

高效液相色谱 - 质谱联用技术测定人血浆中双氢青蒿素的含量

洪馨, 黄天来, 宓穗卿, 叶少梅, 欧卫平, 王宁生

(广州中医药大学 临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 建立了测定人血浆中的双氢青蒿素的液相色谱 - 质谱联用法。色谱条件: Alltima C₁₈ 柱(2.1 ×150 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇 - 水(体积比 85 : 15); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 用于定量分析的离子分别为 m/z 307(双氢青蒿素), m/z 275(蒿甲醚)。样品用液 - 液萃取方法处理。双氢青蒿素的线性范围为 5 ~ 200 μg · L⁻¹, 定量下限为 5 μg · L⁻¹, 日内、日间精密度(RSD)均小于 10%, 萃取回收率在 71.5% ~ 83.2% 之间($n=5$), 分析方法回收率在 98.4% ~ 101.9% 之间($n=5$)。本法操作简便、准确、灵敏度高, 适用于双氢青蒿素的药代动力学研究。

关键词: 双氢青蒿素; 高效液相色谱 - 质谱; 血药浓度

中图分类号: O657.63; R978.61 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2005)01-0046-03

Determination of Dihydroartemisinin in Human Plasma by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

HONG Xin, HUANG Tian-lai, MI Sui-qing, YE Sao-mei, OU Wei-ping, WANG Ning-sheng
(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: A sensitive and specific HPLC - MS method for the determination of dihydroartemisinin in human plasma has been developed. An Alltima C₁₈ column(2.1 ×150 mm, 5 μm) was employed with a mobile phase of methanol - water(85 : 15 by volume) at a flow rate of 0.2 mL/min. An injection volume of 20 μL was used. An electrospray ionization(ESI) source was used and operated in the positive ion mode. Extracted ion mass spectra m/z 307 and m/z 275 were used to quantify dihydroartemisinin and the internal standard of artemether, respectively. A linear calibration curve was obtained in the concentration range of 5 ~ 200 μg · L⁻¹. The lower quantitation limit was 5 μg · L⁻¹. The inter- and intra-day RSDs were both less than 10%, and the extraction recovery was 71.5% ~ 83.2% ($n=5$). The analytical recovery was 98.4% ~ 101.9% ($n=5$). The method has merits of simplicity, sensitivity, and accuracy, and hence can be used for the pharmacokinetics study of dihydroartemisinin in human plasma.

Key words: Dihydroartemisinin; Liquid chromatography - mass spectrometry; Drug concentration in plasma

双氢青蒿素是我国自行研制的抗疟药青蒿素的衍生物, 它是由青蒿素经四氢硼钠还原而来。双氢青蒿素是青蒿素类抗疟药在体内的主要活性代谢物, 具有较强的抗疟活性^[1]。目前, 据国内外文献报道, 双氢青蒿素的体液测定方法有 HPLC - UV 法^[2], HPLC - ECD 法^[3,4]等。由于双氢青蒿素没有发色团, 紫外吸收很低, 用紫外检测器对其进行检测时, 要用酸碱使其开环分解, 再测定分解产物的紫外吸收, 处理方法较为繁琐, 灵敏度较低。国外对生物样品中双氢青蒿素的测定多采用高效液相色谱 - 电化学检测法, 方法灵敏度较高, 但该方法对色谱系统有苛刻的要求, 整个色谱环境须保证无氧, 试验条件较难控制。

本文在国内首次采用了 LC - MS 联用技术对血浆中的双氢青蒿素进行了测定, 方法简便, 灵敏度高, 可用于双氢青蒿素的药代动力学及生物利用度的研究。

1 实验部分

1.1 药品与试剂

双氢青蒿素标准品、蒿甲醚标准品(昆明制药厂提供); 双氢青蒿素胶囊(重庆华立制药公司); 正常人

收稿日期: 2004-01-20; 修回日期: 2004-10-10

基金项目: 世界卫生组织资助项目(ICP/MVP/022 AC; 01.01.ig.08)

作者简介: 洪馨(1973-), 女, 广东汕头人, 助理研究员, 硕士; 宓穗卿, 联系人, Tel: 020-36585303,

E-mail: yddlx@gzhtcm.edu.cn

血浆(广州市中心血站提供); 甲醇、乙酸乙酯、叔丁基甲基醚(色谱纯, 美国 Merck 公司); 水为重蒸水。

1.2 仪器

LC-MS 液相色谱-质谱联用仪(美国 Bruker 公司), 配有美国 Agilent 公司高效液相色谱仪(1100 系列四元泵, 自动进样器, DAD 检测器); ESQUIRE 质谱仪; ESI 离子源。

1.3 色谱及质谱条件

色谱柱: Alltima C₁₈ 柱(2.1 × 150 mm, 5 μm, 美国 ALLTECH 公司); 流动相: 甲醇-水(体积比 85/15); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

电喷雾离子源(ESI); 正离子检测; Nebulizer: 1.03 × 10⁵ Pa; 干燥气流速: 5 L/min; 干燥气温度: 300 °C; 毛细管电压: -4 500 V; 扫描范围: 50 ~ 600 *m/z*。

1.4 对照品溶液及内标溶液

精密称取 105 干燥的双氢青蒿素及蒿甲醚适量, 用流动相溶解, 配制成 200、20 mg · L⁻¹ 的贮备液及内标溶液。临用时, 用流动相将贮备液稀释成标准系列浓度溶液。

1.5 血样预处理

精密量取服药后血浆样品 0.5 mL, 加入 20 mg · L⁻¹ 的蒿甲醚(内标)溶液 12 μL, 加入流动相 20 μL 混匀, 加入混合溶剂乙酸乙酯-叔丁基甲基醚(体积比 6/4) 5.0 mL, 漩涡混合 5 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 移取上清液, 36 °C 水浴中氮气吹干。残渣用 200 μL 流动相溶解, 进样 20 μL 进行 LC-MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析

本方法用正离子方式检测, 在一级全扫描质谱图中未见双氢青蒿素的准分子离子峰 *m/z* 285 和内标蒿甲醚的准分子离子峰 *m/z* 299, 仅见双氢青蒿素及蒿甲醚的 [M+Na]⁺、[2M+Na]⁺、[M+Na-C₂H₅OH]⁺ 的峰(图 2)。本法选择双氢青蒿素的 [M+Na]⁺ (*m/z* 307) 和蒿甲醚的 [M+Na-C₂H₅OH]⁺ (*m/z* 275) 进行定量分析。

2.2 方法专属性

分别取空白人血浆 0.5 mL, 按“1.5”项下操作, 进样 20 μL, 见图 3A; 将一定浓度的双氢青蒿素标准溶液及内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 见图 3B; 双氢青蒿素的保留时间为 3.9 min, 内标为 7.0 min。取健康志愿者服药后收集的血浆样品, 同法操作, 见图 3C。结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰双氢青蒿素及内标的测定。

2.3 标准曲线

分别精密量取空白人血浆 0.5 mL, 依次加入双氢青蒿素标准系列溶液 20 μL, 配制质量浓度为 5、10、20、50、100、200 μg · L⁻¹ 的血浆样品, 除不加入流动相 20 μL 外, 按“血样预处理”项下操作, 建立标准曲线。以待测物与内标的峰面积的比值 *A* 对待测物质量浓度 *C* 进行线性回归, 得双氢青蒿素的标准曲线回归方程为: $A = -0.0681 + 0.0160C$, $r = 0.9993$, 线性范围: 5 ~ 200 μg · L⁻¹, 定量下限为 5 μg · L⁻¹。

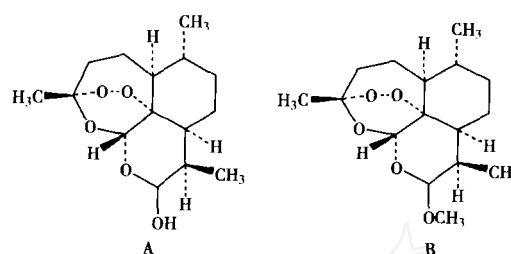


图 1 双氢青蒿素(A)与蒿甲醚(B)的结构式
Fig. 1 Structures of dihydroartemisinin(A) and artemether(B)

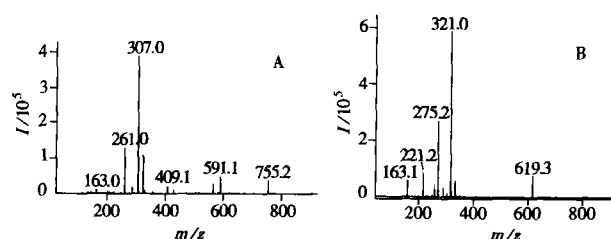


图 2 双氢青蒿素(A)和蒿甲醚(B)的质谱图
Fig. 2 Mass spectra of dihydroartemisinin(A) and artemether(B)

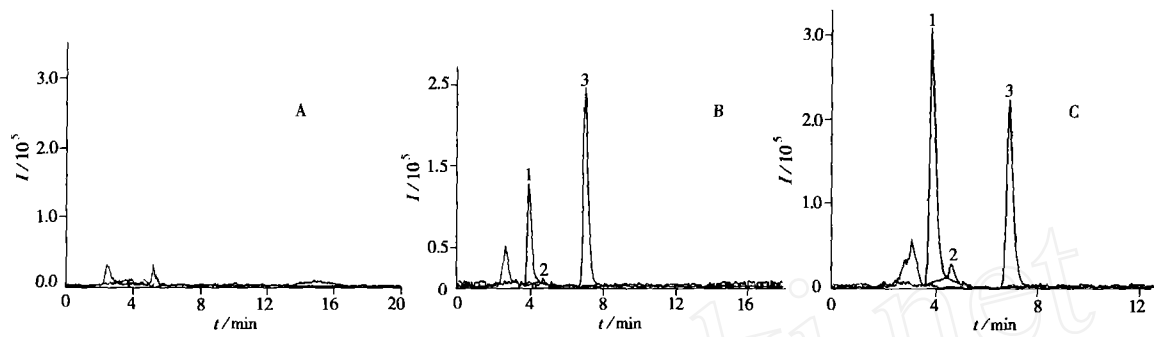


图 3 双氢青蒿素 (m/z 307) 和蒿甲醚 (m/z 275) 的提取离子色谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatograms of dihydroartemisinin at m/z 307 and artemether at m/z 275

A. blank plasma sample; B. blank plasma spiked with $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ dihydroartemisinin and artemether; C. dihydroartemisinin and artemether in a healthy volunteer's plasma 1.5 h after single oral administration of 40 mg dihydroartemisinin capsule
1. -anomer of dihydroartemisinin; 2. -anomer of dihydroartemisinin; 3. artemether

2.4 回收率试验

取空白人血浆 0.5 mL, 加入不同浓度的双氢青蒿素标准溶液 $20 \mu\text{L}$, 使成低、中、高含量 (10 、 50 、 $150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的空白加样样品。按“2.3”项下操作, 测定该方法的方法回收率。将测得的双氢青蒿素的峰面积与内标的峰面积的比值与相应浓度的双氢青蒿素对照品及内标溶液未经处理直接测定的比值相比, 得到萃取回收率, 结果见表 1。

表 1 双氢青蒿素的回收率和日内、日间精密度 ($n=5$)

Table 1 Recovery and precision of dihydroartemisinin in human plasma ($n=5$)

Added $A/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $F/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Method recovery $R/\%$	Extraction recovery $R/\%$	intra-day RSD $s_r/\%$	inter-day $s_r/\%$
10.00	9.84	98.4 ± 3.5	71.5 ± 4.5	5.8	7.1
50.00	48.20	96.4 ± 2.3	83.2 ± 3.2	4.5	3.2
150.00	152.85	101.9 ± 4.7	80.4 ± 4.1	3.5	4.1

2.5 日内精密度与日间精密度

按“2.3”项下操作, 制备双氢青蒿素的低、中、高 3 个质量浓度 (10 、 50 、 $150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的样品, 1 日内每个浓度测定 5 次, 连续测定 5 日, 求算日内精密度与日间精密度, 结果见表 1。

2.6 稳定性考察

据报道^[4]双氢青蒿素血浆样品室温放置 3 d 或 -20°C 保存 4 个月或经过 4 个冷冻-解冻循环均保持稳定。故本文根据试验需要, 仅对双氢青蒿素血浆样品经液-液萃取处理后的稳定性进行了考察。结果表明, 低、中、高 3 个含量 (10 、 50 、 $150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的双氢青蒿素血浆样品经液-液萃取处理后室温放置 12 h 后的相对标准偏差在 $\pm 10\%$ 之内。

2.7 在药代动力学研究中的应用

选用 6 名男性健康志愿者, 单剂量口服 40 mg 双氢青蒿素片后, 分别于 0、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 h 各时间点, 取上肢静脉血约 4 mL。应用本法进行测定得到的药时曲线, 见图 4。

2.8 讨论

双氢青蒿素存在 α 、 β 差向异构体。据文献报道^[5], 双氢青蒿素的 α 、 β 异构体在溶液中经过互相转化后会达到一种平衡状态。本文在所选择的试验条件下, 双氢青蒿素中 α 、 β 异构体在平衡后的比例稳定在 10:1。在测定的线性范围内 α 体

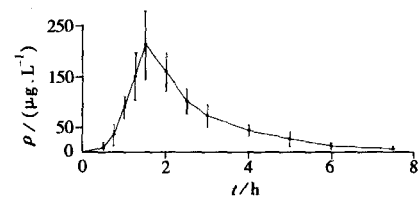


图 4 健康志愿者口服 40 mg 双氢青蒿素后双氢青蒿素的血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Mean plasma concentrations of dihydroartemisinin in healthy volunteers after single oral administration of 40 mg dihydroartemisinin capsule ($n=6$)

(下转第 52 页)

水样分析结果。北小河污水处理厂所采用的几种污水处理工艺中,对邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯及壬基酚去除效率最高的是超滤 + 反渗透工艺;活性炭处理工艺对邻苯二甲酸二异辛酯去除效率最高,对邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯去除效率最低。在两种过滤工艺中,微滤处理工艺的去效率明显高于超滤处理工艺的去效率。

表 2 北小河污水处理厂各工艺段出水中壬基酚与邻苯二甲酸酯的测定 ($\mu\text{g/L}$)

Table 2 Levels ($\mu\text{g/L}$) of nonylphenols and phthalates in effluents from each treatment stages in beixiaohu sewage treatment plant

Compound	Raw water (总进水)	Effluent from the secondary sedimentation (二沉出水)	Added with activated char (+ 活性炭)	+ Microstraining (+ 微滤)	+ Ultrafiltration (+ 超滤)	+ Ultrafiltration and reverse osmosis (+ 超滤 + 反渗透)
Dimethyl phthalate	0.028	0.011	0.026	0.006	0.015	ND*
Diethyl phthalate	0.405	0.019	0.029	0.009	0.018	0.008
Dibutyl phthalate	0.449	0.153	0.272	1.078	0.293	0.202
Di - iso - octyl phthalate	0.204	0.154	0.039	0.042	0.208	0.164
4 - n - Nonylphenol	0.011	ND	ND	ND	ND	ND

*. no detection

3 结 论

该方法背景干扰小,重现性好,灵敏度高,并成功应用于环境样品测定。其中壬基酚、邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯的方法检出限分别为 5.5×10^{-13} (w)、 3.7×10^{-13} (w)、 4.2×10^{-13} (w)、 1.9×10^{-13} (w)、 0.8×10^{-13} (w) ($S/N = 3$)。

参考文献:

- [1] BLACKBURN M, WALDOCK M, WALDOCK M. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales[J]. *Water Res*, 1995, 29(7): 1623 - 1629.
- [2] NAYLOR C, MIEURE J, ADAMS W, *et al.* Alkylphenol ethoxylates in the environment[J]. *J Amer Oil Chemists Soc*, 1992, 69(3): 695 - 702.
- [3] AHEL M, GIGER W. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography[J]. *Anal Chem*, 1985, 57(8): 1577 - 1583.
- [4] LID H, JONGMAN P. Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 3089 - 3095.
- [5] 张银华, 陈旭东, 李植生, 等. 湖泊沉积物中邻苯二甲酸酯类的 GC/MS 分析[J]. *分析测试学报*, 1995, 14(5): 17 - 21.
- [6] 陈正夫, 朱 坚, 周亚康, 等. 环境激素的分析与评价[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 175.
- [7] ROLAND J W, HORST M, SCHRÖDER F. Simultaneous determination of 4-nonylphenol and bisphenol A in sewage sludge[J]. *Anal Chem*, 2002, 74: 3566 - 3574.

(上接第 48 页)

的浓度极低,不易定量,故本文只对双氢青蒿素的 体进行了定量测定。

参考文献:

- [1] 赵凯存, 宋振玉. 双氢青蒿素在人的药代动力学及与青蒿素的比较[J]. *药学学报*, 1993, 28(5): 342 - 346.
- [2] THOMAS C G, WARD S A, EDWARDS G. Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite dihydroartemisinin by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr*, 1992, 583(1): 131 - 136.
- [3] KARBANG J, NA - BANG CHANG K, MOLUNTO P, *et al.* Determination of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 690(1-2): 259 - 265.
- [4] SANDRENAN N, SIOUFI A, GODBILLON J, *et al.* Determination of artemether and its metabolite, dihydroartemisinin, in plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection in the reductive mode[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 691(1): 145 - 153.
- [5] 刘 宁, 杨腊虎, 张中行, 等. 双氢青蒿素差向异构体转化的研究[J]. *药物分析杂志*, 2002, 22(4): 303 - 306.