

山奈酚在家兔体内的药动学研究^Δ

张敏^{1*}, 孔令希¹, 罗成¹, 李绪春^{2#}, 周远大¹(1.重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400012; 2.绵阳市中心医院, 四川绵阳 621000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4040-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.03

摘要 目的:研究山奈酚在家兔体内的药动学特征。方法:6只家兔分别静脉注射山奈酚(2.0 mg/kg),分别于给药后1、3、5、10、15、20、40、80、160、240 min采血。采用高效液相色谱(HPLC)法检测家兔血浆中山奈酚质量浓度。色谱柱为Phenomenex C₁₈(100 mm×4.6 mm, 6 μm),流动相为乙腈-水(1:2, V/V),流速为0.5 ml/min,检测波长为370 nm,柱温为35 ℃,进样量为80 μl。经3p97软件计算药动学参数,并进行统计学分析。结果:山奈酚回归方程为 $y=1.077 1x-0.044 3$ ($r=0.999 6$)。山奈酚质量浓度在0.040~16.213 μg/ml范围内与峰面积和内标峰面积比值呈良好线性关系。静脉注射山奈酚后, $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 、CL、AUC_{0-∞}分别为(0.957±0.172)min、(6.409±1.584)min、(0.034±0.003)ml/min、(98.459±7.031) μg·min/ml。结论:静脉注射山奈酚后消除加快,提示应改变山奈酚的给药途径。

关键词 山奈酚;家兔;HPLC;药动学

Pharmacokinetic Study of Keampferol in Rabbits

ZHANG Min¹, KONG Ling-xi¹, LUO Cheng¹, LI Xu-chun², ZHOU Yuan-da¹(1.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400012, China; 2.Mianyang Central Hospital, Sichuan Mianyang 621000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the pharmacokinetic characteristics of keampferol in rabbits. METHODS: 6 rabbits were given keampferol(2.0 ml/min) intravenously. The blood samples were collected from the rabbits at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 80, 160 and 240 min, respectively. The keampferol concentrations were determined by HPLC. The determination was performed on Phenomenex C₁₈(100 mm×4.6 mm, 6 μm)column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (1:2, V/V) at the flow rate of 0.5 ml/min. The detection wavelength was set at 370 nm, and the column temperature was 35 ℃. The sample size was 80 μl. Pharmacokinetic parameters were calculated by 3p97 program and analyzed statistically. RESULTS: The regression equation of keampferol was $y=1.077 1x-0.044 3$ ($r=0.999 6$). The linear range of keampferol was 0.040-16.213 μg/ml. After intravenous injection of keampferol, the main pharmacokinetic parameters were as follows: $t_{1/2\alpha}$ (0.957±0.172)min, $t_{1/2\beta}$ (6.409±1.584)min, CL(0.034±0.003)ml/min and AUC_{0-∞}(98.459±7.031) μg·min/ml, respectively. CONCLUSIONS: Keampferol is eliminated quickly in rabbits, which indicate the route of administration should be changed.

KEYWORDS Keampferol; Rabbits; HPLC; Pharmacokinetics

山奈酚属黄酮类化合物,分布于各种天然植物中,具有广泛的药理作用。目前,含有山奈酚的各种中药制剂很多,但对其药动学的报道尚不多见,且多集中于中药复方制剂中山奈酚的研究,对山奈酚单独的药动学研究报道较少。山奈酚在小肠经葡萄糖醛酸结合反应生成二相代谢产物,并以结合物的形式进入体循环,故口服后在动物体内不能或极少检测出原型,于是导致了山奈酚口服生物利用度极低。为了避开首关效应,并结合检测的特点,笔者选用iv给药,以家兔为研究对象,测定给药后家兔血浆中山奈酚的含量,利用3p97软件模拟山奈酚在家兔体内的药动学过程,为进一步了解山奈酚在体内代谢的情况及其真正发挥药理作用的机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100系列高效液相色谱仪,包括1100泵系统、1100可测

波长紫外检测器、1100工作站(美国Agilent公司);SK-1型快速混匀器(江苏金坛市中大仪器厂);B160A型医用低速离心机(河南安新县白洋离心机厂);BP61型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

山奈酚对照品(南京泽朗医药科技有限公司,批号:20110324,纯度:98%);槲皮素对照品(重庆市中药研究院,批号:20110087,纯度:>99%);乙腈(色谱纯,韩国SK Chemicals公司,批号:10071743);甲醇(分析纯,重庆川东化工化学试剂厂,批号:20111587);乙醚(分析纯,上海马陆制药厂,批号:20110423);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF清洁级健康家兔6只,♀♂兼半,体质量2.0~3.0 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(渝)2012-0001]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Δ 基金项目:重庆市卫生局中医药科技项目(No.2009-1-6)

* 药师。研究方向:临床药学。E-mail:dudumamamin@163.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:023-68898185

色谱柱: Phenomenex C₁₈(100 mm×4.6 mm, 6 μm); 流动相: 乙腈-水(1:2, V/V); 流速: 0.5 ml/min; 检测波长: 370 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 80 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取约 50 mg 山奈酚对照品, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 精密吸取 2.5 ml, 置 25 ml 量瓶中, 甲醇定容, 得 194.560 μg/ml 的山奈酚对照品贮备液, 4 °C 贮藏, 备用。将山奈酚对照品贮备液连续以甲醇稀释为 162.133、108.086、81.067、48.640、32.427、8.107、2.432、0.810、0.405 μg/ml 的系列对照品溶液, 4 °C 贮藏, 备用。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取 17 mg 槲皮素, 置 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得 680 μg/ml 的内标贮备液。并将内标贮备液以甲醇稀释为 5.01 μg/ml 的内标溶液, 4 °C 贮藏, 备用。

2.2.3 质控样品的制备 分别吸取不同质量浓度的对照品溶液 10 μl, 置 1.5 ml 塑料离心管中, 氮气吹干。加入空白血浆 100 μl, 涡旋 30 s, 制备质量浓度为 16.213、8.107、0.081 μg/ml 的质控样品(即高、中、低质量浓度的质控样品)。

2.3 血浆样品的处理

取家兔血浆 0.5 ml, 加入 5.01 μg/ml 的内标溶液 40 μl, 涡旋 10 s 混匀后, 加入 4 ml 乙醚, 涡旋提取 1 min, 然后以离心半径为 13.5 cm, 5 000 r/min 离心 5 min, 静置分层。取上清, 50 °C 水浴中氮气吹干, 以 100 μl 流动相复溶, 进样测定。

2.4 专属性考察

取 0.2 ml 空白血浆、0.2 ml 空白血浆+山奈酚对照品+内标、0.2 ml 给药后家兔血浆样品+内标, 按“2.3”项下方法处理样品, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 在本试验条件下, 血浆内源性物质不干扰药物峰, 药物及内标达到基线分离, 两峰分离良好(R>1.5), 空白血浆+山奈酚与内标和给药后兔血浆样品色谱中山奈酚出峰时间一致, 约为 7.76 min。色谱见图 1。

2.5 标准曲线的制备

按“2.2.1”项下方法制备对照品系列溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以山奈酚质量浓度(x)为横坐标, 峰面积和内标峰面积比值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 1.0771x - 0.0443$ ($r = 0.9996$)。结果表明, 山奈酚质量浓度在 0.040~16.213 μg/ml 范围内与其峰面积和内标峰面积比值呈良好线性关系。定量下限为 0.040 μg/ml (RSD=17.9%)。

2.6 精密度试验

按“2.2.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品各 5 份, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样测定日内精密度(5次)、日间精密度(5d)。精密度试验结果见表 1。

表 1 精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Results of precision tests($\bar{x} \pm s, n=3$)

加入量, μg/ml	日内精密度		日间精密度	
	测得量, μg/ml	RSD, %	测得量, μg/ml	RSD, %
16.213	15.750±0.272	1.728	15.855±0.955	6.001
8.107	8.395±0.568	6.768	8.675±0.830	9.564
0.081	0.084±0.004	5.119	0.089±0.005	6.031

2.7 萃取回收率考察

按“2.2.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录

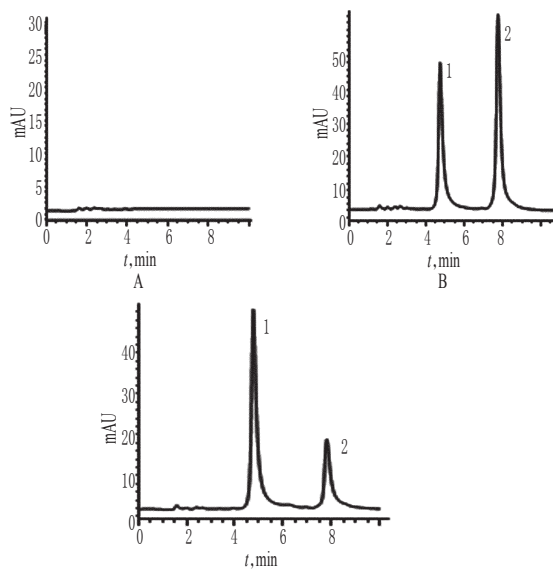


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+山奈酚对照品+内标; C. 给药后家兔血浆样品+内标; 1. 内标; 2. 山奈酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+kaempferol+IS; C. plasma sample after intravenous injection of kaempferol+IS; 1. IS; 2. kaempferol

色谱图, 作为萃取后的数据。另分别取 200 μl 高、中、低质量浓度的山奈酚对照品溶液, 在色谱条件下进样分析, 记录峰面积, 作为未萃取的数据。以萃取后的峰面积与相应的未经萃取的峰面积比较, 计算萃取回收率。无水乙醚对高、中、低质量浓度的山奈酚血浆样品的平均萃取回收率分别为(92.975±3.218)%、(98.147±2.922)%、(104.775±6.297)%。

2.8 加样回收率试验

取相同的含药血浆 0.5 ml, 分别加入“2.2.3”项下高、中、低质量浓度质控样品溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 加样回收率为 90%~110%, 符合样品的分析要求。加样回收率试验结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入量, μg/ml	测得量, μg/ml	回收率, %	RSD, %
16.213	16.848±1.222	103.914±7.535	1.02
8.107	7.957±0.785	98.152±9.680	4.99
0.081	0.083±0.007	102.814±9.078	2.59

2.9 稳定性试验

取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各 5 份, 置室温贮藏(25 °C)8、12 h 后测定, 考察血浆样品的短期稳定性; 取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各 5 份, 贮藏于 4 °C, 7 d 后测定, 考察血浆样品的长期稳定性; 取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各 5 份, 贮藏于 -20 °C, 在室温中充分解冻, 然后再次冷冻, 每次间隔 24 h, 重复 2 个冻融周期后测定, 考察血浆样品的 2 周期冻融稳定性。结果, 山奈酚稳定性的 RSD<10%, 表明山奈酚在血浆样品中稳定性良好。稳定性试验结果见表 3。

2.10 药动学研究

山奈酚结晶粉末先用少量乙醇溶解后加生理盐水研磨, 制备成 0.36 mg/ml 的山奈酚溶液(含 1.67% 乙醇), 于家兔耳缘

表3 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	室温放置8 h	室温放置12 h	4 °C放置7 d	冻融2次
加入量, $\mu\text{g/ml}$	16.213	16.213	16.213	16.213
	8.107	8.107	8.107	8.107
	0.081	0.081	0.081	0.081
测得量, $\mu\text{g/ml}$	16.568 ± 1.027	15.780 ± 0.694	16.808 ± 1.490	15.358 ± 1.348
	7.865 ± 0.603	8.114 ± 0.515	8.783 ± 0.693	8.175 ± 0.664
	0.077 ± 0.007	0.088 ± 0.004	0.084 ± 0.005	0.084 ± 0.006
RSD, %	6.198	4.400	8.862	8.779
	7.672	5.772	7.886	8.098
	9.046	4.976	5.860	6.940

iv 山奈酚溶液(2.0 mg/kg), 分别于给药后 1、3、5、10、15、20、40、80、160、240 min 耳缘静脉取血 1.5 ml, 置于加入肝素的试管中, 4 °C 下以离心半径为 13.5 cm、5 000 r/min 离心 5 min, 得血浆样品。血浆样品按“2.3”项下方法处理后, 进样测定, 记录色谱图。将山奈酚与内标峰面积之比代入标准曲线方程, 求得血浆中山奈酚的质量浓度。将药物血浆浓度与时间数据代入药动学 3p97 软件, 根据 AIC 和相关系数, 确定适合的权重和房室模型, 选出最佳拟合曲线方程, 求得主要药动学参数。浓度-时间曲线见图 2; 大鼠 iv 山奈酚后的血药浓度见表 4; 药动学参数见表 5。

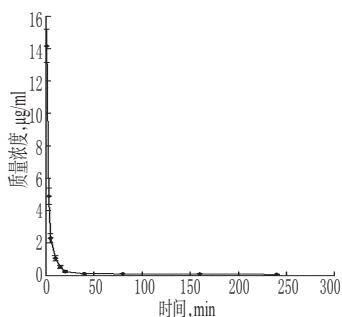


图2 浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curves

表4 大鼠 iv 山奈酚后的血药浓度($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Plasma concentration of kaempferol in rats after intravenous injection($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间, min	血药浓度, $\mu\text{g/ml}$	时间, min	血药浓度, $\mu\text{g/ml}$
1	14.158 ± 1.034	40	0.230 ± 0.062
3	4.890 ± 0.518	80	0.104 ± 0.014
5	2.297 ± 0.287	120	0.096 ± 0.016
10	1.068 ± 0.153	180	0.084 ± 0.014
20	0.519 ± 0.089	240	0.062 ± 0.005

表5 药动学参数($n=6$)

Tab 5 Pharmacokinetic parameters($n=6$)

药动学参数	测得值	药动学参数	测得值
$A, \mu\text{g/ml}$	24.025 ± 1.860	$K_{11}, 1/\text{min}$	0.457 ± 0.040
$V, (\text{mg/kg})/(\mu\text{g/min})$	0.075 ± 0.008	$K_{12}, 1/\text{min}$	0.214 ± 0.066
$t_{1/2\alpha}, \text{min}$	0.957 ± 0.172	$AUC_{0-\infty}, \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$	98.459 ± 7.031
$t_{1/2\beta}, \text{min}$	6.409 ± 1.584	$AUC_{0-240}, \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$	75.969 ± 5.804
$K_{21}, 1/\text{min}$	0.185 ± 0.052	$CL, \text{ml/min}$	0.034 ± 0.003

3 讨论

山奈酚的检测方法有紫外光度法、电化学法、毛细管电泳法等, 但对生物样品中山奈酚检测的报道不多见, 国外文献^[1]报道使用质谱检测大鼠血浆中山奈酚, 但成本较高, 过程复杂。

本研究采用高效液相色谱法检测家兔血浆中山奈酚的含量, 简单、快速、准确, 可达到分析要求, 与文献^[2-3]比较, 样品处理方法直接使用乙醚提取, 不需酸或酶水解, 更加适用于体内山奈酚原型的检测, 所得色谱图杂峰更少, 更清晰。本研究结果表明, 家兔 iv 山奈酚后, 药物在 5 min 内迅速分布全身, 然后迅速经肝脏代谢, 30 min 内基本代谢完, $t_{1/2\alpha} = (0.957 \pm 0.172) \text{ min}$, 与文献^[3]比较, 分布更为迅速; $t_{1/2\beta} = (6.409 \pm 1.584) \text{ min}$, $AUC_{0-\infty} = (98.459 \pm 7.031) \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$, 与文献^[1, 3-4]比较, 代谢半衰期更短, 代谢速度更快, AUC 明显增大, 这说明 iv 给药后药物能迅速到达肝脏进行代谢且远大于口服给药。

据文献^[5-6]报道, 山奈酚在肝脏大量经尿苷二磷酸葡萄糖酰基转移酶(UDP-glucuronosyltransferases, UGTs) 和磺基转移酶(Sulfotransferase, SULTs) 生成葡萄糖酸结合物和少量硫酸化物, 原型药物极少, 因此生物利用度极低。笔者研究也发现, 家兔 iv 山奈酚后, 血药浓度迅速下降, 说明山奈酚在体内很快就发生了二相代谢, 4 h 后基本已降低至纳克水平, 与文献^[1]报道的口服山奈酚后的血药浓度基本相符。文献^[7-8]综述了多项体内研究, 表明山奈酚确实具有抗癌、降脂、抗菌等作用, 其如此快的代谢速度, 提示在体内真正发挥药理效应的并不是原型药物本身, 很可能代谢产物才是其真正发挥药效的物质。关于山奈酚二相代谢产物的活性还需进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang WD, Wang XJ. Determination of free and glucuronidated kaempferol in rat plasma by LC-MS-MS application to pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(23):2 137.
- [2] 田杨, 蒋学华, 兰轲, 等. HPLC 测定大鼠血浆中的山奈酚[J]. *华西药理学杂志*, 2008, 23(3):357.
- [3] 冀召帅, 韩佳容, 邹梅娟, 等. 大鼠血浆中山奈酚的 HPLC 测定法及其在药物动力学研究中的应用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(1):159.
- [4] Zhang QL, Zhang YJ, Zhang ZT, et al. Sensitive determination of kaempferol in rat plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection and application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(29):3 595.
- [5] Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans[J]. *Free Radical Res*, 2004, 38(8):771.
- [6] Shinya Yodogawa, Takayuki A Rakawa, Narumi Sugihera, et al. Glucurono- and sulfo-conjugation of kaempferol in rat liver subcellular preparations and cultured hepatocytes[J]. *Bio Pharm Bull*, 2003, 26(8):1 120.
- [7] JM Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. mini-reviews in medicinal chemistry[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(4):298.
- [8] 姚秋萍, 俞道进, 李健, 等. 油菜花粉有效成分山奈酚在家兔体内的药代动力学研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(4):169.

(收稿日期:2014-07-21 修回日期:2014-09-29)