

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.002

对羟基苯甲醛的代谢物在大鼠体内的药代动力学研究*

冯 晋, 杨建光, 杨琼英, 徐娅玲, 何芳雁[△]

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650000)

摘要:目的 探讨对羟基苯甲醛(4-HBd)的代谢物对羟基苯甲酸(4-HBA)在正常大鼠及大脑中动脉阻塞/再灌注损伤(MCAO/R)模型大鼠体内的药代动力学特征。方法 采用线栓法复制大鼠 MCAO/R 模型,采用微透析取样技术结合高效液相色谱(HPLC)法进行 4-HBd 灌胃后的代谢物 4-HBA 在正常及 MCAO/R 模型大鼠血浆的药代动力学特征。结果 灌胃 4-HBd 400 mg/kg 后,其代谢物 4-HBA 在正常大鼠体内于 10.667 min 的血药浓度达峰值,药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)为(20 336.89 ± 9 433.55)mg · min/L,半衰期为 31.805 min;在 MCAO/R 模型的病理状态下,8.833 min 血药浓度达峰值, $AUC_{0-\infty}$ 为(9 915.19 ± 5 942.32)mg · min/L,半衰期延长至 78.847 min。结论 灌胃 4-HBd 400 mg/kg 后,其代谢物 4-HBA 在正常大鼠体内的血药浓度迅速达峰,暴露量较原形药明显增多。在 MCAO/R 模型的病理状态下,代谢物 4-HBA 的半衰期明显延长。

关键词:对羟基苯甲醛;对羟基苯甲酸;药代动力学;微透析;高效液相色谱法

中图分类号:R965;R971

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)23-0009-04

Pharmacokinetics of Metabolites of *p*-Hydroxybenzaldehyde in Rats

FENG Jin, YANG Jianguang, YANG Qiongying, XU Yaling, HE Fangyan

(College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650000)

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetic characteristics of *p*-hydroxybenzoic acid [4-HBA, the metabolite of *p*-hydroxybenzaldehyde(4-HBd)] in normal rats and middle cerebral artery occlusion/reperfusion(MCAO/R) model rats. **Methods** The MCAO/R model rats were established by the suture method, and the pharmacokinetic characteristics of 4-HBA(the metabolite of 4-HBD after intragastric administration) in plasma of normal and MCAO/R model rats were studied by microdialysis sampling technique combined with high performance liquid chromatography(HPLC) method. **Results** After administration of 4-HBd(400 mg/kg), the plasma concentration of 4-HBA reached the peak at 10.667 min in normal rats, and the $AUC_{0-\infty}$ was (20 336.89 ± 9 433.55) mg · min/L, the half-life period was 31.805 min. In MCAO/R model rats, the plasma concentration of 4-HBA reached the peak at 8.833 min, the $AUC_{0-\infty}$ was (9 915.19 ± 5 942.32)mg · min/L, and the half-life period was extended to 78.847 min. **Conclusion** After administration of 4-HBd(400 mg/kg), the plasma concentration of 4-HBA rapidly reached a peak in normal rats, and the exposure dose was significantly higher than 4-HBd. Under the pathological state of MCAO/R, the half-life period of the 4-HBA was significantly prolonged.

Key words: *p*-hydroxybenzaldehyde; *p*-hydroxybenzoic acid; pharmacokinetics; microdialysis; HPLC

对羟基苯甲醛(4-HBd)是天麻脑保护作用的指征性成分之一,具有对抗脑缺血再灌注损伤(CIRI)^[1]、保护血脑屏障(BBB)^[2]、抗血小板聚集^[3]、抑制钙超载^[4]、减轻神经炎症损伤^[5-6]等作用。采用微透析取样技术结合高效液相色谱(HPLC)法,对 4-HBd 进行药代动力学(简称药动学)研究,发现 4-HBd 可在外周迅速代谢为对羟基苯甲酸(4-HBA),并可在脑中检测到 4-HBA,且仅有少量原型药进入脑内。由于病理学状态可影响药物在体内的药动学特征,为了考察 4-HBA 在正常大鼠和大脑中动脉阻塞/再灌注损伤(MCAO/R)模型大鼠体内的药动学差异,本研究在前期基础上对大鼠灌胃 4-HBd 后其代谢物 4-HBA 的血浆药动学进行研究,比较 4-HBA 在正常及 MCAO/R 模型大鼠体内的变

化,分析 CIRI 的病理状态对 4-HBd 代谢物 4-HBA 在大鼠体内药动学的影响,以期在分析 4-HBA 体内过程的同时为原形药发挥药效作用的作用机制提供参考。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Culex 型微透析仪(美国 BASi 公司);PF5001 型激光多普勒血流监测仪(瑞典 Perimed 公司);CF16RX II 型低温离心机(日本 Hitachi 公司);XW-80A 型涡旋振荡器(江苏海门市麒麟医用仪器厂);NDK200-1 型氮吹仪(杭州米欧仪器有限公司);Dionex U3000 型超高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

*基金项目:云南省教育厅科学研究基金[2017ZZX287];云南省科技厅科技计划项目[2018FF001(-074),2017FF117(-004),2018FF001(-007)]。

第一作者:冯晋,男,在读硕士研究生,研究方向为中药药理学,(电子信箱)1285187026@qq.com。

[△]通信作者:何芳雁,女,硕士研究生,实验师,研究方向为中药药理学,(电子信箱)735137511@qq.com。

1.2 试剂

对羟基苯甲醛(美国百灵威科技有限公司,纯度为99.89%,批号为L470Q62);乙腈(色谱纯,批号为158927),甲醇(色谱纯,批号为154447),均购自赛默飞世尔科技有限公司;冰乙酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号为150811);乙酸乙酯(分析纯,四川西陇化工股份有限公司,批号为160105);异氟烷(瑞沃德生命科技有限公司,批号为217170702)。

1.3 动物

200~240 g SPF级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为SCXK<湘>2016-0002,合格证号为43004700038286)12只。试验动物进入实验室后进行适应性饲养,每日定时喂食及饮水,定期更换垫料,保持动物生活环境干净整洁。饲养环境温度18~24℃,相对湿度为40%~60%。

2 方法与结果

2.1 大鼠MCAO/R模型的复制与评价

2.1.1 大鼠MCAO/R模型的复制

取体质量为200~240 g的雄性SD大鼠,取颈部正中偏右0.5 cm处切口,约1.5 cm,分离大鼠右侧颈总动脉和迷走神经。结扎颈总动脉近心端,远心端用动脉夹夹闭,在距分叉1 cm处剪一“V”形缺口,将栓线经缺口插入。松开动脉夹,调整栓线进入大脑,栓线插入深度为18~20 mm。采用激光多普勒血流检测仪检测脑血流量变化,血流量下降至基础值的20%~30%时停止插栓,完成一侧大脑中动脉阻塞(MCAO)。MCAO后2 h再灌注时轻拉线栓,使其头端回到颈总动脉内,即可实现大脑中动脉再灌注,再灌注2 h后给予受试物并取样^[7-9]。

2.1.2 大鼠MCAO/R模型的评价

Longa5法神经学评分:0分为无神经功能缺损症状;1分为轻度局灶性神经功能缺损,即提尾悬空不能伸展左侧前爪;2分为中度局灶性神经功能缺损,即行走向左侧转圈;3分为中度局灶性神经功能缺损,即行走困难,并向左侧倾倒;4分为不能自发行走,意识水平下降。1~3分为成功^[7]。

激光多普勒检测仪检测脑血流量评价:造模后,当脑血流量降至基础值的20%,且在再灌注2 h后脑血流量有所回升,视为模型成功^[10]。

MCAO/R模型成功标准:以上2种评价方法均成功为模型成功,所得实验数据纳入结果统计。

MCAO/R模型评价结果:结果显示,模型大鼠有明显的神经功能缺失症状,神经病学平均评分为(2.33±0.82)分;MCAO/R大鼠经激光多普勒检测脑血流量,MCAO前为(100±0.00)%,MCAO后为(12.65±

3.92)%,再灌注后为(54.12±7.24)%,造模后大脑中动脉平均脑血流量已降至基础值的12.65%,且在再灌注2 h时脑血流量有所回升。

2.2 微透析采血

2.2.1 微透析采血方法建立

大鼠麻醉后,颈正中往左上侧开约1 cm创口,分离颈静脉,剪一“V”形口,插入采血引导管,将引导管沿近心端方向插入颈静脉,并将引导管从大鼠颈后部开口引出,连接微透析采血系统,按设置时间自动采集血样。

2.2.2 微透析取样

将大鼠放置在微透析仪的活动装置内,将微透析仪采血系统管路与颈静脉插管大鼠相连,设置取样程序为1,3,6,10,15,20,30,45,60,75,90,120 min,采血量250 μL。仪器准备完成后灌胃,其中MCAO/R模型大鼠在缺血2 h再灌注2 h后灌胃,灌胃后,启动微透析采血系统,取样。

2.3 动物分组与给药

将大鼠分为正常组、MCAO/R模型组,每组6只。实验前禁食12 h,自由饮水。正常组和MCAO/R模型组给药剂量按400 mg/kg、给药体积按1 mL/100 g灌胃给予4-HBd。

2.4 代谢物4-HBA体内分析方法学考察

2.4.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%冰醋酸水溶液(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:278 nm;柱温:25℃;进样量:40 μL。

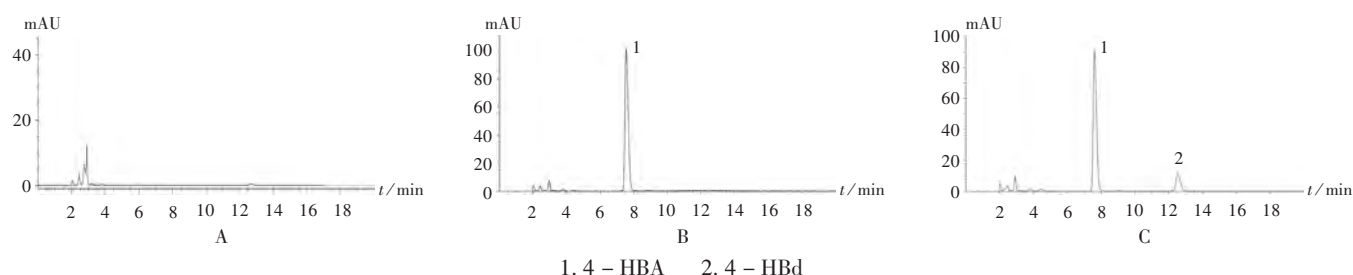
2.4.2 样品前处理

取全血样品,以13 000 r/min的转速于4℃离心10 min,取上层血浆100 μL,加入1 mL乙酸乙酯,涡旋振荡萃取2 min,4 000 r/min离心10 min,取乙酸乙酯层,残留物加入1 mL乙酸乙酯重复上述操作,合并2次乙酸乙酯层,氮气吹干,100 μL流动相涡旋振荡2 min复溶,13 000 r/min离心10 min,取上清液40 μL,进样。

2.4.3 方法学考察

专属性考察:分别考察空白血浆样品、含代谢物对照品血浆、给药后血浆样品,处理后,采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定,结果4-HBA的保留时间为7.8 min,4-HBA出峰良好,且无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:取9.98 mg 4-HBA,精密称定,置10 mL容量瓶内,加流动相定容,作为母液,稀释成质量浓度为998,499,249.50,124.75,62.38,31.19,15.59,7.80,3.90,1.95,0.97,0.49,0.24 mg/L的系列血浆样品。处理后,依法测定,作回归曲线,得4-HBA回归方程 $Y=0.010\ 09X-37.550\ 40$ ($R^2=0.999\ 56$),线性范



1. 4-HBA 2. 4-HBd
A. 空白血浆 B. 空白血浆 + 代谢物对照品溶液 C. 大鼠灌胃 4-HBd 血浆样品

图1 高效液相色谱图

围为 0.24 ~ 998 mg/L, 定量下限为 0.24 mg/L ($S/N > 9$)。

精密度和准确度考察: 制备高、中、低 3 个(质量浓度 499.00, 15.59, 0.49 mg/L)的 4-HBA 血浆质控样品。处理后, 采用 HPLC 法进行测定, 1 d 内平行操作 5 次, 连续测定 3 d。结果该方法的准确度在 85% ~ 115% 范围内, 精密度的 RSD 小于 15%, 符合要求。详见表 1。

表1 含 4-HBA 血浆的精密度和准确度试验结果 ($n = 5$)

质量浓度 (mg/L)	日内			日间		
	测量质量浓度 ($\bar{X} \pm s$, mg/L)	RSD (%)	准确度 (%)	测量质量浓度 ($\bar{X} \pm s$, mg/L)	RSD (%)	准确度 (%)
499.00	498.54 ± 1.09	0.22	99.91	497.97 ± 1.12	0.23	99.79
15.59	15.40 ± 0.28	1.82	98.74	15.47 ± 0.25	1.64	99.20
0.49	0.48 ± 0.02	3.54	99.46	0.48 ± 0.02	4.24	98.75

稳定性试验: 制备高、中、低 3 个质量浓度(499.00, 15.59, 0.49 mg/L)的 4-HBA 血浆质控样品。处理后, 分别在室温下放置 4 h、-20 °C 下放置 7 d、反复冻融 3 次, 采用 HPLC 法平行测定 5 次。结果准确度相对误差和 RSD 均小于 15%, 表明血浆中的 4-HBA 在以上 3 种条件下均能保持稳定。详见表 2。

提取回收率和基质效应测定: 1) 提取回收率。制备高、中、低 3 个质量浓度(499.00, 15.59, 0.49 mg/L)的血浆质控样品。处理后, HPLC 法测定所得峰面积记为 A_1 。另取大鼠空白血浆同法处理, 取上清液加入已吹干的 4-HBA 质控浓度溶液中, HPLC 法测定所得峰面积记为 A_2 。计算提取回收率(A_1/A_2)。2) 基质效应。取双蒸水代替空白血浆, 其余步骤同提取回收率项下 A_2 的处理方法, 采用 HPLC 法测定所得峰面积记为 A_3 。以 3 种质量浓度 2 种处理方法下所得峰面积比值(A_2/A_3)计算基质效应。结果血浆中提取回收率与基质效应均在 85% ~ 115% 范围内, RSD 小于 15%, 符合要求, 无明显

表2 含 4-HBA 血浆的稳定性试验结果 ($n = 5$)

质量浓度 (mg/L)	短期放置稳定性(25 °C, 4 h)			长期放置稳定性(-20 °C, 7 d)			冻融稳定性(-20 ~ 25 °C, 3 次)		
	测量值($\bar{X} \pm s$, mg/L)	准确度(%)	RSD(%)	测量值($\bar{X} \pm s$, mg/L)	准确度(%)	RSD(%)	测量值($\bar{X} \pm s$, mg/L)	准确度(%)	RSD(%)
499.00	498.67 ± 1.11	99.93	0.22	498.76 ± 1.17	99.95	0.23	498.70 ± 1.14	99.94	0.23
15.59	15.41 ± 0.29	98.80	1.89	15.39 ± 0.27	98.70	1.77	15.39 ± 0.28	98.68	1.84
0.49	0.48 ± 0.02	98.79	3.19	0.48 ± 0.02	98.99	4.77	0.48 ± 0.02	98.46	4.23

基质效应。详见表 3。

表3 含 4-HBA 血浆的提取回收率和基质效应(%)

质量浓度 (mg/L)	提取回收率		基质效应	
	$\bar{X} \pm s$	RSD	$\bar{X} \pm s$	RSD
499.00	92.34 ± 0.43	0.47	99.67 ± 0.74	0.74
15.59	93.78 ± 0.97	1.03	100.38 ± 0.91	0.91
0.40	92.16 ± 1.36	1.48	100.16 ± 1.51	1.51

2.5 灌胃 4-HBd 后代谢物 4-HBA 在大鼠体内的药动学特征

血药浓度-时间曲线: 灌胃 400 mg/kg 4-HBd 后代谢物 4-HBA 在大鼠体内的血药浓度-时间曲线见图 2。

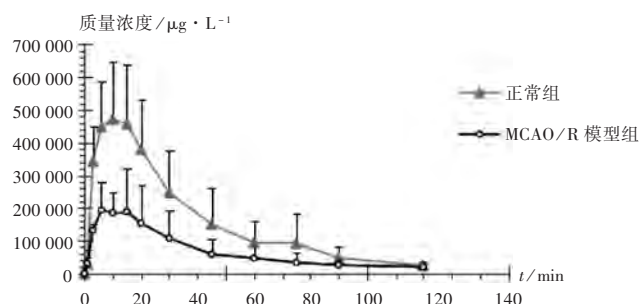


图2 大鼠灌胃 400 mg/kg 4-HBd 后代谢物 4-HBA 的血药浓度-时间均数曲线 ($n = 6$)

药动学参数: 大鼠灌胃 400 mg/kg 4-HBd 后代谢物 4-HBA 在大鼠体内的药动学参数见表 4。

2.6 统计学处理

采用 DAS 3.0 软件进行绘图并统计, 药动学参数均以非房室模型统计矩计算。

3 讨论

药物代谢是药动学研究中最复杂的部分, 是药物在体内消除的重要途径, 是药物在体内产生或失去药效与毒性的重要过程, 药物进入生物体后在药酶作用下与机

表4 4-HBA在大鼠体内的药动学参数($n=6$)

参数	正常组		MCAO/R模型	
	测量值($\bar{X} \pm s$)	RSD(%)	测量值($\bar{X} \pm s$)	RSD(%)
AUC_{0-12} ($\text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}$)	19 212.29 $\pm$ 8 874.60	46.2	8 224.46 $\pm$ 5 066.74	61.6
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}$)	20 336.89 $\pm$ 9 433.55	46.4	9 915.19 $\pm$ 5 942.32	59.9
MRT_{0-12} (min)	31.50 $\pm$ 6.50	20.6	32.73 $\pm$ 7.51	23.0
VRT_{0-12} (min^2)	684.70 $\pm$ 113.62	16.6	814.77 $\pm$ 183.33	22.5
$t_{1/2}$ (min)	31.81 $\pm$ 4.61	14.5	78.84 $\pm$ 43.21	54.8
$T_{\max}$ (min)	10.67 $\pm$ 5.24	49.1	8.83 $\pm$ 3.60	40.8
V_z/F (L/kg)	0.06 $\pm$ 0.03	59.6	0.34 $\pm$ 0.29	83.4
CL_z/F ($\text{L}/(\text{min} \cdot \text{kg})$)	0.001 $\pm$ 0.001	100.0	0.003 $\pm$ 0.002	66.7
$C_{\max}$ (mg/L)	513.20 $\pm$ 156.56	30.5	247.48 $\pm$ 122.20	49.4

注: AUC 为血药浓度-时间曲线下面积, MRT 为平均滞留时间, VRT 为滞留时间方差, $t_{1/2}$ 为半衰期, $T_{\max}$ 为达峰时间, V_z/F 为表观分布容积, CL_z/F 为清除率, $C_{\max}$ 为峰浓度。

体间发生一系列的相互作用,药物结构发生了改变^[11]。多数药物经代谢失去药理活性后随尿液或胆汁排出体外,但也有一些药物经代谢后药理活性增强或产生了毒性代谢产物,药物代谢对药物作用的强弱、作用持续时间、药物治疗的安全性等方面均有不同程度的影响^[11-12]。采用微透析技术对活体动物进行取样,具有实时、高效、在线的优势,对动物的损伤小,可在动物保持清醒的状态下连续取样,动态地监测内源性或外源性物质的浓度,获取真实、可靠的数据^[13-14]。

前期研究结果显示,4-HBd在正常大鼠体内 $AUC_{0-\infty}$ 为(59.14 $\pm$ 16.48) $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}$,在MCAO/R模型大鼠体内 $AUC_{0-\infty}$ 下降至(17.37 $\pm$ 5.78) $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}$,提示CIRI的病理状态影响4-HBd的药动学过程,4-HBd吸收进入血液循环的量减少到正常大鼠的30%,推测4-HBd形成了代谢产物进入血液循环。经鉴定,4-HBd的代谢产物为4-HBA。为考察4-HBd的代谢产物4-HBA的药动学特征,本研究中建立了4-HBA的HPLC分析方法,经验证,该方法的方法学考察结果均符合国家食品药品监督管理局对生物样品分析方法学考察的要求,可用于代谢物4-HBA在大鼠体内的药动学研究。同时,为了解CIRI的病理状态对4-HBA药动学过程的影响,本研究中采用线栓法复制大鼠MCAO/R模型模拟CIRI病理损伤,灌胃给予4-HBd后,对其代谢产物4-HBA的药动学特征进行了考察。结果显示,4-HBA在正常和MCAO/R模型大鼠体内分别在10.667 min和8.833 min达峰,半衰期分别为31.805 min和78.847 min。由于一分子的4-HBA是由一分子的4-HBd反应得来,且二者相对分子质量接近。因此,按代谢物与原形药物 AUC 的比值计算代谢率,在正常和MCAO/R模型病理状态下的代谢率分别约

为 $3.44 \times 10^4\%$ 和 $5.71 \times 10^4\%$ 。结果表明,灌胃4-HBd后,在大鼠血浆中的代谢物4-HBA的暴露量要明显大于4-HBd,且MCAO/R模型组的代谢率大于正常组,MCAO/R模型的病理状态会使4-HBA的代谢率增加,半衰期延长。由前期研究结果可知,4-HBd具有良好的脑保护作用,4-HBA无脑保护作用,4-HBd的绝对生物利用度低。认为4-HBd转化为代谢物这一过程可能在4-HBd产生脑保护作用中起到了重要作用。

为了明确产生代谢物的过程与脑保护作用指征性成分4-HBd与发挥脑保护作用的相关性,课题组后续将在前期研究基础上,进行4-HBd的代谢机制及4-HBA在大鼠体内的分布特征研究,明确其代谢部位和分布规律,并探讨其是否在特定部位发生代谢从而发挥脑保护作用,以期从药动学角度揭示4-HBd脑保护的机制。

参考文献:

- [1] 周晓楠,宋雪兰,李艳,等. 对羟基苯甲醛对脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国药理学通报,2017,33(12): 1729-1735.
- [2] 祝燕平,李欣,杜瑶,等. 对羟基苯甲醛对血脑屏障的保护作用及机制研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1021-1027.
- [3] 申婷,肖纯,向彬,等. 天麻成分对羟基苯甲醛抗血小板聚集的作用机制研究[J]. 中国药业,2017,26(18):4-7.
- [4] 周晓楠,宋雪兰,柳弯,等. 对羟基苯甲醛对神经元缺氧所致钙超载的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(8):1296-1301.
- [5] 向彬,肖纯,申婷,等. 对羟基苯甲醛可预防大鼠急性脑缺血后神经炎症[J]. 中成药,2017,39(8):1572-1576.
- [6] 刘珊珊,向彬,郭营营,等. 天麻成分对羟基苯甲醛抗炎作用及机制研究[J]. 中国民族民间医药,2016,25(9):16-17.
- [7] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20(1):84-91.
- [8] 何芳雁,韩春妮,李艳,等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要点及体会[J]. 实验动物科学,2013,30(4):46-48.
- [9] 许潇莹,冯霞. 改良线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的经验总结[J]. 特别健康,2017(13):89.
- [10] 饶梦琳,唐蜜,何锦悦,等. 芍药苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑血流量及 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ 平衡的影响[J]. 药学报,2014,49(1):55-60.
- [11] 温菁,方平飞. 液-质联用技术分析体内药物代谢物的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2017,52(21):1879-1883.
- [12] 冯平平. 微透析技术在药物动力学和药物代谢研究中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(63):115.
- [13] 韩慧婉,舒鸿钧,刘国淦. 微透析技术及其在应用[J]. 化学通报,2000,63(12):52-56.
- [14] 余露山,毕惠嫦,吴宝剑,等. 2018年中国药物代谢研究进展[J]. 药学报,2019,54(6):963-970.

(收稿日期:2020-05-27;修回日期:2020-07-15)