

骨元肽分子量分布及大鼠在体结肠吸收的实验研究

李延平 邓亦峰 吴科锋 刘义 崔燎

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)02-0095-03

摘要:目的 研究骨元肽分子量分布及大鼠在体结肠吸收率。方法 采用高压凝胶色谱法测定骨元肽均重分子量(M_w)。大鼠在体结肠吸收实验分为 3 组,分别用 14.0、28.0 和 84.0 mg/L 骨元肽结肠灌注 4 h,紫外可见分光光度计测定骨元肽含量,观察骨元肽的大鼠结肠吸收率。结果 骨元肽 M_w 为 189 ~ 1000 D,其中 189 ~ 512 D 组分占 68.5% 以上,结肠吸收率为 45.69%、50.64% 和 52.50% ($P < 0.05$)。结论 低分子量骨元肽对大鼠结肠吸收有剂量依赖作用。

关键词: 高压凝胶色谱法; 分子量分布; 结肠吸收; 在体灌注

A study on the distribution and absorption of Guyaung peptide's molecular weight (M_w) in the colon of rats LI Yanping, DENG Yifeng, WU Kefeng, LIU Yi, CUI Liao. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China

Abstract: **Objective** To investigate the distribution and absorption of Guyaung Peptide's M_w in the colon of rats. **Methods** This research employs high performance gel permeation Chromatography (HPGPC) to survey and evaluate the molecular weight's (M_w) distribution of Guyaung Peptide, and survey methods to measure the absorption in the rats' colon. Actually, the rats of this research are divided into three groups. The liquid concentration of perfusion is 14.0 mg·L⁻¹, 28.0 mg·L⁻¹ or 84.0 g·L⁻¹ which perfuse respectively for 4 h. UV-Vis spectrophotometry is employed to measure the concentration of Guyaung Peptide and to observe the effects of the colon absorption by Guyaung. **Results** The M_w of Guyaung Peptide is between 189 ~ 1000 D, in which the component of 189 ~ 512 takes 68.5% or above. The absorption rate is 45.69%, 50.64% or 52.50% ($P < 0.05$) respectively in the colon of rats. **Conclusion** The low M_w of Guyaung Peptide has a dose-dependent on the absorption in the rats' colon.

Key words: HPGPC; M_w distribution; Colon absorption; In situ perfusion

骨元肽是采用本实验室中国发明专利技术(专利申请号 200610033055.8)以马鹿骨为原料,制备低分子量多肽,其相对分子量分布为 189 ~ 512。具有水溶性强、生物活性高的特点,用于防治骨质疏松症。如果选择普通口服剂型,易被胃肠道消化液、酶水解而失去活性。制成注射剂,频繁给药,给患者带来许多不便。结肠中蛋白消化酶较少且药物在结肠中运转时间较长,是蛋白质、多肽给药的最佳吸收部位^[1],也是蛋白质、多肽给药途径的研究热点^[2]。

本研究采用高压凝胶色谱法测定骨元肽相对分子量分布并进行 SD 大鼠在体结肠灌注,以酚红作

结肠灌流液体积校正,Lowry 法蛋白质定量,测定其结肠吸收率。

1 材料和方法

1.1 仪器

LCMS-8000 a 型高效液相色谱-质谱联用仪,岛津(含有脱气机、SPD-10A_{vp} 紫外检测计,柱温箱,APCI 原接口,四级杆质谱检测器);恒流泵(型号:BT₁-100E,上海琪特分析仪器有限公司);UV-3101PC 紫外-可见-近红外扫描分光光度计,岛津(日本);Milli-QA10(超纯水器(Millipore Inc,美国));超级恒温水浴锅(上海实验仪器厂)。

1.2 药品与试剂

多肽分子量对照品:细胞色素 C (Cytochrome, MW 12500.0)、抑肽酶 (aprotinin, MW 6500.0)、杆菌

基金项目:广东省科技计划项目(071120400080)

作者单位:524023 广东天然药物研究与开发重点实验室

通讯作者:李延平,Email: liyp0406@yahoo.com.cn

肽(bactitracin, MW 1450.0)、乙氨酸-乙氨酸-氨酸-精氨酸 (MW 451.5)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189.2), 以上对照品均为 Sigma 产品, 纯度: $\geq 98\%$; Lowry 法蛋白质定量试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司) 酚红(上海试剂三厂); 骨元肽固体粉末(自制, 纯度 $> 90\%$); Krebs-Ringer 缓冲液(pH 7.4): 每 1000 mL 内含 NaCl 7.8g、KCl 0.35g、CaCl₂ 0.37 g、MgCl 0.02 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、NaHCO₃ 1.37 g、葡萄糖 1.4 g, pH = 7.2) 0.2 mol/L NaOH 生理盐水。

1.3 分子量分布

1.3.1 色谱条件: 色谱柱为 TSKgel G 2000S WXL (300 mm $\times$ 7.8 mm), 流动相: 乙腈: 水: 三氟乙酸 = 30:70:0.1 (体积比), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: UV 214 nm, 柱温: 35°C, 进样体积: 10 μ L。

1.3.2 标准曲线: 取已知 M_w 为 12500.0、6500.0、1450.0、451.0、189.0 的 5 种多肽对照品, 用 0.05% 叠氮化钠溶液制成 0.5 mg/mL 的溶液, 进样体积: 10 μ L, 记录色谱图, 绘制标准曲线。回归线性方程: $\text{Log } M_w = -0.6277X + 807912, \gamma = -0.99972$ 。

1.3.3 测定样品分子量分布: 测定液的制备: 精密称取骨元肽粉末 2.0g, 置于离心管中, 加超纯水 10 mL, 超声处理 20 min, 离心, 3000 r/min, 10 min, 分离上清液, 残渣加超纯水 5 mL, 超声、离心同上, 合并两次上清液, 采用 0.22 μ m 滤膜过滤至 50 mL 的容量瓶中, 加超纯水至刻度, 摇匀。根据 Lowry 法蛋白质定量结果, 稀释成 1 mg/mL, 取 10 μ L 上机进样。

1.3.4 分子量分布计算方法: 根据 LCMS-8000 a 数据处理系统, 将样品的色谱数据代入校正曲线方程中计算, 即得多肽分子量及其分布范围。用峰面积归一法计算得出不同分子量范围的相对百分比。

1.4 在体大鼠结肠灌流

1.4.1 动物分组: SD 大鼠 18 只, 雌雄各半, 体重 (220 $\pm$ 20) g, 随机分为 3 组(低剂量组 14.0 mg·L、中剂量组 28.0 mg·L、高剂量组 84.0 mg·L) 结肠灌流。全部动物由广东医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: 粤监证字 2005A023。

1.4.2 结肠灌流液中酚红标准曲线: 精密吸取酚红标准储备液 (0.5 mg/mL) 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.6 mL, 用 Krebs-Ringer 缓冲液分别稀释至 10 mL, 配制成 5、10、20、30、40、50、60 和 80 mg·L 的标准工作液, 分别吸取 0.5 mL, 加入 0.2 mol/L NaOH 5 mL, 用紫外-可见分光光度计, 在 550 nm 处测定吸光度值, 以吸光度 (A) - 浓度 (C) 作图, 酚红在结肠灌流液中的标准曲线方程为: $A = 0.0106C + 0.0153 (r =$

$0.9989, n = 6)$ 。

1.4.3 结肠灌流液中骨元肽标准曲线: Lowry 法标准工作曲线: 用 Krebs-Ringer 缓冲液配制蛋白液 0.5 mg/mL, 0、25、50、100、150 和 200 μ L, 分别置于 Eppendorf 管内, Krebs-Ringer 缓冲液至 200 μ L, 分别加入 CTC 工作液 200 μ L, 充分混匀, 室温放置 10 min, 分别加入 1 mol/L Folin-Ciocalteu 试剂 100 μ L, 立即混匀。室温放置 30 min。用容量 0.5 mL, 光径 1 cm 的比色杯比色, 波长 750 nm, 以吸光度 (A) - 浓度 (C) 作图, 骨元肽在结肠灌流液标准曲线方程为: $A = 0.0347C + 0.3151 (r = 0.9989, n = 6)$ 。

1.4.4 大鼠在体结肠灌流吸收实验: 骨元肽结肠灌流液的配制: 取骨元肽粉末各 14.0、28.0 和 84.0 mg, 分别置于 1000 mL 量瓶中, 用适量 Krebs-Ringer 缓冲液溶解, 吸取酚红标准储备液 (0.5 mg·mL) 40.0 mL, 混匀, 再用 Krebs-Ringer 缓冲液稀释至 1000 mL。质量浓度为 14.0、28.0 和 84.0 mg/L。

大鼠在体结肠灌流: 取禁食 18 h (自由饮水) SD 大鼠 18 只, 随机分为 3 组。按 40 mg/kg ip 戊巴比妥钠麻醉, 固定在操作台上, 沿腹中线打开腹腔, 在盲肠后端 1 cm 处插管作为灌流液进口, 8 ~ 10 cm 处插管作为灌流液出口, 用生理盐水冲洗结肠内容物 10 min, 流速 5.0 mL/min。再用 (37 $\pm$ 0.5) °C 骨元肽溶液 50 mL 进行灌流, 流速 2.5 mL·min, 每 30 min 取样 1 次, 共取样 8 次 (4 h), 每次 1.0 mL, 补加酚红溶液 2.0 mL, 分别按酚红和骨元肽标准曲线方法测定其含量。

1.4.5 统计学处理: 以酚红校正结肠灌流液体积, 计算骨元肽在结肠中吸收量, 取对数 ($\ln X$) - 取样时间 (t) 作图, 求出吸收率 (%), 数据比较采用 SPSS 13.0 方差分析。

2 结果

2.1 分子量分布

2.1.1 标准及样品色谱图: 5 种多肽对照品分子量分布标准色谱图见图 1 的 5 个吸收峰; 骨元肽为单峰, 见图 2。

2.1.2 骨元肽分子量分布: 分子量校正曲线见表 1。

表 1 分子量标准曲线

Mw	12500	6500	1450	451.5	189.2
Log Mw	4.0969	3.813	3.610	2.655	2.277
t_R (min)	6.336	7.912	8.975	9.726	10.376

根据分子量校正曲线方程 ($\text{Log } M_w = -0.62811X_{t_R} + 8.7848, \gamma = -0.99972$) 计算样品分子

量分布范围,用峰面积归一法计算相对分子量范围的百分比,189~512D 占 68.5%。

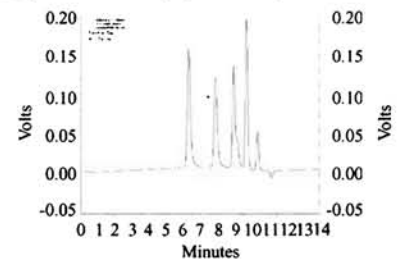


图 1 分子量分布标准色谱图

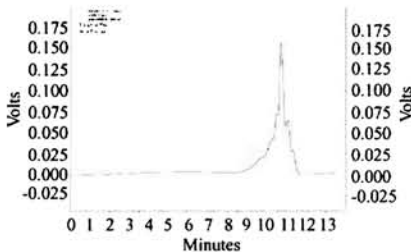


图 2 骨元肽测定色谱图

2.2 大鼠在体结肠灌流吸收

相对分子量 189~512 的骨元肽,是水溶性低分子量多肽,结肠容易吸收,结肠灌流 4 h 时,低、中、高剂量组吸收率均值分别为 45.69%、50.64% 和 52.50%。经方差分析低剂量组与高剂量组比较 ($P < 0.05$) 差异有显著性,说明大鼠在体结肠灌流吸收率随剂量增大而吸收率增高,结果见表 2。

表 2 骨元肽大鼠在体结肠灌流吸收率($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

mg/L	Absorption rate % · h ⁻¹			
	1.0	2.0	3.0	4.0
14.0	15.17 ± 1.90	23.86 ± 2.53	34.29 ± 3.33	45.69 ± 1.17
28.0	18.20 ± 3.60	27.47 ± 2.95	36.33 ± 2.20	50.64 ± 1.77
84.0	19.58 ± 4.94*	34.89 ± 3.49*	43.33 ± 1.78*	52.50 ± 1.78*

注:与 14 mg/L 组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

结肠在吸收骨元肽过程中,不仅吸收药物,也吸收水分,导致灌流液体积减少,直接计算骨元肽的剩余量误差较大,故本实验定量加入酚红用于测定结肠对水分的吸收量,校正体积^[3],计算骨元肽在灌流液中的剩余量。

本实验结果表明水溶性骨元肽相对分子量分布范围 189~500,在结肠灌流液中稳定,大鼠在体结肠灌流吸收率随剂量增大而吸收率增高,在结肠灌流 2~3 h 之间,高剂量组吸收率明显升高。由于结肠水分少,内容物黏稠,压力大,故吸水性强^[4],而骨元肽又是水溶性小分子多肽,易被结肠丰富的淋巴组织吸收^[5],另外结肠内大量的消化酶均失活,不能水解小分子多肽^[6],可提高生物利用度。本实验为研制抗骨质疏松的小分子多肽结肠靶向制剂奠定了理论基础。其作用机理,有待于深入研究。

【参考文献】

[1] Sinha V, Singh A, Kumar RV, et al. Oral colon-specific drug delivery of protein and peptide drugs. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2007,24(1):63-92.

[2] Chourasia MK, Jain SK. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. J Pharm Pharm Sci,2003,6(1):33-66.

[3] Lu B. Pharmaceutical Experiment(药剂学实验). Beijing: People's Medical Publishing House,1994.

[4] Sun Xiwei, Zhou Lingfang, Sun Jie. Colonic drug targeting and an updated review. Chin JMAP,2002,19(3):196-198.

[5] Shareef MA, Khar RK, Ahuja A, et al. Colonic drug delivery: an updated review. AAPS Pharm Sci,2003,5(2):E17.

[6] Haupt S, Rubinstein A. The colon as a possible target for orally administered peptide and protein drugs. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,2002,19(6):499-551.

(收稿日期: 2007-09-03)