

青蒿琥酯自微乳在大鼠体内的药动学研究

席建军^{1,2}, 张建康², 潘旭旺², 赵艳梅², 何若愚², 庄让笑^{2*}, 邱利焱^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中青蒿琥酯的 HPLC-MS/MS 测定方法, 并研究青蒿琥酯自微乳在大鼠体内的药动学特征。方法 12 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 单剂量分别灌胃(50 mg·kg⁻¹)青蒿琥酯自微乳和青蒿琥酯原料药, 以格列吡嗪为内标, 用 LC-MS/MS 测定给药后血浆中的药物浓度, 并计算药动学参数。结果 青蒿琥酯血浆样品的线性范围为 1.0~1 000.0 ng·mL⁻¹, 回归方程为 $A=294.74C-439.33$ ($r=0.999\ 6$), 定量下限为 1.0 ng·mL⁻¹。日内、日间变异系数(RSD)均 <10%, 符合生物样品的分析要求。青蒿琥酯原料药和青蒿琥酯自微乳的药动学参数 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 和 AUC_{0-t} 分别为: (87.6±8.80)ng·mL⁻¹, (1.88±0.33)h 和 (43.3±1.74)h·ng·mL⁻¹; (421±41.6)ng·mL⁻¹, (1.48±0.17)h 和 (282±17.7)h·ng·mL⁻¹。其中, C_{max} 和 AUC_{0-t} 存在显著性差异($P<0.01$)。结论 该方法简便灵敏, 可用于血浆中青蒿琥酯的含量测定, 经灌胃给药后, 与原料药比较, 青蒿琥酯自微乳能显著提高生物利用度。

关键词: 青蒿琥酯; 自微乳; 药动学; LC-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0385-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.017

Pharmacokinetics of Artesunate Self-microemulsion in Rats

XI Jianjun^{1,2}, ZHANG Jiankang², PAN Xuwang², ZHAO Yanmei², HE Ruoyu², ZHUANG Rangxiao^{2*}, QIU Liyan^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining the plasma concentration of artesunate in rat with LC-MS/MS, and study the pharmacokinetic parameters of artesunate self-microemulsion in rat. **METHODS** Twelve SD rats were randomly divided into two groups, which were gavaged with a single dose of artesunate self-microemulsion and artesunate API at the concentration of 50 mg·kg⁻¹. Afterwards, the drug plasma concentrations were determined by LC-MS/MS with glipizide as an internal standard, and pharmacokinetic parameters were calculated as well. **RESULTS** The linear ranges of artesunate was from 1.0 to 1 000 ng·mL⁻¹ with a regression equation: $A=294.74C-439.33$ ($r=0.999\ 6$), and the limit of quantitation was 1.0 ng·mL⁻¹. The intraday and inter-day variable coefficients were both <10%, which met the requirements of biological sample analyses. The C_{max} , $t_{1/2}$ and AUC_{0-t} values of artesunate self-microemulsion were (421±41.6)ng·mL⁻¹, (1.48±0.17)h and (282±17.7)h·ng·mL⁻¹ while with values of (87.6±8.80)ng·mL⁻¹, (1.88±0.33)h and (43.3±1.74)h·ng·mL⁻¹ for artesunate API. **CONCLUSION** The method for evaluating these pharmacokinetic parameters is simple and sensitive, which can be used for determining the content of artesunate in plasma. Besides, the bioavailability of artesunate self-microemulsion in rats is significantly improved after gavage administration compared to that of the artesunate API.

KEY WORDS: artesunate; self-microemulsion; pharmacokinetic; LC-MS/MS

青蒿琥酯, 化学名为二氢青蒿素-1, 2- α -琥珀酸单酯, 是抗疟药青蒿素的衍生物成分, 除具有明显的抗疟作用外, 还具有抗肿瘤^[1]、抗肝癌^[2]、免疫调节^[3]等多方面药理作用。但由于青蒿琥酯存在水溶性差、生物利用度低等问题, 导致其使用受到限制。自微乳制剂是由油相、乳化剂和助乳化剂组成的一种新型制剂, 能够显著提高药物的溶解性和口服生物利用度^[4], 从药物剂型方面来提高青蒿琥酯的溶解性和生物利用度。本研究以单

剂量灌胃青蒿琥酯自微乳和青蒿琥酯原料药, 考察青蒿琥酯自微乳在大鼠体内的药动学参数。

1 材料

1.1 仪器

液质联用仪由 AB-sciex6500 三重四极杆质谱仪、Shimadzu LC-30 AD 高效液相二元泵、Shimadzu SIL-30AC 自动进样器、Shimadzu CTO-20A 柱温箱以及 Shimadzu CBM-20A 脱气机组成; Agilent 1200 液相色谱仪(美国安捷伦公司), G1315D 二极

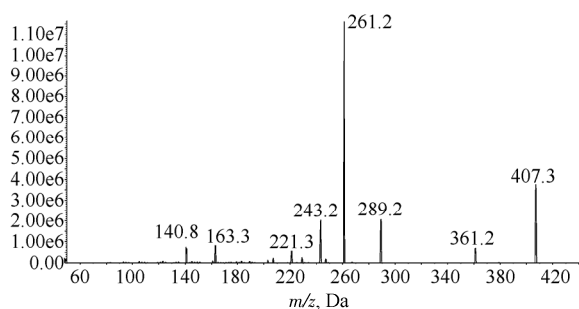
基金项目: 杭州市医疗科研及重点专科专病项目(20110733Q20); 杭州市重大科技项目(20142013A60)

作者简介: 席建军, 男, 硕士生, 主管药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: 360550573@qq.com *通信作者: 庄让笑, 男, 主任药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: zhuangrangxiao@sina.com 邱利焱, 女, 教授, 博导 Tel: (0571)87952046 E-mail: lyqiu@zju.edu.cn

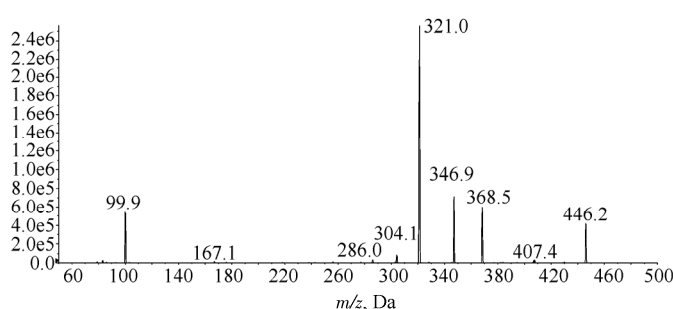
管阵列检测器; XP26 电子天平(瑞士梅特勒); -70 °C超低温冰箱(美国 Thermo Fisher); 5810R 低温冷冻离心机(德国 Eppendorf); VXR 小型摇床(德国 IKA); Vortex 振荡器(德国 IKA); KQ5200DA 超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

青蒿琥酯原料药(阿拉丁试剂上海有限公司, 批号: H1202009, 纯度>98%); 青蒿琥酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100200-201003, 纯度: 99.7%); 青蒿琥酯自微乳自制(处方的比例为油酸乙酯 10%, Cremophor EL 54%, 正丁醇 36%, 青蒿琥酯质量分数为 50 mg·g⁻¹); 格列吡嗪(内标, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: MKBT4419V, 纯度≥98%); 乙腈(HPLC 级, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲酸(HPLC 级, 德国 Merck 公司); Milli-Q 超纯水(睿智化学)。其他化学试剂均为分析纯。



青蒿琥酯二级全质谱扫描图



格列吡嗪二级全质谱扫描图

图 1 青蒿琥酯和格列吡嗪二级全质谱扫描图

Fig. 1 ESI-MS/MS product ion spectra of artesunate and glipizide

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流速: 0.60 mL·min⁻¹; 进样体积: 2.0 μL; 柱温箱: 50 °C; 流动相 A: 水-0.05%甲酸, 流动相 B: 乙腈-0.05%甲酸, 梯度洗脱: 0.20~0.60 min, 90%→10%A, 0.60~1.30 min, 10%A, 1.30~1.31 min, 10%→90%A, 1.31~1.80 min, 90%→0%A。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取青蒿琥酯对照品 1.0 mg, 加 MeOH/DMSO(80:20)配制 1 mg·mL⁻¹的青蒿琥酯标准贮备液, 置于 4 °C 冰箱备用。测定时, 将贮备液用 MeOH 稀释成 0.02, 0.04, 0.2, 0.6, 2, 6, 18, 20 μg·mL⁻¹的系列标准溶液, 置于 4 °C 冰箱备用。

2.4 内标溶液的配制

精密称取格列吡嗪对照品, 用乙腈配置成 20 ng·mL⁻¹的溶液, 4 °C 保存备用。

1.3 实验动物

SD 大鼠 12 只, ♀♂各半, 6~7 周龄, 体质量 185~207 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: 2015000516514。

2 方法

2.1 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 检测方式: 正(+)离子方式检测; 扫描方式: 多反应监测(MRM); 离子源温度: 550 °C; 离子源电压: 5 500 V; GS₁: 60 psi, GS₂: 60 Psi; 气帘气: 40 psi, 碰撞气: 8 psi。青蒿琥酯的解簇电压(DP): 40 V, 碰撞电压(CE): 20 V; 格列吡嗪的解簇电压(DP): 35V, 碰撞电压(CE): 20 V。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 407.3→261.2(青蒿琥酯)和 m/z 446.2→321.0(内标, 格列吡嗪), 青蒿琥酯和格列吡嗪的二级全质谱扫描图见图 1。

2.5 血浆样品处理

将全血置于用肝素钠抗凝的离心管中, 在 4 °C 下, 4 600 r·min⁻¹离心 5 min, 分离血浆, 取血浆 20 μL, 精密加入 20 ng·mL⁻¹格列吡嗪溶液(内标)200 μL, 涡旋混合 10 min, 5 800 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清液 2 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.6 药动学给药方案及样品采集

SD 大鼠 12 只, 给药前禁食过夜, 随机分为 2 组, 每组 6 只, 采用灌胃方式分别给予青蒿琥酯自微乳(50 mg·kg⁻¹)和相应剂量的青蒿琥酯原料药(用 0.5% CMC-Na 配制成混悬液), 分别在给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 h 时间点尾静脉采血 0.2 mL, 置于用肝素钠抗凝的离心管中, 在 4 °C 下, 4 600 r·min⁻¹离心 5 min, 分离血浆, 先将血浆置于干冰中冻存, 然后转移至-70 °C 冰箱长期保存直至样品分析。

2.7 数据处理方法

根据药物浓度-时间数据,采用 WinNonlin 6.2 软件(美国)按非房室模型计算青蒿琥酯的药动学参数,低于 80%定量下限(即 $<0.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的数据不参与药动学参数的计算。

3 结果

3.1 色谱行为

分别测定大鼠空白血浆,含青蒿琥酯对照品

的含药血浆以及大鼠灌胃给药后 1 h 后的血浆样品,比较色谱图。在该分析条件下,青蒿琥酯和内标格列吡嗪能同时被检测到,二者保留时间分别为 1.01 min 和 0.95 min;血浆中内源性成分不干扰青蒿琥酯的测定,典型色谱图见图 2。

3.2 线性关系

取大鼠空白血浆 190 μL ,再加入“2.3”项下不同质量浓度的青蒿琥酯对照品溶液 10 μL ,漩涡

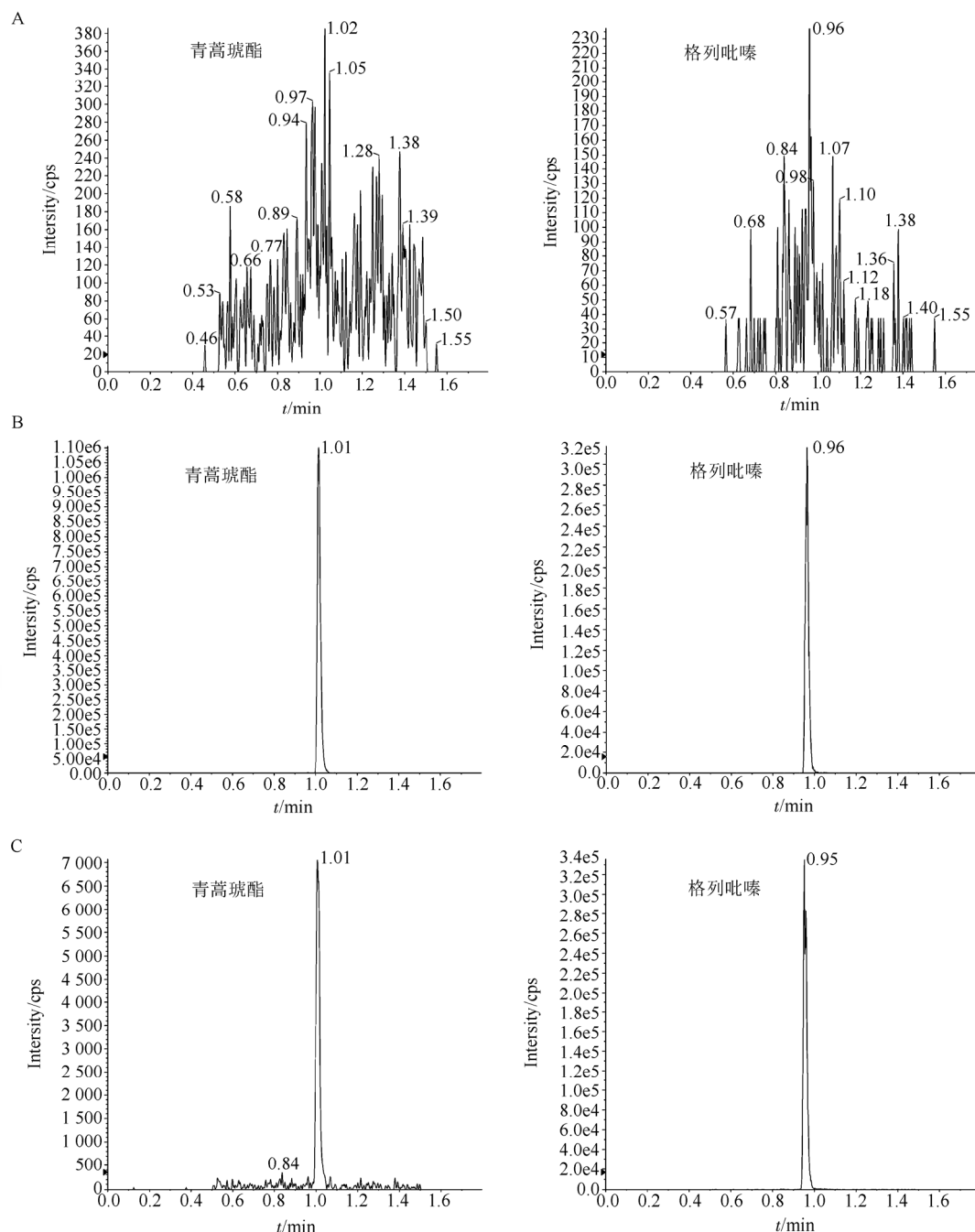


图 2 典型色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加入青蒿琥酯和格列吡嗪; C-血浆样品(给药后 1 h)。

Fig. 2 Typical chromatograms

A-blank serum; B-blank serum mixed with artesunate and Glipizide; C-serum sample(after administered 1h).

混匀制备成青蒿琥酯浓度依次为 1.0, 2.0, 10.0, 30.0, 100.0, 300.0, 900.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样本, 按“2.5”项下方法处理样品进样分析, 以青蒿琥酯的血药浓度(C)为横坐标, 青蒿琥酯峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(A)进行回归, 得到回归方程: $A=294.74C-439.33(r=0.999\ 6)$ 。青蒿琥酯血浆浓度在 1.0~1 000.0 ng·mL⁻¹内线性关系良好, 定量下限(LLOQ)青蒿琥酯浓度为 1.0 ng·mL⁻¹。

3.3 精密度与准确度

取大鼠空白血浆 190 μL, 再加入“2.3”项下不同浓度青蒿琥酯对照溶液 10 μL, 配成 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品, 按“2.5”项下方法处理样品进样分析, 记录样品峰面积并计算浓度, 每个浓度平行 5 份, 在同 1 d 内不同时间测定, 得到日内精密度; 日间精密度同上制备血浆样品进样分析, 每天测定 1 次, 连续 5 d, 得到日间精密度。结果表明青蒿琥酯在该色谱条件下精密度良好, 结果见表 1。

3.4 回收率

取大鼠空白血浆 190 μL, 再加入“2.3”项下不同浓度青蒿琥酯对照溶液 10 μL, 配成 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品, 按“2.5”项下方法处理样品进样分析, 并记录样品峰面积并计算浓度 C_1 ; 另取不同浓度的青蒿琥酯对照溶液 10 μL, 用流动相稀释制成相应浓度的标准样品(S)直接进样分析, 记录样品峰面积并计算浓度 C_2 , 计算提取回收率。结果 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品的提取回收率分别为(89.7±7.75)%, (93.9±7.47)%和(97.3±4.17)%, RSD 分别为 8.64%, 7.96%和 4.30%。

表 1 精密度与准确度结果(n=5)

Tab. 1 The results of accuracy and precision(n=5)

青蒿琥酯/ng·mL ⁻¹	日内精密度			日间精密度		
	测得量/ng·mL ⁻¹	准确度/%	RSD/%	测得量/ng·mL ⁻¹	准确度/%	RSD/%
10.0	9.68±0.45	96.8	3.39	9.61±0.76	96.10	7.96
100.0	100.41±2.44	100.4	2.43	99.05±2.45	99.05	2.47
1 000.0	995.83±12.74	99.6	1.28	1 004.55±31.63	100.5	3.15

表 2 稳定性结果(n=5)

Tab. 2 The results of stabilities(n=5)

青蒿琥酯/ng·mL ⁻¹	室温储存		4℃储存		反复冻融	
	测得值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	测得值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	测得值/ng·mL ⁻¹	RSD/%
10.0	9.28±0.56	6.01	9.45±0.55	5.82	9.10±0.70	7.72
100.0	98.81±1.91	1.94	99.43±2.11	2.13	99.31±2.08	2.10
1 000.0	989.63±17.31	1.75	986.36±14.23	1.44	994.82±12.99	1.31

3.5 基质效应

以提取后添加法对基质效应进行考察, 取不同大鼠空白血浆 190 μL, 按“2.5”项下方法处理样品后, 再加入“2.3”项下不同浓度青蒿琥酯对照溶液 10 μL, 配成 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品(即为提取后添加样品 C); 另按照“3.4”项下制备对应浓度的标准样品(S)。测得添加样品(C)和标准样品(S)的峰面积并计算浓度, 然后计算基质效应=(C/S)×100%, 结果 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品的基质效应分别为 95.1%, 100.2%和 98.4%, RSD 分别为 3.89%, 1.74%和 2.42%。表明在上述色谱条件下, 青蒿琥酯不存在明显的基质效应。

3.6 稳定性

取大鼠空白血浆 190 μL, 再加入“2.3”项下不同浓度青蒿琥酯对照溶液 10 μL, 配成 10.0, 100.0 和 1 000.0 ng·mL⁻¹的血浆样品, 然后将血浆样品室温放置 6 h 后测定稳定性; 4℃储存 24 h 后测定稳定性; -70℃冰箱储存 14 d 及反复冻融 3 次后测定稳定性, 血浆样品按“2.5”项下方法处理样品进样分析, 每个浓度样品平行测定 5 份。结果发现血样中青蒿琥酯在室温放置 4 h、4℃储存 24 h, -70℃冰箱储存 14 d 反复冻融 3 次后均保持稳定, 结果见表 2。

3.7 药动学参数

2 组大鼠分别单次灌胃 50 mg·kg⁻¹青蒿琥酯自微乳和青蒿琥酯原料药后, 血药浓度采用 WinNonlin 6.2 软件按非房室模型计算青蒿琥酯的药动学参数, 结果见表 3, 青蒿琥酯平均血药浓度-时间曲线见图 3。

表3 青蒿琥酯药动学参数(n=6)

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of artesunate(n=6)

参数	青蒿琥酯原料药	青蒿琥酯自微乳
T_{max}/h	0.25	0.25
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	87.6 ± 8.80	421 ± 41.6
$t_{1/2}/h$	1.88 ± 0.33	1.48 ± 0.17
$AUC_{0 \rightarrow t}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	43.3 ± 1.74	282 ± 17.7
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	49.2 ± 2.08	286 ± 18.3

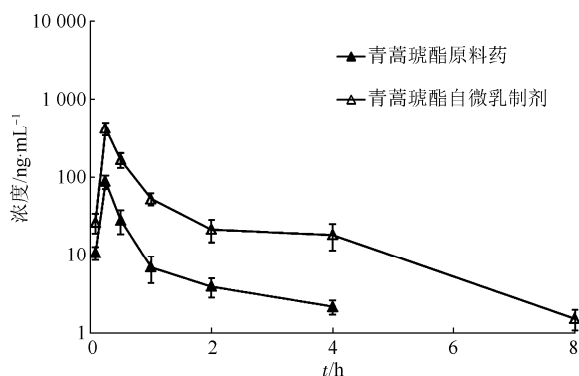


图3 大鼠灌胃给予青蒿琥酯自微乳和青蒿琥酯原料药的药时曲线(n=6)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of artesunate in 12 rats after intragastric administration of artesunate self-microemulsion and artesunate suspension(n=6)

由上述主要药动学参数可知,青蒿琥酯自微乳的AUC是原料药的6.5倍,青蒿琥酯自微乳的 C_{max} 和 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 与青蒿琥酯原料药相比较显著增加,将青蒿琥酯制成自微乳制剂,其生物利用度显著提高。

4 讨论

本研究建立大鼠血浆中青蒿琥酯的LC-MS/MS测定方法,以乙腈-水、乙腈-冰醋酸水和甲醇-水的不同比例的流动相进行等度或梯度洗脱,比较不同流动相条件下的色谱图,最终选用流动相A(水-0.05%甲酸)和流动相B(乙腈-0.05%甲酸)进行梯度洗脱,在流动相中加入0.05%的甲酸,不仅可以抑制青蒿琥酯结构中羧基的电离,而且还可以有效改善峰形^[5],而且内源性物质对青蒿琥酯无干扰。

药动学实验通过大鼠单剂量灌胃青蒿琥酯原料药和青蒿琥酯自微乳后, C_{max} 、 $t_{1/2}$ 和 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 分别为: $(87.6 \pm 8.80)ng \cdot mL^{-1}$ 、 $(1.88 \pm 0.33)h$ 和

$(43.3 \pm 1.74)h \cdot ng \cdot mL^{-1}$; $(421 \pm 41.6)ng \cdot mL^{-1}$ 、 $(1.48 \pm 0.17)h$ 和 $(282 \pm 17.7)h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ 。其中, C_{max} 和 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 存在显著性差异($P < 0.01$),而 $t_{1/2}$ 两者区别不大;江静舟等^[6]采用同位素稀释液相色谱-串联质谱法,对46名中国男性健康受试者单次口服青蒿琥酯/阿莫地喹双层片(100/270 mg)后,对不同时间点血浆中青蒿琥酯及其代谢产物双氢青蒿素的含量进行测定分析,结果二者 t_{max} 、 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 和 $t_{1/2}$ 分别为 $(0.33 \pm 0.15)h$ 和 $(0.50 \pm 0.17)h$; $(186.4 \pm 84.5)h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ 和 $(1166 \pm 369)h \cdot ng \cdot mL^{-1}$; $(0.50 \pm 0.23)h$ 和 $(1.17 \pm 0.22)h$;沈雪松等^[7]采用薄膜分散法将青蒿琥酯制备成纳米脂质体后,采用紫外法对青蒿琥酯脂质体和原料药在大鼠体内药动学性质进行测定,结果其血药浓度-时间数据符合单室模型,两者的AUC分别为 $1708.40 \mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$ 和 $446.703 \mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$, t_{max} 分别为4.21 h和0.7 h,从以上药动学参数比较可以看出,青蒿琥酯自微乳可以显著提高青蒿琥酯的口服生物利用度。

REFERENCES

- [1] WU F H, GE W, ZHOU X J, et al. Effects of artesunate on cell proliferation and apoptosis in human gastric cancer HGC27 cells and its mechanisms [J]. China Med Her(中国医药导报), 2014, 11(5): 9-12.
- [2] JIN M H, SHEN X S, ZHAO C X. On the anti-HepG2 cells effect of artesunate nano-liposomes [J]. Acta Med Sin(华夏医学), 2011, 24(6): 638-642.
- [3] MEI X, LIU J, BAI M, et al. Immunosuppressive and regulatory mechanism of artesunate [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(11): 878-883.
- [4] RU R P, SUN Y, LI S L. Preparation of glycyrrhizic acid phospholipid complex self-emulsifying drug delivery system [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 63-68.
- [5] LI J Y, MIAO F R, LIN L, et al. Determination of brucine and strychnine in rat after cutaneous administration of Semen Strychni niosome gel by LC-MS/MS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(6): 853-857.
- [6] JIANG J Z, YAO L, ZHANG M Q, et al. Isotope dilution LC-MS/MS methods for determination of artesunate and dihydroartemisinin in human plasma [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2013, 32(12): 970-974.
- [7] 沈雪松, 徐伟, 金美华, 等. 青蒿素类纳米脂质体在大鼠体内的药动学研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 384-386.

收稿日期: 2016-06-13

(本文责编: 曹粤锋)