

委陵菜黄酮在大鼠体内的药动学研究

齐悦, 唐钺, 段宏泉*

天津医科大学药学院 基础医学研究中心, 天津 300070

摘要 目的: 建立测定血浆中委陵菜黄酮的分析方法, 初步对该化合物在大鼠体内的经时过程进行考察。方法: 建立委陵菜黄酮的 HPLC 测定方法, 考察大鼠 iv 委陵菜黄酮 (10、20、40 mg/kg) 后血药浓度-时间曲线。结果: 大鼠尾 iv 3 个剂量委陵菜黄酮后, 血浆药时曲线符合三室模型, 药时曲线下面积 AUC_{0-180} 分别为 346.05、455.74 和 1 655.14 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, 分布相半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 分别为 103.90、15.59 和 9.49 min, 消除相半衰期 $t_{1/2\beta}$ 分别为 30 580.98、2 045.70 和 894.84 min。结论: iv 给药后, 委陵菜黄酮血浆药时曲线符合三室模型, 在大鼠体内迅速分布, 但消除速率较慢。

关键词 委陵菜黄酮; 糖尿病; 药时曲线

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0187-04

Pharmacokinetic study on flavones from *Potentilla chinensis* in rats *in vivo*

QI Yue, TANG Cheng, DUAN Hong-quan *

School of Pharmaceutical Sciences, Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract **Objective:** To establish the method of measuring concentration of flavones from *Potentilla chinensis* in plasma of rats and to explore its pharmacokinetic features. **Methods:** An HPLC analysis method for the determination of flavones in *P. chinensis* was established and used to analyze the plasma concentration-time curve on iv injection of flavones in *P. chinensis* to rats. **Results:** A RP-HPLC analysis method with C-18 column for the determination of flavones in *P. chinensis* was established. After the injection of 10, 20, and 40 mg/kg of flavones in *P. chinensis*, the plasma concentration-time curve was in line with the three-compartment model, AUC_{0-180} were 346.05, 455.74, and 1 655.14 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, respectively. Distribution phase half-life $t_{1/2\alpha}$ was 103.90, 15.59, and 9.49 min, and elimination phase half-life $t_{1/2\beta}$ were 30 580.98, 2 045.70, and 894.84 min, respectively. **Conclusion:** After iv administration, the plasma concentration-time curve of flavones in *P. chinensis* is in line with the three-compartment model, the rapid distribution, while the slower rate of elimination in rats.

Key words flavones from *Potentilla chinensis* Ser.; diabetes; plasma concentration-time curve

糖尿病是由于胰岛素绝对或相对不足引起的以高血糖和多并发症并存为特征的内分泌代谢性常见病, 可分为 I 型和 II 型糖尿病, 是一种严重危害人体健康的常见慢性终身疾病。它主要表现为慢性高血糖并伴有碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢障碍。进入 21 世纪以来, 随着社会的发展, 人口老龄化的趋势, 糖尿病已经成为一种世界性疾病, 已成为世界各国关注的重大公共卫生问题^[1,2]。现有的化药以对症治疗为主, 虽然降血糖作用明显, 但普遍具有不同程度的毒副作用, 不能有效防治并发症的产生。这种潜在的危险限制了它在肝、肾功能受损及心衰病人中的应用。现有中药制剂虽然可以降低并发症,

但单用中药难以将血糖维持在正常水平。因此, 从天然产物中寻找低毒、高效的防治糖尿病的化合物具有非常重要的现实意义和很高的应用价值。

蔷薇科植物委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser. 为多年生草本植物, 有 500 多种, 主要分布在北半球的温带和寒带, 只有少数几种分布在南半球。委陵菜又名翻白菜、白头翁、蛤蟆草、天青地白, 干燥全草入药, 为《中国药典》2000、2005 年版 (一部) 所收载^[3], 性寒, 味苦, 具有清热解毒、凉血止痢的作用。常用于赤痢腹痛、久痢不止、痔疮出血、痈肿疮毒等。经临床应用调查, 天津蓟县中医医院和天津中医药大学附属医院应用委陵菜治疗糖尿病,

收稿日期: 2010-02-29

基金项目: 教育部博士点基金项目 (200800620007)

作者简介: 齐悦 (1986—), 男, 天津市人, 硕士研究生, 研究方向: 中药药物分析研究

* 通讯作者 段宏泉 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn

取得了较好的疗效。本课题组前期研究表明委陵菜降糖作用的主要成分为山柰酚-3-*O*- β -D-(6-*O*-trans-*p*-桂皮酰基)葡萄糖苷, 称为委陵菜黄酮(transtiliroside, 图 1) [4], 其降血糖作用强于盐酸苯乙双胍。该化合物与市售双胍类、磺脲类、 α -糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类以及 GLP-1R 激动类药物在结构上存在根本差异, 则可能存在不同的作用机制, 是具有较高开发价值的活性先导化合物。本文建立了测定血浆中委陵菜黄酮浓度的 HPLC 分析方法, 并用此方法绘制了大鼠 iv 给药后的药-时曲线, 初步研究了委陵菜黄酮在大鼠体内的经时过程。

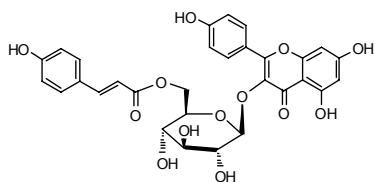


图 1 山柰酚-3-*O*- β -D-(6-*O*-trans-*p*-桂皮酰基)葡萄糖苷的化学结构

Fig.1 Chemical structure of kaempferol-3-*O*- β -D-(6-*O*-trans-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside

1 材料

1.1 药品及试剂

委陵菜黄酮对照品 (质量分数>98%, 本室制

备); 甲醇 (色谱纯, 天津基准化学试剂有限公司); 乙腈 (色谱纯, 天津福晨化学试剂厂); 冰醋酸 (分析纯, 天津基准化学试剂有限公司)。

1.2 仪器

SSI PC-2001 型高效液相色谱系统 (SSI Series III型泵、SSI Model 201 型紫外检测器、LabAlliance 色谱工作站, OV-2001 色谱柱恒温箱); Sartorius BT125D 型电子天平; WH-1 型微型涡旋混合仪; LG16-B 型超速离心机。

1.3 动物

健康大鼠, 品系 SD, 级别 SPF, 雌雄各半, 体重 (225 $\pm$ 25) g, 购自军事科学院实验动物中心, 许可证号 SCXK- (军) 2002-001。

2 方法

2.1 分析条件

色谱柱: LabAlliance Kromasil C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.3%冰醋酸 (35 : 65) (pH 6.0); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μ L。在此色谱条件下, 委陵菜黄酮峰形良好, 保留时间为 10.715 min, 生物样品中的内源性物质与委陵菜黄酮的分离度均大于 2.5, 对委陵菜黄酮的测定不产生干扰 (图 2)。因此, 本法具有良好的专属性, 符合测定要求。

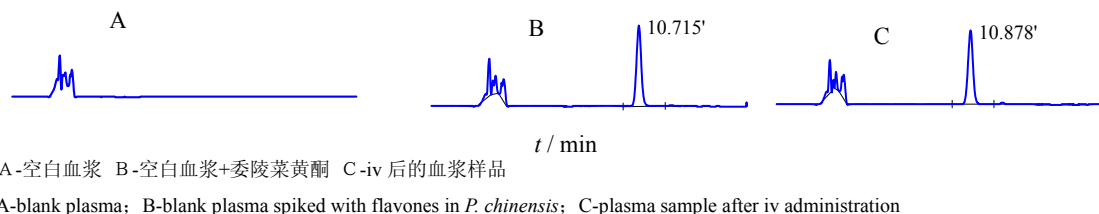


图 2 血浆样品的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatograms of rat plasma sample

2.2 大鼠血浆样品的预处理

取 200 μ L 血浆样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 甲醇, 涡旋混匀 1.5 min, 于 12 000 r/min 离心 3.0 min, 取上清液, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干。200 μ L 甲醇复溶, 涡旋混合 1.0 min, 0.22 μ m 滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 委陵菜黄酮血浆标准曲线

配制 100 μ g/mL 的委陵菜黄酮甲醇储备液, 精密加于 1.5 mL 离心管中, 使其质量浓度分别为 0.1、2.0、8.0、16.0、32.0、48.0、75.0 μ g/mL。氮气吹干。加入空白血浆 200 μ L, 按照“2.2”项下的方法处理,

以色谱峰面积 (*A*) 为纵坐标, 以样品浓度 (*C*) 为横坐标作回归分析, 得血浆中委陵菜黄酮的标准曲线。

2.4 批内差、批间差试验

精密吸取空白血浆 200 μ L, 分别加入不同浓度的委陵菜黄酮标准溶液, 配制低、中、高 3 个质量浓度 (分别为 3.0、54.0、75.0 μ g/mL) 的血浆样品, 按照“2.2”项下方法进行样品预处理、滤过、测定。每个浓度批次平行进行 5 个样品分析, 连续测定 3 批样品。根据委陵菜黄酮的色谱峰面积求得批内差、批间差。

2.5 稳定性考察

大鼠空白血浆 200 μL , 加委陵菜黄酮的对照品适量, 配制成低、中、高 3 个质量浓度 (3.0、54.0、75.0 $\mu\text{g/mL}$) 若干份样品, 分别放置 0 h 和 12 h, 按血浆样品处理方法制备, 进样 20 μL , 测定。

2.6 血浆样品回收率实验

取 200 μL 空白大鼠血浆。加委陵菜黄酮标准溶液, 配制成低、中、高 3 个质量浓度 (分别为 3.0、54.0、75.0 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品。依照“2.2”项下方法进行样品预处理、滤过、测定。计算得 3 个浓度下药物的回收率。

2.7 最低检测限与定量限

将委陵菜黄酮标准液稀释后进样分析, 当色谱峰响应等于基线 3 倍时 ($S/N=3$) 所测定的溶液浓度即定为最低检测限, 当色谱峰响应等于基线 10 倍时 ($S/N=10$) 所测定的溶液浓度即定为定量限。

2.8 委陵菜黄酮注射液的配制

精密称取自制委陵菜黄酮样品 200.0 mg, 溶于 4.0 mL DMSO 中, 再加入 4.0 mL PEG-400 溶液, 涡旋混匀, 随后加入注射用水, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热, 使黄酮完全溶解, 最后加入纯净水使样品溶液总体积为 20.0 mL。0.22 μm 滤膜滤过, 制成浓度为 10 mg/mL 的黄酮注射液。

2.9 委陵菜黄酮血药浓度的测定

SD 大鼠 18 只, 雌雄各半, 随机分成 3 组, 实验前在动物室饲养一周, 适应环境。给药前禁食不禁水 12 h, 3 个剂量组分别按 40、20 和 10 mg/kg 剂量尾 iv 给予委陵菜黄酮, 3 组大鼠均于给药前和给药后 2、5、15、10、20、30、40、60、90 min 眼眶取血于肝素化试管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μL , 立即置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。按照“2.2”项下的方法处理、测定。

3 结果

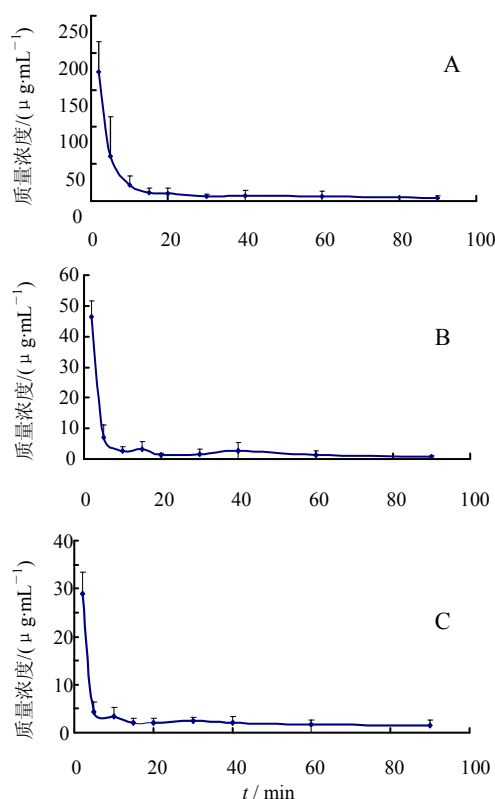
3.1 方法学考察

委陵菜黄酮在血浆中标准曲线的线性关系良好, 最低检测限为 0.02 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。线性范围为: 0.1~75.0 $\mu\text{g/mL}$, 利用色谱峰面积 (A) 为纵坐标, 以样品浓度 (C) 为横坐标作直线回归, 得回归方程 $A=14\ 878C-2\ 401.9$ ($r=0.999\ 1$)。该分析方法的批内差分别为 1.72%、2.42%、3.13%; 批间差分别为 1.80%、2.53%、3.24%。稳定性结果表明委陵菜黄酮稳定, 浓度无明显降低

($RSD<10\%$)。回收率分别为 70.00%、75.01% 和 81.53%。

3.2 委陵菜黄酮大鼠体内药动力学研究

3 组 SD 大鼠尾 iv 40、20 和 10 mg/kg 剂量平均血药浓度-时间曲线见图 3, 其数据采用药代动力学统计软件 3P97 进行处理, 计算各剂量的药代动力学参数见表 1。大鼠尾 iv 委陵菜黄酮的平均血浆药-时曲线符合三房室模型, 3 个剂量 AUC 分别为 346.05、455.74、1 655.14 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。分布相半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 分别为 9.49、15.59、103.90 min, 消除相半衰期 $t_{1/2\beta}$ 分别为 894.84、2 045.70 和 30 580.98 min, 说明大鼠尾 iv 给药后, 委陵菜黄酮在体内分布较快但消除慢。



A-iv 质量浓度 40 mg/kg; B-iv 质量浓度 20 mg/kg;

C-iv 质量浓度 10 mg/kg

A-iv administration of 40 mg/kg; B-iv administration of 20 mg/kg; C-iv administration of 10 mg/kg

图 3 委陵菜黄酮的平均血药浓度-时间曲线

Fig.3 Mean plasma concentration-time profile of flavones in *P. chinensis*.

4 讨论

在实验过程中对委陵菜黄酮甲醇溶液进行 200~700 nm 全波长紫外扫描, 绘制吸收曲线, 确定委陵菜黄酮的最大吸收波长为 254 nm。

实验中生物样品进行去蛋白处理时，最常用的蛋白沉淀试剂为乙腈和甲醇。甲醇作为沉淀剂沉淀蛋白后，蛋白沉淀呈絮状，且提取回收率高。而以乙腈为沉淀剂，蛋白沉淀呈紧密块状，黏附在离心管壁上，提取回收率仅 60%。使用甲醇为沉淀剂时，其使用量为样品的 5 倍时，蛋白沉淀率大于 98%。因而本试验选用甲醇作为沉淀蛋白的试剂。

药物在体内的 $t_{1/2}$ 是根据定时测定药物血浆浓

度计算出来的，并不是一个绝对数值，众所周知， $t_{1/2}$ 具有个体差异，多种因素可以引起 $t_{1/2}$ 变动^[5]。不同的人对同一个药物，其 $t_{1/2}$ 可能有较大差异，甚至相差几倍。本实验结果中消除半衰期和分布半衰期在低、中、高浓度中差异较大，可能是因为肝肠循环和个体差异的原因。大鼠尾 iv 委陵菜黄酮后，药物在大鼠体内迅速分布，但消除较慢。

表 1 大鼠尾静脉注射不同剂量委陵菜黄酮的房室参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters for flavones in *P. chinensis* after iv administration of different dose levels in rats

参数	单位	数值		
		10 mg·kg ⁻¹	20 mg·kg ⁻¹	40 mg·kg ⁻¹
V_c	L	0.32	0.24	0.32
$t_{1/2\alpha}$	min	103.90	15.59	9.49
$t_{1/2\beta}$	min	30580.98	2045.70	894.84
AUC_{0-180}	μg·mL ⁻¹ ·min ⁻¹	346.05	455.74	1655.14
K_{10}	min ⁻¹	0.69	0.54	0.15
K_{12}	min ⁻¹	0.31	0.09	0.12
K_{21}	min ⁻¹	0.06	0.08	0.25
K_{13}	min ⁻¹	0.34	0.31	0.25
K_{31}	min ⁻¹	0.0034	0.0056	0.0094

参考文献:

[1] 王 蕾, 童 丰. 糖尿病的防治及其治疗药物的研究进展[J]. 中国临床医药研究杂志, 2004, 114:11985-11987.

[2] 顾 为, 聂爱华, 李 松. 基于二肽激酶IV结构的II型糖尿病药物的研究进展[J], 中国药物化学杂志, 2004, 14(6), 373-378.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2005.

[4] 赵 川, 乔 卫, 段宏泉, 等. 委陵菜抗糖尿病有效部位及有效成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 6(33): 680-682.

[5] 刘宝洪, 范愿军, 沈 琳. 生物半衰期在临床中的应用[J]. 实用药物与临床, 2006, 9(5):303-306.