



HPLC-MS 测定大鼠血浆中青蒿素浓度及其应用

傅川¹, 余继英², 邹静², 何林^{2*}, 董芸³, 黄园¹

(1. 四川大学 华西药学院, 四川 成都 610041;

2. 四川省医学科学院 四川人民医院 药剂科, 四川 成都 610072;

3. 四川省医学科学院 四川人民医院 急诊科, 四川 成都 610072)

[摘要] 目的:建立青蒿素大鼠体内药物浓度的分析方法。方法:采用高效液相色谱-质谱联用技术,选用艾司唑仑为内标,样品与内标使用甲基叔丁基醚提取,并分别于 m/z 305, 296 进行测定。结果:在 $5 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 青蒿素峰面积与内标峰面积比值与浓度有良好的线性关系,最低定量质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:方法学证明该法能够满足青蒿素大鼠体内血药浓度的测定,可用于动物体内药物动力学的研究需求。

[关键词] 青蒿素;高效液相色谱-质谱联用;药物动力学

青蒿素是我国药学工作者 1971 年从菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 叶中提取分离到的一种具有过氧桥结构的倍半萜内酯化合物,是目前全世界公认的抗疟疾首选药物之一。近年来,人们又发现青蒿素及其衍生物具有很好的抗肿瘤作用,同时还有抗炎、免疫抑制等生物活性,是极具发展潜力的天然类药物^[1]。

由于青蒿素分子结构中无特征光谱特性,故采用常规的紫外检测、荧光检测均不能满足其测定的要求,一般采用柱前或柱后衍生化后进行测定^[2]。青蒿素血药浓度检测方法有 UV^[3], HPLC-UV^[4], HPLC-ECD^[5]。近 10 年来,由于液相色谱质谱串联法的发展,液质联用技术被广泛用于青蒿素的血药浓度检测^[6-9],但大多采用 LC-MS/MS 技术定量测定。本文在文献的基础上,建立了 LC-MS 检测青蒿素大鼠体内药物浓度,方法简洁,灵敏度高,相较 LC-MS/MS 仪器设备要求简单。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters ZQ4000 质谱仪、Waters Masslynx V4.1 色谱工作站;BS 210s 电子天平(Sartorius, Germany), HC-2517 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限

公司), VORTEX GENIUS 3 型混悬仪(德国 IKA 公司), GM-0.33 II 津腾隔膜真空泵(天津市腾达过滤器件厂), CQ-205 型超声清洗仪(上海超声波仪器厂), MicrSprayer[®] Aerosolizer_Model IA_1B 肺部给药装置(美国 Penn-Century)

1.2 试药 青蒿素对照品(100713, 四川协力制药提供,纯度 99%), 艾司唑仑对照品(中国食品药品检定研究院, 1219-0102)。青蒿素对照品溶液:精密称取青蒿素 25.50 mg, 用甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶, 得青蒿素对照品储备液($1.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏保存。精密取上述储备液, 用 50% 甲醇稀释, 配制成 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品工作液。内标溶液:精密称取艾司唑仑对照品 5.35 mg, 甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶, 得艾司唑仑对照品储备液 1 ($535 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏保存。取 94 μL 储备液 1 于 10 mL 量瓶内, 50% 甲醇定容即得约 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标储备液 2, 临用前用 50% 甲醇稀释 2 倍, 即得内标溶液。甲醇为色谱纯, 水为纯净水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 (250 ± 20) g (四川省人民医院实验动物中心提供)。

2 方法

2.1 测定条件 色谱: Xterra[®] MS C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 150 mm, 5 μm)。流动相甲醇-水 (80:20); 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 5 μL 。

质谱为电喷雾电离源 (ESI⁺); 选择离子监测 (青蒿素 m/z 305, 艾司唑仑 m/z 296); 毛细管电压

[稿件编号] 20120307005

[通信作者] *何林, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物新制剂及临床药理, Tel/Fax: (028) 87393932, E-mail: helinn@tom.com

[作者简介] 傅川, 硕士研究生, E-mail: 281558607@qq.com

3.5 kV;椎孔电压 50 V;二级椎孔电压 2 V;六级杆透镜电压 0.3 V;源温度 120 °C;脱溶剂气温度 350 °C;脱溶剂气流量 900 L · h⁻¹;锥孔气流量 50 L · h⁻¹。

2.2 血浆样品预处理 取血浆样品 120 μL,置 2 mL 具塞塑料管中,加入内标工作液 20 μL(艾司唑仑 2.5 mg · L⁻¹),涡旋混匀,加入饱和氯化钠溶液 45 μL 及甲基叔丁基醚 1 mL,涡旋 2 min 后 12 000 r · min⁻¹离心 6 min,吸取上清液 40 °C 氮气吹干,用 120 μL 流动相溶解,进样 5 μL 在上述色谱与质谱条件下分离测定,记录青蒿素和内标的色谱峰面积,内标法计算血浆中的青蒿素浓度。

2.3 方法特异性 在选定测定条件下,青蒿素和内标的 *m/z* 分别为 305.3,296,保留时间分别为 3.7,2.8 min,血浆样品中其他物质不干扰样品的测定。空白血浆、青蒿素和内标加空白血浆及血浆样品色谱图见图 1~3。

2.4 标准曲线和定量下限 吸取 20 μL 青蒿素标准品工作液,加入空白血浆 100 μL 配成终浓度为 5,10,20,50,100,200,500 μg · L⁻¹ 的标准血样,按 2.1 项下处理后分析测定。记录青蒿素和内标的色谱峰面积,内标法计算血浆中青蒿素浓度,得青蒿素血浆标准曲线回归方程(权重 $w = 1/C^2$): $Y = 0.0245X + 0.00481$ ($r = 0.995$),表明青蒿素在 5~500 μg · L⁻¹ 线性关系良好;定量下限为 5 μg · L⁻¹。

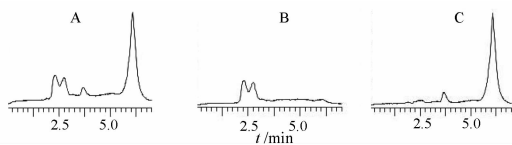
2.5 准确度与精密度 按标准曲线方法配制并测定 5,50,500 μg · L⁻¹ 已知浓度的青蒿素血样,以测得值与加入量的比值计算回收率;以 1 d 内 5 次测定结果计算批内精密度,1 周内 3 d 测定结果计算批间精密度。青蒿素高、中、低浓度的回收率分别为 102.4%,102.9%,90.2%,批内 RSD 分别为 8.1%,5.2%,6.2%,批间 RSD 分别为 7.3%,7.3%,11%,结果符合要求。

2.6 萃取回收率考察 按标准曲线方法配制并测定 5,50,500 μg · L⁻¹ 3 个血样;另取相同浓度,直接用 40 °C 氮气吹干,加入 120 μL 的流动相复溶后进样测定。以前后 2 种处理测定得到的青蒿素峰面积之比和内标峰面积之比分别计算青蒿素和内标的萃取回收率。结果青蒿素高、中、低浓度的萃取回收率分别为 (66.8 ± 2.8)%, (64.0 ± 2.5)%, (65.2 ± 4.7)% ($n = 3$),内标萃取回收率为 (57.2 ± 4.3)% ($n = 9$)。

2.7 基质效应 按 2.1 项下方法制备空白基质溶液。取 20 μL 高、中、低浓度青蒿素对照品工作液和 20 μL 内标溶液,直接用 40 °C 氮气吹干,分别用 120 μL 的空白基质溶液和流动相溶解,进样测定,以二者峰面积比值得基质效应。结果 500,50,5 μg · L⁻¹ 的青蒿素溶液基质效应分别为 92.0%,87.9%,86.0%,内标基质效应为 88.0%。

2.8 稳定性 本实验考察了青蒿素血浆样品室温放置 6 h、处理后样品室温放置 6 h、经 3 次冻融及在 -20 °C 下冷冻放置 7,15 d 的稳定性。吸取 20 μL 青蒿素工作液加入 100 μL 空白血浆,配制 500,50,5 μg · L⁻¹ 3 个样品,每个浓度 5 份,按 2.1 项下方法处理分析,结果表明血浆样品及处理液在室温条件下 6 h 内稳定,血浆样品经历 3 次冻融后稳定,血浆样品在 -20 °C 下冷冻放置 15 d 内稳定。

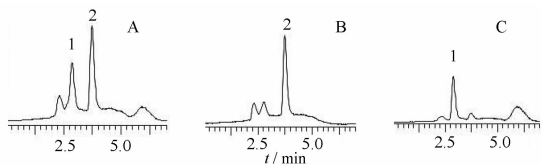
2.9 给药方案与样品采集 将本方法应用于青蒿素肺部给药后药动力学研究。选取健康 SD 大鼠,40



A. 青蒿素及内标;B. 青蒿素选择离子(*m/z* 305.3);C. 内标选择离子(*m/z* 296)(图2,3同)。

图1 空白血浆色谱图

Fig.1 Chromatograms of a blank plasma of rats



1. 艾司唑仑(内标);2. 青蒿素(图3同)。

图2 空白血浆中加入青蒿素和艾司唑仑(内标)色谱图

Fig.2 Chromatograms of a blank plasma spiked with artemisinin and extazolam

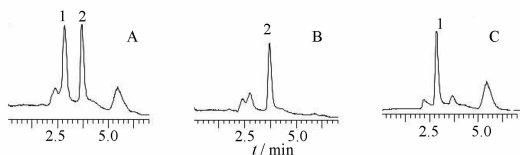


图3 青蒿素大鼠肺部给药后血样加内标色谱图

Fig.3 Chromatograms of a sample mixed with estazolam (I.S.) after pulmonary administration of artemisinin to rat



$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 苯巴比妥麻醉后,分离气管与两侧颈静脉,于甲状软骨下5到6节软骨处气管插管,采用肺部给药装置插入切口下2 cm(气管分支处)分别给予100 μL 高、中、低3个组(20,8,4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿素溶液),每组3只,分别于5,15,30,60,90,120,180,240 min处颈静脉采血0.5 mL,置肝素管中,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,分离血浆于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,待测。

3 结果

按上述所建立方法测定青蒿素浓度,绘制药时曲线见图4。

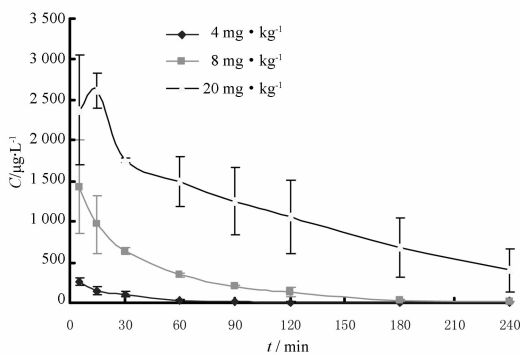


图4 不同质量浓度青蒿素(4,8,20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)大鼠肺部给药后药时曲线图($n=3$)

Fig. 4 The plasma concentration time curves after pulmonary delivery of drug solution-containing artemisinin to rats at doses of 4, 8 and 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=3$)

4 讨论

4.1 样品预处理的优化 本实验对乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷、甲基叔丁基醚等常用提取溶剂进行了筛选,结果表明甲基叔丁基醚比乙酸乙酯、二氯甲烷提取回收率高,比乙醚萃取后杂质少,最终确定甲基叔丁基醚为提取溶剂;因所有溶剂提取进样后皆有干扰,本实验通过添加饱和氯化钠溶液与生物蛋白作用,解决了杂质的干扰问题;为考察是否存在氯化钠离子抑制作用,本实验采用样品提取后水反洗,结果显示空白仍无干扰,而水反洗后萃取回收率并未有所改变,因此本实验萃取回收率较低可能是因为

添加了饱和氯化钠溶液,存在一定的离子抑制作用,而反洗这一步带入的损失和离子抑制作用相当,故未添加这一步。

4.2 本方法的优势 由于青蒿素分子结构中无特征光谱特性,采用常规 HPLC 测定时需衍生化反应,用于体内分析时步骤繁多且误差大,本文参考有关文献建立了 HPLC-MS 测定青蒿素的大鼠血浆中的浓度,步骤简单且灵敏度更高,更适用于青蒿素生物样品检测。与 HPLC-MS/MS 比较,仪器设备简单且也能达到同等灵敏度,方法学验证证明能够用于动物体内青蒿素药动学的研究。

[参考文献]

- [1] 向仲朝,杨德山,龚光隆. 青蒿素的高效液相色谱测定法[J]. 现代预防医学,2007, 34 (12): 2332.
- [2] 申薇薇,王锐利,胡爽,等. 高效液相-柱后衍生化法测定青蒿素含量[J]. 中国药物与临床,2007, 7 (9): 657.
- [3] Adyasha Bharati, S C Sabat. A spectrophotometric assay for quantification of artemisinin[J]. Talanta, 2010, 82: 1033.
- [4] T Gordi, M Ashton, Z Yu, et al. Direct analysis of artemisinin in plasma and saliva using coupled-column high-performance liquid chromatography with a restricted-access material pre-column [J]. Chromatogr B, 2000, 742: 155.
- [5] K Na-Bangchang, J Karbwang, L N Hung, et al. Simple high-performance liquid chromatography method with electrochemical detection for the simultaneous determination of artesunate and dihydroartemisinin in biological fluids [J]. J Chromatogr B, 1998, 708: 201.
- [6] 方翼,王静,潘志恒,等. LC-MS/MS 测定人血浆中青蒿素和磷酸萘酚喹的浓度[J]. 药物分析杂志,2009, 29 (8): 1264.
- [7] Xing J, Yan H X, Zhang S Q, et al. A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma [J]. Mass Spectrom, 2006, 20: 1463.
- [8] LI L, D Pabbisetty, P Carvalho, et al. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of artemisinin in rat serum and its application in pharmacokinetics[J]. J Chromatogr B, 2008, 867: 131.
- [9] N Lindegardh, J Tarning, P V Toi, et al. Quantification of artemisinin in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49 (3): 768.



Determination of artemisinin in rat plasma with HPLC-MS and its application

FU Chuan¹, YU Jiyang², ZOU Jing², HE Lin^{2*}, DONG Yun³, HUANG Yuan¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. Department of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China;

3. Intensive Care Unit Department, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

[**Abstract**] **Objective:** To develop a method for determining artemisinin in rat plasma *in vivo*. **Method:** HPLC-MS was adopted. Estazolam was selected as an internal standard (I. S.). The sample and I. S. were extracted using methyl tertbutyl ether and measured at *m/z* of 305 and 296, respectively. **Result:** Within the linear range of 5-500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, the ratio of artemisinin's peak area and I. S. peak area and the concentration showed good linearity, thus the minimum concentration was set to be 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The methodology proved that the method is so suitable for determining the drug concentration in rat blood that it can be used for studying pharmacokinetics in animals.

[**Key words**] artemisinin; HPLC-MS; pharmacokinetics

doi:10.4268/cjmm20121927

[责任编辑 陈玲]