

- behavior of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizic acid and Gancao-Fuzi-Tang [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(2): 221-228.
- [7] 项琪,程刚,陈济民. 芍药甘草汤在大鼠体内药代动力学研究[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(9): 615-618.
- [8] Raggi M A, Maffei F, Bugamelli F, *et al*. Bioavailability of glycyrrhizin and licorice extract in rat and human plasma as detected by HPLC method [J]. *Pharmazie*, 1994, 49(4): 269-272.
- [9] Wang Z, Kurosaki Y, Nakayama T, *et al*. Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(10): 1399-1403.

银杏叶总黄酮及其水解物静脉注射给药后在大鼠体内的药动学研究

冯小龙,王 伟,张兰桐*

(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 研究银杏叶提取物中黄酮类成分及其水解物大鼠尾 iv 给药后的药动学差异,同时研究内酯类成分对黄酮类成分药动学的影响。方法 以高效液相色谱法测定血浆中槲皮素、山柰素和异鼠李素,用 3p97 软件进行药动学参数的计算。结果 槲皮素药动学符合二房室模型,山柰素和异鼠李素的药动学符合非房室模型。银杏水解物中槲皮素的 $t_{1/2}$ 比银杏叶提取物中槲皮素的 $t_{1/2}$ 短,与水解物相比提取物的相对生物利用度低,水解物中异鼠李素的相对生物利用度高。结论 银杏黄酮糖苷在大鼠体内转化为黄酮苷元的量较少,苷元的相对生物利用度较高;内酯对黄酮的代谢无明显影响。

关键词:银杏;槲皮素;山柰素;异鼠李素;药动学

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)09-1402-05

银杏叶提取物的主要活性成分是黄酮类和萜内酯类化合物。黄酮类主要是由山柰酚、槲皮素和异鼠李素等的糖苷组成。研究表明,黄酮苷元的生物活性明显优于糖苷^[1],糖苷与苷元的体内过程有较大差异且不同苷元间可相互转化^[2,3]。银杏黄酮类成分药动学研究需对血浆样品进行水解后测定苷元,操作复杂,因水解后部分苷元的代谢产物转化为相应的苷元,测得的苷元量不准确^[4]。本实验旨在建立简易的同时测定血浆中槲皮素、山柰素和异鼠李素苷元的 HPLC 方法,比较大鼠尾静脉注射银杏叶提取物及其水解物后槲皮素、山柰素和异鼠李素药动学的差异,为银杏叶提取物制剂的进一步开发提供理论依据。

1 仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪;XW—80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),L G16—W 高速离心机(北京医用离心机厂)。

槲皮素(批号 100081-200406)、山柰素(批号 110861-200405)和异鼠李素(批号 110860-200406)对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯);银杏叶提取物由山东仁和制药有限公司提供。

Wistar 大鼠,雄性,200~250 g,由河北医科大

学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(冀)2007-1-003。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 银杏叶提取物的制备:按《中国药典》2005 年版一部制备。

2.1.2 银杏叶水解物的制备:取银杏叶提取物样品溶解于水解液 25%盐酸-甲醇(1:4)中,80℃ 加热回流 30 min,迅速冷至室温,每次用 1/2 体积乙醚-丙酮(15:1)萃取,共 3 次,合并有机相并减压蒸干即得。

2.1.3 无内酯银杏叶提取物的制备:取银杏叶提取物适量溶解于 60℃ 水中,每次用 1/2 体积醋酸乙酯萃取,共 3 次,除去内酯类成分;水相减压分离水中溶解的醋酸乙酯后,用 1/2 体积正丁醇萃取,共 4 次,合并正丁醇相并减压蒸干即得银杏总黄酮。

2.1.4 无内酯银杏叶水解物的制备:取银杏总黄酮(去除萜内酯)样品按“银杏叶水解物的制备”的方法制备,即得。

2.2 给药剂量的确定:4 个样品和槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品均用丙二醇、乙醇和水组成的复合溶剂配制制成适当质量浓度的溶液,经 0.22 μm 微孔

* 收稿日期:2008-12-28

作者简介:冯小龙(1976—),男,河北医科大学药学院博士研究生,研究方向为中药有效成分的药物代谢研究。

*通讯作者 张兰桐 Tel/Fax:(0311)86266419 E-mail:zhanglantong@263.net

滤膜滤过除菌,分别测定苷元和内酯,尾静脉 iv 给药,给药体积 0.4 mL/100 g,样品中 3 种苷元和内酯的给药量见表 1。可见无内酯银杏叶提取物和无内酯银杏叶水解物中内酯的量远低于银杏叶提取物和银杏叶水解物样品中的量。

表 1 样品中各苷元的给药剂量

Table 1 Dose of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in different samples

样 品	剂量/(mg·kg ⁻¹)				
	槲皮素	山柰素	异鼠李素	总苷元	总内酯
银杏叶提取物	6.00	5.04	1.36	12.40	7.90
银杏叶水解物	7.08	4.48	0.84	12.40	7.26
无内酯银杏叶提取物	6.56	4.64	1.24	12.44	0.57
无内酯银杏叶水解物	6.64	4.64	1.12	12.40	0.42
槲皮素	6.00				
山柰素		4.80			
异鼠李素			1.20		

2.3 血浆中槲皮素、山柰素和异鼠李素测定方法的建立

2.3.1 色谱条件:Alltech Brava BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5%磷酸液(55:45);柱温:30℃;体积流量:1 mL/min。

2.3.2 对照品贮备液的制备:精密称取槲皮素、山柰素和异鼠李素对照品各 5.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 血浆样品的处理:取大鼠血浆 100 μL,加入 200 μL 25%盐酸-甲醇(1:4),涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,即得。高浓度点以空白血浆适当稀释后再按此方法处理。

2.3.4 方法的专属性:取大鼠空白血浆 0.1 mL,按“血浆样品的处理”依法操作,进样 100 μL,得色谱图;将一定质量浓度对照品贮备液加入空白血浆,依法操作,得色谱图;取 iv 给药后的大鼠血浆样品,依法操作,得色谱图,见图 1。可见槲皮素、山柰素和异鼠李素的保留时间分别为 7.5、11.5、12.6 min,空白血浆中内源性物质及样品的代谢产物均不干扰测定。

2.3.5 标准曲线的制备:取空白血浆 0.1 mL,加含槲皮素、山柰素和异鼠李素的对照品贮备液,配制成质量浓度为 10、25、75、200、500、1 000、2 000 ng/mL 的样品,按血浆样品的处理项下方法依法操作,进样 100 μL,记录色谱图。以待测物质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,求得标准曲线回归方程,分别为槲皮素: $Y=0.2125X-0.2166(r=0.9997)$;山柰素: $Y=0.1639X+0.2786(r=0.9997)$;异鼠李素: $Y=0.1607X+$

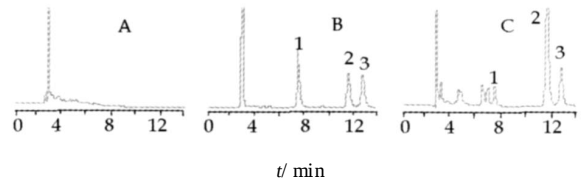


图 1 空白血浆(A)、空白血浆加对照品(B)和血浆样品(C)色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with quercetin, kaempferol, and isorhamnetin (B), and plasma sample (C)

0.2273($r=0.9993$);线性范围均为 10~2 000 ng/mL。定量下限为 10 ng/mL。

2.3.6 精密度和准确度试验:取空白血浆 0.1 mL,按标准曲线的制备项下方法配制含槲皮素、山柰素和异鼠李素分别为 25、200、1 000 ng/mL 样品,各 6 个样本,连续测定 3 d,并与标准曲线同时进行,计算样品的测得质量浓度,与配制质量浓度对照,求得本法的精密度和准确度。结果各样品测定方法的日内、日间精密度 RSD 为 1.86%~5.37%、1.43%~5.96%,准确度为 -7.85%~2.21%。

2.3.7 稳定性试验:取空白血浆 0.1 mL,按标准曲线的制备项下方法配制含槲皮素、山柰素和异鼠李素分别为 25、1 000 ng/mL 的样品,3 个样本,经 2 次冷冻-解冻循环(RSD 为 ±6.2%),室温放置 4 h(RSD 为 ±4.0%)及按血浆样品处理方法处理后室温放置 4、12 h(RSD 为 ±7.0%)均稳定。

2.3.8 样品提取回收率试验:含槲皮素、山柰素和异鼠李素分别为 25、200、1 000 ng/mL 血浆样品提取回收率分别为 94.4%、91.8%、93.7%、92.6%、92.3%、94.8%、98.4%、98.7%、100.1%,RSD 分别为 3.9%、4.6%、2.8%、2.7%、1.8%、0.6%、2.5%、3.1%、2.8%($n=6$)。

2.4 血样采集:取大鼠 35 只,随机分成 7 组,各组分别按表 1 中样品尾 iv 给药 12.4 mg/kg(以 3 种苷元总量计)(0.4 mL/100 g),于给药后 0.02、0.05、0.08、0.17、0.33、0.67、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、24.0 h 从眼底静脉丛取血 0.5 mL,置肝素钠抗凝处理过并加入 1 mg/mL 抗坏血酸溶液 5 μL 的试管中^[5],3 000 r/min 离心 10 min,转移血浆,置 -20℃保存待测。

2.5 数据处理:采用 3p97 软件计算药动力学参数。相对生物利用度 $F=AUC_{\text{样品}} \times D_{\text{对照品}} / (AUC_{\text{对照品}} \times D_{\text{样品}}) \times 100\%$ 。

2.6 药动学结果:大鼠尾 iv 给药后,样品中槲皮素的药时曲线(图 2)符合二房室模型,药动学参数见表 2,山柰素(图 3)和异鼠李素(图 4)药时曲线不符合房室模型,用非室分析法,统计矩参数见表 3。

可见以苷元成分为主的银杏叶水解物和无内酯银杏叶水解物样品中的槲皮素在大鼠体内的平均滞留时间较短,而以糖苷成分为主的银杏叶提取物和无内酯银杏叶提取物中的槲皮素在大鼠体内的 $t_{1/2\beta}$ 较长;山柰素和异鼠李素的苷元和糖苷之间在大鼠体内的平均滞留时间相差较小。表明槲皮素糖苷在体内的消除较慢,而苷元消除较快。可见,槲皮素苷元注射给药后很快转化为其甲基化形式异鼠李素(图 5)。

表 2 各样品大鼠 iv 给药后槲皮素的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

参 数	单 位	槲皮素	银杏叶提取物	无内酯银杏叶提取物	银杏叶水解物	无内酯银杏叶水解物
$t_{1/2\alpha}$	h	0.13 $\pm$ 0.050	0.21 $\pm$ 0.110	0.04 $\pm$ 0.020	0.80 $\pm$ 0.210	0.65 $\pm$ 0.060
$t_{1/2\beta}$	h	7.84 $\pm$ 1.020	14.18 $\pm$ 2.380	12.06 $\pm$ 0.710	8.98 $\pm$ 1.570	7.98 $\pm$ 0.720
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	11.814 $\pm$ 0.696	1.048 $\pm$ 0.141	1.069 $\pm$ 0.097	10.832 $\pm$ 0.898	11.123 $\pm$ 0.674
K_{21}		0.627 $\pm$ 0.208	0.545 $\pm$ 0.308	2.072 $\pm$ 0.470	0.185 $\pm$ 0.044	0.178 $\pm$ 0.024
K_{10}		0.930 $\pm$ 0.311	0.449 $\pm$ 0.105	0.605 $\pm$ 0.155	0.404 $\pm$ 0.101	0.531 $\pm$ 0.042
K_{12}		5.260 $\pm$ 3.215	3.996 $\pm$ 2.898	19.597 $\pm$ 6.932	0.432 $\pm$ 0.167	0.454 $\pm$ 0.064
Cl/F	$\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.510 $\pm$ 0.029	14.887 $\pm$ 4.647	6.186 $\pm$ 0.586	0.925 $\pm$ 0.077	0.599 $\pm$ 0.036
Vd/F	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.598 $\pm$ 0.163	5.578 $\pm$ 1.708	11.572 $\pm$ 5.366	2.424 $\pm$ 0.535	1.138 $\pm$ 0.147

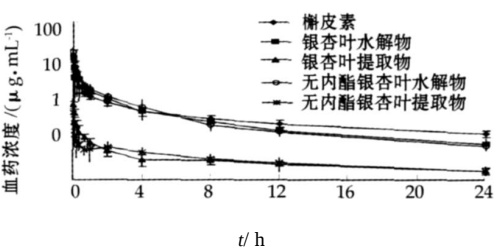


图 2 大鼠 iv 槲皮素、银杏叶提取物、银杏叶水解物、无内酯银杏叶提取物和无内酯银杏叶水解物后槲皮素的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of quercetin in various sample after iv administration to rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

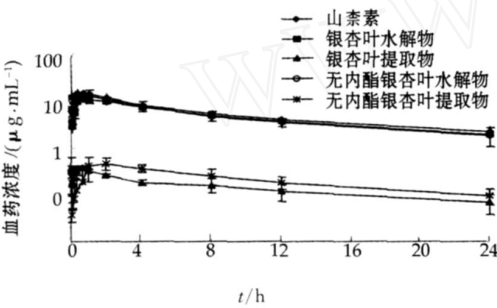


图 3 大鼠 iv 山柰素、银杏叶提取物、银杏叶水解物、无内酯银杏叶提取物和无内酯银杏叶水解物后山柰素的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of kaempferol in various samples after iv administration to rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

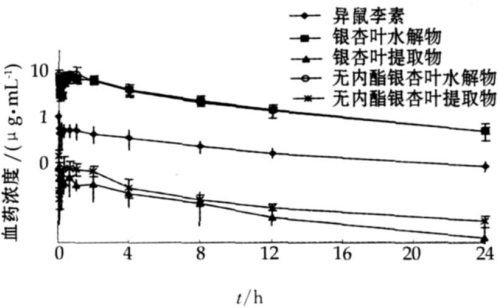


图 4 大鼠 iv 异鼠李素、银杏叶提取物、银杏叶水解物、无内酯银杏叶提取物和无内酯银杏叶水解物后异鼠李素的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curve of isorhamnetin in various sample after iv administration to rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 3 大鼠尾 iv 各样品给药后山柰素和异鼠李素的药动学统计矩参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Pharmacokinetic moment parameters of kaempferol and isorhamnetin in various samples after iv administration to rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

样 品	给药剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	$\text{AUC}_{(0 \sim t)}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{AUC}_{(0 \sim \infty)}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	MRT/h
山柰素	3.50	127.596 $\pm$ 16.734	166.789 $\pm$ 21.100	7.88 $\pm$ 0.18
银杏叶提取物	4.20	3.441 $\pm$ 0.797	4.923 $\pm$ 1.644	8.68 $\pm$ 0.32
无内酯银杏叶提取物	4.64	5.250 $\pm$ 1.083	6.899 $\pm$ 2.310	8.31 $\pm$ 1.57
银杏叶水解物	3.30	110.832 $\pm$ 16.869	141.824 $\pm$ 22.539	8.22 $\pm$ 0.14
无内酯银杏叶水解物	4.64	112.790 $\pm$ 23.520	144.191 $\pm$ 36.132	7.82 $\pm$ 0.20
异鼠李素	1.00	7.223 $\pm$ 0.796	10.613 $\pm$ 2.092	8.91 $\pm$ 0.14
银杏叶提取物	1.10	0.861 $\pm$ 0.292	1.080 $\pm$ 0.686	7.59 $\pm$ 0.27
无内酯银杏叶提取物	1.24	1.227 $\pm$ 0.054	1.635 $\pm$ 0.198	7.32 $\pm$ 0.35
银杏叶水解物	1.00	37.740 $\pm$ 3.670	45.530 $\pm$ 3.984	7.78 $\pm$ 0.20
无内酯银杏叶水解物	1.12	37.712 $\pm$ 5.860	45.886 $\pm$ 9.410	7.57 $\pm$ 0.20

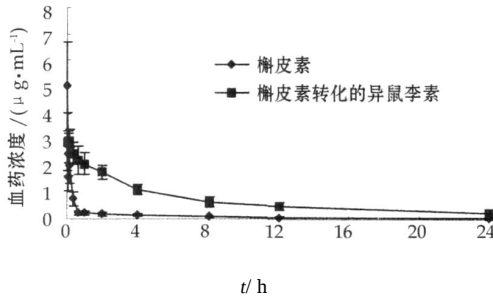


图 5 大鼠 iv 槲皮素后血浆中槲皮素及其代谢产物异鼠李素的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig 5 Mean plasma concentration-time curve of quercetin and its metabolite (isorhamnetin) after iv administration to rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.7 槲皮素、山柰素和异鼠李素相对生物利用度: 为便于比较,分别以槲皮素、山柰素和异鼠李素对照品给药组为对照,计算其他 4 个样品中 3 种苷元的相对生物利用度,结果见表 4。可见以苷元为主要成分的银杏叶水解物和无内酯银杏叶水解物中的槲皮素和山柰素的相对生物利用度与对照品相差较少,而异鼠李素的相对生物利用度高于对照品;而以糖苷为主要成分的银杏叶提取物和无内酯银杏叶提取物中的 3 种成分的相对生物利用度仅为对照品的 10 % 左右。结果表明,以糖苷为主要成分的银杏叶提取物和无内酯银杏叶提取物在体内仅有少部分转化为苷元。内酯类成分对黄酮类成分在大鼠体内药动学过程无明显影响。

表 4 大鼠 iv 给药后槲皮素、山柰素和异鼠李素的相对生物利用度

Table 4 Bioavailability of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin after iv administration to rats

样 品	相对生物利用度/ %		
	槲皮素	山柰素	异鼠李素
对照品	100.0	100.0	100.0
银杏叶提取物	9.0	2.8	9.0
银杏叶水解物	72.5	91.1	612.8
无内酯银杏叶提取物	7.8	4.3	14.9
无内酯银杏叶水解物	83.1	89.4	463.2

3 讨论

肝脏作为机体各种物质的主要代谢器官,在黄酮类的代谢过程中可能发挥重要作用。比较槲皮素在血和肝脏中的代谢产物,发现肝中槲皮素浓度较低,并且同血中一样存在较多的甲基化形式(异鼠李素)^[6]。本实验中发现,槲皮素苷元在体内可转化为异鼠李素,以苷元为主要成分的银杏叶水解物和无内酯银杏叶水解物样品中的异鼠李素的相对生物利用度分别比对照品异鼠李素高 6.13、4.63 倍,可能

是由于槲皮素在体内转化为异鼠李素所引起。Lambert 等从猪肝细胞中纯化出 β -葡萄糖苷酶,发现其可以使某些槲皮素葡萄糖苷(如槲皮素-4'葡萄糖)脱糖基,但槲皮素-3'葡萄糖、槲皮素-3,4'葡萄糖、芦丁等并不脱糖,槲皮素-3'葡萄糖在一定程度上还可以抑制槲皮素-4'葡萄糖脱糖^[7],表明体内的脱糖苷酶对糖基的种类和取代位置可能有选择性。本实验中发现,以糖苷为主要成分的银杏叶提取物和无内酯银杏叶提取物样品中 3 种成分的相对生物利用度仅有对照品的 10 % 左右,表明糖苷类在大鼠体内转化为苷元的比例较低,或者是仅有部分种类的糖苷可转化为苷元。

本实验中使用的银杏叶水解物中 3 种苷元的比例与银杏提取物中的不同,主要是因制备工艺引起的,在给药时主要是使苷元总剂量一致,因此在给药时并未对它们之间的比例进行校正。

用 HPLC 法同时测定槲皮素、山柰素和异鼠李素的方法已有报道^[8],实验发现,色谱柱对三者分离度影响较大,尤其是山柰素与异鼠李素的极性相近,试用了 Symtry-C₁₈ 和 Diamonsil-C₁₈ 柱,山柰素和异鼠李素的分离度较差,而 Alltech brava BDS 柱的分离度高、保留时间短,同时流动相的条件简单。

参考文献:

- [1] Odontuya G, Hoult J R, Houghton P J. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(9): 782-786.
- [2] Duarte S I, Rodrigues A S, Gaspar J, et al. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol [J]. *Mutagenesis*, 1997, 12(5): 383-390.
- [3] Vincent C J, Ashwin A D, Hester W, et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs [J]. *J Nutr*, 2005, 135(7): 1718-1725.
- [4] Wang F M, Yao T W, Zeng S. Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administrated tablet of ginkgo biloba extract by HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(2): 317-321.
- [5] Chen X, Yin O Q, Zuo Z, et al. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(6): 892-901.
- [6] Manach C, Texier O, Morand C, et al. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(11): 1259-266.
- [7] Lambert N, Kroon P A, Faulds C B, et al. Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1435(1): 110-116.
- [8] Wang Y, Cao J, Weng J H, et al. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed*, 2005, 39: 328-333.