

α -倒捻子素脂质体的药动学研究

吴飞跃¹, 林玳¹, 顾卓珺¹, 郑怀宇¹, 傅军^{2*} (1.舟山医院药剂科, 浙江 舟山 316000; 2.同济大学附属第十人民医院药学部, 上海 200072)

摘要: 目的 采用 LC-MS/MS 考察 α -倒捻子素脂质体的药动学特征。方法 采用 SPF 级 ICR 小鼠, ♀, 尾静脉注射 α -倒捻子素脂质体 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用 LC-MS/MS 测定 α -倒捻子素血药浓度, 并计算其药动学参数。结果 α -倒捻子素线性范围为 $5 \sim 1\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.997\,6$), 定量限为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 日内、日间精密度均 $<11.0\%$ 。主要药动学参数: $t_{1/2}$ 为 $(0.99 \pm 0.12) \text{ h}$, C_{max} 为 $(1\,524.60 \pm 323.82) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, AUC_{0-t} 为 $(645.84 \pm 63.74) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, MRT 为 $(0.70 \pm 0.11) \text{ h}$, CL 为 $(4.80 \pm 0.45) \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, Vd 为 $(6.80 \pm 1.00) \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结论 该法操作简便、快速、灵敏, 可用于测定小鼠血浆中 α -倒捻子素浓度。本研究结果可为药物的进一步研究提供依据。

关键词: α -倒捻子素; 脂质体; 液相色谱-质谱; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)05-0703-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.015

引用本文: 吴飞跃, 林玳, 顾卓珺, 等. α -倒捻子素脂质体的药动学研究[J]. 中国现代应用药理学, 2017, 34(5): 703-705.

Study on Pharmacokinetics of α -Mangostin Liposome

WU Feiyue¹, LIN Dai¹, GU Zhuojun¹, ZHENG Huaiyu¹, FU Jun^{2*} (1. Department of Pharmacy, Zhoushan Hospital, Zhoushan 316000, China; 2. Department of Pharmacy, the Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a sensitive and specific LC-MS/MS method for investigating the pharmacokinetics characteristic of α -mangostin liposome in mice. **METHODS** ICR mice were given in tail vein α -mangostin $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The α -mangostin concentration was determined by LC-MS/MS and pharmacokinetic parameters was calculated. **RESULTS** The linearity ranged from 5 to 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.997\,6$). The detection of α -mangostin was $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The RSDs within day and between days were $<11\%$. The main pharmacokinetic parameters of $t_{1/2}$, C_{max} , AUC_{0-t} , MRT , CL and V_{ss} were $(0.99 \pm 0.12) \text{ h}$, $(1\,524.60 \pm 323.82) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(645.84 \pm 63.74) \text{ ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(0.70 \pm 0.11) \text{ h}$, $(4.80 \pm 0.45) \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, and $(6.80 \pm 1.00) \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** The precision, accuracy and recovery of the method are found to be adequate for pharmacokinetic studies. The results can provide the basis for future research.

KEY WORDS: α -mangostin; liposome; LC-MS/MS; pharmacokinetics

α -倒捻子素从藤黄科藤黄属植物山竹(*Garcinia mangostana* L.)果壳中分离获得, 是具生物活性的咕吨酮类化合物。体外研究表明, α -倒捻子素生物活性广泛, 具有抗炎^[1], 抑制细菌生长^[2], 降低 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的聚集程度^[3]及抑制 VEGF 诱导的血管生成^[4]等作用。 α -倒捻子素脂质体是 α -倒捻子素被包裹于形态稳定的脂质体中, 使其在体内的循环时间延长, 同时由于其粒径较小, 更有利于穿过血脑屏障, 到达脑部。为此, 本实验建立了检测血浆中 α -倒捻子素的 LC-MS/MS 方法, 并对其药动学特征进行研究, 为其临床应用提供参考。

1 仪器与试剂

API4000 Qtrap 质谱仪(美国 ABI 公司)及 Analysis1.3 数据处理系统; 微量分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; SI-A256 涡旋振荡器

(Scientific Industries); 多管涡旋振荡器(美国 Fisher Scientific); 5417R 小型台式高速冷冻离心机(Eppendorf); KQ-2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); RE-52C 旋转蒸发仪(上海亚光仪器有限公司); JY92-II 超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究)。

甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(美国 TEDIA); DMSO(美国 SIGMA-ALDRICH); 水为去离子水。 α -倒捻子素(批号: 20130719, 纯度 $>99\%$)和内标 KTR3186(批号: 20121105, 纯度 $>98\%$)由杭州博麦医药科技有限公司提供。二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)购自美国 Avanti Polar Lipids 公司; 胆固醇(CH, 美国 Sigma 公司)。

SPF 级 ICR 小鼠, ♀, 体质量 $18 \sim 22 \text{ g}$, 由上

基金项目: 舟山市医药卫生科技计划(2015G02)

作者简介: 吴飞跃, 男, 副主任药师 Tel: (0580)2290410 (021)66301147 E-mail: fujun_shsy@aliyun.com

Email: wfy009@163.com

*通信作者: 傅军, 男, 副主任药师

Tel:

海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。动物许可证号: SCXK(沪)2008-0016。

2 方法与结果

2.1 α -倒捻子素脂质体制备

用电子分析天平精确称取 DSPC 50 mg、CH 10 mg、DSPE-PEG2000 7.5 mg、DSPE-PEG2000-COOH 3 mg, 溶于 25 mL 氯仿中, α -倒捻子素 5 mg(药脂比 1:12)也溶解其中, 在 60 °C 条件下旋蒸, 成膜后加入 15 mL 生理盐水进行水化, 水化约 1 h 后, 形成淡黄色均匀的乳状液体。水浴超声 15 min, 探头超声 100 W, 30 次, 工作 2 s, 间隔 3 s。制备好后置于 4 °C 冰箱备用。制备的脂质体各项参数: 粒径(207 ± 8.54)nm、多分散指数(PDI) 0.412 ± 0.064 、包封率(89.1 ± 5.2)%、载药量(6.61 ± 1.4)%、电位(-17.85 ± 6.0)mV。

2.2 药动学研究

2.2.1 色谱和质谱条件 Agela Venusil XBP C₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 5 μ m), 室温。流动相为乙腈-水(70:30, 含 0.1%甲酸), 流速为 0.5 mL \cdot min⁻¹, 进样量: 10 μ L。质谱条件为 APCI 离子喷射电压 5 000 V, 温度 400 °C, 碰撞能量(CE): 46 V (α -倒捻子素)和 19 V(内标)。采用正离子检测, 选择离子反应监测(MRM)方式, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 411.3 \rightarrow 397.1(α -倒捻子素), m/z 551.2 \rightarrow 419.4(内标)。

在以上检测条件下, α -倒捻子素和内标的保留时间分别为 1.75 min 和 1.15 min。小鼠空白血浆中内源性物质和代谢物不干扰待测物及内标物的测定, 内标响应稳定, 结果见图 1。

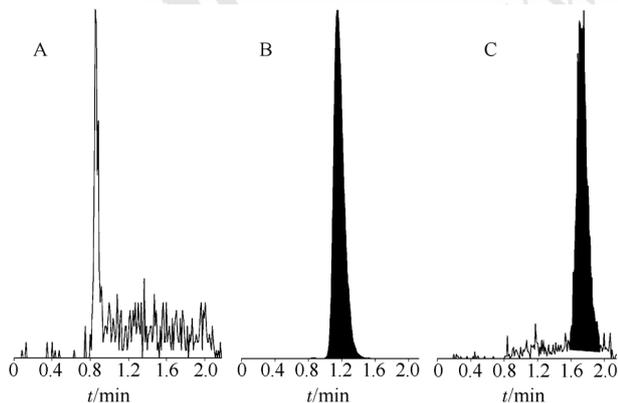


图 1 α -倒捻子素和内标的代表性色谱图

A-空白血浆; B-内标; C- α -倒捻子素(50 ng \cdot mL⁻¹)。

Fig. 1 Representative chromatogram of α -mangostin and IS
A-blank plasma sample; B-IS; C- α -mangostin(50 ng \cdot mL⁻¹).

2.2.2 溶液的配制 准确称取 10.0 mg α -倒捻子素于 25 mL 量瓶中, 加入少量 DMSO 涡旋使其完

全溶解, 乙腈定容, 配制成浓度为 0.4 mg \cdot mL⁻¹ 储备液。将 10.0 mg 内标物全部转移至 25 mL 量瓶中, 乙腈定容, 得到浓度为 0.4 mg \cdot mL⁻¹ 内标储备液。

2.2.3 血浆样品处理方法 取 20 μ L 血浆样品至 1 mL EP 管中, 加入 180 μ L 乙腈(含内标, 内标终浓度为 20 ng \cdot mL⁻¹), 涡旋 3 min 后离心 3 min (10 000 \times g)。取上清液进样 10 μ L。

2.2.4 线性关系及定量下限 用乙腈稀释 α -倒捻子素储备液得到 50, 100, 500, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 ng \cdot mL⁻¹ 的对照品溶液, 取 45 μ L 空白血浆, 加入 5 μ L 上述不同浓度的 α -倒捻子素对照品溶液, 得到 5, 10, 50, 100, 200, 500 和 1 000 ng \cdot mL⁻¹ 系列溶液, 按“2.2.3”项下方法处理, 以浓度(X)与峰面积和内标峰面积之比(Y)进行回归, 得到回归方程 $Y=0.00341X+0.00103$, $r=0.9976$, 结果显示血浆药物浓度在 5~1 000 ng \cdot mL⁻¹ 内线性关系良好。定量限为 5 ng \cdot mL⁻¹。

2.2.5 精密度试验 用乙腈稀释 α -倒捻子素 0.4 mg \cdot mL⁻¹ 储备液得到 50, 500, 8 000 ng \cdot mL⁻¹ 的溶液, 45 μ L 空白血浆中加入 5 μ L 上述溶液, 配制成浓度分别为 5, 50, 800 ng \cdot mL⁻¹ 的样品。按“2.2.3”项下方法操作。每个浓度平行做 5 份, 连续测定 3 d。计算日内、日间精密度, 结果见表 1。

表 1 日内、日间精密度($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Precision and accuracy for the determination of α -mangostin in mouse plasma($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

| 加入浓度/ ng \cdot mL ⁻¹ | 日内精密度 | | 日间精密度 | |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| | 测得值/ng \cdot mL ⁻¹ | RSD/% | 测得值/ng \cdot mL ⁻¹ | RSD/% |
| 5 | 5.18 \pm 0.31 | 5.98 | 5.15 \pm 0.32 | 6.21 |
| 50 | 49.76 \pm 5.28 | 10.61 | 49.57 \pm 3.93 | 7.93 |
| 800 | 757.52 \pm 51.82 | 6.84 | 777.48 \pm 45.26 | 5.82 |

2.2.6 提取回收率与基质性考察 浓度分别为 5, 50, 800 ng \cdot mL⁻¹ 质控样品按“2.2.3”项下方法操作, 进样得峰面积 A_1 。小鼠空白浆经乙腈沉淀蛋白, 涡旋, 10 000 \times g 离心 5 min, 取上清液配置得到 5, 50, 800 ng \cdot mL⁻¹ 样品, 进样得峰面积 A_2 ; 采用流动相配置上述 3 个浓度样品进样, 得峰面积 A_3 。每个浓度平行做 5 份。以 $A_1/A_2 \times 100\%$ 计算得 α -倒捻子素的提取回收率, 以 $A_2/A_3 \times 100\%$ 计算得到基质效应。3 个浓度提取回收率均 $>90\%$, 基质效应在 94%~101%内。表明基质效应对样品检测影响小。

2.2.7 稳定性考察及稀释试验 取 α -倒捻子素质控样品分别考察室温放置 4 h、处理后样品进样器内放置 6 h、反复冻融 3 次、-80 °C 冰箱保存 24 h

的稳定性, 每个浓度检测 3 份样品, 结果表明以上各条件下测定浓度与实际浓度的相对误差均在 15% 内, 表明在此放置条件下 α -倒捻子素较稳定。配制 α -倒捻子素对照品溶液得 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 空白血浆稀释 3 倍, 按“2.2.3”项下方法操作, 取上清液进样, 结果稀释后测得药物浓度的 $\text{RSD}<5\%$, $\text{RE}<10\%$, 表明此方法可应用于高于标准浓度的 α -倒捻子素血浆样品分析。

2.2.8 小鼠体内药动学考察 SPF 小鼠随机分组, 每个时间点 5 只, 给药前 12 h 禁食, 小鼠经戊巴比妥钠麻醉后, 由尾静脉按原形药物 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予 α -倒捻子素脂质体, 给药后 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 h 经心脏穿刺采大约 0.4 mL 血液, 4°C 下 $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液。样品按“2.2.3”项下方法操作, 计算各时间点的药物浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 见图 2。结果表明, 血药浓度数据符合非房室模型, 以 winNolin (Version 6.3) 软件进行计算, 得药动学参数: 达峰时间(T_{max})为 0.083 h, 达峰浓度(C_{max})为 $(1\ 524.60 \pm 323.82) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 半衰期($t_{1/2}$)为 $(0.99 \pm 0.12) \text{ h}$, AUC_{0-t} 为 $(645.84 \pm 63.74) \text{ ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, 清除率(CL)为 $(4.80 \pm 0.45) \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 平均滞留时间(MRT)为 $(0.70 \pm 0.11) \text{ h}$, 表观分布容积(Vd)为 $(6.80 \pm 1.00) \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

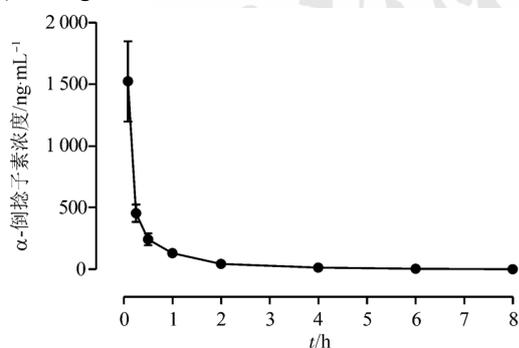


图 2 α -倒捻子素的平均血药浓度-时间图

Fig. 2 Mean concentration-time curve of α -mangostin

3 讨论

本实验建立了一个灵敏、简便、快速的 LC-MS/MS 方法对小鼠血浆中 α -倒捻子素的浓度进行检测, 并针对 α -倒捻子素脂质体药动学特征进行了考察。本研究中血浆样本用量仅为 $20 \mu\text{L}$, 是一种高灵敏度的检测方法, 无内源性物质干扰。为更好地应用于动物药动学研究, 对其检测的线性范围还应进一步提高。

从植物提取物中寻找理想的阿尔茨海默病

(Alzheimer's disease, AD) 治疗药物, 延缓或逆转 AD 的病理改变进程, 是 AD 研究的热点问题, 如鹰嘴豆异黄酮提取物、葛根素^[5]等。 α -倒捻子素近年来报道的一系列实验结果中逐渐显露出令人瞩目的对 AD 的延缓作用^[6], 但药动学研究显示 α -倒捻子素口服生物利用度低^[7], 大鼠经口服给药 10 min 后血药浓度已难以检测^[8]。笔者预试验数据显示, 小鼠尾静脉给予 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ α -倒捻子素, 4 h 后难以检测到药物, 提示 α -倒捻子素应该采取口服以外的给药形式, 或改善剂型, 以适于口服给药。本实验研制了 α -倒捻子素脂质体, 研究结果显示 α -倒捻子素脂质体在血浆中达峰较快, 但 $t_{1/2}$ 较短, 仍不利于每日单次给药, 需多次给药。若将该药物运用到 AD, 在相应的小鼠模型中, 关注静脉给药后脑内药物浓度和疗效的同时, 需同时注意外周血浆和中枢脑内的浓度比值, 如外周浓度较高, 则需注意在治疗 AD 的治疗剂量时, 外周有无不良反应发生^[9]。在今后的研究中需要进一步优化制剂剂型, 进行药效及药动学研究, 为以后的临床研究打下基础。

REFERENCES

- [1] LEE L T, TSAI Y F, HU N Y, et al. Anti-arthritis effect of mangostins from *G. Mangostana* [J]. Biomed Prev Nutri, 2013, 3(3): 227-232.
- [2] KAOMONGKOLGIT R, JAMDEE K, PUMKLIN J, et al. Laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of alpha-mangostin when used as a root canal irrigant [J]. Indian J Dent, 2013, 4(1): 12-17.
- [3] WANG Y, XIA Z, XU J R, et al. α -mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β -amyloid oligomers-induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation [J]. Neuropharmacology, 2012, 62(2): 871-881.
- [4] JITTIPORN K, SUWANPRADID J, PATEL C, et al. Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthone derivative α -mangostin [J]. Microvasc Res, 2014(93): 72-79.
- [5] MEI Z R, TAN X P, HUANG H H, et al. Puerarin against Alzheimer's disease by inhibition β -amyloid protein [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(1): 5-9.
- [6] 王卓群, 胡萍, 余少文. α -倒捻子素的生物活性与药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(19): 1808-1811.
- [7] KONDO M, ZHANG L, JI H, et al. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich Mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(19): 8788-8792.
- [8] LI L, BRUNNER I, HAN A R, et al. Pharmacokinetics of α -mangostin in rats after intravenous and oral application [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(Suppl 1): S67-74.
- [9] 段磊, 司继刚, 刘萍. 阿尔茨海默病药物治疗研究进展[J]. 河北医药, 2015, 37(7): 1077-1080.

收稿日期: 2016-11-07

(本文责编: 曹粤锋)