

高活性溴酚化合物 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮在大鼠体内的排泄特征研究

高 洁, 冯秀娥*, 梁 瑞, 李青山

山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘 要: 目的 建立反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定大鼠粪便和尿液中 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮(LM49), 并研究大鼠 ig 给予 LM49 后在粪便和尿液中的排泄特征。方法 采用甲醇提取生物样品中的 LM49, Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇/乙腈/水(磷酸调 pH 至 3.0) (68:5:27) 为流动相, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 261 nm, 柱温 25 °C。雄性 SD 大鼠单次 ig 给予 100 mg/kg 的 LM49 后, 收集 0~12、13~24、25~36、37~48 h 的粪便和尿液, 采用 RP-HPLC 法测定 LM49, 计算排泄量、排泄率、累积排泄率。结果 单次口服给予大鼠 100 mg/kg 的 LM49 后, 48 h 内 LM49 在粪便中的排泄主要集中在 13~36 h, 占整个排泄量的 77.4%, 累积排泄率为 13.9%; 其尿液中 0~12 h 的累积排泄率为 0.05%, 13~48 h 未检测到 LM49。结论 LM49 口服吸收不完全, 有较高的粪便排泄率, 原型尿排泄甚少, 推测可能被代谢分解或在组织器官中蓄积。

关键词: 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮; 排泄; 粪便; 尿液; 口服给药; 大鼠

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)06-0633-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.010

Excretion of 2, 5'-dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone, a bromophenol compound with high activity in rats

GAO Jie, FENG Xiu-e, LIANG Rui, LI Qing-shan

Shanxi Medical University, Shanxi Normal University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method to determine the content of 2,5'-dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone (LM49) in feces and urine of rats, and to study the excretion of LM49 after oral administration to rats. **Methods** LM49 was extracted from biological samples with methanol as extracting reagent, and separated on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (68:5:27, pH was adjusted to 3.0 with phosphoric acid) at a flow rate of 0.8 mL/min at 25 °C, and the detection wavelength was 261 nm. After the oral administration with LM49 (100 mg/kg) to male SD rats, the feces and urine were collected in 0—12 h, 13—24 h, 25—36 h, and 37—48 h. The concentration of LM49 in excretion samples was detected by RP-HPLC. And the content of excretion, excretion ratio and accumulative excretion ratio of LM49 were determined. **Results** After the oral administration with LM49 (100 mg/kg) to male SD rats, the excretion of LM49 in the feces was mainly accumulated in 13—36 h, the content of which attained to 77.4 % of the total excretion in the feces, and the accumulative excretion ratio of LM49 was 13.9 % within 48 h. The accumulative excretion ratio of LM49 was 0.05 % in the urine within 12 h, and LM49 was not detected in the urine after 13 h. **Conclusion** The oral absorption of LM49 is not complete with higher excretion rate in the feces and rare LM49 in the urine, which implies that LM49 is metabolized or stored in tissues and organs.

Key words: 2, 5'-dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone; excretion; feces; urine; oral administration; rat

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2013AA092903); 国家自然科学基金(81473100); 山西省自然科学基金(2013011060-2); 山西医科大学科技创新基金(01201116); 山西医科大学博士启动基金(B03201213)

作者简介: 高 洁(1989—), 男, 研究生。电话 13633449582 E-mail: 575801690@qq.com

*通讯作者 冯秀娥, 女, 副教授, 博士。电话: 13191058319 E-mail: xiuefeng@163.com;

李青山, 男, 博导, 教授。电话: 0351-4690322 E-mail: sxlqs2012@163.com

作为一种天然来源活性化合物,从海藻中提取到的溴酚类化合物具有显著的抗肿瘤、抗菌、降低血脂、降血糖和抗氧化等多种生物活性,是极具潜力的药物先导化合物^[1,2]。本课题组前期以此类化合物为先导,经系统结构优化获得了一个高活性新结构候选物 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮(LM49),该候选物对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤具有显著的保护活性^[3],有显著的抗大鼠动脉粥样硬化及心肌缺血再灌注损伤的作用^[4,5],显示了重要的应用开发价值。但其药动学特征,如在大鼠体内的排泄特征仍不清楚,制约了对其进一步研究。因此,本文探讨大鼠单次 ig 给予候选物 LM49 后,在粪便和尿液中的排泄特征,计算排泄量、排泄率、累积排泄率,为后续深入研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 试剂与实验动物

甲醇(一级色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司),乙腈(一级色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司),三蒸水,磷酸(天津市德恩化学试剂有限公司,AR),候选物 LM49(课题组合成,批号 20100302,质量分数 99.5%)及 LM49 对照品(课题组合成,三次重结晶,质量分数 99.9%)。SD 大鼠(雄性,体质量 220~240g,由山西医科大学实验动物中心提供)。

1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪,QL-901 微型旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),chibitan-II 高速电动离心机(日本),BT25S 电子天平(Sartorius),HC.TP 11B.5 托盘天平(北京医用天平厂),锥形瓶,大鼠灌胃针,一次性使用无菌注射器,微孔滤膜等。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-水(磷酸调 pH 至 3.0) (68:5:27) 为流动相,体积流量 0.8 mL/min,检测波长 261 nm,柱温 25 °C,进样 20 μL。

2.2 样品制备

2.2.1 尿液样品 取尿样 100 μL 于 1.5 mL 的 EP 管中,加入 100 μL 色谱甲醇。振摇 1 min,涡旋 1 min,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 150 μL,过滤,取续滤液 50 μL,按照“2.1 色谱条件”项直接进样。

2.2.2 粪便样品 称取真空干燥至恒重并研细的粪便样品 100 mg,置于 4 mL 的 EP 管中,加入 500 μL 色谱甲醇。振摇 1 min,涡旋 1 min,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 350 μL,过滤,取续滤液 50 μL,按照“2.1 色谱条件”项直接进样。

2.3 专属性实验

取大鼠空白尿液和干燥至恒重并研细的粪便,按照“2.2”方法操作后进样测定,记录空白样品色谱图。将 LM49 对照溶液加入空白尿液和粪便中,同法操作,记录色谱图。大鼠单次 ig 给予 100 mg/kg LM49 后收集到的尿液和粪便样品分别进样。可见内源性物质不干扰测定,LM49 的保留时间为 12.4 min,候选物 LM49 主峰与杂质峰的分离度大于 1.5,理论塔板数大于 5 000。见图 1 和图 2。

2.3 标准曲线的制备

配制标准溶液 精密称取 25 mg 干燥至恒重的 LM49 对照品于 5 mL 量瓶中,加色谱甲醇定容后混匀,得质量浓度为 5 g/L 的对照品贮备液,4 °C 储存备用,使用前逐级稀释。

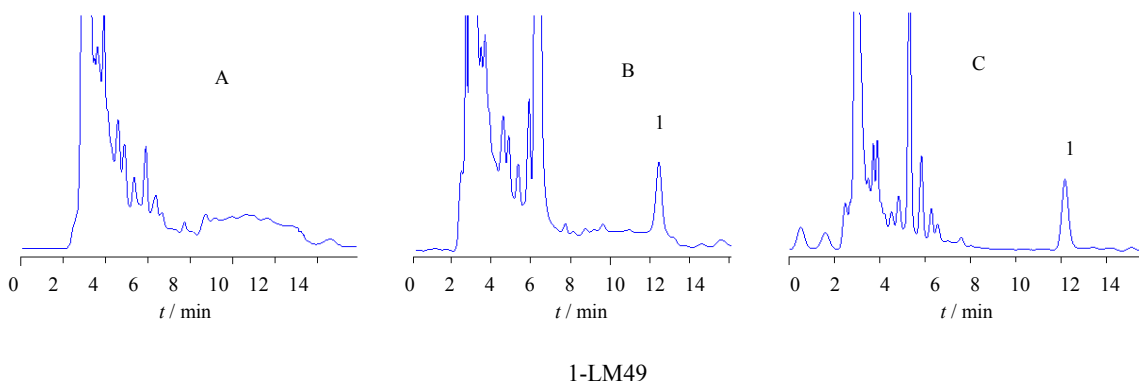


图1 空白粪便(A)、空白粪便+对照品(B)和 LM49 在给药后 12 h 的粪便样品(C)中的 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC of blank feces (A), blank feces + LM49 (B), and feces sample after 12 h of oral administration with LM49 to rats (C)

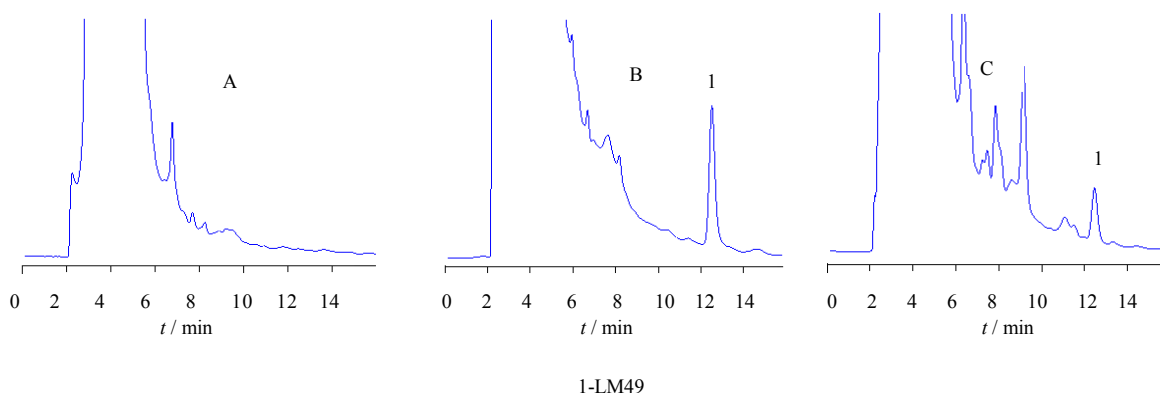


图2 空白尿液(A)、空白尿液+对照品(B)和LM49给药后12 h的尿液样品(C)的HPLC色谱图

Fig.2 HPLC of blank urine (A), blank urine + LM49 (B), and urine sample after oral administration with LM49 to rat 12 h (C)

尿液样品 精密量取LM49对照品溶液,用色谱甲醇稀释成浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10、15、20、50 mg/L的系列LM49对照溶液。收集正常SD大鼠空白尿液,取尿液100 μ L,共9份,其中1份加入100 μ L色谱甲醇作为空白对照,另外8份分别加入上述系列LM49对照溶液各100 μ L,按照“2.2样品的处理”项方法操作后,按照“2.1色谱条件”项进样测定。以对照品峰面积为纵坐标,以尿液中药物浓度(mg/L)为横坐标,进行线性回归。得标准曲线方程: $Y = 5.1322X - 2.4475$, $r = 0.9992$ 。结果表明在大鼠尿液中LM49在0.5~50 mg/L线性关系良好,最低检测浓度为0.2 mg/L,最低定量浓度为0.5 mg/L。

粪便样品 精密量取LM49对照品溶液,用色谱甲醇稀释成浓度为25、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000 mg/L的系列LM49对照溶液。收集正常SD大鼠空白粪便,干燥至恒重,称取研细的粪便100 mg,共9份,其中1份加500 μ L色谱甲醇作为空白对照,另外8份各加400 μ L色谱甲醇,再分别加入上述系列LM49对照溶液各100 μ L,按照“2.2样品的处理”项方法操作后,按照“2.1色谱条件”项进样测定。以对照品峰面积为纵坐标,以粪便中药物浓度(μ g/g)为横坐标,进行线性回归。得标准曲线方程: $Y = 5.246X - 88.056$, $r = 0.9954$ 。结果表明在大鼠粪便中LM49在25~5000 μ g/g线性关系良好,最低检测浓度为10 μ g/g,最低定量浓度为25 μ g/g。

2.4 精密度

取空白尿液和空白粪便加入不同浓度的对照品

溶液,配制低、中、高3个质量浓度1.0、10、20 mg/L的对照品尿液样品和100、500、2000 mg/L的对照品粪便样品,按照“2.2样品的处理”项处理,于日内每个浓度平行测定5次,计算日内精密度RSD分别为4.8%、1.9%、2.8%;5日内不同时间测定5次,计算日间精密度RSD分别为5.4%、2.3%、3.5%。粪便样品中日内精密度RSD值分别为6.5%、3.7%、5.4%,日间精密度RSD值分别为7.8%、3.2%、4.3%。

2.5 提取回收率

取空白尿液和空白粪便加入不同浓度的对照品溶液,配制1.0、10、20 mg/L的对照品尿液样品和100、500、2000 mg/L的对照品粪便样品,各质量浓度均平行处理5份样品,按照“2.1色谱条件”项进样测定。将各样品实测LM49峰面积与相应浓度LM49对照品溶液的主峰面积进行比较,计算提取回收率。1.0、10、20 mg/L的对照品尿液样品的平均提取回收率分别为73.7%、93.4%、86.3%;100、500、2000 mg/L的对照品粪便样品的平均提取回收率分别为82.1%、89.9%、79.5%。RSD值均大于70%,符合生物样品检定的要求。

2.6 排泄实验

雄性SD大鼠6只,体质量220~240 g。给药前禁食12 h,自由饮水。大鼠ig给予100 mg/kg的候选物LM49后,每只动物在代谢笼中单独饲养。收集给药前2 h的空白粪便和尿液,以及给药100 mg/kg后,0~12、13~24、25~36、37~48 h的粪便和尿液,粪便干燥后称质量,并记录尿液体积。按照“2.2样品的处理”项方法处理后,按照“2.1色谱条件”项进样分析,记录LM49的峰面积,根

据回归方程计算相应的药物浓度。计算出排泄量、排泄率及累积排泄率,见表1、2。在粪便中48 h的累积排泄率为13.9%,集中在13~36 h,占累积排泄量的77.4%;尿液中的排泄在0~12 h的累积排泄率为0.05%,在13~48 h未检测到LM49。

表1 大鼠单次ig给予100 mg/kg的LM49后在粪便中的排泄 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Excretion of LM49 in feces of rats after ig administration with 100 mg/kg LM49 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

取样时间/h	排泄量/ μg	平均排泄率/%	累积排泄率/%
0~12	317.5 $\pm$ 209.7	1.5 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.9
13~24	1 005.6 $\pm$ 734.7	5.4 $\pm$ 3.6	6.4 $\pm$ 3.1
25~36	1 213.4 $\pm$ 171.8	6.0 $\pm$ 1.5	12.4 $\pm$ 3.0
37~48	332.0 $\pm$ 291.9	2.1 $\pm$ 2.2	13.9 $\pm$ 1.9

表2 大鼠单次ig给予100 mg/kg LM49后在尿液中的排泄 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Excretion of LM49 in urine of rats after ig administration with 100 mg/kg LM49 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

取样时间/h	排泄量/ μg	排泄率/%	累积排泄率/%
0~12	9.1 $\pm$ 5.6	0.05 $\pm$ 0.03	0.05

3 讨论

3.1 流动相选择

根据LM49的结构特点及化学性质,进行色谱条件选择时,发现调节流动相水的pH为3.0时,可以显著改善LM49主峰的峰形,理论塔板数满足要求,加入乙腈,进一步改善峰形,最终确定色谱条

件为甲醇-乙腈-水(磷酸调pH至3.0)(68:5:27)。

3.2 LM49在尿液和粪便中的排泄

ig给予大鼠LM49后,12 h前排便量很少,可能与给药前禁食有关,这与相关文献相一致^[6]。48 h内LM49在粪便中的排泄主要集中在13~36 h,占整个排泄量的77.4%,说明36 h内吸收基本完成,但48 h内药物在粪便中的累积排泄率为13.9%。而在尿液中0~12 h的累积排泄率仅为0.05%,13~48 h未检测到LM49。研究表明LM49口服吸收不完全,有较高的粪便排泄率,原型尿排泄甚少,推测可能被代谢分解或在组织器官中蓄积。

参考文献

- [1] 郭书举,李敬,苏华,等.海藻中溴酚化合物研究进展[J].海洋科学,2010,34(4):89-94.
- [2] 卢伟伸,管华诗,徐珊珊,等.海洋溴酚类化合物的生物活性研究进展[J].中国海洋药物杂志,2010,29(6):56-63.
- [3] Zhao W Y, Feng X E, Ban S R, et al. Synthesis and biological activity of halophenols as potent antioxidant and cytoprotective agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 4132-4134.
- [4] 李青山,冯秀娥,班树荣.多羟基溴代二苯甲酮类化合物及其衍生物在治疗和预防动脉粥样硬化中的应用 ZL201210565382.3 [P]. 2014-09-17.
- [5] 李青山,王义,冯秀娥,等.两种溴酚类化合物及其药用盐在制备保护心肌缺血再灌注损伤药物中的应用 ZL201110292997.9 [P]. 2013-05-01.
- [6] 贾敏. Hemay014 在大鼠体内的药代动力学研究[D].重庆:重庆医科大学,2008.