

葛根有效成分的代谢研究

II. ^{14}C -黄豆甙元在大鼠体内的吸收、分布和消除

苏成业* 朱秀媛

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文采用纸片液体闪烁计数法研究了 ^{14}C -黄豆甙元在大鼠体内的吸收、分布和消除。大鼠口服 ^{14}C -黄豆甙元30分钟, 血液即可测出放射性, 6~8小时达高峰, 以后缓慢下降。口服给药吸收不完全, 由实验推论约有64.6%放射性可被吸收。静脉注射后, 血放射性消失曲线分为快、慢两个时相, 其生物半衰期分别为13分钟和42分钟。放射性在肾、肝含量最高, 血浆、肺、心次之, 肌肉、脾、睾丸、脑较低。静脉注射后, ^{14}C 主要自尿排出(24小时可排出剂量的71.2%), 自粪排出17.4%。口服后24小时可自尿排出34.3%, 自粪排出33.1%。胆汁也是一条重要排泄途径, 静脉注射后24小时可自胆汁排出剂量的47.4%; 口服后相应时间内排出39.1%。

本文所得结果与前文应用化学方法所得结果进行比较, 表明自消化道、尿、胆汁所回收的放射性主要是黄豆甙元的代谢产物, 说明该药在体内的代谢很旺盛。

药理实验证明, 中药葛根有降低血管阻力、改善脑及冠脉循环、降低心肌氧耗等作用^[1,2]。近年来, 葛根制剂已用于心血管、脑血管和突发性耳聋等疾病的治疗^[3~5]。黄豆甙元(Daidzein, 7, 4'-二羟基异黄酮)是葛根的有效成分之一^[6], 现已由药物研究所合成室人工合成^[7], 具有和葛根片或酒浸膏相似的疗效。我们曾报道了一种特异性较高而又比较灵敏的在生物样品中测定黄豆甙元的方法, 并用此法研究了黄豆甙元的体内代谢^[8]。结果指出, 大鼠口服黄豆甙元后24小时, 约有剂量的50%未被吸收, 口服后24小时尿中排出的黄豆甙元仅为剂量的0.73%。表明口服后黄豆甙元在胃肠道吸收较差。考虑到这一测定方法仅反映原形药, 而同位素示踪法则可反映原形药和代谢物, 因此, 我们用 ^{14}C 标记的黄豆甙元研究了大鼠体内的吸收、分布和消除, 以便与化学法所得结果相比较。

材料及方法

(一) 主要药品和试剂

黄豆甙元 由本所合成室供给。

^{14}C -黄豆甙元 由中国医学科学院放射医学研究所合成。

^{14}C 标记在黄豆甙元的第四位碳原子上(结构见图1), 比活性为 $3.83 \mu\text{C}/\text{mg}$ 。用聚酰胺薄层层析证明, 放射纯度 $>98\%$ 。

应用时以2%可溶性淀粉配成0.5% ^{14}C -黄豆甙元混悬液, 供灌胃用; 用含20%丙二醇的磷酸缓冲液(pH 8.0~8.5)配成0.2%的溶液(临用时新鲜配制)供静脉注射用。

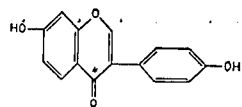


图1 ^{14}C -黄豆甙元结构式
*代表 ^{14}C 所在位置

甲酸 85%，化学纯，北京化工厂。

过氧化氢 29%，化学纯，北京化工厂。

甲苯 分析纯。北京化工厂。

2,5-二苯基噁唑(PPO) 中国医学科学院放射医学研究所赠。

1,4-双[5-苯基噁唑基-2]-苯(POPOP) 上海试剂总厂。

(二) 动物和给药方法

采用体重 160~250 g 的雄性大鼠。口服给药，实验前禁食 12 小时，自由饮水。

大鼠静脉注射¹⁴C-黄豆甙元为 20 mg/kg (76.6 μc/kg)，灌胃为 50 mg/kg (191.5 μc/kg)。在部分实验中，为了调整药物剂量，以便与前文^[8]所得结果相比较，我们将¹⁴C-黄豆甙元 20 mg/kg (76.6 μc/kg) 加入非标记的黄豆甙元 30 mg/kg 给大鼠灌胃。

(三) 生物样品的制备

1. 组织、尿和胆汁 将大鼠断头处死，取出内脏，经生理盐水冲洗后用滤纸吸干。开颅取脑，于冰冻条件下分离小脑、脑干和大脑^[9]。各组织均取 100 mg。用肝素抗凝的全血和血浆各取 0.1 ml。尿样取 0.2 ml。胆汁取 0.1 ml。各样品分别置于经标定的 5 ml 刻度试管中，用 85% 甲酸 0.4 ml 和 29% 过氧化氢 0.4 ml 进行消化和脱色，加 1 滴辛醇以防泡沫，置 80±5 °C 水浴上加热 20 分钟(部分组织稍加震荡)。待消化液冷至室温，取 0.1 ml 测定其放射性。

2. 粪 先置红外灯下烤干、称重，用乳钵研磨成粉。取 30 mg，用 85% 甲酸 1 ml 和 29% 过氧化氢 1 ml 进行消化和脱色，加 2 滴辛醇以防泡沫，置 75~80 °C 水浴加热 20 分钟，取 0.1 ml 消化液测定放射性。

3. 胃肠内容物 拉断大鼠颈椎，迅速取出全部胃肠道，用 95% 乙醇多次冲洗胃肠道内容物，经静止沉淀后，倾出上清液。用 95% 乙醇洗沉淀数次，将洗液与上清液合并，使总体积达 250 ml。取 0.25 ml 进行消化和脱色，并测其放射性。具体步骤同尿样。

(四) 放射性测定

按纸片液体闪烁计数法测定。将圆形层析纸(直径 1.9 cm)置平滑的蜡面上，将 0.1 ml 消化液均匀地滴在层析纸上。待自然干后，将纸片平置于 10 ml 小瓶的底部，加入 0.4 ml 闪烁液 (0.5% PPO 与 0.05% POPOP 甲苯溶液)，用 EKGO 液体闪烁仪计数。以内标准法对各样品的淬灭进行校正。

实 验 及 结 果

(一) 放射性自胃肠道的消失

大鼠 12 只，均分为 6 组。按 20 mg/kg ¹⁴C-黄豆甙元灌胃 (同时灌入未标记的黄豆甙元 30 mg/kg)。于给药后不同时间取出全部胃肠内容物，测定其放射性，结果表明，灌入¹⁴C-黄豆甙元后 2、4、12、24 小时，分别自胃肠道回收的放射性为剂量的 80.3%、78.1%、73.6% 及 41.4%。

(二) 血液放射性

大鼠 (3 只) 静脉注射¹⁴C-黄豆甙元后不同时间，由尾部末端放血，测定其放射性。结果表明，初期血液放射性迅速下降，30 分钟后下降变慢。以血放射性浓度的对数为纵坐标，给药后时间为横坐标作图(见图 2)，可见血放射性的消失曲线为两条直线所组成，其血液生物半衰期分别为 13 分钟(快相，α相)和 42 分钟(慢相，β相)。

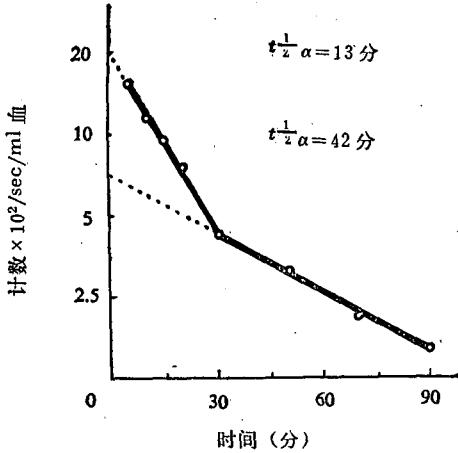


图2 大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元 20 mg/kg (76.6 $\mu\text{C}/\text{kg}$) 后不同时间血液中的放射性 (3 只动物的均值)

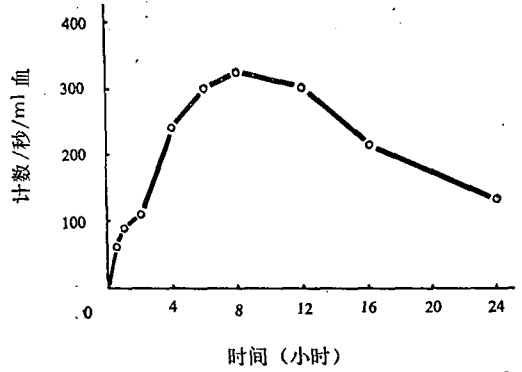


图3 大鼠灌胃 ^{14}C -黄豆甙元 50 mg/kg (191.5 $\mu\text{C}/\text{kg}$) 后不同时间血液中的放射性 (3 只动物的均值)

大鼠 (3 只) 以 ^{14}C -黄豆甙元 50 mg/kg 灌胃后, 血液放射性水平见图 3。由图 3 可见, 口服后 30 分钟血中即有放射性, 6~8 小时血放射性水平最高, 此后放射性水平缓慢下降。

(三) 组织分布

大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后 15 分钟 (3 只动物) 或 1 小时 (3 只动物) 将动物断头处死, 分别测定各组织的放射性。结果如图 4 所示。

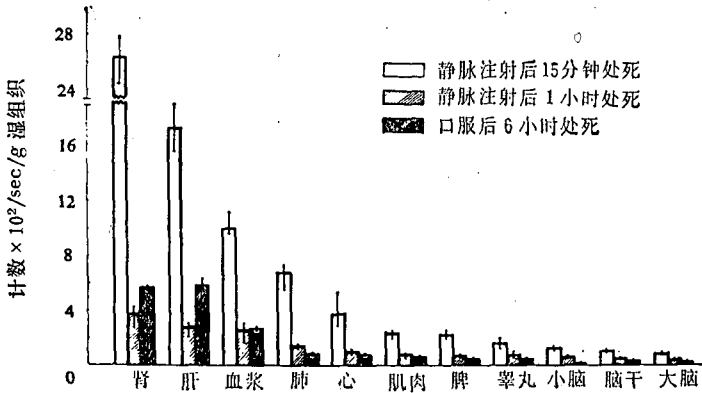


图4 大鼠静脉注射 (20 mg/kg, 76.6 $\mu\text{C}/\text{kg}$) 或灌胃 (50 mg/kg, 191.5 $\mu\text{C}/\text{kg}$) ^{14}C -黄豆甙元后放射性的组织分布 (3 只动物的均值纵线表示范围)

由图 4 可见, 大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后 15 分钟, 肾脏放射性最高, 肝、血浆、肺、心次之, 肌肉、脾、睾丸、小脑、脑干和大脑较低。小脑、脑干和大脑的放射性无明显差别。静脉注射 1 小时后放射性明显降低, 但组织分布形式与 15 分钟处死者相同。

大鼠口服 ^{14}C -黄豆甙元 50 mg/kg 后 6 小时, 肝、肾放射性最高, 其它组织中放射性的分布形式与静脉注射者基本相同 (图 4)。

(四) 消除

1. 尿和粪

大鼠口服或静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元 20 mg/kg (口服给药时同时加入未标记的黄豆甙元 30 mg/kg) 后, 放射性自大鼠尿、粪的消除见表 1。

表 1 ^{14}C -黄豆甙元自大鼠尿、粪的消除

给药途径	剂量 mg/kg ($\mu\text{C}/\text{kg}$)	给药后时间 (小时)	累积排出量 (剂量%)	
			尿	粪
口服 (2只动物)	50* (76.6)	2	3.9	—
		4	8.5	0.1
		8	14.8	0.6
		24	34.3	33.1
静脉注射 (3只动物)	20 (76.6)	1	6.8	—
		2	16.8	—
		4	20.4	—
		6	31.0	—
		8	40.9	—
		12	44.8	11.4
24	71.2	17.4		

* 其中含有非标记的黄豆甙元 30 mg

表 2 ^{14}C -黄豆甙元静脉注射(20mg/kg, 76.6 $\mu\text{C}/\text{kg}$)和口服(50mg/kg*, 76.6 $\mu\text{C}/\text{kg}$)后放射性自大鼠胆汁的排出

给药后时间 (小时)	累积排出量(剂量%)	
	静脉注射 (2只动物)	口服 (3只动物)
1	39.6	—
2	41.6	4.3
4	42.7	11.8
6	43.5	17.3
8	—	22.7
12	46.0	30.8
24	47.4	39.1

* 其中含有非标记的黄豆甙元 30 mg

由表 1 可知,大鼠口服 ^{14}C -黄豆甙元后 2 小时,尿中已有放射性排出。给药后 24 小时,自尿消除的放射性为剂量的 34.3%,自粪消除的放射性为剂量的 33.1%。

大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后,放射性主要自尿消除,给药后 24 小时自尿排出的放射性为剂量的 71.2%,粪为剂量的 17.4%。

2. 胆汁

大鼠于乙醚轻度麻醉下行胆道插管,待动物清醒后静脉注射或以 ^{14}C -黄豆甙元 20 mg/kg 灌胃(灌胃时加非标记的黄豆甙元 30 mg/kg)。放射性自胆汁排出见表 2。由表 2 可见,大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后 24 小时,自胆汁排出的放射性为剂量的 47.4%,其中主要是前 1 小时所排出,约占 24 小时胆汁中总排出量的 83.5%。灌胃后 24 小时自胆汁排出的放射性为剂量的 39.1%。

讨 论

本工作中应用了纸片液体闪烁计数法,这是一种特殊的悬液计数法。与均相法相比,此法操作简单、经济(每一样品所需闪烁液仅为 0.4 ml,为一般均相法耗用量的 4~5%),样品可保存,重复性好。根据我们的实验,纸片法效率约为均相法的 85%。国内曾对纸片法测量生物样品的特点和遇到的各种问题进行过研究和讨论^[10,11],但迄今采用纸片法研究药物代谢的报道还不多。本文采用改进的纸片法对 ^{14}C -黄豆甙元在大鼠体内的吸收、分布和消除进行了研究,获得较满意的结果。

结果指出,大鼠以 ^{14}C -黄豆甙元灌胃后半小时,血内即显放射性,说明半小时即可吸收入血。灌胃后 24 小时自粪及胃肠道内容物回收的放射性为剂量的 74.5%(图 5)。这一结果说明胃肠道吸收并不完全;但残留在胃肠道的放射性并不能完全代表未吸收的药物,因为一部分药物吸收入血后仍可从胆汁排入肠腔。24 小时从胆汁排入肠腔的放射性占剂量的 39.1%(表 2,图 5),如将这部分放射性除去,则残留于胃肠道及粪中的放射性仅为剂量的 35.4%。从理论上推测 24 小时自胃肠道吸收的放射性应达剂量的 64.6%。前文^[8]指出:大鼠以黄豆甙元灌胃后 24 小时,约有半量未被吸收,所得结果与本实验基本相吻合。

大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后,放射性很快离开血液,分布于组织或自尿、胆汁消除。

血放射性消失曲线分为快、慢两个时相, 其生物半衰期分别为 13 分钟和 42 分钟。前者主要反映静脉注射后放射性在体内的分布速度, 后者主要反映放射性消除的速度。大鼠口服 ^{14}C -黄豆甙元后, 血中放射性 6~8 小时达高峰, 此后缓慢下降。一次口服其在血中维持时间较长。

大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后, 放射性分布形式与口服者基本相同, 都以肾、肝为最高。说明这两器官是该药排泄和代谢的主要部位。 ^{14}C -黄豆甙元可通过血脑屏障进入脑内, 但大脑、脑干及小脑的放射性含量无明显差异。

大鼠静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后 24 小时, 尿、粪排出的总放射性为剂量的 88.6%, 口服后 24 小时尿、粪排出的总放射性为剂量的 67.4%。看来, ^{14}C -黄豆甙元自大鼠体内消除较完全, 不易发生蓄积。

表 3 两种测定方法所得结果的比较

给药途径	集样时间 (小时)	样 品	回收剂量%	
			示踪法	化学法 ^[7]
口 服	24	胃肠道内容和粪	74.5	49.1
	24	尿	34.3	0.73
静脉注射	24	尿	71.2	10.9
	6	胆 汁	43.5	0.87

出的放射性很大一部分是 ^{14}C -黄豆甙元的代谢物。这说明, 黄豆甙元在大鼠体内的代谢是比较旺盛的。前文已指出^[8], 胆汁中含有大量的黄豆甙元结合物。我们采用大鼠离体肝、肾、心、肺、血浆等组织做体外温孵实验证明, 这些组织不能使 ^{14}C -黄豆甙元转变为 $^{14}\text{CO}_2$ 。至于黄豆甙元在体内的代谢产物有几个, 究竟是什么, 这些代谢物有无活性, 均有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 曾贵云等: 葛根的药理研究 I. 葛根对犬血压、血管反应性、脑循环及外周循环的作用, 中华医学杂志, 54:265, 1974.
- [2] 范礼理等: 葛根的药理研究 II. 葛根黄酮对犬冠脉循环、心脏血流动力学和心肌代谢的作用, 中华医学杂志, 55:724, 1975.
- [3] 中国医学科学院阜外医院内科等: 葛根治疗高血压 102 例临床疗效分析, 内部资料, 1974.
- [4] 首钢医院等: 葛根片治疗心绞痛 75 例临床疗效, 内部资料, 1974.
- [5] 北京市耳鼻咽喉科研究所听力组: 葛根治疗突发性耳聋(附 294 例疗效对比分析), 中华医学杂志, 53:591, 1973.
- [6] 方起程等: 葛根黄酮的研究, 中华医学杂志, 54:271, 1974.
- [7] 中国医学科学院药物研究所: 黄豆甙元合成, 内部资料, 1975.
- [8] 岳天立等: 葛根有效成分的代谢研究——黄豆甙元在生物样品中的测定方法及其体内代谢, 中国科学, (2):182, 1977.
- [9] Glowinski J, et al: The disposition of ^3H -Noradrenaline, ^3H -dopamine and ^3H -dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*, 13:655, 1966.
- [10] 中国医学科学院放射所: 大量放射性生物样品的纸片铺样液体闪烁测量, 内部资料, 1971.
- [11] 西安医学院工业卫生教研组: 应用国产 FJ-353 型双道液体闪烁计数器对 S^{35} 生物样品测量方法的初步探讨, 内部资料, 1975.

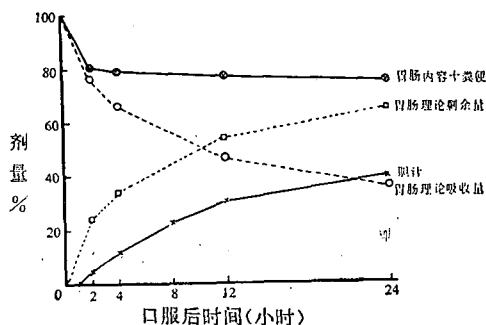


图 5 大鼠灌胃 ^{14}C -黄豆甙元 50 mg/kg (191.5 μC /kg) 后 ^{14}C 自胆汁排出, 胃肠道及粪便的回收, 实线表示实测值, 虚线表示计算值

本实验表明, 口服或静脉注射 ^{14}C -黄豆甙元后, 胃肠道内容物和粪的回收量以及从尿、胆汁的排出量, 和化学法^[8]所得结果不同(表 3)。例如, 口服或静脉注射后 24 小时从尿排出, 示踪法为 34.3% 和 71.2%, 化学法仅为 0.73% 和 10.9%。由于化学法只能测出原形药, 而同位素示踪法测得的除原形药外还包括部分代谢产物, 可见从尿、胆汁或胃肠道排

THE METABOLIC FATE OF THE EFFECTIVE COMPONENTS OF RADIX PUERARIAE

II. THE ABSORPTION, DISTRIBUTION AND ELIMINATION OF ^{14}C -DAIDZEIN.

Su Chengye and Zhu Xiuyuan

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT

The absorption, distribution and elimination of carbon-14 labelled daidzein (^{14}C -daidzein) were studied in rats using filter paper-liquid scintillation counting method.

The radioactivity began to appear in the blood 30 min after oral administration of ^{14}C -daidzein, reached its peak in 6~8 hrs, and then decreased steadily. It was estimated that about 64.6% of the radioactivity was absorbed from the gastrointestinal tract within 24 hrs.

After intravenous injection of ^{14}C -daidzein, the blood level of radioactivity was found to decrease in two phases, namely the distribution phase and the elimination phase, with the $T_{1/2}$ of 13 min and 42 min respectively. The level of radioactivity was highest in the kidney and liver, moderate in the plasma, lung and heart, and low in the skeletal muscle, spleen, testis and brain.

After intravenous injection of ^{14}C -daidzein, the majority (71.2%) of the radioactivity was excreted in the urine 24 hrs after administration, while only 17.4% was recovered from the faeces. However, after oral administration, the amount excreted in the urine and faeces was about equal, namely 34.3% and 33.1%, respectively.

About 47.4% or 39.1% of the dose could be recovered from the bile 24 hrs after intravenous or oral administration, indicating that biliary excretion was one of the main routes of elimination.

Comparison of the results presented above with those reported in the previous paper using chemical method for the determination provides evidence that the radioactivity recovered from the gastrointestinal tract, urine and bile was mainly metabolites of daidzein. It implies that daidzein is metabolized rapidly in the body.