

染料木黄酮在 Beagle 犬体内的药代动力学

周四元¹, 梅其炳^{1*}, 杨兴斌¹, 李欣¹, 胡玉珍², 王剑波³

(第四军医大学 1. 药理学教研室, 2. 生理学教研室, 3. 药物研究所, 陕西 西安 710032)

摘要: 目的 研究染料木黄酮(genistein)在 Beagle 犬体内的药代动力学。方法 染料木黄酮 ig 后用反相高效液相色谱法测定犬血浆、尿及粪便中原型药物浓度, 血浆药物浓度-时间数据用 3P97 药代动力学软件分析。结果 Genistein 在 Beagle 犬体内的代谢符合一室模型, ig 后 0.29 h 达药峰浓度, $T_{1/2\text{ke}}$ 为 0.52 h。给药后 24 h 内有 10.79% 的原型药物由尿排出, 21.55% 的原型药物由粪便排出。60 h 内有 13.00% 的原型药物由尿排出, 有 52.46% 的原型药物由粪便排出。结论 Beagle 犬 ig 染料木黄酮后吸收迅速, 血浆中药物的消除速度快, 药物主要以原型经尿和粪便排出体外。

关键词: 染料木黄酮; 药代动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.1; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2003)09 - 0646 - 04

Pharmacokinetics of genistein in Beagle dogs

ZHOU Si-yuan¹, MEI Qi-bing^{1*}, YANG Xing-bin¹, LI Xin¹, HU Yu-zhen², WANG Jiar-bo³

(1. Department of Pharmacology, 2. Department of Physiology, 3. Institute of Materia Medica, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Aim** To study the pharmacokinetics of genistein in Beagle dogs. **Methods** Genistein, suspended in 0.5% CMC-Na solution, was orally administered to Beagle dogs at the dose of 5.34 mg·kg⁻¹. At various time intervals, 1.5 mL of blood was drawn from the vein of dogs in their front legs. At the same time, urine and feces were collected. After the collection, the feces were homogenized with physiological saline (to 1 g feces, 10 mL physiological saline were added). The genistein in plasma, urine and homogenized feces was extracted twice by vortexing with 2.0 mL mixture of methyl *tert*-butyl ether and pentane (8:2). The organic phase was transferred into tubes and evaporated in ventilation cabinet. The residue was dissolved in 50 μL of methanol and 20 μL of the solution was drawn and detected by high-performance liquid chromatography. The pharmacokinetic parameter was calculated by 3P97 software. **Results** The plasma concentration-time curve was fitted to a one-open compartment model. The peak time was 0.29 h, and the elimination half-life was 0.52 h. After genistein was administered, 10.79% of genistein were excreted from urine and 21.55% from feces within 24 h. It was also found that 13.00% genistein were excreted from urine and 52.46% from feces within 60 h. **Conclusion** It showed that the speed of absorption and elimination of genistein was high in Beagle dog, and genistein was mainly excreted in the form of parent compound in urine and feces.

Key words: genistein; pharmacokinetics; high-performance liquid chromatography; half life

大豆异黄酮富含于黄豆及其制品中, 主要有黄豆苷原(7,4'-二羟基异黄酮, daidzein)、染料木黄酮(5,7,4'-三羟基异黄酮, genistein)、生原禅宁 A (biochanin A) 和芒柄花素(7-羟基-4'-甲氧异黄酮)。染料木黄酮是大豆异黄酮的主要活性成分之一, 由

于其结构类似雌二醇, 通过与雌二醇竞争雌激素受体而具有某些雌激素样作用, 因此又称为植物雌激素(phytoestrogens)。染料木黄酮结合雌激素受体的能力是雌二醇的 1/175, 活性仅为雌二醇的 1/1000, 低剂量时, 染料木黄酮竞争性占据雌二醇受体, 发挥拮抗雌激素作用, 对激素相关疾病有保护作用^[1]。染料木黄酮对预防心血管疾病^[2]、骨质疏松^[3,4]、乳腺癌、前列腺癌^[1]及调节生殖功能^[5]等有明显作用。

收稿日期: 2002-09-17.

* 通讯作者 Tel: 86 - 29 - 3374552, Fax: 86 - 29 - 3374552,

E-mail: pharml@fmmu.edu.cn

黄豆及其制品是我国大多数人群喜爱的主要食物之一,染料木黄酮对健康的影响引起人们的广泛关注,成为营养学家及药理学家研究的热点^[6,7]。大鼠灌胃给予染料木黄酮,其葡糖醛酸化代谢产物的体内过程已有报道^[8],但缺少对原型药物体内变化过程的研究。本文旨在观察 Beagle 犬灌胃给予染料木黄酮后,原型药物在其体内的吸收、消除及排泄动力学,可望为其营养学、药理学及开发研究提供指导。

材料和方法

实验药物及动物 Genistein(Sigma 公司),4℃干燥保存。Beagle 犬(8±2)kg,由国家医药管理局新药研究管理中心成都实验动物基地提供,实验前禁食 12 h。

主要实验仪器及试剂 高效液相色谱仪(美国 Beckman 公司),LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂)。甲醇与乙腈(色谱纯,TEDIA 公司),甲基叔丁醚(色谱纯,Fluka 公司),正戊烷及柠檬酸三钠为分析纯,地塞米松(Sigma 公司)。

色谱条件 用反相高效液相色谱法测定 Beagle 犬血浆、尿及粪便中 genistein 含量。色谱分析柱为 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,Phenomenex),预柱亦为 C₁₈柱(50 mm×4.6 mm,5 μm,Tianhe Chromatography),流动相组成为 40%乙腈及 60%柠檬酸三钠溶液(pH 4.1,50 mmol·L⁻¹),流速 1 mL·min⁻¹。检测波长为 260 nm。

工作曲线的制备 犬前腿部静脉采集血液标本,肝素抗凝,离心得血浆;收集尿及粪便标本,将粪便用生理盐水制成匀浆液(1 g 粪便加生理盐水 10 mL)。①取 6 支试管分别加入犬血浆 0.5 mL,然后分别加入 0,0.05,0.1,0.2,0.4,1 和 4 mg·L⁻¹ genistein 标准液 0.1 mL(含地塞米松 4 mg·L⁻¹,内标),混匀,用甲基叔丁醚-正戊烷(8:2) 2 mL 提取 2 次,合并提取液于尖底试管中,通风橱中挥干。残留物用甲醇 50 μL 溶解,取溶解物 20 μL 用于高效液相色谱分析。②取 7 支试管各加入犬尿液 0.1 mL,然后分别加入 0,0.4,1,4,10,20 和 40 mg·L⁻¹ genistein 标准液 0.1 mL(含地塞米松 4 mg·L⁻¹,内标),最后每支试管中均加入生理盐水 0.3 mL,混匀,其余步骤同①。③取 7 支试管各加入犬粪便匀浆液 0.1 mL,然后分别加入 0,0.4,1,4,10,20 和 40 mg·L⁻¹ genistein 标准液 0.1 mL(含地塞米松 4 mg·L⁻¹,内标),最后每支试管中均加入生理盐水 0.3 mL,混匀,其余步骤同①。

药代动力学实验 用 0.5%CMC-Na 将 genistein 制成混悬剂,按 5.34 mg·kg⁻¹(按大鼠药效学实验的有效中剂量 9 mg·kg⁻¹折算所得)给犬 ig 后分别于 0,5,10,15,30,45,60,75,90,120,180 和 240 min,犬前腿部静脉采集血液标本,肝素抗凝,离心得血浆;于 ig 后 0~2,2~6,6~12,12~24,24~36,36~48 和 48~60 h,收集犬尿及粪便标本,并分别记录总量。①取血浆 0.5 mL,加入 4 mg·L⁻¹地塞米松溶液 0.1 mL,按工作曲线制备方法提取检测。②取尿液 0.1 mL,加入 4 mg·L⁻¹地塞米松溶液 0.1 mL 及生理盐水 0.3 mL,按工作曲线制备方法提取检测。③将粪便用生理盐水制成匀浆液(1 g 粪便加生理盐水 10 mL),取粪便匀浆液 0.1 mL,加入 4 mg·L⁻¹地塞米松溶液 0.1 mL 及生理盐水 0.3 mL,按工作曲线制备方法提取检测。

数据统计分析 用 3P97 药代动力学软件(中国科学院北京数学研究所研制)进行统计分析。

结果

1 分析方法的特异性

生物样品中 genistein 含量低,干扰物质多,无法直接测定。文献多用乙醚或乙酸乙酯提取。实验发现乙醚提取虽挥干速度快,杂质少,但提取率低;用乙酸乙酯提取,挥干速度慢且杂质多。本实验用甲基叔丁醚-正戊烷(8:2)提取生物样品中 genistein,有挥干快,杂质少,提取率高且稳定的特点。由样品色谱图(图 1~4)可见,本研究用的分析方法特异性较好。

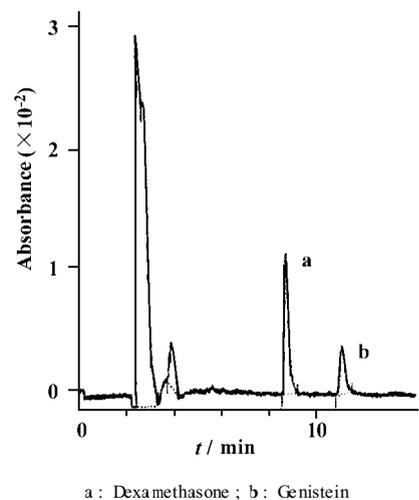
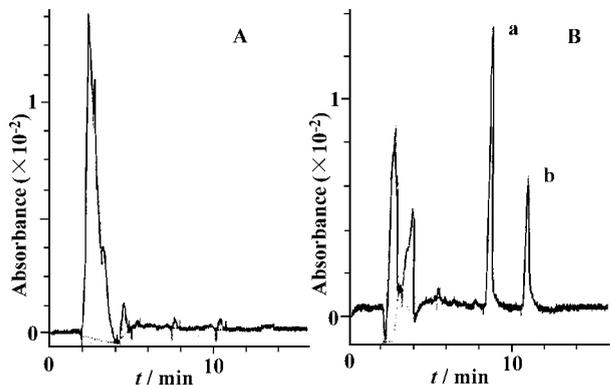
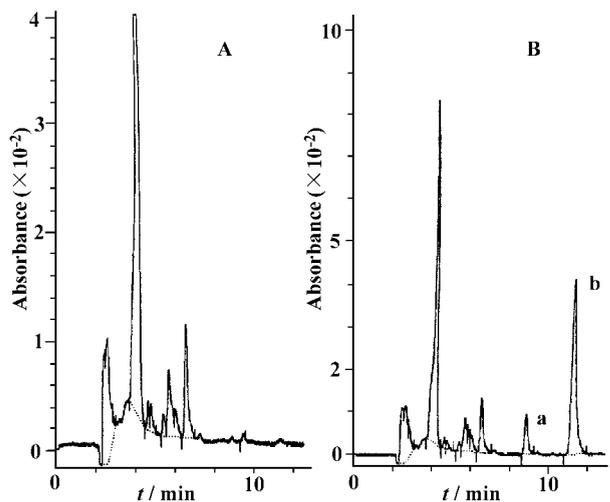


Figure 1 HPLC chromatogram of standard solution of dexamethasone and genistein



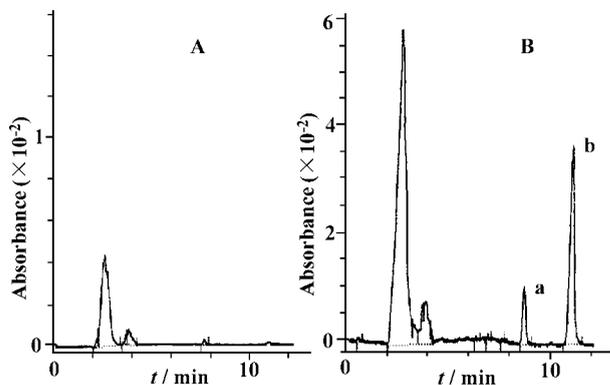
a: Dexamethasone; b: Genistein

Figure 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A) and drug-containing plasma (B) in Beagle dog



a: Dexamethasone; b: Genistein

Figure 3 HPLC chromatograms of blank urine (A) and drug-containing urine (B) in Beagle dog



a: Dexamethasone; b: Genistein

Figure 4 HPLC chromatograms of blank feces (A) and drug-containing feces (B) in Beagle dog

2 测定工作曲线回归方程

以 genistein 与内标的峰面积比(Y)为纵坐标, genistein 的浓度(X)为横坐标作图, 得工作曲线。测定血浆样品的工作曲线回归方程为 $Y =$

$- 0.004 514 2 + 7.921 73 X, r = 0.999 9, n = 5$, 线性范围为 $0.01 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 方法的回收率、日内、日间标准差分别为 $(95 \pm 5) \%$, 4.94% , 5.67% (genistein 的加入浓度为 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。测定尿样的工作曲线回归方程为 $Y = - 0.017 43 + 2.830 838 X, r = 0.999 9, n = 5$, 线性范围为 $0.4 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 方法的回收率、日内、日间标准差分别为 $(94 \pm 6) \%$, 3.19% , 6.85% (genistein 的加入浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。测定粪样的工作曲线回归方程为 $Y = - 0.192 754 + 2.801 298 X, r = 0.999 9, n = 5$, 线性范围为 $0.4 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 方法的回收率、日内、日间标准差分别为 $(91.1 \pm 2.4) \%$, 4.64% , 0.13% (genistein 的加入浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。由结果可见, 本研究建立的分析方法的回收率和精密度符合药代动力学研究的要求。

3 血药浓度随时间的变化

犬 ig genistein $5.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 血药浓度随时间变化的情况如图 5 和表 1 所示, 可见 genistein 在 Beagle 犬体内的代谢过程个体差异明显。血药浓度-时间数据经 3P97 药代动力学软件分析, 其体内过程符合一室开放模型。Beagle 犬 ig genistein 后约 0.29 h 血药浓度达峰值, 消除半衰期约为 0.52 h。

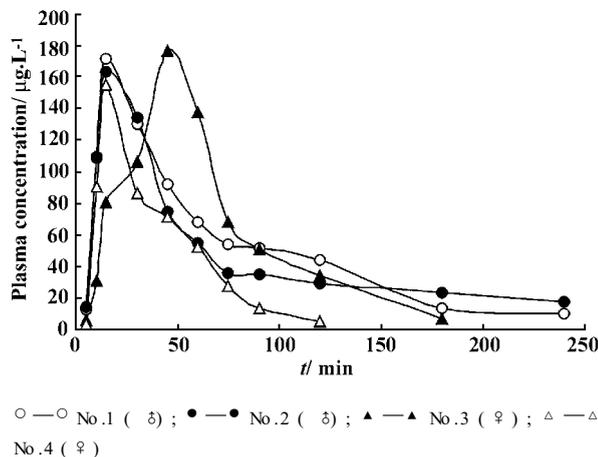


Figure 5 Plasma concentration time curve of genistein in Beagle dog after oral administration of genistein at the dose of $5.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

4 药物排泄

由图 6 可见, Beagle 犬给药后原型药物经尿排出较少, 24 h 内有 10.79% 的原型药物由尿排出, 60 h 内有 13.00% 的原型药物由尿排出。24 h 内有 21.55% 的原型药物由粪便排出, 60 h 内有 52.46% 的原型药物由粪便排出。说明 genistein 主要以原型经粪便排出体外。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of genistein after oral administration of the drug to Beagle dog at the dose of 5.34 mg·kg⁻¹

Parameter	No.1(♂)	No.2(♂)	No.3(♀)	No.4(♀)	$\bar{x} \pm s$
$K_e/L \cdot h^{-1}$	0.869 2	1.554 6	1.474 6	1.905 2	1.4 ± 0.4
$K_d/L \cdot h^{-1}$	15.789 0	10.270 4	2.306 4	9.902 5	10 ± 6
$T_{1/2 K_e}/h$	0.80	0.45	0.47	0.36	0.52 ± 0.19
T_{peak}/h	0.19	0.22	0.54	0.21	0.29 ± 0.17
$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	140.8	154.0	108.7	130.5	134 ± 19
$AUC/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	196.07	138.70	162.94	101.46	150 ± 40

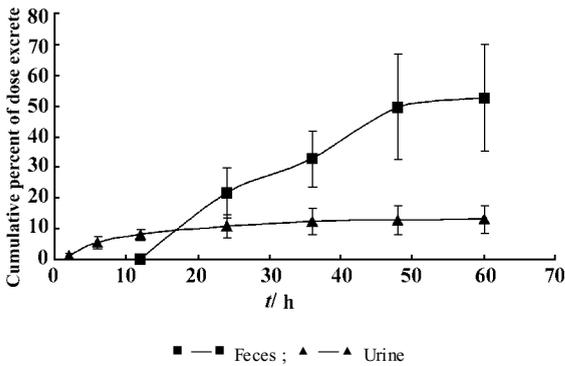


Figure 6 Cumulative excretion of the parent compound in Beagle dogs following a single oral dose (5.34 mg·kg⁻¹) of genistein. n = 4, $\bar{x} \pm s$

讨论

测定方法的特异性、准确性和灵敏度将直接影响药代动力学研究的准确度。目前 genistein 的检测方法主要有 HPLC 梯度洗脱光度法检测及 HPLC 电化学法检测,前者分离度虽好,但分析速度慢(1 个样品需用 50 min)^[9];后者虽具有快速经济的特点,但分离效果不好^[8,10]。经特异性、回收率、精密度及工作曲线考察,本文所建立的 HPLC 光度法检测分析方法具有灵敏、准确、特异的特点,从而保证了所得数据的可靠性。

Beagle 犬 ig genistein 后,吸收迅速,血浆中原型药物消除速度快,大部分药物以原型经粪便排出体

外。葡糖醛酸化是许多异黄酮的主要代谢途径^[11],用葡糖醛酸酶水解 Beagle 犬血浆、尿及粪便, genistein 含量未增加 (unpublished data),说明在 Beagle 犬血浆、尿及粪便中未检测到葡糖醛酸化的 genistein。

References :

[1] Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, et al. Phytoestrogens : where are we now [J]. *Br J Nutr*, 1998 ,**79**(5) :393 - 406 .
 [2] Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk [J]. *Lancet* , 1997 ,**349** (9053) :699 .
 [3] Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis [J]. *J Nutr* , 1996 ,**126**(1) :161 - 167 .
 [4] Arjmandi BH, Smith BJ. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action [J]. *J Nutr Biochem* , 2002 ,**13**(3) :130 - 137 .
 [5] Mitchell JH, Cawood E, Kinniburgh D, et al. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males [J]. *Clin Sci* , 2001 ,**100**(6) :613 - 618 .
 [6] Wu YN, Zhao YF, Wang XQ. The potential effect of phytoestrogen of soy bean on human health [J]. *Chin J Food Hyg* (中国食品卫生杂志) , 2000 ,**12**(1) :40 - 44 .
 [7] Misra RR, Hursting SD, Perkins SN, et al. Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones [J]. *Int J Toxicol* , 2002 ,**21**(4) :277 - 285 .
 [8] King RA, Broadbent JL, Head RJ. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats [J]. *J Nutr* , 1996 ,**126** (1) :176 - 182 .
 [9] Fanti P, Sawaya BP, Custer LJ, et al. Serum levels and metabolic clearance of the isoflavones genistein and daidzein in hemodialysis patients [J]. *J Am Soc Nephrol* , 1999 ,**10** (4) :864 - 871 .
 [10] King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans [J]. *Am J Clin Nutr* , 1998 ,**67**(5) :867 - 872 .
 [11] Sfakianos J, Coward L, Kirk M, et al. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats [J]. *J Nutr* , 1997 ,**127**(7) :1260 - 1268 .