

口服枳术丸后人体内橙皮苷、柚皮苷的药代动力学研究

王喜军^{1*}, 陈曦¹, 曹洪欣², 孙晖¹, 杨舸¹

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 阐明枳术丸的人体药动学特性。方法: 利用葡萄糖醛酸酶使血浆中的苷元与葡萄糖醛酸游离, 用 HPLC 方法, 测定血浆中柚皮素(naringenin)及橙皮素(hesperetin)的含量, 并用 3p97 软件进行数据分析。结果: 柚皮素及橙皮素的 T_{1/2}(k_a)/T_{1/2}(k_e)(h) 分别是 2.142 ± 0.999/5.491 ± 3.926 和 2.106 ± 0.728/5.824 ± 3.067, AUC(mg/L·h) 分别是 34.886 ± 22.199 和 39.407 ± 19.535, 两种化合物的行为基本一致, 生物利用度均较高。结论: 建立了口服枳术丸后血浆中柚皮素及橙皮素的含量测定方法, 并阐明了药动学特性, 可用于指导该药的临床应用。

[关键词] 枳术丸; 柚皮素; 橙皮素; 药动学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)08-0018-03

Pharmacokinetic Studies of Naringenin and Hesperetin in Human Plasma after Oral Administration of Zhizhu Wan

WANG Xi-jun^{1*}, CHEN Xi¹, CAO Hong-xin², SUN Hui¹, YANG Ge¹

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Elucidating the pharmacokinetic properties of Zhizhu Wan. **Method:** By using β -Glucuronidase, free hesperetin and naringenin were obtained from the hesperetin-glucuronide naringenin-glucuronide in plasma, the contents of the two compounds in plasma was determined by HPLC. **Results:** T_{1/2}(k_a)/T_{1/2}(k_e)(h) for naringenin and hesperetin are 2.142 ± 0.999/5.491 ± 3.926 and 2.106 ± 0.728/5.824 ± 3.067 respectively, and the AUC(mg/L·h) value are 34.886 ± 22.199 and 39.407 ± 19.535 for naringenin and hesperetin respectively. **Conclusion:** The method for determining naringenin and hesperetin in plasma has been established, and the pharmacokinetic parameters can be instructive for clinic application.

[Key words] Zhizhu Wan; naringenin; hesperetin; pharmacokinetics

枳术丸始载于李东垣的《脾胃论》, 由白术和枳实组成, 应用历史悠久, 主要用于治疗脾胃虚弱, 食少不化, 脘腹痞满等症^[1], 该药已被《中华人民共和国药典(2005版)》收载。药理学研究表明, 枳术丸中含有的橙皮苷对离体肠管有先兴奋后抑制作用, 能

降低毛细血管通透性; 另报道橙皮苷、柚皮苷有抗炎作用, 可降低小鼠甲醛性足踝浮肿; 含有的新橙皮苷等其他黄酮类物质能抑制毛细血管脆性和恢复损伤所致的紫斑, 从而具康复作用^[2]。关于枳术丸的相关报道很多, 但未有药代动力学方面的报道, 本文通过对成人口服枳术丸后血中的成分进行分析检测及药代动力学研究, 力图阐明该药的体内过程及药代动力学特性, 为临床科学给药方案的建立提供基础数据。

1 仪器、材料及受试者

1.1 仪器 日本岛津公司高效液相色谱仪 LC-

[收稿日期] 2007-01-04

[基金项目] 科技部基础性工作专项“中药材标准及中医临床疗效评价标准”(2001DEA20010)

[通讯作者] * 王喜军, Tel: (0451) 82193010; E-mail: wxj@hljucm.net

2010A 系列, 配以双波长紫外检测器, 自动进样器。

1.2 药品与试剂 枳术丸样品: 白术与枳实的比例为 2:1, 二药为细末, 水泛为丸。由中国中医科学院试验药厂提供, 批号 20040901; 经 HPLC 分析, 柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷含量分别为 (11.54 ± 0.42) , (1.28 ± 0.07) , (11.78 ± 0.40) mg/g; 柚皮苷、橙皮苷对照品(购自中国药品生物制品检定所, 批号为 110722-200309, 0721-200010, 供含量测定用); 柚皮素、橙皮素、新橙皮苷对照品(购自 MP Biomedicals, Inc. 产品号分别为 15385, 15264); 槲皮素(购自日本和光纯药工业株式会社, 批号 545-00283); β -Glucuronidase(型号 HP-2, 购自 Sigma Aldrich CO.), 甲醇为色谱纯, 其他所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 受试者 7 名健康男性志愿者, 年龄(24~30)岁, 身高 (172.4 ± 4.0) cm, 体重 (63.6 ± 4.0) kg。志愿者血常规, 尿常规, 心电图, 血压, 肝、肾功能检查均正常。无急慢性疾病或家族遗传病史, 自愿参加该试验并在受试前签署知情同意书。试验期间禁烟、酒, 受试前 2 周及试验期间禁服其它任何药物。试验期间统一食谱。试验中有临床医师监护, 并有急救药物及设备。

2 方法

2.1 给药与取样 7 名受试者禁食 12 h 后, 次日清晨, 抽取给药前空白血样后分别空腹口服枳术丸 48 g, 温开水 400 mL 送服。各受试者于给药后 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 分别由留置针抽取前臂静脉血 10 mL, 置于肝素化试管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 分离血浆, $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。受试者服药后 4 h 给予统一低脂餐。

2.2 色谱条件 DIKMA C_{18} 柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 醋酸水溶液(29:71); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 282 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.3 供试品溶液制备 取血浆室温下融冻, 各吸取 2 mL 加入质量浓度为 0.78 mol/L 醋酸钠(pH4.8)缓冲盐溶液 110 μL 及 0.1 mol/L 抗坏血酸 100 μL , 振荡混匀 1 min, 加入 40 μL β -Glucuronidase, 振荡混匀 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 17 h 后加入内标物槲皮素 0.1 mL (1.46 μg), 然后加入 1 mL 5 mol/L HCl 振荡混匀 30 s 沉淀蛋白, 分别用乙酸乙酯萃取 3 次(4 mL、4 mL、2 mL), 3 000 r/min 离心 5 min, 乙酸乙酯层减压回收至

干(45 $^{\circ}\text{C}$), 残渣定容至 0.2 mL, 进样 20 μL 。

2.4 标准曲线制备 取健康人空白血浆 2.0 mL, 分别精密加入已配好的柚皮素、橙皮素对照品贮备液。使血浆中柚皮素、橙皮素的含量分别为不同浓度, 按供试品溶液制备项下方法进行操作, 并进行色谱分析。以柚皮素、橙皮素的峰面积与内标物峰面积比值 A 对进样量 W 进行线性回归, 得到标准曲线回归方程。柚皮素: $A = 0.6486W + 0.2388$, $r = 0.9993$, 进样量在(0.1~25.5) μg 范围内线性良好。橙皮素: $A = 6.6547W + 0.386$, $r = 0.9992$; 进样量在(0.1~27.7) μg 范围内线性良好。柚皮素、橙皮素最低检出浓度为 0.25 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N > 3$)。

2.5 精密度和回收率试验 取空白血浆 2.0 mL 加入柚皮素、橙皮素对照品贮备液, 使浓度约为 12.75, 63.75, 127.50 $\mu\text{g/mL}$, 按供试品溶液制备项下方法进行操作, 与相应柚皮素、橙皮素标准工作液分别进样分析, 计算求得柚皮素、橙皮素在血浆中的绝对回收率、相对回收率、日内、日间变异系数, 结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果

被测成分	相对回收率 (%)	绝对回收率 (%)	日内差 RSD (%)	日间差 RSD (%)
柚皮素	98.80 \pm 4.41	74.23 \pm 8.13	2.51	2.68
橙皮素	97.94 \pm 4.55	76.20 \pm 8.67	2.77	3.14

2.6 数据处理 利用中国药理学会数学专业委员会编制的 3p97 实用药代动力学程序计算主要药代动力学参数($t_{1/2}$ 、AUC、MRT 等), T_{max} 、 C_{max} 为实测值。

3 结果

3.1 色谱分析 按选定的色谱条件, 测得空白血浆、加入柚皮素、橙皮素的血浆、受试者血浆的色谱图, 见图 1。

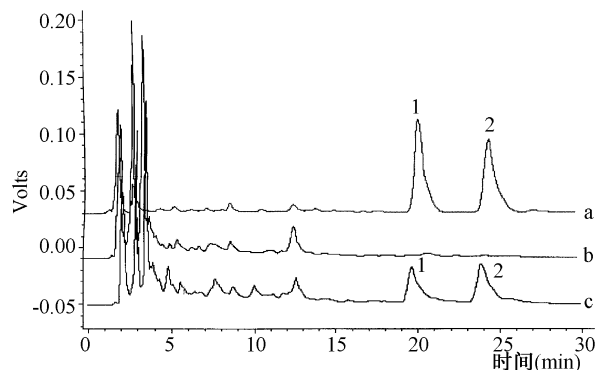


图 1 人口服枳术丸后入血成分分析 HPLC 图谱

a. 血清中加入柚皮素、橙皮素对照品; b. 空白血浆; c. 服枳术丸后血浆; 1. 柚皮素(naringenin); 2. 橙皮素(hesperetin)

由图 1 可见, 血浆中的内源性杂质不干扰柚皮素、橙皮素的测定, 柚皮素、橙皮素的保留时间为 20

min 和 25 min。

3.2 血药浓度——时间曲线 7 名健康志愿者口服枳术丸后的血药浓度——时间曲线见图 2。

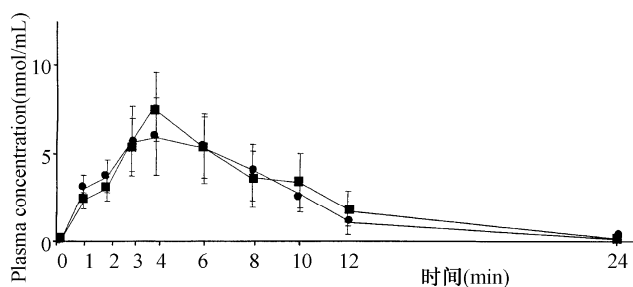


图 2 7 名志愿者口服枳术丸后的血药浓度——时间曲线
—■—: 橙皮苷; —●—: 柚皮苷

3.3 药代动力学研究 7 名志愿者口服试验枳术丸制剂的血药浓度—时间数据经 3p97 实用药代动力学程序处理, 数据更接近一室模型, 其主要药代动力学参数见表 2。

表 2 药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 7$)

药代动力学参数	橙皮素	柚皮素
Ke	0.190 ± 0.119	0.181 ± 0.096
Ka	0.384 ± 0.165	0.401 ± 0.159
T _{1/2} (ka) (h)	2.142 ± 0.999	2.106 ± 0.728
T _{1/2} (ke) (h)	5.491 ± 3.926	5.824 ± 3.067
C _{max} (mg/L)	2.574 ± 1.531	3.492 ± 1.662
AUC(mg/L·h)	34.886 ± 22.199	39.407 ± 19.535

4 讨论

采用高效液相色谱法测定 7 名健康志愿者口服枳术丸的经时血药浓度, 经 3p97 程序处理后, 从主要药代动力学参数可见, 受试者口服枳术丸制剂后于 4.0 h 左右橙皮素和柚皮素达血药浓度峰值; 消除半衰期约为 5 h。从上述数据说明每天服药 2 次可维持较好的血药浓度。

在大量预试验中, 口服枳术丸后, 在血浆中检测不到橙皮苷 (hesperitin-7-rutinoside)、柚皮苷 (naringenin-7-neohesperidoside) 和新橙皮苷 (hesperitin-7-neohesperidoside) 等成分, 证明了该类成分不是以原形存在。文献报道, 橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷等黄酮糖苷在肠内细菌作用下脱糖基化产生苷元被吸收进入肝脏, 其中大部分苷元和葡萄糖醛酸结合^[3], 因此在血浆中很难检测到上述黄酮糖苷及其苷元。通过文献方法利用葡萄糖醛酸酶 (β -Glucuronidase) 使血浆中的苷元与葡萄糖醛酸断开^[4], 在血浆中检测到苷元——橙皮素和柚皮素 (hesperitin, naringenin)。另有研究表明上述肠内细菌转化对于陈皮、枳实、枳壳等柑桔类中药含有的黄

酮糖苷普遍存在, 将柚皮苷 (10 mg) 与大鼠肠内菌丛在厌氧菌条件下温孵培养, 从转化产物中检出柚皮苷元 (naringenin) 和对羟基苯甲酸, 说明柚皮苷在细菌作用下, 引起骨架开裂; 将橙皮苷和橙皮素灌胃给予大鼠, 也在肠内细菌作用下引起环的开裂, 主要转化产物系间羟基苯甲酸, 而人口服橙皮素和橙皮苷, 从尿中排泄的代谢产物为 3-羟基-4-甲氧苯基羟基苯甲酸。柚皮苷在大鼠和人肠中转化亦不同, 大鼠灌胃得尿中排泄物对羟基苯甲酸, 人口服得柚皮苷元和其葡萄糖醛酸结合物^[5]。这种代谢产物种间存在的特异性原因不明, 很可能由于大鼠和人的肠内菌丛和肝脏酶的种类不同所致。

枳术丸中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量分别为 11.54 mg/g, 1.28 mg/g 和 8.19 mg/g。由于橙皮苷和新橙皮苷的苷元均为橙皮素, 因此血中检测到的橙皮素含量较高极有可能来源于枳术丸中的橙皮苷和新橙皮苷代谢。

采用文献的方法将样品酶解后^[4], 筛选不同试剂进行除血浆中大量蛋白, 其中用甲醇、高氯酸、三氯乙酸和稀盐酸不同浓度进行试验, 最终选用 5N 盐酸进行除血浆中蛋白方法, 该方法的绝对回收率 (平均值 75%) 优于其它各试剂; 选用乙酸乙酯萃取比原文献的固相萃取柱方法得到的谱图干扰较少, 因中药复方制剂中含的成分众多, 对用甲醇提取、固相萃取等方法会有其他未知成分干扰, 因此经萃取后挥干溶剂用甲醇定容, 方法的相对回收率和精密度试验均符合要求, 方法可靠。

[参考文献]

- [1] 朱鹰, 侯俊玲. 试析李东垣对枳术丸的发挥[J]. 山西中医, 2000, 16(2): 44.
- [2] 蔡逸平. 枳实、枳壳类药材的化学成分及药理研究概况[J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(1): 18.
- [3] Griffiths LA and Smith GE. Metabolism of Apigenin and Related Compounds in the Rat Metabolite Formation in vivo and by the Intestinal Microflora in vitro[J]. Biochem, 1972, 128(4): 901-911.
- [4] Iris Erland, Esa Meririnne, Georg Alfthan, et al. Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice[J]. Journal of Nutrition, 2001, 131: 235-241.
- [5] 杨秀伟, 郝美荣, 服部征雄, 等. 中药成分代谢分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 45, 577.