

染料木黄酮在 Beagle 犬体内代谢动力学的剂量依赖性研究

周四元¹, 梅其炳^{1*}, 王汝涛¹, 王庆伟¹, 杨志福¹, 王四旺²

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

摘要: 目的 研究不同剂量染料木黄酮 (genistein) 在 Beagle 犬体内的药代动力学特征。方法 将染料木黄酮制成混悬液, 按 2.67, 5.34 及 10.68 mg·kg⁻¹ 给 Beagle 犬灌胃, 于灌胃后不同时间在犬前腿部静脉采抗凝血标本, 用葡萄糖醛酸酶溶液处理血浆。采用反相高效液相色谱法测定血浆中母体药物及葡萄糖醛酸结合型药物浓度, 血浆药物浓度-时间数据用 3P97 药代动力学软件分析。结果 染料木黄酮在 Beagle 犬体内过程符合二室开放模型, 当剂量为 2.67 mg·kg⁻¹ 时, 母体药物 MRT 为 52.9 min, AUC 为 6.7 mg·min·L⁻¹, 葡萄糖醛酸结合型药物 AUC 为 33.9 mg·min·L⁻¹; 当剂量为 5.34 mg·kg⁻¹ 时, 母体药物 MRT 为 224.8 min, AUC 为 26.1 mg·min·L⁻¹, 葡萄糖醛酸结合型药物 AUC 为 70.1 mg·min·L⁻¹; 当剂量为 10.68 mg·kg⁻¹ 时, 母体药物 MRT 为 267.7 min, AUC 为 33.2 mg·min·L⁻¹, 葡萄糖醛酸结合型药物 AUC 为 140.5 mg·min·L⁻¹。结论 染料木黄酮首过代谢突出, 血浆中药物主要以葡萄糖醛酸结合形式存在。在一定范围内随给药剂量增加, 母体药物的吸收量趋于饱和, 药物的血浆消除半衰期延长。

关键词: 染料木黄酮; 药物代谢动力学; 高效液相色谱; 半衰期

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)06 - 0553 - 04

Dose-dependent pharmacokinetic study of genistein in Beagle dogs

ZHOU Si-yuan¹, MEI Qi-bing^{1*}, WANG Ru-tao¹, WANG Qing-wei¹,
YANG Zhi-fu¹, WANG Si-wang²

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

Abstract: **Aim** To study the pharmacokinetics of genistein at different doses in Beagle dogs. **Methods** Suspended in 0.5% CMC-Na solution, genistein was orally administered to Beagle dogs at doses of 2.67, 5.34 and 10.68 mg·kg⁻¹. At various time intervals, 1.5 mL of blood was drawn from the femoral vein of dogs in their front legs. The plasma was treated with β-glucuronidase. The genistein in plasma was extracted twice by vortexing with 2.0 mL mixture of methyl *tert*-butyl ether and pentane (v/v=8:2). The organic phase was removed into the tubes and then evaporated in ventilation cabinet. The residue was dissolved in 50 μL of methanol. 20 μL solution was drawn and detected by high-performance liquid chromatography. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3P97 software. **Results** The plasma drug concentration-time data were fitted to the two-compartment model. When the dose was 2.67 mg·kg⁻¹, the MRT and AUC of parent compound were 52.9 min and 6.7 mg·min·L⁻¹, respectively. When the dose rose to 5.34 mg·kg⁻¹, the MRT and AUC of parent compound became 224.8 min and 26.1 mg·min·L⁻¹, respectively. However, when the dose increased to 10.68 mg·kg⁻¹, the MRT and AUC of parent compound increased to 267.7 min and 33.2 mg·min·L⁻¹, respectively. The AUC of glucuronidated genistein was 33.9, 70.1 and 140.5 mg·min·L⁻¹ at the dose of 2.67, 5.34 and 10.68 mg·kg⁻¹, respectively. **Conclusion** Due to significant first pass metabolism, the drug was mainly existed in the form of glucuronidated genistein in the plasma. With the increase of dose, the absorption of genistein became saturated and the half life prolonged.

收稿日期: 2004-10-29.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2003AA2Z347C).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 29 - 83374552, E-mail: qbmei@fmmu.edu.cn

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

染料木黄酮 (5, 7, 4'-三羟基异黄酮, genistein) 和大豆苷元 (7, 4'-二羟基异黄酮, daidzein) 是大豆异黄酮的主要活性成分。大豆异黄酮以葡糖苷的形式存在于大豆中, 其在胃肠道水解后以苷元的形式被吸收^[1]。由于大豆异黄酮的结构类似雌二醇, 通过与雌二醇竞争雌激素受体而具有某些雌激素样作用, 故称为植物雌激素 (phytoestrogen)。大量的流行病学调查、临床试验、动物实验以及体外实验均已证实对大豆的长期摄入降低了乳腺癌、骨质疏松和心血管疾病的发病率^[2-4]。染料木黄酮的药代动力学虽有研究, 但均为单次给药, 未见系统的有关其吸收及代谢的剂量依赖性和时间依赖性研究。大豆在亚洲作为食物已有上千年的历史, 人和动物与其长期接触, 因此染料木黄酮不同于普通的具有雌激素活性的化学异物, 有可能形成独特的吸收、转运及代谢方式。本研究旨在观察不同剂量染料木黄酮在 Beagle 犬体内的代谢动力学特点, 揭示其吸收及生物转化规律, 可望为其营养学、药理学及毒理学研究提供依据, 为大豆异黄酮类保健品的合理使用提供指导。

材料与方法

药品与试剂 Genistein (灰白色粉状固体, 纯度为 98.5%, 由第四军医大学药物研究所提供)。乙腈 (色谱纯, TEDIA 公司生产), 甲基叔丁醚 (色谱纯, Fluka 公司生产), 甲醇 (色谱纯, TEDIA 公司生产), 正戊烷 (分析纯, 天津市博迪化工有限公司生产), 柠檬酸三钠 (分析纯, 河南焦作市化工三厂生产)。地塞米松 (Sigma 公司)。葡糖醛酸酶 (Sigma 公司, 编号 G-0251, 使用时用 $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.6 乙酸铵溶液配制)。

动物 Beagle 犬 12 只, ♀ ♂ 兼用, 体重 (8 ± 0.5) kg, 由上海市新冈实验动物场提供, 质量合格证号: 沪合证字 119 号, 实验前禁食 12 h。

仪器 高效液相色谱仪 (美国 Beckman 公司生产), CR21 F 型高速低温离心机 (日本 HITACHI 生产), DSHZ-300 多用途恒温水浴振荡器 (江苏太仓市实验仪器厂)。

色谱条件 色谱分析柱为 C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$, $5 \mu\text{m}$, Phenomenex), 预柱 (C_{18} 柱, $50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$, $5 \mu\text{m}$, TianHe Chromatography), 流动相组成为 42% 乙腈及 58% 柠檬酸三钠溶液 (pH 4.1,

$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。检测波长为 260 nm。在此色谱条件下, 样品峰和内源性干扰峰可实现基线分离^[5]。

标准曲线的制备 ① Beagle 犬前腿部静脉采集抗凝血标本 (肝素抗凝), 离心得血浆。取 6 支试管分别加入空白犬血浆 0.5 mL, 然后分别加入 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1 和 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 染料木黄酮对照液 0.1 mL (均含地塞米松 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 内标), 用甲基叔丁醚-正戊烷 (8:2) 的混合液 2 mL 提取两次, 合并提取液于尖底试管中, 通风橱中空气流挥干。残留物用甲醇 50 μL 溶解, 取 20 μL 用于高效液相色谱分析。② 取 6 支试管分别加入空白犬血浆 0.5 mL, 加入葡糖醛酸酶溶液 ($1000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.2 mL, 置 37°C 水浴摇床中孵育 24 h, 然后分别加入 0, 0.1, 0.4, 1, 4 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 染料木黄酮对照液 0.1 mL (均含地塞米松 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 内标), 混匀, 提取及分析方法同前。

血药浓度监测 根据大鼠药效学研究剂量 ($4.5, 9$ 和 $18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 确定染料木黄酮在 Beagle 犬体内药代动力学实验的剂量为 2.67, 5.34 和 $10.68 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量。用 0.5% CMC-Na 将染料木黄酮制成混悬剂, 按设定剂量给犬灌胃, 于灌胃后 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 和 720 min, 犬前腿部静脉采集血标本 (肝素抗凝), 离心得血浆。① 取血浆 0.5 mL, 加入地塞米松溶液 ($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 内标) 0.1 mL, 摇匀, 提取及分析方法同工作曲线。② 取血浆 0.5 mL, 加入葡糖醛酸酶溶液 ($1000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.2 mL, 置 37°C 水浴摇床中孵育 24 h, 加入地塞米松溶液 ($4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 内标) 0.1 mL, 摇匀, 提取及分析方法同工作曲线, 可测得原型 + 葡糖醛酸结合型药物浓度。③ 原型 + 葡糖醛酸结合型药物量减去原型药物量可得葡糖醛酸结合型药物量。

数据统计分析 采用 3P97 药代动力学软件 (中国药理学会数学药理专业委员会研制) 及 Excel 软件进行数据统计分析。

结果

1 标准曲线回归方程

以染料木黄酮与内标的峰面积比 (Y) 为纵坐标, 染料木黄酮的浓度 (X) 为横坐标作图, 得工作曲线。测定 Beagle 犬血浆中游离染料木黄酮的回归

方程为 $Y = 0.0386 + 0.00815X$, $r = 0.9999$, $n = 5$, 线性范围为 $0.01 - 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低检出限为 $0.004 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测定 Beagle犬血浆中总染料木黄酮的回归方程为 $Y = 0.1134 + 0.00795X$, $r = 0.9999$, $n = 5$, 线性范围为 $0.02 - 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低检出限为 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 测定 Beagle犬血浆中染料木黄酮的回收率和精密度

当犬血浆中的染料木黄酮浓度为 40, 200 和 600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 按 2.2 方法测定浓度, 并计算回收率及日内、日间精密度。由表 1 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。

Table 1 Recovery, precision of the method ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Concentration / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		Recovery / %	RSD	
Theoretical	Observed		Intra-day	Inter-day
40	43.9 \pm 2.8	110 \pm 7	4.0%	4.9%
200	203 \pm 19	102 \pm 10	3.0%	2.2%
600	604 \pm 21	101 \pm 4	2.3%	4.0%

3 药物在 Beagle犬体内的代谢动力学

Beagle犬灌胃给予不同剂量染料木黄酮, 血浆中原型药物及葡糖醛酸结合型药物浓度随时间变化的情况如表 2 所示, 可见 Beagle犬灌胃给予染料木黄酮后, 药物吸收迅速, 在 10 - 20 min 可达峰值浓度, 药物的消除相对较慢。染料木黄酮在 Beagle犬体内被迅速葡糖醛酸化, 在血浆中检测到染料木黄酮的同时, 便可检测到葡糖醛酸结合型染料木黄酮,

血浆中原型药物所占比例很小, 药物主要以葡糖醛酸结合的形式存在。用血浆中葡糖醛酸结合型药物量除以血浆用酶水解后所测得的总药物量, 发现血浆中葡糖醛酸结合型药物所占比率随给药剂量增大而增加 (表 3)。母体药物及葡糖醛酸结合型药物的血药浓度-时间数据经 3P97 药代动力学软件分析, 其体内过程符合二室开放模型。用统计矩法对血药浓度-时间数据进行分析, 所得主要药代动力学参数如表 4 所示。MRT 随着灌胃剂量的增大而延长, C_{max} 随着灌胃剂量的增大而缓慢升高, 但变化不呈倍比关系。葡糖醛酸化的量与给药剂量之间的依赖关系明显, 随着灌胃剂量的增大, 血中葡糖醛酸结合型药物量 (AUC) 倍比增加。

Table 3 The ratio of glucuronidated genistein in plasma after oral administration of the drug to Beagle dog at the different doses ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Time / min	Ratio / %		
	2.67 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	5.34 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	10.68 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
5	44 \pm 20	48 \pm 16	63 \pm 7
10	46 \pm 10	45 \pm 5	71 \pm 5
20	61 \pm 12	58 \pm 14	80 \pm 4
40	76 \pm 7	69 \pm 12	81 \pm 8
60	80 \pm 12	78 \pm 9	83 \pm 4
90	79 \pm 11	81 \pm 9	84 \pm 6
120	77 \pm 15	79 \pm 8	83 \pm 6
180	78 \pm 7	72 \pm 15	85 \pm 6
240	NA	70 \pm 20	82 \pm 8
360	NA	73 \pm 12	79 \pm 7
480	NA	69 \pm 13	79 \pm 4
720	NA	60 \pm 12	78 \pm 5
820	NA	NA	66 \pm 6

Ratio: Glucuronidated genistein / (free genistein + glucuronidated genistein). NA: Not applicable

Table 2 Plasma concentration of genistein and glucuronidated genistein after oral administration of the drug to Beagle dogs at different doses ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Time / min	Concentration / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$					
	2.67 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		5.34 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		10.68 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	Genistein	Glucuronidated-genistein	Genistein	Glucuronidated-genistein	Genistein	Glucuronidated-genistein
5	65 \pm 7	60 \pm 43	54 \pm 15	59 \pm 39	77 \pm 13	134 \pm 36
10	140 \pm 20	127 \pm 49	133 \pm 35	127 \pm 78	188 \pm 30	476 \pm 141
20	111 \pm 25	179 \pm 54	143 \pm 36	221 \pm 102	176 \pm 30	768 \pm 350
40	52 \pm 16	164 \pm 46	126 \pm 33	300 \pm 94	136 \pm 99	515 \pm 156
60	30 \pm 9	134 \pm 43	75 \pm 34	264 \pm 67	81 \pm 31	401 \pm 120
90	24 \pm 9	99 \pm 30	53 \pm 29	223 \pm 69	70 \pm 45	346 \pm 112
120	18 \pm 6	67 \pm 27	58 \pm 22	252 \pm 131	60 \pm 18	311 \pm 127
180	11.4 \pm 1.1	42 \pm 12	43 \pm 15	133 \pm 66	45 \pm 19	256 \pm 54
240	-	46 \pm 14	34 \pm 18	92 \pm 42	39 \pm 14	182 \pm 37
360	-	37 \pm 15	28 \pm 16	69 \pm 7	32 \pm 11	128 \pm 35
480	-	27 \pm 4	22 \pm 10	47 \pm 9	31 \pm 6	116 \pm 31
720	-	11.9 \pm 2.9	10.0 \pm 1.5	15 \pm 7	17 \pm 6	60 \pm 21
820	-	-	-	-	11 \pm 4	21 \pm 6

- : Non-detectable

Table 4 Pharmacokinetic parameters of genistein and glucuronidated genistein after oral administration of the drug to Beagle dogs at different doses

Parameter	Genistein dose /mg• kg ⁻¹			Glucuronidated genistein dose /mg• kg ⁻¹		
	2.67	5.34	10.68	2.67	5.34	10.68
T _{peak} /min	8.1	16.2	9.6	23.7	45.0	16.7
C _{max} /ng• mL ⁻¹	142.2	155.9	196.1	193.3	287.4	667.0
MRT/min	52.9	224.8	267.7	218.5	206.7	248.9
MRT _{0-∞} /min	94.8	339.6	388.4	299.7	248.2	288.7
AUC/mg• min• L ⁻¹	6.7	26.1	33.2	33.9	70.1	140.5
AUC _{0-∞} /mg• min• L ⁻¹	8.05	30.0	37.7	37.6	74.0	140.7

讨论

染料木黄酮为多羟基化合物,口服易产生首过代谢,文献^[6]报道其部分生物转化在胃肠道进行。本实验结果显示,口服给药 5 min 即可在血浆中检测到染料木黄酮和染料木黄酮葡萄糖醛酸结合物,表明该药物在 Beagle 犬胃肠道中吸收迅速,并立即发生生物转化。比较血浆中原型药物与糖醛酸结合型药物的量,可见血浆中原型药物所占比例很小,药物主要以葡萄糖醛酸结合的形式存在。随着灌胃剂量的倍比增大,血药峰值浓度并不倍比增加,吸收入血的染料木黄酮的量趋于饱和,葡萄糖醛酸化的量却倍比增多。提示在高剂量情况下染料木黄酮可能激活了某种转运和代谢机制,使原型药物吸收相对减少,而增强了其本身的首过代谢消除。这种首过消除机制可能与大豆异黄酮的低毒性特性密切相关,它作为一种生物进化的调节机制,不仅可避免机体大量摄入富含大豆异黄酮的食物或药物引起的毒性反应,而且可能对保持机体激素内环境的相对稳定发挥着重要的调节作用。采用 Caco-2 细胞为吸收模型研究染料木黄酮的转运代谢机制,发现染料木黄酮透过 Caco-2 细胞单层膜具有明显的剂量依赖性、温度依赖性和可饱和性,其他黄酮类药物如芦丁 (rutin) 和乐精 (quercetin) 可竞争性地抑制染料木黄酮的跨膜转运^[6],提示染料木黄酮等植物雌激素类药物在胃肠道的吸收不是一种简单扩散过程,可能有主动转运参与其跨膜吸收,具体机制尚需进一步深入研究。

染料木黄酮在 Beagle 犬体内的吸收、代谢个体差异较大,灌胃给予 5.34 及 10.68 mg• kg⁻¹ 染料木黄酮,部分犬的 C-T 曲线呈双峰,其可能与药物的肝肠循环、体内再分布和吸收不一致有关^[7],具体原因有待阐明。

References

- [1] Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, **76**(2): 447 - 453.
- [2] 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.
- [3] Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, et al. Phytoestrogens: where are we now [J]. *Br J Nutr*, 1998, **79**(5): 393 - 406.
- [4] Arjmandi BH, Smith BJ. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, **13**(3): 130 - 1375.
- [5] Zhou SY, Mei QB, Yang XB, et al. The pharmacokinetics of genistein in Beagle dogs [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2003, **38**(9): 646 - 649.
- [6] Oitate M, Nakaki R, Koyabu N, et al. Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2) [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2001, **22**(1): 23 - 29.
- [7] 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.