | 0.73 ± 0.15 | 1.23 ± 0.19 | 3.03 ± 0.27 | 9.05 ± 3.42 | 3.18 ± 0.55 |
| 3TC + VBCP40 组 | 4.59 ± 1.05 | 5.00 ± 1.08 | 0.83 ± 0.18 | 1.35 ± 0.23 | 2.53 ± 0.32** | 13.21 ± 5.61 | 3.73 ± 0.77 |
| 3TC + VBCP60 组 | 7.17 ± 0.98* | 7.88 ± 0.87** | 0.75 ± 0.17 | 2.01 ± 0.42** | 2.64 ± 0.16** | 8.56 ± 2.59 | 2.31 ± 0.26** |
| 3TC + VBCP80 组 | 5.28 ± 0.86 | 7.05 ± 2.57 | 1.00 ± 0.52 | 1.37 ± 0.39 | 3.02 ± 0.49 | 15.30 ± 11.19 | 2.75 ± 0.66 |

注: * 与单用组比较, $P < 0.05$; ** 与单用组比较, $P < 0.01$ 。

果见图 7。结果显示醋柴胡多糖不同醇沉部位不同程度地影响拉米夫定在大鼠体内的分布,各脏器中拉米夫定的峰值浓度从大到小依次为肾脏、肝脏、脾脏、脾脏、心脏。与拉米夫定(3TC)单用相比,VBCP60、VBCP80 联用组给药 40 min 时肝脏中拉米夫定浓度显著增加($P < 0.05$);肾脏中拉米夫定浓度均降低,其中,与 VBCP80 联用组作用具有显著性($P < 0.05$)。与不同醇沉部位联用后拉米夫定在其余脏器中浓度变化不显著。



注: * 与单用拉米夫定组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 各组 SD 大鼠灌服拉米夫定以及拉米夫定 + 不同醇沉多糖部位后 20 min、40 min 和 4 h 各组织分布($n=6, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

分级纯化是探讨多糖化学结构和生物活性的基础,常用方法有沉淀法,主要包括分级醇沉法和季铵盐沉淀法;柱层析法,

主要包括凝胶色谱法、阴离子交换色谱法和大孔树脂色谱柱法;超滤法^[9-12]。其中分步醇沉法因其操作简单、损失少、成本低、可行性高等优点而成为分级纯化中最常用的手段之一^[13]。本研究通过分级醇沉方法得到了 3 个不同多糖醇沉部位,理化性质表征结果显示随着醇沉浓度的增加,多糖醇沉部位分子量逐渐减小;不同醇沉部位的多糖均由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖,但单糖组成比例有较大的不同,VBCP-40 以半乳糖醛酸、葡萄糖和阿拉伯糖为主,VBCP-60 和 VBCP-80 以葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖为主。其中 3 个组分共有的葡萄糖和阿拉伯糖,随着醇沉浓度的增加葡萄糖的比例减少,阿拉伯糖的比例逐渐增加。不同醇沉部位粒径大小差异显著,随着醇沉浓度的增加,多糖粒径越小。可见分级醇沉可实现醋柴胡多糖的初步分离纯化。

拉米夫定由于水溶性高,几乎分布于所有细胞外液,导致靶器官肝脏分布少,因此其临床给药剂量大,不良反应和耐药性显著增加^[14]。前期研究显示醋柴胡多糖能增加肝炎细胞对拉米夫定的摄取进而增效拉米夫定抗乙肝作用,且醋柴胡多糖具有肝靶向性^[6,15],因此推测醋柴胡多糖可能通过肝靶向作用增加拉米夫定在肝脏分布从而发挥增效作用,而本研究中醋柴胡多糖对拉米夫定药代动力学研究结果显示与单用组相比,VBCP-60 和拉米夫定联用组 AUC₀₋₉、AUC_{0-∞}、C_{max}显著升高,CL_z/F 显著降低,表明 VBCP-60 能显著升高拉米夫定的血药浓度。组织分布研究结果显示 VBCP-60 和 VBCP-80 可使拉米夫定在肝脏中药物浓度增加,显示出一定的肝靶向性;同时 VBCP-80 可降低肾脏中的药物含量。因此在实际使用中联用后可减少拉米夫定的剂量,从而对拉米夫定用药过多而产生耐药性及拉米夫定的肾毒性有积极作用。

多糖的生物活性与其结构密切相关,多糖的构效关系研究是目前多糖研究的热点和难点^[16-17],其中分子量是影响多糖生物活性的一个重要结构特征。研究发现由于分子内氢键作用较弱,分子量较低的多糖和更多的羟基或氨基处于游离状态,从而更有利于其发挥生物活性^[18-19],而分子量较高的多糖具有水溶性差、黏度高的特点,阻碍了其在体内的吸收利用^[20-21]。本研究结果显示分子量较高的 VBCP-40 对体内过程无明显影响,而分子量较低的 VBCP-60 和 VBCP-80 部位可增加拉米夫定在肝脏中的分布,且 VBCP-80 可减少其在肾脏中的分布,与文献报道相符。此外多糖的单糖组成是影响多糖活性的另一重要结构特征。研究发现半乳糖能被肝细胞特异性识别,因此构建半乳糖基靶向载体能够增强药物的肝靶向性^[22-24]。本研究发现 VBCP-60、VBCP-80 半乳糖的比例相较于 VBCP-40 显著升高,因此进一步证实了 VBCP-60、VB-

CP-80的肝靶向性与半乳糖比例相关。此外,与VBCP-40相比,VBCP-60、VBCP-80中阿拉伯糖的比例较高,而葡萄糖的比例明显减少,提示醋柴胡多糖的肝靶向作用也可能与这两种单糖比例也相关。多糖的立体结构与多糖的活性和体内行为密切相关。我们课题组前期研究发现醋柴胡多糖能够自组装成纳米粒^[8,25],因此本研究对醋柴胡多糖的粒径和电位进行了测定,结果发现VBCP-40、VBCP-60、VBCP-80的粒径差异较大,且粒径较小且粒径范围在100~200 nm的VBCP-60、VBCP-80显示出更好的肝靶向作用。因此不同醇沉部位作用区别可能与其分子量、单糖组成中葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖的比例以及粒径密切相关。然而具体哪种理化性质和结构的多糖活性最好,还需进一步研究。

综上所述,本研究通过分级醇沉获得3个醋柴胡多糖醇沉部位,其分子量、单糖组成和立体结构均有明显区别,可见分级醇沉可实现醋柴胡多糖的初步分离纯化。3个醋柴胡多糖醇沉部位对拉米夫定的体内过程影响明显不同,其中VBCP-60和VBCP-80可增加拉米夫定在效应器官肝脏中的分布,可能是联用拉米夫定增效的活性部位。本课题的研究为醋柴胡多糖联用拉米夫定增效作用提供科学依据,并为醋柴胡多糖的进一步开发提供参考数据。

参考文献

[1] 董邓波,邹圣强,唐舒. 2009—2019年中国病毒性肝炎发病的时空流行病学特征分析[J]. 现代预防学,2024,51(4):595-601.

[2] 陈昶敏,陈铢莲,刘俊皓. 典型抗病毒药物拉米夫定的降解研究进展[J]. 广东化工,2024,51(4):69-71.

[3] GOHAR M, REHMAN I U, ULLAH A, et al. Phylogenetic analysis and emerging drug resistance against different nucleoside analogues in hepatitis B virus positive patients [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(11): 2622.

[4] 王海强,周千瑶,李冰琪,等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2024,44(1):96-100.

[5] 董蕊,逯影,王盼. 嫡权法结合 Box-Behnken 响应面法优化北柴胡醋炙工艺及其对小鼠肝损伤保护作用研究[J]. 食品工业科技,2021,42(23):209-217.

[6] ZHAO Y, WANG J Q, LIU L J, et al. Vinegar-baked radix bupleuri enhances the liver-targeting effect of rhein on liver injury rats by regulating transporters [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(11): 1588-1597.

[7] 刘丽娟,赵亚,吴亚运,等. 醋柴胡多糖对拉米夫定体外抗乙型肝炎病毒的增效作用研究[J]. 世界中医药,2023,18(8):1079-1084.

[8] ZHAO Y, WAN P, WANG J Q, et al. Polysaccharides from vinegar baked radix bupleuri as efficient solubilizer for water-insoluble drugs of Chinese Medicine [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 229(2020): 115473.

[9] 李翠丽,王炜,张英,等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J]. 中国药房,2016,27(19):2700-2703.

[10] 刘雅欣,贾鹏,王虹,等. 乙醇分级沉淀黄芪多糖免疫活性的评价[J]. 中成药,2020,42(10):2729-2732.

[11] 赵小亮,郭正磊,杨超福,等. 半夏多糖的制备和表征及抗氧化

和免疫增强活性研究[J]. 中成药,2024,46(3):1013-1018.

[12] 何静静,杨晓宽. 板栗果酒多糖的提取纯化及其抗疲劳活性[J]. 食品工业科技,2024,45(24):222-232.

[13] 孙婷婷,刘洋,李卓柯,等. 基于分步醇沉法研究酒制黄精多糖理化性质及免疫活性[J]. 中华中医药学刊,2023,41(11):58-62,268-269.

[14] MOTALEB M A, ABO-KUL M, IBRAHIM S M, et al. Synthesis of (125) I-lamivudine and (125) I-lamivudine-ursodeoxycholic acid codrug [J]. *J Labelled Comp Radiopharm*, 2016, 59(11): 451-453.

[15] WU Y Y, LIU L J, ZHAO Y, et al. Polysaccharides of vinegar-baked radix bupleuri promote the hepatic targeting effect of oxymatrine by regulating the protein expression of HNF4 α , Mrp2, and OCT1 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113471.

[16] CHEN N, HU M, JIANG T, et al. Insights into the molecular mechanisms, structure-activity relationships and application prospects of polysaccharides by regulating Nr2-mediated antioxidant response [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 333: 122003.

[17] LIANG X, LIU M, WEI Y, et al. Structural characteristics and structure-activity relationship of four polysaccharides from Lycii fructus [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 5): 127256.

[18] ZHU B W, NI F, XIONG Q, et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: source, preparation, structure, physiological activity and applications [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(1): 60-74.

[19] LI X, PENG B, CHEUNG P C K, et al. Depolymerized nondigestible sulfated algal polysaccharides produced by hydrothermal treatment with enhanced bacterial fermentation characteristics [J]. *Food Hydrocoll*, 2022, 130: 107687.

[20] PHIL L, NAVEED M, MOHAMMAD IS, et al. Chito oligosaccharide: an evaluation of physicochemical and biological properties with the proposition for determination of thermal degradation products [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 438-451.

[21] 周雪艳,常贺,苟海芹,等. 分子量影响多糖生物活性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 124-132.

[22] 唐勇,李坚,张阳德. 具有肝靶向功能的半乳糖化紫杉醇长循环纳米脂质体抑瘤作用研究[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(9):6-11.

[23] 颜红,欧阳婷,杨琼梁,等. 西瑞香素半乳糖化脂质体在大鼠体内组织分布的研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(18):3457-3462.

[24] YU L X, YING M H, HONG S, et al. Dual-targeting galactose-functionalized hyaluronic acid modified lipid nanoparticles delivering silybin for alleviating alcoholic liver injury [J]. *Int J Pharm*, 2024(12): 124662.

[25] ZHAO Y, LI P, WANG X S, et al. A novel pectin polysaccharide from vinegar-baked *Radix Bupleuri* absorbed by microfold cells in the form of nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 266(Pt 1): 131096.

经典名方白术散化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测分析

(正文见5-14页)

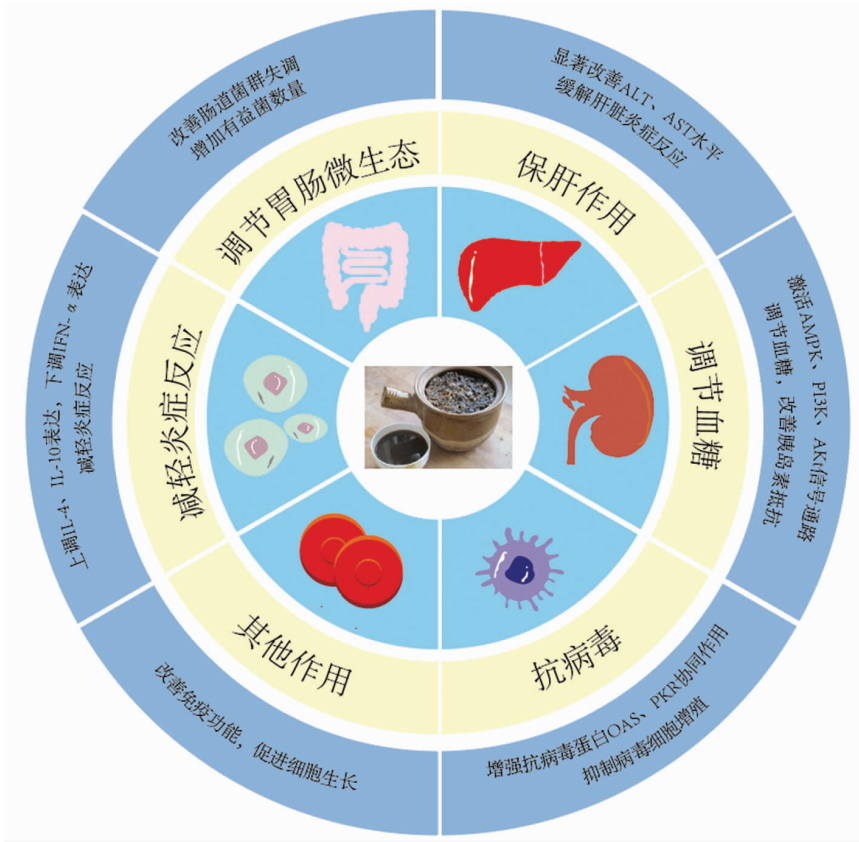


图1 白术散的药理作用及其作用机制示意

醋柴胡多糖分级醇沉及其对拉米夫定药代动力学及组织分布的影响

(正文见26-32页)



图1 3个醇沉多糖部位分子量的HPGPC图

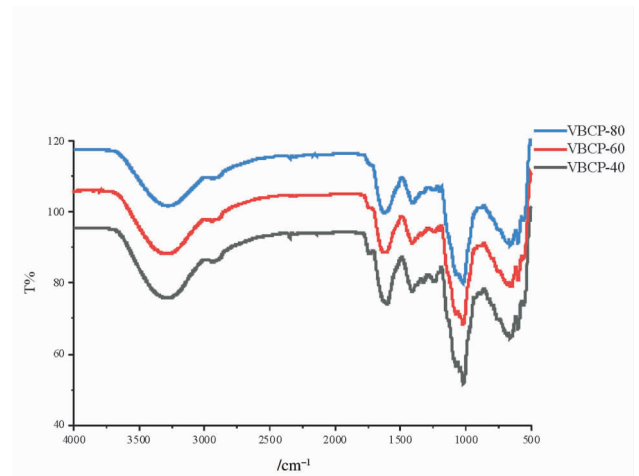


图3 3个醇沉多糖部位红外光谱分析