

神经酸口服给药后在大鼠体内的药动学研究

黄和飞²，阳剑¹，李霖¹，徐湘婷¹，李孟莲¹，李波¹，吕小波^{2*}，张玲^{1*}

(1. 昆明医科大学药学院, 云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2. 昆明和合医学检验所, 云南昆明 650106)

摘要: 目的 考察神经酸口服给药后在大鼠体内的药动学。方法 分析采用 SUPELCO Ascentis Express F5 色谱柱 (10 cm×2.1 mm, 2.7 μ m); 流动相水-甲醇 (含 0.1% 甲酸); 体积流量 0.35 mL/min; 柱温 25 °C; 电喷雾离子源; 正离子扫描; 多反应监测模式。24 只大鼠随机分为对照组 (食用菜籽油) 及神经酸低、中、高剂量组 (30、60、120 mg/kg), 灌胃给药, 于 0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、14、24、36 h 采血, LC-MS/MS 法检测神经酸血药浓度, 计算主要药动学参数。结果 神经酸在 62.5~4 000.0 ng/mL 范围内线性关系良好 ($r=0.9994$), 加样回收率 95%~106%。口服给药后, AUC_{0-36h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 均随神经酸剂量增加而升高 ($P<0.01$); T_{max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT 分别为 10.44、5.24、12.52 h, 不同剂量组之间无显著性差异 ($P>0.05$)。结论 在 30~120 mg/kg 口服剂量范围内, 神经酸在大鼠体内的 AUC 、 C_{max} 呈现剂量依赖性, 符合一室模型药动学特征。

关键词: 神经酸; 体内药动学; 口服给药; LC-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-0936-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.033

蒜头果 *Malania oleifera* Chun et S. Lee 为铁青树科蒜头果属植物, 是我国特有、云南省特色植物, 其果实所含的神经酸含量高达 60% 以上, 是目前该成分含量最高的植物^[1-5]。神经酸是一种长链单不饱和 omega-9 脂肪酸, 最早在哺乳动物神经组织中发现^[3-8], 为大脑、神经发育及其正常功能维持所必需的营养物质, 在体内合成极少, 主要靠体外摄取补充^[7], 具有促进神经细胞增殖和分化、延缓大脑老化、增强学习记忆能力、调节血脂血糖、提高免疫等功能, 也是大脑神经组织和神经细胞的核心成分^[1-10], 同时抑郁、注意力缺陷障碍等神经系统疾病也与体内该成分含量相关^[6,11-12], 在医学领域研究价值很高。目前, 对植物型神经酸的研究尚处于起步阶段, 主要涉及其药理活性、提取、分离、制备等方面, 尚未涉及药动学, 故本实验建立 LC-MS/MS 法考察神经酸口服给药后在大鼠体内的药动学, 以期为后续相关药物开发提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 8050CL 高效液相色谱串联质谱仪 (日本岛津公司); 医用高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); MD200-2 氮吹仪 (杭州奥盛仪器有限公司);

XA105 电子天平 (十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); 多管涡旋振荡器 (杭州米欧仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 神经酸对照品 (纯度≥95%, 白色片状结晶) 由云南医科万正生物科技股份有限公司提供; 神经酸对照品 (纯度≥99%) 购于美国 Sigma 公司。甲醇 (色谱纯)、乙酸乙酯 (分析纯) (德国 Merck 公司); 水为蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 来源于昆明医科大学实验动物学部, 实验动物生产许可证号 SCXK (滇) K2020-0004。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 标准工作液 精密称取神经酸对照品 5 mg, 转移到 10 mL 量瓶中, 加入 8 mL 甲醇, 超声溶解 10 min 后定容至刻度, 即得 (质量浓度为 500 μ g/mL), 取适量, 流动相逐步稀释至 0.625、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 μ g/mL。

2.1.2 含药血浆对照品溶液 取 “2.1.1” 项下标准工作液各 100 μ L, 加到 900 μ L 大鼠空白血浆中, 即得 (外源

收稿日期: 2023-06-05

基金项目: 云南省基础研究计划 (昆医联合专项) [2019FE001 (-192)]; 云南省本科教育教学改革研究项目 (JG2023001)

作者简介: 黄和飞 (1989—), 男, 工程师, 研究方向为临床质谱检测方法开发和验证。Tel: 15812124255, E-mail: 464511258@qq.com

*通信作者: 吕小波 (1979—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为临床质谱检测方法开发和验证。Tel: 15825285720, E-mail: 237883996@qq.com

张玲 (1976—), 女, 博士生, 副研究员, 研究方向为药理学和毒理学。Tel: 13888136030, E-mail: 154318763@qq.com

性神经酸质量浓度分别为 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血浆随行质控样品中其低、中、高质量浓度分别为 0.12、0.40、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.3 供试品溶液 称取 360 mg 神经酸对照品至烧杯中，加入食用菜籽油搅拌均匀至 30 mL，得到 120 mg/10 mL 高剂量油溶液，取 15 mL，加入 15 mL 食用菜籽油，混匀，即得 60 mg/10 mL 中剂量油溶液，同法得到 30 mg/10 mL 低剂量油溶液。

2.2 LC-MS/MS 分析条件

保留时间/min	离子对	母离子 m/z	子离子 m/z	Dwell	Q1/V	碰撞能量/V	Q3/V
3.72	定量	367.30	349.45	200	-14	-13	-18
3.72	定性	367.30	57.20	200	-17	-28	-24

2.3 分组、给药与采血 参考文献 [13-15] 报道，24 只大鼠随机分为 4 组，分别为对照组（食用菜籽油）及神经酸低、中、高剂量组（30、60、120 mg/kg），禁食 16 h 后以 10 mL/kg 剂量灌胃给药，于给药前及给药后 0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、14、24、36 h 眼眶取血各 300 μL （其间每 4 h 灌胃给予生理盐水），4 000 r/min 离心 15 min，取上层血浆，在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.4 样品前处理 取“2.1.2”项下含药血浆对照品溶液或“2.3”项下血浆样品 100 μL ，置于 1.5 mL 离心管中，加入 800 μL 乙酸乙酯，涡旋混匀 5 min 后离心 10 min，取 700 μL 上清， N_2 吹干，100 μL 甲醇复溶后振荡混匀 1 min，高速离心 10 min，取上清液进行分析。

2.5 数据处理 通过 DAS 2.0 软件中的拟合一室模型计算主要药动学参数，SPSS 23.0 软件进行组间方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 取按“2.4”项下方法前处理的空白血浆、含药血浆对照品溶液（0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、含药血浆（24 h，30 mg/kg）适量，在“2.2”项条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，血浆中神经酸出峰时间一致，均在 3.7 min 左右，并且其色谱峰分离度和峰型均良好；空白血浆中可见内源性神经酸色谱峰，其质量浓度低于 30 ng/mL，对测定不会造成实质性干扰，表明该方法专属性良好。

3.1.2 基质效应试验 取不同体质量大鼠的空白血浆 6 份，按“2.4”项下方法前处理，提取空白基质，加入神经酸，制成低、中、高质量浓度，即 0.12、0.40、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，混匀，在“2.2”项条件下进样测定，以神经酸在空白基质血浆中的响应峰面积与不含基质甲醇中的响应峰面积比值为基质因子，测得 3 个质量浓度下分别为 90.83% ~ 114.17%、93.05% ~ 104.53%、91.24% ~ 107.30%，总基质因子为 99.47%，在 (100 ± 15)% 以内；RSD 分别为 8.82%、4.16%、5.58%，总 RSD 为 6.19%，均小于 15%，符合 2020 年版《中国药典》^[16] 所规定的生物样品定量分析方法验证指导原则。

2.2.1 色谱 SUPELCO Ascentis Express F5 C₁₈ 反向色谱柱（10 cm × 2.1 mm, 2.7 μm ）；流动相水-甲醇（含 0.1% 甲酸）（17 : 83）；体积流量 0.35 mL/min；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 20 μL 。

2.2.2 质谱 电喷雾离子源（ESI）；正离子扫描；多反应监测（MRM）模式；雾化气体积流量 3 L/min；加热气体积流量 10 L/min；接口温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ；DL 温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ；加热块温度 400 $^{\circ}\text{C}$ ；干燥器体积流量 10 L/min，其他参数见表 1。

表 1 神经酸质谱条件

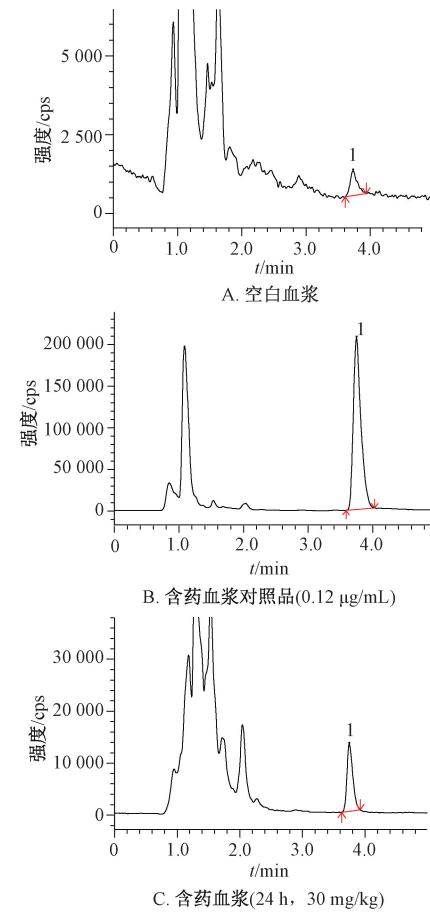


图 1 神经酸专属性色谱图

3.1.3 线性关系考察 按“2.1.2”项下方法制备标准工作液，在“2.2”项条件下各进样 20 μL 测定。以对照品峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，得方程为 $Y = 31 684.8X + 5.273 31$ ($r = 0.999 4$)，在 0.062 5~4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。再按 3 倍信噪比确定检测限为 0.31 ng/mL，10 倍信噪比确定定量限为 1 ng/mL，并且最低定量限低于 C_{max} 的 1/20~1/10，在 3~5 个 $t_{1/2}$ 后仍能检测，符合相关要求。

3.1.4 精密度、加样回收率试验 取不同时间段3批样品溶液(“3.1.2”项下低、中、高质量浓度),平行5份,采用同一台仪器于同一天内在“2.2”项条件下进样测定,计算日内精密度;同法测定3d,每天1次,计算日间精密度。取大鼠含药血浆适量,分别加入“3.1.2”项下低、中、高质量浓度样品溶液,按“2.4”项下方法前处理,在“2.2”项条件下进样测定3次,计算回收率。结果,低、中、高质量浓度下日内精密度RSD分别为3.44%、2.82%、3.54%,日间精密度RSD分别为5.12%、4.42%、5.32%,均小于15%,表明该方法精密度良好;神经酸平均加样回收率分别为(96.67±5.00)%、(95.75±0.75)%、(105.15±4.25)% ,均在(100±15)%以内。

3.1.5 稳定性试验 分别考察在4℃、室温、-80℃下放置1、3、6、9、12、24、48、72 h,以及在-80℃至室温下反复冻融5次时含药血浆稳定性,平行3份。结果,含药血浆在4℃下稳定性良好, RSD为2.67%;室温下神经酸含量RSD为6.30%,可稳定放置24 h;48、72 h神经酸含量略有下降;反复冻融3次后神经酸含量RSD为9.55%,但第4~5次时其含量逐渐降低, RSD升高。

3.2 体内药动学研究 单次灌胃给予30、60、120 mg/kg神经酸后,大鼠体内代谢过程均符合一室模型,给药前,大鼠血浆中神经酸含量RSD为38.73%,但对照组及各剂

量组无显著性差异($P>0.05$);对照组在不同时间点的神经酸含量也无显著性差异($P>0.05$),血药浓度-时间曲线见图2。

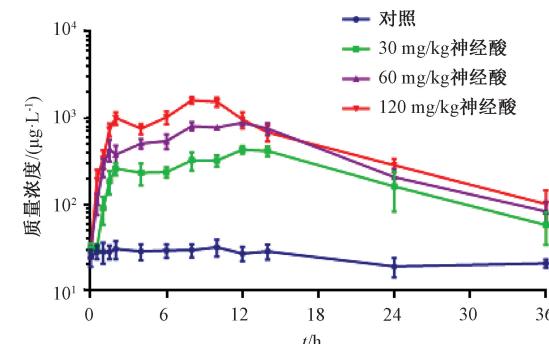


图2 神经酸血药浓度-时间曲线($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

采用基线校正法^[17-19], DAS 2.0软件中的拟合一室模型计算主要药动学参数,结果见表2,可知 AUC_{0-36h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 均随神经酸剂量增加而升高($P<0.01$); T_{max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT分别为10.44、5.24、12.52 h,不同剂量组之间无显著性差异($P>0.05$)。图3显示, AUC_{0-36h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 呈线性相关, R^2 分别为0.9506、0.9549、0.9986。

表2 神经酸主要药动学参数($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

参数	单位	低剂量组(30 mg/kg)	中剂量组(60 mg/kg)	高剂量组(120 mg/kg)
$t_{1/2}$	h	5.05±1.57	4.51±1.07	6.17±1.95
K_e	$1\cdot h^{-1}$	0.27±0.09	0.21±0.06	0.23±0.08
V_1/F	$L\cdot kg^{-1}$	67.47±25.25	45.52±9.36	65.97±13.41
CL/F	$L\cdot h^{-1}\cdot kg^{-1}$	13.07±4.78	7.59±0.96	10.19±2.10
AUC_{0-36h}	$ng\cdot h\cdot mL^{-1}$	7 282.93±1 265.77	14 345.99±581.03 **	20 620.56±1 601.48 **
$AUC_{0-\infty}$	$ng\cdot h\cdot mL^{-1}$	8 062.52±1 470.87	15 129.34±813.39 **	21 636.73±1 956.68 **
MRT_{0-36h}	h	13.18±1.32	12.83±0.41	11.53±0.68
$MRT_{0-\infty}$	h	14.23±2.12	14.52±0.79	12.97±1.33
T_{max}	h	11.33±1.12	11.00±1.00	9.00±0.45
C_{max}	$ng\cdot mL^{-1}$	491.80±26.76	959.12±31.91 **	1 764.34±93.03 **

注:与低剂量组(30 mg/kg)比较, ** $P<0.01$ 。

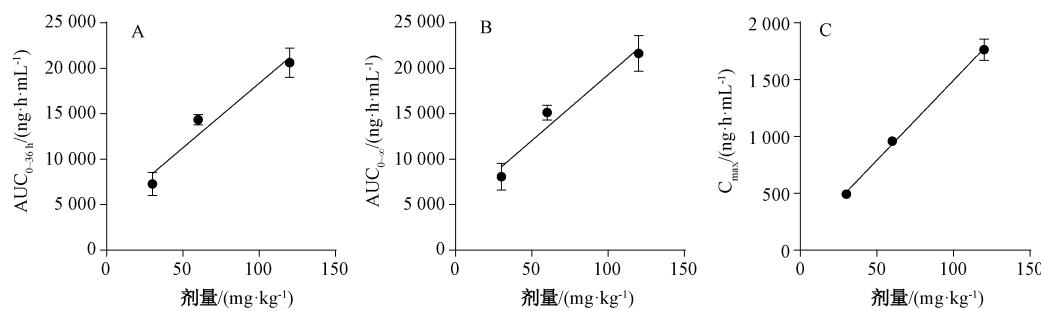


图3 AUC_{0-36h} (A)、 $AUC_{0-\infty}$ (B)、 C_{max} (C)与神经酸剂量的线性关系

4 讨论与结论

本实验采用乙酸乙酯进行液液萃取,提取率较高,并建立LC-MS/MS法测定大鼠血浆中神经酸血药浓度,其稳定性良好,符合定量分析要求^[15-16,19-20]。文献[11-12, 21-22]报道,人乳、血浆(清)中含有内源性神经酸,但个

体有差异;本实验采用大鼠混合空白血浆作为基质绘制标准曲线,排除了基底值干扰和基质效应,同时在药动学研究中采用基线校正法^[17-19],以对照组进行对点校正,即各剂量组血药浓度在所有采样时间点均减去对应时间点对照组血浆样品浓度平均值,以排除溶剂、节律等可能产生的

影响。

药动学结果显示,单次给予大鼠神经酸后血药浓度对数-时间曲线具有双峰现象,高剂量下更明显,可能与胃排空时间和/或肝肠循环有关。另外,神经酸药动学符合一室模型,在30~120 mg/kg口服剂量范围内AUC、 C_{max} 与剂量呈线性相关,即呈现剂量依赖性。

综上所述,本实验开展神经酸在大鼠体内药动学的研究,可为该成分进一步药效学机制考察及安全性评价提供参考,为防治神经系统疾病相关药物开发提供思路,同时也为云南省特色植物蒜头果开发利用、打造优势产品奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 蒲定福,冯自伟,郑仁健,等.神经酸来源新方向的探讨[J].中国油脂,2021,46(8):76-80;86.
- [2] 李洪果,黎云睦,邓振海,等.盾叶木籽营养成分分析[J].中国油脂,2023,48(3):130-134.
- [3] 玛依乐·艾海提,侯晨,孟永宏,等.神经酸的来源与功能研究进展[J].中国油脂,2019,44(10):105-109.
- [4] 刘速速,周庆礼,孙华,等.神经酸的功能及提纯工艺研究进展[J].中国油脂,2019,44(10):142-146.
- [5] Liu F, Wang P D, Xiong X J, et al. A review of nervonic acid production in plants: Prospects for the genetic engineering of high nervonic acid cultivars plants[J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 626625.
- [6] 谷颖卓.响应面优化超声辅助蒜头果中神经酸提取工艺及其HPLC分析[D].哈尔滨:东北林业大学,2020.
- [7] 赵立言,于炎冰,张黎.神经酸研究现状及前景[J].中华神经外科疾病研究杂志,2017,16(3):282-285.
- [8] He X, Li D Z, Tian B. Diversity in seed oil content and fatty acid composition in *Acer* species with potential as sources of nervonic acid[J]. *Plant Divers*, 2021, 43(1): 86-92.
- [9] Wu R, Zhong S Q, Ni M M, et al. Effects of *Malania oleifera* Chun oil on the improvement of learning and memory function in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 8617143.
- [10] Liu S S, Sun H, Zhou Q L, et al. Nervonic acid regulates the oxidative imbalance in experimental allergic encephalomyelitis [J]. *Food Sci Technol Res*, 2021, 27(2): 269-280.
- [11] Kageyama Y, Kasahara T, Nakamura T, et al. Plasma nervonic acid is a potential biomarker for major depressive disorder: a pilot study[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2018, 21(3): 207-215.
- [12] Kageyama Y, Deguchi Y, Hattori K, et al. Nervonic acid level in cerebrospinal fluid is a candidate biomarker for depressive and manic symptoms: A pilot study[J]. *Brain Behav*, 2021, 11(4): e02075.
- [13] Hung W L, Chang W S, Lu W C, et al. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution and excretion of tangeretin in rat[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 849-857.
- [14] Yang J L, Li Y Y, Li Y, et al. Effects of atorvastatin on pharmacokinetics of amlodipine in rats and its potential mechanism[J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(6): 685-688.
- [15] 罗毅,刘子夜,姚元成,等.复方西羚解毒胶囊中5种成分在大鼠血浆中体内药动学研究[J].中成药,2022,44(9):2773-2778.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版四部[S].北京:中国医药科技出版社.2020:466-471.
- [17] 曹国颖,朱孔彩,胡欣.内源性物质药物生物等效性评价的探讨[J].中国新药杂志,2012,21(13):1558-1561.
- [18] 王婷,蒋学华,王凌.HPLC-MS/MS测定大鼠血浆中谷氨酰胺的浓度及其应用[J].中国药学杂志,2015,50(3):253-257.
- [19] 代秋琼,刘红斌,崔佳丽,等.三七提取物大鼠体内3种皂苷成分测定方法建立及药代动力学研究[J].云南大学学报(自然科学版),2021,43(1):157-163.
- [20] 孙嘉辰,陈玉皎,吴玥婷,等.麦角甾醇在小鼠体内药代动力学及生物利用度[J].中成药,2015,37(5):965-970.
- [21] Yu J H, Yuan T L, Zhang X H, et al. Quantification of nervonic acid in human milk in the first 30 days of lactation: Influence of lactation stages and comparison with infant formulae [J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1892.
- [22] Vozella V, Basit A, Misto A, et al. Age-dependent changes in nervonic acid-containing sphingolipids in mouse hippocampus [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(12): 1502-1511.