

双氢青蒿素固体分散体的制备及其生物利用度研究

蒋沅岐¹, 田成旺^{2,3,4}, 周钰通^{2,3,4}, 王旭光^{4,5}, 夏媛媛^{4,5}, 周福军^{2,3,4*}, 陈常青^{2,3,4*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津药物研究院, 天津 300462

3. 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

4. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462

5. 中国医学科学院药物代谢新技术创新单元, 天津 301617

摘要: 目的 制备双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)固体分散体(solid dispersion, SD)(DHA-SD), 对其进行处方优化和表征, 以提高 DHA 的体外溶出度及其在大鼠体内的生物利用度。方法 通过溶解度筛选出与 DHA 相容性较好的载体材料, 以体外溶出度为评价指标, 采用正交试验对 DHA-SD 进行处方优化, 应用扫描电子显微镜(SEM)、差示扫描量热分析(DSC)、X-射线衍射分析(XRD)和红外光谱(IR)对所制备的 DHA-SD 进行表征。将 DHA-SD 进行初步压片, 采用 LC-MS/MS 法分析 DHA 在大鼠体内的药动学特征, 比较片剂及原料药的相对生物利用度, 采用 WinNonlin 8.3.1 软件非房室模型统计矩法, 计算 DHA 的主要药动学参数。结果 平衡溶解度结果显示, 以羟丙基- β -环糊精(H- β -CD)和大豆磷脂为主要载体的 DHA-SD 对 DHA 的增溶效果较好; 优化后的 DHA-SD 处方为 DHA 20%、H- β -CD 66.12%、大豆磷脂 13.22%、柠檬酸 0.66%, 其在纯水中 30 min 的溶出度达到了 94.51%。体内生物利用度结果显示, SD 大鼠 ig 给予 DHA 片剂后, 最大血药浓度(C_{max})和药时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为原料药的 4.44、2.94 倍。结论 DHA-SD 可显著提高 DHA 的溶解度和口服生物利用度。

关键词: 双氢青蒿素; 固体分散体; 溶解度; 体外溶出度; 生物利用度; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)04-1013-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.007

Preparation and bioavailability of dihydroartemisinin solid dispersions

JIANG Yuan-qi¹, TIAN Cheng-wang^{2,3,4}, ZHOU Yu-tong^{2,3,4}, WANG Xu-guang^{4,5}, XIA Yuan-yuan^{4,5}, ZHOU Fu-jun^{2,3,4}, CHEN Chang-qing^{2,3,4}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300462, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

5. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To prepare the solid dispersion (SD) of dihydroartemisinin (DHA) (DHA-SD), optimize and characterize its formulation to improve its dissolution rate *in vitro* and bioavailability in rats. **Methods** By solubility test, the carrier materials with better compatibility to DHA were screened out. Taking the *in vitro* dissolution rate as the evaluation index, the formulation of DHA-SD was optimized utilizing the orthogonal test. The prepared DHA-SD was characterized with the help of scanning electron microscope (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction analysis (XRD) and infrared spectroscopy (IR). Then, the DHA-SD was compressed into tablets, the pharmacokinetic characteristics of DHA in rats were analyzed by LC-MS/MS method, and the relative bioavailability of tablets and APIs was compared. Finally, WinNonlin 8.3.1 software non-compartmental model statistical moment

收稿日期: 2021-09-07

基金项目: 国家重大科技专项(2017ZX09101002-001-005); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2019-I2M-5-020)

作者简介: 蒋沅岐, 女, 硕士研究生, 研究方向为制剂研究与开发。E-mail: yuanqi_jiang@163.com

*通信作者: 陈常青 E-mail: chencq@tjpr.com

周福军 E-mail: zhoufj@tjpr.com

method was used to calculate the main pharmacokinetic parameters of DHA. **Results** The results of equilibrium solubility showed that the DHA-SD with H- β -CD and soybean phospholipid as the carrier had a better solubilization effect on DHA; the optimized DHA-SD prescription was DHA 20%, H- β -CD 66.12%, soybean phospholipid 13.22%, citric acid 0.66%, whose dissolution rate in pure water could reach 94.51% within 30 min. The results of *in vivo* bioavailability showed that, after intragastric administration of DHA tablets to SD rats, C_{max} and AUC_{0-t} were 4.44 times and 2.94 times that of the crude drug, respectively. **Conclusion** DHA-SD can significantly improve the *in vitro* dissolution and oral bioavailability of the drug.

Key words: dihydroartemisinin; solid dispersion; solubility; *in vitro* dissolution rate; *in vivo* bioavailability; LC-MS/MS; pharmacokinetics

青蒿素是菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 叶中分离得到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 为青蒿素经硼氢化钠还原得到的衍生物, 分子式为 $C_{15}H_{24}O_5$, 相对分子质量为 284.35, 其半合成工艺简单, 是青蒿素类药物在体内的主要代谢产物^[1]。构效关系研究显示, DHA 保留了抗疟活性基团过氧桥, 将羰基还原了成羟基, 极大增强了抗疟效果^[2]。近年研究发现 DHA 有抗肿瘤作用^[3]。然而, DHA 的水溶性差, 生物利用度低限制了其在临床上的应用。近年来, 许多研究者着眼于应用现代制剂手段开发 DHA 的新剂型, 如脂质体^[4]、自微乳给药系统^[5]、包合物^[6]、前药自组装纳米粒^[7]等, 以提高其生物利用度。

固体分散体 (solid dispersion, SD) 技术将药物和载体混合, 制成高度分散的固体分散物, 药物以分子、胶态、微晶或无定形态存在于载体材料中, 固体分散体是提高疏水药物的溶解度、溶出度和口服生物利用度的最有效的形式之一^[8]。磷脂分子具有两亲性, 是非常有效的乳化剂, 同时也是细胞膜的重要组成部分, 与人体具有较好的相容性^[9], 其能以非能量依赖的方式穿透细胞的磷脂双分子层进入细胞, 提高生物利用度, 而不对细胞产生毒性^[10]。DHA 属难溶性药物, 且在溶液中不稳定, 因此, 本研究以羟丙基- β -环糊精 (H- β -CD) 和大豆磷脂为主要载体材料, 制备了双氢青蒿素固体分散体 (DHA-SD), 更有利于提高其稳定性。以溶出度为指标优化 DHA-SD 处方, 并进一步应用差示扫描量热 (DSC) 法、X-射线粉末衍射 (XRD) 法、红外光谱 (IR) 法、扫描电子显微镜 (SEM) 对优选处方的 DHA-SD 进行表征。然后将 DHA-SD 初步压片, 考察其在 SD 大鼠体内的生物利用度。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695-2998 液相色谱仪, 美国 Waters 公

司; Agilent 1260-VWD 液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Sciex Triple QuadTM, API 4000 Q-Trap 质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; 17R 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; SB-3200DTN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; AB-204N 型电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 天津赛盟实验仪器有限公司; RV10 型旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; RC 12AD 型智能溶出测定仪, 天津市天大天发科技有限公司; DW-Z 型电动搅拌器, 天津科诺仪器设备有限公司; 1710 FT-IR 红外光谱仪, 美国尼高力公司; HWT-20C 恒温水浴摇床, 天津市恒奥科技发展有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; Gemini 300 扫描电子显微镜, 德国蔡司公司; DSC-60 差示扫描热分析仪, 日本岛津公司; D/max-2500 X 射线粉末衍射仪, 日本理学公司。

1.2 材料

DHA 原料药, 批号 C01120200501, 质量分数 98.2%, 昆药集团重庆武陵山制药有限公司; 对照品 DHA (质量分数 99.90%, 批号为 100184-201403)、青蒿素 (质量分数 99.6%, 批号为 100202-201606), 中国食品药品检定研究院; H- β -CD, 淄博千汇生物科技有限公司; 大豆磷脂, 沈阳天峰生物制药有限公司; 柠檬酸、泊洛沙姆 407, 罗辅医药科技 (上海) 有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 天津光复精细化工研究所; 聚维酮 K30 (PVP K30)、泊洛沙姆 188、聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus), 北京凤礼精求医药股份有限公司; *N*-甲基-*D*-葡萄糖胺, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羟丙基甲基纤维素 (HPMC), Ashland 公司; 乳糖, 安徽山河药用辅料股份有限公司; 聚乙二醇 (PEG) 6000, 南京威尔药业股份有限公司; 磺丁基- β -环糊精钠, 西安德立生物化工有限公司; 双氧水, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 乙酸铵,

天津市光复科技发展有限公司；蒸馏水，广州屈臣氏食品饮料有限公司；甲酸，色谱纯，天津市大茂化学试剂厂；甲醇、乙腈、无水乙醇，色谱纯，天津市康科德科技有限公司。

SPF 级 SD 大鼠 6 只，雄性，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，实验动物使用许可证编号：SYXK（津）2016-0009。本研究的动物实验均在符合国际实验动物评估认证管理委员会（AAALAC）认证的动物实验设施内进行，符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 DHA-SD 的制备

采用溶剂法制备 DHA-SD^[11]，依处方称取原料药及各辅料，加入适量无水乙醇，于 40 ℃ 恒温磁力搅拌至溶解，继续搅拌 20 min，于 50 ℃ 减压旋转蒸发除去无水乙醇，真空干燥除去残留无水乙醇，研细，过 60 目筛，即得 DHA-SD。

2.2 平衡溶解度实验初筛处方

2.2.1 色谱条件^[5] Agilent 1260-VWD 液相色谱仪；色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈（250 mm×4.16 mm，5 μm）；检测波长 216 nm；柱温 25 ℃；体积流量 1 mL/min；进样体积 20 μL；流动相为乙腈-水，梯度洗脱条件：0~18.0 min，45%乙腈；18.0~18.1 min，45%~100%乙腈；18.1~23.0 min，100%乙腈；23.0~23.1 min，100%~45%乙腈；23.1~30.0 min，45%乙腈；理论塔板数以 DHA 峰计算为 21 928。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密量取适量 DHA 对照品，加甲醇溶解配制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 溶解度测定 在 5 mL 水中加入过量的 DHA-SD 置于 50 mL 三角瓶中，涡旋混匀，于 25 ℃、60 Hz 恒温水浴振荡 24 h 后取出，10 000 r/min 离心 10 min，吸取适量的上清液，用甲醇稀释至适当质量浓度，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液于“2.2.1”项 HPLC 色谱条件下测定 DHA 的含量，并计算其溶解度。

2.2.4 处方初筛 初步选定可用于 DHA-SD 的辅料有 H-β-CD、PVPK30、大豆磷脂、HPMC、PEG6000、乳糖、泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407、SDS、柠檬酸、磺丁基-β-环糊精钠、N-甲基-D-葡萄糖胺、Soluplus 等，采用 24 h 平衡溶解度实验测定不同辅料对 DHA 的增溶效果，具体处方及平衡溶

解度测定结果见表 1。根据平衡溶解度结果，以 H-β-CD、大豆磷脂为载体时溶解度较高，大豆磷脂可有效提高 DHA 在水中的溶解度。本课题组前期研究发现，DHA 在 H-β-CD 中较稳定，柠檬酸有助于提高 DHA 的稳定性。故选择大豆磷脂、柠檬酸和 H-β-CD 作为 DHA-SD 的载体材料。

表 1 不同处方 DHA-SD 的平衡溶解度

Table 1 Equilibrium solubilities of DHA-SD in different formulations

处方	质量比	平衡溶解度/ (mg·mL ⁻¹)
DHA : H-β-CD : PVP K30	1 : 4.5 : 1.5	1.784
DHA : H-β-CD : PVP K30	1 : 5 : 1	2.115
DHA : H-β-CD	1 : 6	2.124
DHA : H-β-CD : PVP K30	1 : 3 : 3	1.090
DHA : H-β-CD : 大豆磷脂	1 : 3 : 3	4.473
DHA : H-β-CD : HPMC	1 : 3 : 3	0.874
DHA : H-β-CD : 乳糖	1 : 3 : 3	1.228
DHA : H-β-CD : PEG 6000	1 : 3 : 3	0.925
DHA : H-β-CD : 泊洛沙姆 188	1 : 3 : 3	0.660
DHA : H-β-CD : SDS	1 : 5 : 0.5	1.047
DHA : H-β-CD : 柠檬酸	1 : 5 : 0.5	1.519
DHA : 磺丁基-β-环糊精钠 : PVP K30	1 : 3 : 3	0.932
DHA : 磺丁基-β-环糊精钠	1 : 6	1.752
DHA : 泊洛沙姆 407 : PVP K30	1 : 3 : 3	0.050
DHA : H-β-CD : N-甲基-D-葡萄糖胺	1.5 : 7 : 1	0.020
DHA : PVP K30 : Soluplus	1 : 3 : 1	0.061

2.3 DHA-SD 处方的优化

2.3.1 色谱条件 Waters e2695-2998 液相色谱仪；色谱柱为 Reprosil-Pur Basic C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水（60 : 40）；检测波长 216 nm；柱温 25 ℃；样温 15 ℃；体积流量 1 mL/min；进样体积 20 μL；理论塔板数以 DHA 峰计算为 8398。

2.3.2 DHA-SD 辅料比例筛选 根据前期对方处的初步研究，拟定了 DHA-SD 处方组成，现采用正交试验对 DHA-SD 辅料的配比进行研究。在正交试验中，以 H-β-CD（A）、大豆磷脂（B）、柠檬酸（C）的质量比为考察因素进行 L₉(3⁴)正交试验，以 DHA-SD 溶出度为评价指标，确定最佳制剂处方，正交试验因素水平、实验设计与结果见表 2，方差分析结果见表 3。采用桨法进行溶出度测定，以纯水为溶出介质，溶出介质体积为 250 mL，温度 37 ℃，转

表 2 DHA-SD 处方优化正交试验设计及结果

Table 2 Results and analysis of orthogonal experiments of DHA-SD prescription optimization

试验号	A	B	C	D(空白)	溶出度/%
1	4 (1)	0.5 (1)	0.05 (1)	(1)	70.02
2	4 (1)	1.0 (2)	0.10 (2)	(2)	65.26
3	4 (1)	2.0 (3)	0.15 (3)	(3)	53.70
4	5 (2)	0.5 (1)	0.10 (2)	(3)	73.74
5	5 (2)	1.0 (2)	0.15 (3)	(1)	78.45
6	5 (2)	2.0 (3)	0.05 (1)	(2)	81.19
7	6 (3)	0.5 (1)	0.15 (3)	(2)	68.75
8	6 (3)	1.0 (2)	0.05 (1)	(3)	82.21
9	6 (3)	2.0 (3)	0.10 (2)	(1)	70.89
K ₁	188.98	212.51	233.42	219.36	
K ₂	233.38	225.92	209.89	215.20	
K ₃	221.85	205.78	200.90	209.65	
R	14.80	6.71	10.84	3.24	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	117.95	2	58.98	22.37	P<0.05
B	23.36	2	11.68	4.43	
C	62.67	2	31.33	11.88	
D(误差)	5.27	2	2.637	1.00	

速 100 r/min, 依法操作, 分别于 15、30 min 时取出 2 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液即为供试品溶液。因 15min 时各处方溶解度差异较明显, 故选用 15min 的结果作为筛选依据。用“2.3.1”项 HPLC 条件测定 DHA 含量。由 DHA-SD 处方研究 L₉(3⁴)正交试验直观分析可知, 各因素作用主次为 A>C>B, 最佳工艺参数为 A₂B₂C₁。方差分析结果显示, 因素 A 对试验有显著影响 (P<0.05)。综合考虑, 确定 DHA-SD 各辅料的比例为 H-β-CD: 大豆磷脂: 柠檬酸 (5:1:0.05)。

2.3.3 DHA-SD 原料药与辅料比例的确定 原辅料的比例直接影响 SD 的溶解度、可压性等性质。因此, 实验选择药辅比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 制备 SD, 对 DHA-SD 原料药和辅料的比例进行优化, 采用“2.2”项下的溶出测定方法对制得的样品进行含量测定。实验结果 (表 4) 显示, 当药辅比为 1:4 和 1:5 时, DHA 溶出度较高, 分别为 94.51% 和 96.84%, 考虑到后续压片过程还需添加其他辅料, 为保证含药量, 故选择 1:4 作为最终的原

表 4 药辅比筛选结果

Table 4 Screening results of proportion of drugs and excipients

药辅比例	t/min	溶出度/%	药辅比例	t/min	溶出度/%
1:1	15	75.24	1:3	30	83.67
1:1	30	88.36	1:4	15	80.78
1:2	15	65.14	1:4	30	94.51
1:2	30	79.97	1:5	15	82.30
1:3	15	68.51	1:5	30	96.84

料药与辅料的比例。

最终得到 DHA-SD 最优处方为 DHA 20%、H-β-CD 66.12%、大豆磷脂 13.22%、柠檬酸 0.66%。制备得到的 DHA-SD 载药量较大, 溶解性好, 制备工艺简单可行。

2.3.4 工艺验证 按照最优处方制备 3 批 DHA-SD, 3 批投料量均为 100 g。取适量 DHA-SD, 依法测定 30 min 时的溶出度, 考察重现性, 结果 (表 5) 表明该制备工艺稳定, 重现性好。

表 5 验证试验结果

Table 5 Results of verification

试验号	得率/%	溶出度/%
1	95.76	93.82
2	94.99	94.59
3	95.43	94.07

2.4 固体分散体的表征

2.4.1 XRD 分析 通过 XRD 检测 DHA 原料药、DHA-SD、物理混合物 (各成分比例与 DHA-SD 一致) 及各载体材料的晶型。工作参数为靶电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描速度 10°/min, 扫描范围 2θ 3°~40°。由图 1 可以看出, DHA 存在明显的特征衍射峰, H-β-CD 无晶体衍射峰, 而在物理混合物和 DHA-SD 中, 代表 DHA 晶型的特征衍射峰依然存在。XRD 可用于识别物质的非晶态和多晶形态, 谱图中出现尖锐峰表明是晶体物质, 而钝峰则表明是无定形物质^[12]。因此, 推测在本研究的固体分散体中, DHA 依然是以晶体形式存在的。

2.4.2 SEM 观察 使用 SEM 对 DHA 原料药、DHA-SD 及各载体材料的表面微观形态进行观察。取少量样品粘于导电胶上, 喷金后进行样品检测。

DHA 原料药、大豆磷脂、H-β-CD、柠檬酸、DHA-SD 及物理混合物的 SEM 图如图 2 所示。由图 2-A、B、D、E 可以看出, 大豆磷脂表面较光滑,

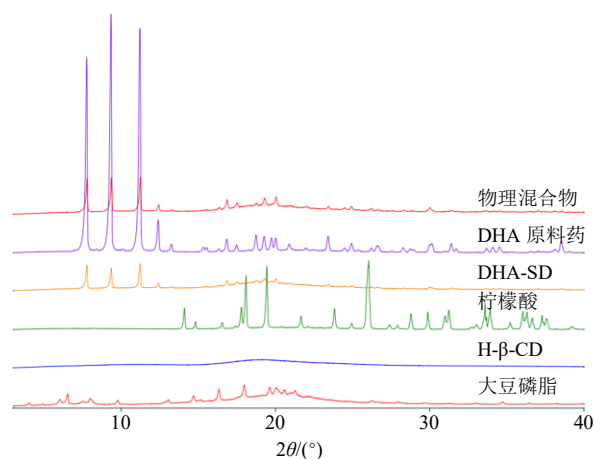


图 1 物理混合物、DHA 原料药、DHA-SD、柠檬酸、H-β-CD、大豆磷脂的粉末 XRD 图

Fig. 1 XRD curves of physical mixture, DHA, DHA-SD, citric acid, H-β-CD and soybean phospholipid

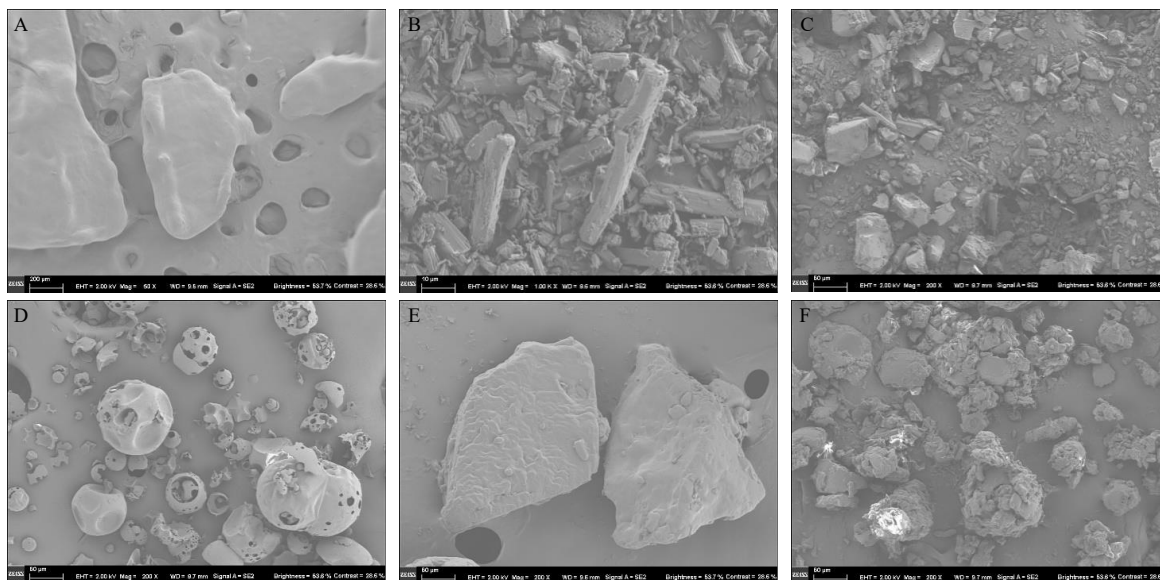


图 2 大豆磷脂 (A)、DHA (B)、DHA-SD (C)、H-β-CD (D)、柠檬酸 (E) 及物理混合物 (F) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM of soybean phospholipid (A), DHA (B), DHA-SD (C), H-β-CD (D), citric acid (E), and physical mixture (F)

10 °C/min, 氮气体积流量为 40 mL/min, 升温范围为 30~250 °C。DHA 原料药、H-β-CD、大豆磷脂、柠檬酸、DHA-SD 及物理混合物的 DSC 图谱如图 3 所示。结果显示, 柠檬酸在 156 °C 左右存在 1 个尖锐的吸收峰, H-β-CD 和大豆磷脂无明显的吸热峰, 说明其主要以无定形形式存在^[11]。DHA 的熔点峰在 168 °C 左右, 该峰可作为 DHA 的晶型指示峰。物理混合物在 165 °C 左右仍存在吸热峰, 说明 DHA 与载体材料只是简单的混合, 并未改变晶型; DHA-SD 中未检测到 DHA 的吸热峰, 可能由于药物已分散于 SD 中^[14]。

2.4.4 IR 分析 IR 用于分析化合物的化学键、官能

DHA 原料药为针状晶体, H-β-CD 为球形带有凹陷孔洞的颗粒, 柠檬酸为表面凹凸不平的不规则颗粒。可以看出, DHA 与大豆磷脂、H-β-CD、柠檬酸 3 种载体材料的物理混合物仅为 4 者的简单混合, 仍可见 H-β-CD 和大豆磷脂的特征。而从图 2-C 中观察发现, DHA 与载体材料聚合形成了块状、均一的颗粒, 在形态学上发生了显著变化, 表明几种化合物之间形成了不同于任何一种原料的物态形式, 这种变化可能是由药物与聚合物之间相互作用导致的^[13]。

2.4.3 DSC DSC 的研究主要用于观察在 DHA-SD 的制备过程中 DHA 原料药的晶型是否发生了改变, 采用 DSC 法对样品玻璃化转变温度 (T_g) 值进行检测。分别称取 DHA 原料药、DHA-SD、物理混合物及载体材料 1~3 mg 于密闭的铝盘中, 升温速度为

团及晶体结构有无变化。分别取 DHA 原料药、DHA-SD、物理混合物及载体材料适量, 与干燥的 KBr 充分混合研磨并压片, 在 400~4000 cm^{-1} 进行扫描, 分辨率为 2 cm^{-1} , 每个样品采集 32 次, 结果见图 4。

对 DHA-SD、DHA 原料药及各辅料的 IR 图谱分析可知, DHA-SD 在 3400 cm^{-1} 附近存在宽而钝的峰, 对应 H-β-CD 上的 O-H 通过氢键缔合后的红外吸收, 而该钝峰上 3 379.5 cm^{-1} 处有 1 明显的尖峰, 对应 DHA 的 12 位半缩醛 O-H 伸缩振动; 与 DHA 原料药和物理混合物相比, DHA-SD 中该峰略有蓝移, 显示其键能有所增加。大豆磷脂的酯羰基伸缩振动峰位于 1 738.8 cm^{-1} 处, 而 DHA-SD 中相

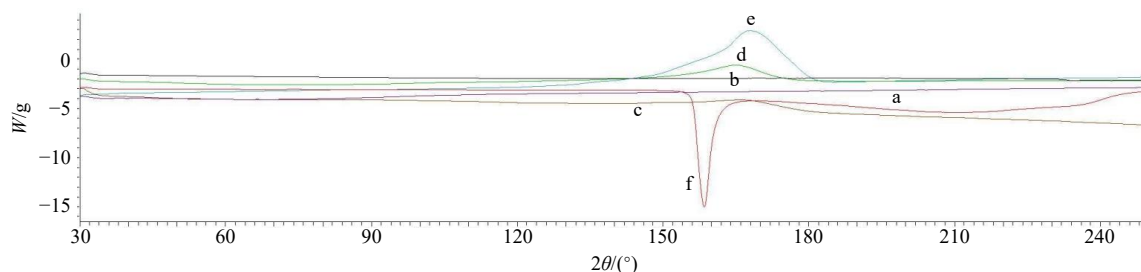


图 3 H-β-CD (a)、大豆磷脂 (b)、DHA-SD (c)、物理混合物 (d)、DHA 原料药 (e)、柠檬酸 (f) 的 DSC 分析图

Fig. 3 DSC curves of H-β-CD (a), soybean phospholipid (b), DHA-SD (c), physical mixture (d), DHA (e) and citric acid (f)

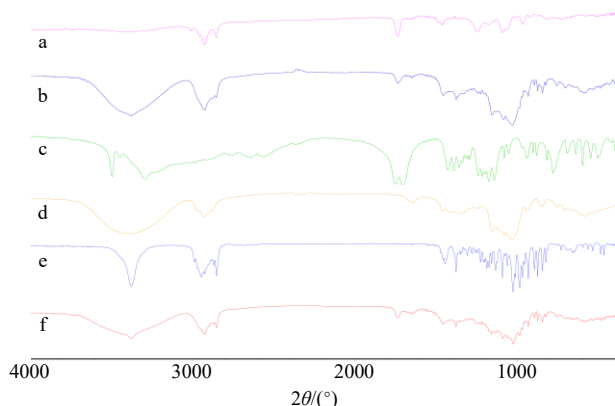


图 4 大豆磷脂 (a)、DHA-SD (b)、柠檬酸 (c)、H-β-CD (d)、DHA (e)、及物理混合物 (f) 的红外光谱扫描图

Fig. 4 IR curves of soybean phospholipid (a), DHA-SD (b), citric acid (c), H-β-CD (d), DHA (e) and physical mixture (f)

应的吸收峰出现在 1733.9 cm^{-1} 处, 周围无其他吸收峰干扰。由于 DHA 结构中不存在羰基, 由此可以推断 1733.9 cm^{-1} 的吸收峰是大豆磷脂的酯羰基与 DHA 或其他辅料形成氢键后产生红移所致。DHA-SD 中 1227.4 cm^{-1} 处的小峰是 DHA 结构中 C-O 的伸缩振动所致, 而 1156.6 cm^{-1} 处的强吸收是 H-β-CD 吡喃环上的 C-O 伸缩振动峰。DHA 在 1159.7 cm^{-1} 和 1092.9 cm^{-1} 处的缩醛 (5 位) 和半缩醛 (12 位) C-O 的伸缩振动在物理混合物的红外图谱中仍可见, 但在 DHA-SD 中消失, 这表明在 DHA-SD 中 DHA 与辅料相互作用的强度更大。另外, DHA 过氧键的特征峰 (824 cm^{-1} 处 O-O 的伸缩振动和 876 cm^{-1} 处的 O-O-C 的弯曲振动) 在 DHA-SD 中仍然保留, 显示 DHA 的 1,2,4-三噁烷药效团在制剂过程中未受到影响。

2.5 大鼠体内相对生物利用度比较研究

2.5.1 给药方案与生物样品的采集 对制得的 DHA-SD 进行初步压片, 研究其在大鼠体内的生物利用度。取健康 SD 大鼠 6 只, 雄性, 随机分为 2 组, 每组 3 只, 进行单剂量、单次给药试验。第 1

组大鼠 ig 给予原料药混悬液制剂, 另 1 组大鼠 ig 给予片剂混悬液制剂。ig 给药量为 0.5 mL/kg 。给药前禁食不少于 12 h, 自由饮水, 给药后 2 h 统一给食。分别于 ig 给药后 5、15、30、45 min 及 1、1.5、2、3、4、6、9、12、24 h 各时间点, 从颈静脉插管采血约 0.25 mL 于 EDTA 抗凝管中, 立即置于冰上并于 15 min 内离心, 吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血浆于已加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 10%甲酸和 $5\text{ }\mu\text{L}$ 30%双氧水的 EP 管中, 涡旋混匀, 3 样本 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存至 LC-MS/MS 定量分析。

2.5.2 生物样本处理方法 $50\text{ }\mu\text{L}$ 大鼠含药血浆, 加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 10%甲酸水溶液及 $5\text{ }\mu\text{L}$ 双氧水, 再加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 内标青蒿素 (100 ng/mL) 乙腈工作液及 $150\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈溶液, 涡旋 1 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 涡旋 1 min, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 于内插管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 进样 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.5.3 生物样品分析方法的建立

(1) 色谱条件: Zorbax Eclipse C_{18} 柱 ($50\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.5 mL/min ; 进样体积 $20\text{ }\mu\text{L}$; 进样器温度 $6\text{ }^{\circ}\text{C}$; 运行时间 6.5 min ($2.5\sim 4.5\text{ min}$ 切换进质谱); 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵-5%甲醇水溶液, 流动相 B 为 50%甲醇-乙腈溶液, 梯度洗脱程序: $0\sim 0.5\text{ min}$, 50% A; $0.5\sim 6.0\text{ min}$, 50%~10% A; $6.0\sim 7.0\text{ min}$, 10% A; $7.0\sim 7.1\text{ min}$, 10%~50% A; $7.1\sim 10.0\text{ min}$, 50% A。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI); 多反应监测离子扫描 (MRM); 正离子模式; 主要参数设置为喷雾电压 (IS) 5500 V ; 源温 (TEM) $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测质核比为 $m/z\ 302\rightarrow 267$ (DHA), $m/z\ 300\rightarrow 209$ (内标青蒿素)。

2.5.4 方法学验证

(1) 标准曲线与线性范围: 精密量取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度分别为 0.04 、 0.08 、 0.16 、 0.8 、 2 、 7.5 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 加入 $190\text{ }\mu\text{L}$ 大鼠空白血浆, 按照“2.5.2”项下样品处理方法处理, 进行 LC-MS/MS

分析。以待测成分质量浓度为横坐标 (X), 待测物与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得线性回归方程 $Y=8.51 \times 10^{-3} X+3.96 \times 10^{-5}$, $r=0.998\ 9$, 线性范围 $2 \sim 500$ ng/mL。

(2) 准确度和精密度: 配制并处理质量浓度为 5、25、400 ng/mL 的样品进行 LC-MS/MS 分析, 考察 3 个批次, 每批次每质量浓度 6 个样本。进样分析并计算准确度和精密度。结果表明, 大鼠血浆中 DHA 3 个质量浓度水平质控样品的批内准确度在 93.3%~107.0%, 批间准确度在 93.7~105.0%; 批内精密度在 2.38%~4.33%, 批间精密度在 0.95%~10.10%, 均符合接受标准。

(3) 生物样品稳定性: 考察低、高不同质量浓度水平的 DHA 在生物基质及处理后各条件的稳定性, 每质量浓度 3 样本。分别取 DHA 质量浓度为 1、50 $\mu\text{g/mL}$ 溶液 20 μL , 加入大鼠空白全血 3980 μL , 配制成 2 个质量浓度水平的全血稳定性样品, 质量浓度分别为 5、250 ng/mL, 按照 200 μL 进行分装至 EP 管中, 达到各考察条件后离心分离血浆。结果显示, 含药全血冰上放置 20 min 稳定 (准确度分别为 113%); 含药血浆室温放置 4 h 后稳定 (准确度分别为 97.2%、93.1%); 含药血浆 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至室温冻融 3 次稳定 (准确度分别为 96.6%、87.5%); 含药血浆 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存 14 d 稳定 (准确度分别为 99.6%、94.4%); 沉淀处理后样品室温放置 4 h 稳定 (准确度分别为 102%、94.8%), 处理后样品于进样器温度下 ($2 \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) 放置 48 h 后稳定 (准确度分别为 96.1%、86.5%)。

2.5.5 数据处理 应用 Analyst 1.6.3 数据处理软件, 对待测物 DHA 和内标青蒿素进行积分, 得出峰面积。选择 WinNonlin 8.3.1 软件非房室模型统计矩法计算药动学参数 (表 6), 其中曲线下面积 ($\text{AUC}_{0 \sim t}$) 采用梯形法计算, 消除半衰期采用 Best Fit 法计算, $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 采用实测值。经剂量折算后的 $\text{AUC}_{0 \sim t}$ 计算相对生物利用度, ig 给予 DHA-SD 片剂的混悬制剂相比于原料药组相对生物利用度为 294%, SD 大鼠 ig DHA 原料药及片剂后, 原型 DHA 在血浆中于 0.25~0.5 h 达峰, 随后血药浓度逐渐下降。ig DHA 片剂的混悬制剂后, 血浆中原型 DHA 的暴露量高于原料药组, 药时曲线见图 5。

3 讨论

DHA 属于生物药剂学分类系统中的 II 类药物,

表 6 DHA 原料药和 DHA-SD 片的主要药动学参数比较 ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 6 Main pharmacokinetic parameters for DHA and DHA solid dispersion tablets ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

参数	单位	DHA 原料药	DHA-SD 片剂
$C_{\max}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	473 ± 167	2100 ± 1210
$T_{\max}$	h	0.500 ± 0.250	0.333 ± 0.144
$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	523 ± 175	1540 ± 829
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	529 ± 175	1540 ± 826
$t_{1/2}$	h	$0.486\ 0 \pm 0.071\ 2$	$0.241\ 0 \pm 0.033\ 2^{**}$

与原料药比较: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs bulk drug

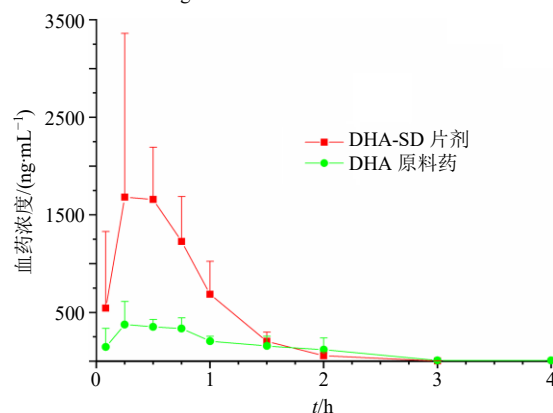


图 5 DHA 原料药和 DHA-SD 片的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Plasma concentration-time curves for DHA and DHA-SD tablets ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

具有低溶解性、高渗透性的特点^[15], 实验测得 DHA 原料药在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 24 h 平衡溶解度仅为 0.140 mg/mL, 低溶解性是此类药物制剂开发中面临的主要问题^[16]。如果药物的溶解速度明显低于吸收速度, 药物的溶解就成为吸收过程中的限速步骤^[17]。

制成固体分散体后, DHA 的 24 h 溶解度增加了 30 倍, 在纯水中 30 min 溶出度达到了 94.51%, 有效提高了药物的溶解度。在本研究中, 大豆磷脂为固体分散体的关键载体之一, 是一种具有多种用途的多功能表面活性剂, 磷脂具有两亲性, 对难溶性药物具有增溶潜力^[18]。H- β -CD 可通过将药物包合到疏水空腔中, 作为络合剂来提高药物的溶解性和生物利用度。试验发现, 当同时使用 H- β -CD 和大豆磷脂作为载体时, 增溶效果明显优于单用 H- β -CD, 可能由于大豆磷脂分散在水中时可与药物形成脂质体结构或乳化胶束微粒^[19], 进一步促进药物的溶解, H- β -CD 和大豆磷脂的双重作用增加了载药量和药物的溶解度。本课题组在前期研究中发现柠檬

酸对 DHA 有稳定作用, 故处方中加入少量柠檬酸以提高药物的稳定性。本研究的目标剂型为双氢青蒿素固体分散体片剂, 而片剂不利于大鼠的口服给药, 故将片剂制成混悬液 *ig* 给药, 以研究其生物利用度。体内药动学研究结果显示, 固体分散体片剂的 $C_{\max}$ 较原料药提高了 4.4 倍, 生物利用度提高了 2.94 倍, 表明其明显促进了药物的体内吸收。

综上所述, 本研究制备的 DHA-SD 溶解性好, 生物利用度高, 为 DHA 的制剂开发提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒋沅岐, 董玉洁, 周福军, 等. 青蒿素及其衍生物的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(02): 599-608.
- [2] 黄静. 双氢青蒿素片剂的研制及溶出度研究 [J]. 长春师范大学学报, 2018, 37(4): 60-64.
- [3] 梁小娜, 单淇, 周福军, 等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞凋亡的信号通路研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 775-780.
- [4] 古秀娟, 曾娅莉, 邓建军, 等. 双氢青蒿素脂质体的制备及抑制耐药结核分枝杆菌机制的考察 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(7): 882-888.
- [5] 张然, 杨冰, 廖茂梁, 等. 双氢青蒿素自微乳给药系统的制备及其评价 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1291-1302.
- [6] 周慧, 郑一敏, 胥秀英. 双氢青蒿素-羟丙基- β -环糊精包合物的制备工艺研究 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(8): 9-11.
- [7] 王蓉蓉, 任国莲, 王锐利, 等. 十八胺修饰的双氢青蒿素前药自组装纳米粒的制备及其抗疟活性评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(10): 1201-1207.
- [8] Vasconcelos T, Marques S, Das Neves J, *et al.* Amorphous solid dispersions: Rational selection of a manufacturing process [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 85-101.
- [9] 陈金玉, 张鑫, 吴祖芳, 等. EGCG 磷脂复合物抗氧化活性的研究 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 137-143.
- [10] 宫璇, 齐筱莹, 赵志康, 等. 卵磷脂及复合物的功能活性研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 295-299.
- [11] 蒋婷, 郑玲利, 袁明勇, 等. 阿折地平肠溶固体分散体的制备及质量评价 [J]. 中国药房, 2021, 32(15): 1862-1867.
- [12] Karolewicz B, Górniak A, Owczarek A, *et al.* Solid dispersion in pharmaceutical technology. Part II. The methods of analysis of solid dispersions and examples of their application [J]. *Polimery W Medycynie*, 2012, 42(2): 97-107.
- [13] 黄婉. 美洛昔康固体分散体及片剂的制备和性质评价 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
- [14] 汤晶晶. 非布索坦固体分散体的制备及评价 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2018.
- [15] 张东, 全燕, 袁涛, 等. 新工艺双氢青蒿素片溶出度测定方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1273-1277.
- [16] Savjani K T, Gajjar A K, Savjani J K. ChemInform abstract: Drug solubility: Importance and enhancement techniques [J]. *ChemInform*, 2013, 44(26): 3469.
- [17] Vimalson D C, Parimalakrishnan S, Jeganathan N S, *et al.* Solid dispersion technique to enhance the solubility and dissolution of febuxostat an BCS class II drug [J]. *Int J Appl Pharm*, 2019, 11(1): 241.
- [18] Li J, Wang X, Zhang T, *et al.* A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10(02): 81-98.
- [19] 董英杰, 艾莉, 李晓怡, 等. 辅酶 Q₁₀ 普利醇环糊精磷脂分散体系的制备与评价 [J]. 中南药学, 2020, 18(10): 1621-1627.

[责任编辑 郑礼胜]