

肠道中胆酸盐及脂类对难溶性药物蒿甲醚的增溶作用

伍飞臻¹, 杨立基¹, 张琪¹, 薛鸿娇¹, 杨兆祥², 普俊学², 蔡铮^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广东省新药筛选重点实验室, 广州 510515;

2. 昆药集团股份有限公司, 昆明 650100)

[摘要] **目的:**考察肠道中胆酸盐及脂类对难溶性药物蒿甲醚溶解度的影响。**方法:**测定蒿甲醚在不同 pH 磷酸盐缓冲液、胆酸盐溶液及胆酸盐/脂类混合胶束溶液中的平衡溶解度。考察的肠道中胆酸盐包括牛磺胆酸盐(TC), 牛磺脱氧胆酸盐(TDC), 牛磺鹅脱氧胆酸盐(TCDC), 甘氨胆酸盐(GC), 甘氨脱氧胆酸盐(GDC)和甘氨鹅脱氧胆酸盐(GCDC)。外源性脂肪的水解产物脂肪酸和单甘油酸酯用于评价食物中脂肪对蒿甲醚的增溶作用。**结果:**pH 对蒿甲醚溶解度的影响不大,其在磷酸盐缓冲液(pH 2~12)中的溶解度 96.0~109.6 mg·L⁻¹。混合胆酸盐能明显增溶蒿甲醚,当胆酸盐达到生理浓度(15 mmol·L⁻¹)时,蒿甲醚的溶解度增加了近4倍。各单一胆酸盐对蒿甲醚的增溶作用不尽相同,其中 TC 和 GC 的增溶作用较小,而 TDC, TCDC, GDC 与 GCDC 增溶作用均较强。加入外源性脂类(脂肪酸和单甘油酸酯)能进一步增加蒿甲醚的溶解度。**结论:**蒿甲醚在进食状态下的溶解度更高。肠道中的胆酸盐与外源性脂类均能显著增加蒿甲醚的溶解度,促进其在肠道的吸收。

[关键词] 蒿甲醚; 胆酸盐; 脂类; 溶解度; 胶束; 青蒿

[中图分类号] R283.6; R284.1; R945; O645.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016200006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160603.1140.024.html>

[网络出版时间] 2016-06-03 11:40

Effect of Bile Salts and Lipids in Intestine on Solubility of Artemether as a Poorly Water-soluble Drug

WU Fei-zhen¹, YANG Li-ji¹, ZHANG Qi¹, XUE Hong-jiao¹, YANG Zhao-xiang², PU Jun-xue², CAI Zheng^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of

Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. KPC Pharmaceuticals Inc., Kunming 650100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of bile salts and lipids in the intestine on the solubility of artemether, a poorly water-soluble drug. **Method:** Equilibrium solubility of artemether in phosphate buffers with different pH, bile salts and bile salts/lipids mixed micelle solution were determined, bile salts in the intestine included taurocholate (TC), taurodeoxycholate (TDC), taurochenodeoxycholate (TCDC), glycocholate (GC), glycodeoxycholate (GDC) and glycochenodeoxycholate (GCDC). Fatty acids and monoglycerides, the main hydrolytic products of the exogenous fat, were used to evaluate effect of fat in food on the solubility of artemether. **Result:** Effect of pH on the solubility of artemether was not significant. The solubility of artemether in buffer phosphate (pH 2-12) 96.0-109.6 mg·L⁻¹. Artemether was solubilized by mixed bile salts micelles, when the physiological concentration reached 15 mmol·L⁻¹, the solubility of artemether increased by nearly four times. There was some difference in solubilization of various bile salts, TC and GC had slightly effect on the solubilization; however, TDC, TCDC, GDC and GCDC could significantly influence the solubility of artemether.

[收稿日期] 20160229(018)

[基金项目] 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究项目(81120108025)

[第一作者] 伍飞臻,在读硕士,从事中药新型给药系统的研究, Tel:020-61648597, E-mail: feizhen2013@sina.com

[通讯作者] *蔡铮,博士,副教授,从事中药新型给药系统的研究, Tel:020-61648597, E-mail: caizheng2002@sina.com

Addition of fatty acid and monoglycerides to simulate fat in food resulted in significantly increase in solubilization.

Conclusion: The solubility of artemether can be substantially increased by fat in food. Bile salts and exogenous lipids can significantly increase the solubility of artemether and promote its intestinal absorption.

[**Key words**] artemether; bile salts; lipids; solubility; micelles; Artemisiae Annuae Herba

青蒿素是从菊科植物黄花蒿中提取分离到的一种含有过氧桥的倍半萜内酯类化合物,具有高效、速效、低毒的抗疟作用^[1]。以青蒿素类药物为主的联合疗法已成为世界卫生组织推荐的抗疟疾标准疗法。青蒿素在水及油中均难溶解,为改善其溶解性,经结构优化得到油溶性的蒿甲醚,并开发了蒿甲醚油针剂^[2]。蒿甲醚对恶性疟(包括抗氯喹恶性疟及凶险型疟疾)的疗效较佳,显效迅速。近年研究表明蒿甲醚除了有抗疟活性外,还有抗肿瘤、免疫抑制、抗心律失常等药理作用^[3]。

除注射剂外,蒿甲醚的片剂、胶囊剂等口服制剂也已在临床上应用多年,疗效确切^[4]。蒿甲醚为脂溶性药物,表观油水分配系数(P)较大($\lg P = 2.2$)^[5],几乎不溶于水,但口服生物利用度约 30%^[6],相对于许多难溶性药物来说,呈现较好的口服吸收效率,提示肠道中可能存在某些因素能促进其溶解和吸收。Wiedmann 等^[7]提出食物中脂肪的水解产物(脂肪酸和单甘油酸酯)能与肠道中内源性的胆酸盐、磷脂形成混合胶束,从而促进难溶性药物的口服吸收。临床药动学研究也表明含脂肪的食物能促进蒿甲醚的吸收^[8],蒿甲醚的口服吸收过程很可能受此类物质的影响。本实验拟考察肠道中胆酸盐及脂类对蒿甲醚的增溶作用,为阐明该成分的口服吸收机制及其新型给药系统的开发提供依据。

1 材料

ACQUITY 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BT21S 型电子分析天平和 FE20 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司),WS27-2 型恒温水浴摇床(美国 Shellab 公司),5424 型离心机(德国 Eppendorf 公司),VOS-301SD 型真空干燥箱(日本 Eyela 公司)。

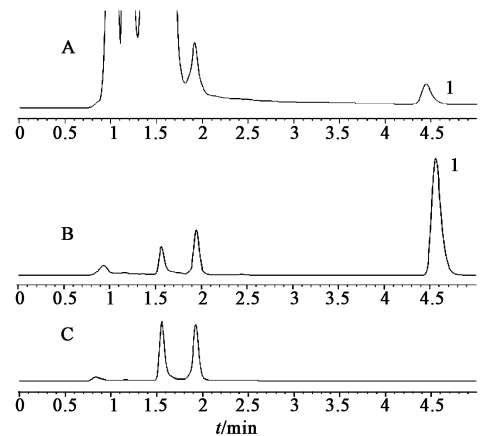
蒿甲醚(昆明制药集团股份有限公司,批号 I20141022,质量分数 100.3%),牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、牛磺鹅脱氧胆酸钠、甘氨酸鹅脱氧胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠(上海笛柏化学品技术有限公司),甘氨酸脱氧胆酸钠、油酸(上海晶纯生化科技股份有限公司),甘油单油酸酯(嘉兴思诚化工有限公司),水为纯化水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分

析纯。

2 方法与结果

2.1 蒿甲醚的 UPLC 检测^[9]

2.1.1 色谱条件 SB C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm),柱温 28 °C,流动相乙腈-水(75:25),流速 0.4 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,进样量 10 μL。见图 1,蒿甲醚的保留时间约 4.5 min,其他组分对其测定无干扰。



A. 供试品; B. 对照品; C. 阴性样品; 1. 蒿甲醚

图 1 蒿甲醚的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of artemether

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取蒿甲醚 25 mg,置于 5 mL 量瓶中,用流动相定容,得 5 g·L⁻¹蒿甲醚贮备液。精密吸取该贮备液适量,加流动相稀释得质量浓度为 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.82 mg·L⁻¹的系列溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 1.156X + 8.585$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 7.82 ~ 500 mg·L⁻¹。

2.2 pH 对蒿甲醚溶解度的影响 精密称取磷酸二氢钠 3.12 g,加水 100 mL 配成 0.2 mol·L⁻¹的溶液。用磷酸与 1.0 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液调成 pH 分别为 2.0, 4.0, 6.5, 7.4, 8.0, 10.0, 12.0 的磷酸盐缓冲液。将过量的蒿甲醚分别加入上述 2.0 mL 磷酸盐缓冲液中,涡旋混匀,置于 (37 ± 2) °C, 50 r·min⁻¹ 水浴摇床振荡 24 h,离心 (1 万 r·min⁻¹, 10 min, 下同),取上清液 100 μL,加入乙腈 300 μL,涡旋混匀,离心。取上清液按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果

发现蒿甲醚在 pH 2.0 ~ 12.0 的平衡溶解度变化不大(96.0 ~ 109.6 mg·L⁻¹),表明 pH 对蒿甲醚溶解度的影响较小。

2.3 胆酸盐对蒿甲醚溶解度的影响

2.3.1 混合胆酸盐对蒿甲醚溶解度的影响 肠道中主要含有 10 种胆酸盐,其中 4 种的总质量分数仅占 5%,故选取其他 6 种胆酸盐^[10-11],包括甘氨酸胆酸盐(glycocholate, GC),甘氨酸脱氧胆酸盐(glycodeoxycholate, GDC),甘氨酸鹅脱氧胆酸盐(glycochenodeoxycholate, GCDC),牛磺胆酸盐(taurocholate, TC),牛磺脱氧胆酸盐(taurodeoxycholate, TDC)和牛磺鹅脱氧胆酸盐(taurochenodeoxycholate, TCDC)。这 6 种胆酸盐按 GC-GDC-GCDC-TC-TDC-TCDC(6:4:6:3:2:3)混合^[12],用 pH 6.5 磷酸盐缓冲液配制浓度为 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15 mmol·L⁻¹ 的混合胆酸盐溶液。取过量蒿甲醚分别加入 2.0 mL 的上述混合胆酸盐溶液中,按 2.2 项下方法测定平衡溶解度,见图 2。结果显示蒿甲醚的溶解度随着混合胆酸盐浓度的增加而增加,当混合胆酸盐浓度 > 5 mmol·L⁻¹ 时,增速明显提升,可推断该混合胆酸盐系统的临界胶束浓度约 5 mmol·L⁻¹;至 15 mmol·L⁻¹ 时,蒿甲醚溶解度接近 500 mg·L⁻¹,与不含胆酸盐的磷酸盐缓冲液相比,蒿甲醚的溶解度增加了近 4 倍。

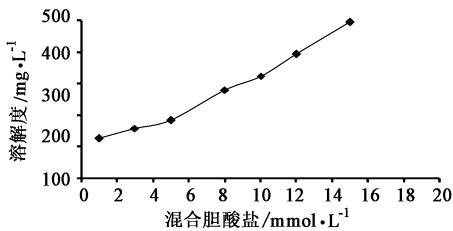


图 2 混合胆酸盐浓度对蒿甲醚平衡溶解度的影响

Fig. 2 Effect of concentration of mixed bile salts on equilibrium solubility of artemether

2.3.2 单一胆酸盐对蒿甲醚溶解度的影响 考察混合胆酸盐中 6 种单一胆酸盐对蒿甲醚增溶作用的差异,用 pH 6.5 磷酸盐缓冲液分别配制浓度为 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15 mmol·L⁻¹ 的各单一胆酸盐溶液。将过量蒿甲醚分别加入 2.0 mL 的上述单一胆酸盐溶液中,按 2.2 项下方法测定平衡溶解度,见图 3。结果显示 GDC, GCDC, TDC 和 TCDC 对蒿甲醚的增溶效果显著,而 GC 与 TC 对蒿甲醚的增溶效果不明显。各类胆酸盐对蒿甲醚的增溶作用均小于混合胆酸盐,强弱大致为脱氧胆酸盐 ≈ 鹅脱氧胆酸盐 > 胆酸盐。

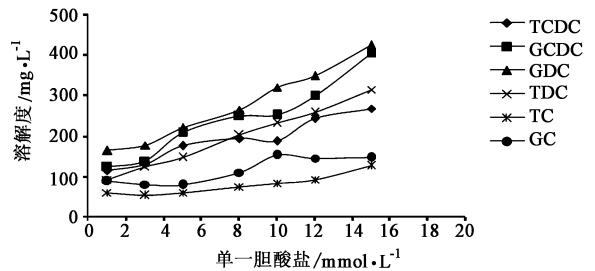


图 3 单一胆酸盐对蒿甲醚平衡溶解度的影响

Fig. 3 Effect of various single bile salts on equilibrium solubility of artemether

2.4 胆酸盐/脂类混合胶束对蒿甲醚溶解度的影响

2.4.1 胆酸盐/脂类混合胶束的制备 肠道胆汁中除混合胆酸盐(MBS)外,还含有与难溶性药物增溶作用相关的内源性磷脂(PL),胆酸盐与磷脂的浓度比为 4:1^[13]。胆汁中的磷脂几乎全部是卵磷脂(PC)^[14],故采用 PC 来模拟内源性脂类。食物中脂肪即外源性脂类的主要成分为三甘油酸酯(TG),TG 可在体内水解为 2 个脂肪酸(FA)和 1 个单甘油酸酯(MG),故 FA 和 MG 的浓度比为 2:1,选择油酸(OA)和对应的甘油单油酸酯(MO)来模拟外源性脂类。通常在空腹、进食 30 min 和 60 min 状态下,十二指肠中 MBS 浓度分别为 5, 15, 10 mmol·L⁻¹^[15],故选取 5, 10, 15 mmol·L⁻¹ 的 MBS 溶液(MBS05, MBS10, MBS15)考察不同进食状态下蒿甲醚的溶解度。参考文献[11]的方法,按 MBS-PC-OA-MO(15:3.75:3:1.5)的比例取一定量 PC, OA 和 MO 溶解于甲醇-三氯甲烷(1:1)中,取溶液置于离心管中,在真空干燥箱内吹干有机溶剂,得脂膜,加入混合胆酸盐溶液,在水浴超声 60 min 使混合均匀,得 MBS/PC/OA/MO 混合胶束溶液。

2.4.2 平衡溶解度的测定 取过量蒿甲醚分别加入到 2.0 mL 的 MBS05, MBS10, MBS15, MBS/PC05, MBS/PC10, MBS/PC15, MBS/PC/OA/MO05, MBS/PC/OA/MO10 及 MBS/PC/OA/MO15 胶束溶液中,各溶液的组成见表 1。按 2.2 项下方法测定平衡溶解度,见表 1。结果发现在 MBS 胶束溶液中,蒿甲醚的溶解度随 MBS 浓度的增加而显著增加;加入模拟内源性脂类的 PC,并未使增溶作用增强,反而有所下降。在用于分别模拟人体内空腹、进食 30 min 和 60 min 状态的胶束系统 MBS/PC05, MBS/PC/OA/MO15 和 MBS/PC/OA/MO10 中,蒿甲醚的溶解度随胶束浓度依次增加。MBS/PC/OA/MO15 与 MBS/PC15 相比,蒿甲醚溶解度增加 1 倍多,表明外源性脂类的增溶作用十分明显,蒿甲醚在进食后的

吸收效率可能较空腹时更高。

表 1 各种胆酸盐/脂类混合胶束对蒿甲醚平衡溶解度的影响

Table 1 Effect of various bile salts/lipids mixed micelles on equilibrium solubility of artemether

胶束系统	C/mmole·L ⁻¹				平衡溶解度 /mg·L ⁻¹
	MBS	PC	OA	MO	
MBS05	5	0	0	0	185.38 ± 2.57
MBS10	10	0	0	0	324.55 ± 7.01
MBS15	15	0	0	0	494.39 ± 18.38
MBS/PC05	5	1.25	0	0	123.15 ± 3.90
MBS/PC10	10	2.50	0	0	202.95 ± 14.49
MBS/PC15	15	3.75	0	0	276.71 ± 12.82
MBS/PC/OA/MO05	5	1.25	1	0.5	249.81 ± 18.61
MBS/PC/OA/MO10	10	2.50	2	1.0	454.77 ± 8.29
MBS/PC/OA/MO15	15	3.75	3	1.5	578.55 ± 20.81

3 讨论

pH 对蒿甲醚溶解度的影响不显著,这可能与其结构有关。蒿甲醚的化学结构中无酸性或碱性基团,在酸性或碱性溶液中不会发生水解,故胃肠道中 pH 的变化不影响蒿甲醚的溶解度。但蒿甲醚在酸性环境(pH 1.0)中的代谢速率明显更快,是弱碱性环境(pH 7.4)中的 4 倍^[16]。

胆汁中的胆酸盐是一种生物型阴离子表面活性剂,在水中可自发形成胶束。当浓度较低时,胆酸盐形成初级胶束,而当浓度较高时,这些初级胶束聚集形成较大的二级胶束,所形成的胶束可对难溶性物质产生增溶作用。肠道中的胆酸盐种类较多,本文选取了其中主要的 6 种胆酸盐进行考察,测得混合胆酸盐的临界胶束浓度约 5 mmol·L⁻¹,与文献[11]报道一致。研究发现肠道中不同种类胆酸盐对蒿甲醚的增溶作用不同,脱氧胆酸盐 ≈ 鹅脱氧胆酸盐 > 胆酸盐,可能因为胆酸盐比脱氧胆酸盐多一个羟基,疏水性降低致使增溶能力减弱。

进食不仅能促进胆汁分泌,食物中的脂肪在肠道分解成的脂肪酸与单甘油酸酯也可与胆酸盐形成胆酸盐/脂类混合胶束,进一步增加蒿甲醚的溶解度。本文为临床上脂肪类食物对蒿甲醚口服吸收的促进作用提供了理论依据,也提示对于一些难溶性药物,餐后适时服用,有可能改善其口服生物利用度。本文通过测定体外平衡溶解度,证实了肠道中胆酸盐及脂类对蒿甲醚存在显著的增溶作用,后续将借助大鼠在体肠灌流模型和 Caco-2 细胞模型等方法,进一步考察胆酸盐及脂类对蒿甲醚肠吸收的影响,以阐明其口服吸收机制。

[参考文献]

[1] 郭宗儒. 青蒿素类抗疟药的研制[J]. 药学学报,

2016,51(1):157-164.

[2] 符林春,郭兴伯,简华香,等. 蒿甲醚注射液 I 期临床试验[J]. 广州中医学院学报,1989,6(1):42-45.

[3] 张楠. 青蒿素类药物的主要研究进展[J]. 药物研究,2013,30(1):13-16.

[4] 张亚红,王丽娟,甘淋玲,等. 蒿甲醚及其制剂的临床应用研究进展[J]. 重庆医学,2014,43(29):3967-3970.

[5] 王晓蕾,孙艺丹,王锐利,等. 蒿甲醚在不同介质中的平衡溶解度及表观油水分配系数的测定[J]. 药物评价研究,2013,36(2):114-118.

[6] Kamolrat S, Newton P N, Paktiya T I, et al. Artemether bioavailability after oral or intramuscular administration in uncomplicated falciparum malaria [J]. Antimicrob Agents Chemother,2003,47(12):3795-3798.

[7] Wiedmann T S, Liang W, Kamel L. Solubilization of drugs by physiological mixtures of bile salts[J]. Pharm Res,2002,19(8):1203-1208.

[8] White N J, Vugt M V, Ezzet F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine [J]. Clin Pharmacokinet,1999,37(2):105-125.

[9] 吴越,刘中秋,黄娟,等. 蒿甲醚与亚铁盐合用的稳定性考察[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(6):467-469.

[10] Staggars J E, Hermell O, Stafford R J, et al. Physical chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption: 1. Phase behavior and aggregation states of model lipid systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings[J]. Biochem,1990,29(8):2028-2040.

[11] 张琼,李林,魏东芝,等. 胆酸盐/脂类混合胶束对疏水性姜黄素的增溶性能[J]. 华东理工大学学报:自然科学版,2010,36(5):639-644.

[12] Wang D Q, Carey M C. Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder bile: Identical pathways to corresponding model bile with three predominating sequences [J]. J Lipid Res,1996,37(12):2539-2549.

[13] 朱雷明,蔡端,吕元,等. 模拟胆汁体系中胆固醇结石内细菌对胆固醇晶体形成的作用[J]. 中华外科杂志,2004,42(24):1501-1504.

[14] 林乐明,张军. 胆汁中总磷脂的纸色谱扫描定量分析[J]. 色谱,1993,11(4):240-242.

[15] Tangerman A, van Shaik A, van der Hoek E W. Analysis of conjugated and unconjugated bile acids in serum and jejunal fluid of normal subjects [J]. Clin Chim Acta, 1986,159(2):123-132.

[16] 陈有根,余伯阳. 蒿甲醚在模拟体内酸碱环境中的代谢动力学研究[J]. 色谱,2002,20(1):37-39.

[责任编辑 刘德文]