

## 离子液体对环孢素 A 口服吸收的影响

闫鑫<sup>1#</sup>, 曹玉珍<sup>1#</sup>, 姜小梅<sup>1</sup>, 汪 曩<sup>1</sup>, 石玉杰<sup>2\*</sup>

(1. 天津大学精仪学院, 天津 300072; 2. 北京大学药学院, 北京 100191)

**摘要:** 研究基于胆碱和香茅酸的离子液体 ([Cho] [CA], COCA) 对难溶性药物环孢素 A (CsA) 口服吸收的影响。由胆碱和香茅酸采用一步中和法制备 COCA, 对其进行质谱、核磁共振氢谱 <sup>1</sup>H-NMR 和红外光谱表征后, 采用超声辅助法制备 CsA-离子液体 (CsA-COCA), 并将其灌装于肠溶胶囊, 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 检测大鼠分别口服 CsA-COCA 胶囊剂及 CsA 混悬剂后全血中 CsA 的浓度, 并采用 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。动物福利和实验过程均遵循北京大学医学部动物伦理委员会的规定。研究表明, 与口服 10 mg·kg<sup>-1</sup> CsA 混悬液相比, 口服相同剂量的离子液体制剂所获得的 CsA 的药时曲线下面积 (area under the curve, AUC) 提高了 2.81 倍, 半衰期 (half-life time,  $T_{1/2}$ ) 延长了 4.41 倍, 平均滞留时间 (mean residence time, MRT) 提高了 1.77 倍。本研究制备的 COCA 可显著促进 CsA 在大鼠体内的口服吸收, 且能延长其半衰期。本研究可为 CsA 等难溶性药物的口服制剂研究提供借鉴。

**关键词:** 离子液体; 环孢素 A; 口服吸收; 难溶性药物; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1180-07

## The effect of ionic liquid on the oral absorption of cyclosporine A

YAN Xin<sup>1#</sup>, CAO Yu-zhen<sup>1#</sup>, JIANG Xiao-mei<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, SHI Yu-jie<sup>2\*</sup>

(1. School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** To investigate the effect of ionic liquid based on choline and citronellic acid ([Cho] [CA], COCA) on the oral absorption of poorly soluble drug cyclosporin A (CsA), COCA was synthesized using choline and citronellic acid by one-step neutralization method, and then characterized by mass spectrometry, <sup>1</sup>H-NMR, and infrared spectrophotometry. Next, CsA-ionic liquid (CsA-COCA) was prepared by ultrasonic-assisted method and filled into enteric-coated capsules. After oral administration of CsA-COCA capsules or CsA suspension preparation in rats, CsA concentration in whole blood was assayed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method, and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 software. All animal care and experiments followed the approval of Institutional Animal Care and Use Committee at Peking University Health Science Center. The results indicated that compared with oral administration of 10 mg·kg<sup>-1</sup> CsA suspension, the area under the curve (AUC), half-life time ( $T_{1/2}$ ), and mean residence time (MRT) of CsA obtained by oral administration the same dose of CsA-COCA increased by 2.81, 4.41, and 1.77 times, respectively. The COCA prepared in this study can significantly promote the oral absorption of CsA in rats, and prolong the half-life. This study can provide reference for the study of oral formulation of insoluble drugs such as CsA.

**Key words:** ionic liquid; cyclosporine A; oral absorption; poorly soluble drug; LC-MS/MS

收稿日期: 2021-11-22; 修回日期: 2021-12-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603041).

#共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-82801590, E-mail: yujiestone@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1668

离子液体 (ionic liquid, IL) 是由有机阳离子和无机或有机阴离子构成的在室温下呈液态的有机盐, 又称为室温熔融盐, 最早由 Wilks 和 Zaworotko 在 1992 年提出<sup>[1]</sup>。选用胆碱、氨基酸和糖等天然成分制备的第三代 IL 具有低挥发性、离子的高度可调性、生物相容性等特性, 再加上制备工艺简单, 使其在药物合成、递送及大分子药物的保护和稳定等方面有巨大应用潜力, 在生物医学领域受到越来越多的关注<sup>[2,3]</sup>。

在药物口服递送方面, IL 可用于增加难溶性药物的溶解度、保护大分子药物, 提高其在消化道环境中的稳定性, 增强药物在肠上皮的渗透性, 从而提高药物的口服生物利用度<sup>[4-6]</sup>。Shi 等<sup>[4]</sup>采用一种胆碱基离子液体 (CAGE) 口服递送 BCS II 类难溶性小分子药物索拉非尼, 使索拉非尼溶解度由  $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  增至  $500 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提高约  $10^6$  倍, 口服生物利用度显著提高。Banerjee 等<sup>[5]</sup>将 CAGE 用于蛋白多肽类药物胰岛素的口服递送, 发现 CAGE 可保护胰岛素免受消化道内酶的降解, 同时可通过打开肠上皮紧密连接促进胰岛素的细胞旁路转运, 显著提高口服生物利用度, 当口服给药  $10 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 胰岛素-CAGE 制剂可使大鼠血糖持续下降高达 45%, 取得了空前的递送效果, 该研究还发现胰岛素可在 CAGE 中室温稳定保存 2 个月, 在  $4^\circ\text{C}$  条件下至少稳定保存 4 个月。Angsantikul 等<sup>[6]</sup>采用另一种胆碱基 IL 口服递送 IgG 抗体, 亦取得了积极的递送效果。这些研究结果表明胆碱基 IL 在解决难溶性药物和生物大分子药物的口服吸收方面有特殊优势, 是非常有应用前景的递送载体。然而胆碱基 IL 对溶解性和透膜性都很差的 BCS IV 类药物口服吸收的影响迄今未见报道。

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 又名环孢菌素 A、环孢霉素 A、山地明、环孢灵或环孢多肽 A, 是由 11 个氨基酸组成的环状多肽, 1972 年由 Borel 发现, 1979 年被 Calne 首次应用于器官移植, 1983 年被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于器官移植, 用作免疫抑制剂<sup>[7]</sup>。CsA 具有高亲脂性, 水溶性极差, 属于 BCS IV 类药物<sup>[8,9]</sup>。此外, CsA 口服生物利用度的个体差异性极大, 同时还是窄治疗指数药物。迄今为止, 如何提高 CsA 的体内性能一直是人们广泛关注的问题, 并相继报道有如脂质体<sup>[10]</sup>、自乳化药物递送系统<sup>[11]</sup>、固体脂质纳米粒<sup>[12]</sup>、嵌段共聚物胶束<sup>[13]</sup>及固体分散体<sup>[14]</sup>、纳米混悬剂<sup>[15]</sup>等多种 CsA 口服药物递送系统的研究。虽然这些研究分别取得了许多积极结果, 但因脂质体载药量低、嵌段共聚物胶束原料不易得及纳米混悬剂物理稳定性差等诸多问题使其临床应用受限, 迄今只有 CsA 的口服自乳化药物递送系统 (Sandimmun Neoral<sup>®</sup>) 成功上市。

因此目前 CsA 制剂主要为微乳口服液及注射剂。

本研究选用一种胆碱基离子液体 COCA ([Cho][CA], 胆碱与香茅酸以 1:2 摩尔比合成) 作为口服递送载体, 选择 CsA 作为 BCS IV 类药物模型, 研制了 CsA 的离子液体制剂 (CsA-COCA), 通过开展大鼠体内药代动力学研究, 探讨 IL 对溶解性和渗透性都很差的 BCS IV 类药物 CsA 口服吸收的影响。

## 材料与方法

**仪器** 岛津 LC-20AD 高效液相色谱系统 (日本 Shimadzu 公司); API4000 型三重四级杆串联质谱仪及 Analyst 1.6.3 数据工作站, 配备 Turbo ionspray 离子源 (美国 AB SCIEX 公司); 傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 紫外分光光度计 (UH5300 型, 日立科学仪器公司); Bruker-AVANCEIII 400 M 型超导 NMR 波谱仪及 Topspin 3.1 处理软件 (美国 Bruker 公司); 真空干燥箱 (上海一恒科学仪器公司); 马尔文激光粒度仪 Malvern Zetasizer (英国 Malvern 公司)。

**试剂** CsA (98%)、环孢素 D (CsD, 95%) (上海源叶生物科技有限公司); 香茅酸 (95%, 四级试剂, 美国 Aladdin 试剂公司); 胆碱碳酸氢盐 (80%, 四级试剂)、七水硫酸锌 (99.5%) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na, 99%, 美国 Selleck 生物科技有限公司); 大鼠肠溶胶囊 (上海玉研科学仪器有限公司); 甲醇 (HPLC/MS 级)、乙腈 (HPLC/MS 级) (美国 Fisher Scientific 公司); 甲酸 (HPLC 级, 北京迪科马科技有限公司)。

**实验动物** 雌性 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 6~8 周龄, 体重  $200 \pm 10 \text{ g}$ , 购自北京维通利华实验动物中心。动物福利和实验过程均遵循北京大学医学部动物伦理委员会的规定。

**COCA 的合成及表征** 精密称量两当量的香茅酸 (3.405 g), 一当量的胆碱碳酸氢盐 (2.065 g), 将香茅酸放入 100 mL 圆底烧瓶中, 放入 1.0 cm 搅拌子, 将胆碱碳酸氢盐缓慢滴加到圆底烧瓶中, 将上述混合物在  $40^\circ\text{C}$  下搅拌反应 16 h 后, 旋转蒸发 2 h 除去水分, 随后真空干燥 48 h, 即得 COCA。待 COCA 合成之后, 采用核磁共振氢谱、质谱和红外光谱法对其进行表征。

**LC-MS/MS 条件** 色谱柱: HALO 90 Å, AQ-C18 反相柱 ( $2.7 \mu\text{m}$ ,  $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ )。色谱条件: 流动相 A 为 0.1% 甲酸-水、B 为 0.1% 甲酸-甲醇; 洗脱梯度: (0.00~0.50 min, 40% B; 0.50~1.30 min, 40%→100% B; 1.30~3.00 min, 100% B; 3.00~3.01 min, 100%→40% B; 3.01~4.00 min, 40% B); 流速:  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量:  $5 \mu\text{L}$ ; 柱温:  $55^\circ\text{C}$ ; 自动进样器温度:  $8^\circ\text{C}$ 。质谱

条件: 电喷雾-正离子模式; 离子源喷射电压 (ion spray voltage, IS): 5 500 V; 气帘气 (curtain gas, CUR): 13 psi; 雾化气 (nebulizing gas, Gas1): 13 psi; 辅助加热气 (heater gas, Gas2): 15 psi; 离子源温度 (ion source temperature, TEM): 150 °C。CsA 及其内标 CsD 的监测离子对、去簇电压、碰撞能 (CE) 等质谱参数及保留时间见表 1。

**Table 1** LC-MS/MS measurement parameters of the determinand. CE: Collision energy; DP: Declustering potential; CsA: Cyclosporin A; CsD: Cyclosporin D

Substance	Parent ion/Da	Product ion/Da	CE/eV	DP/V	Retention time/min
CsA	1 220.2	1 203.2	48	56	2.72
CsD	1 217.0	425.4	93	151	2.73

**CsA-COCA 的制备及其 CsA 的含量测定** 精密量取适量 COCA 离子液体置于 1.5 mL EP 管中, 精密称量适量 CsA 加入其中, 使得药物浓度为 50 mg·mL<sup>-1</sup>, 涡旋 30 s, 将 EP 管避光 25 °C 条件下超声 15 min, 即得 CsA-COCA 制剂。然后在天平称取 CsA-COCA 适量溶于甲醇, 先用甲醇梯度稀释至 10 μg·mL<sup>-1</sup>, 再用 50% 甲醇-水 (含 0.1% 甲酸) 梯度稀释得到 100 ng·mL<sup>-1</sup> 浓度, 加入内标 CsD 工作液配成 CsA 终浓度为 50 ng·mL<sup>-1</sup> 的样品溶液, CsD 终浓度为 1 μg·mL<sup>-1</sup>, 平行制备 3 个样品。使用 CsA 对照品溶液及 CsD 储备液, 配制 25~1 250 ng·mL<sup>-1</sup> 范围内的 5 个标准系列溶液。将上述样品采用 LC-MS/MS 法进行分析。

**全血样本处理** 精密称取 CsD 对照品 2 mg (含量为 95%, 含 CsD 1.9 mg), 放入 1.5 mL EP 管中, 加入 950 μL 甲醇得到 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液, 用 50% 甲醇水-0.1% 甲酸稀释成 50 μg·mL<sup>-1</sup> 的内标工作溶液, 4 °C 储存备用。

将准备好的 100 μL 的全血样品 (空白全血样品、质控样品或加标全血样品等) 转移到 1.5 mL EP 管中, 加入 ZnSO<sub>4</sub> 溶液 (0.1 mol·L<sup>-1</sup>, 100 μL), 涡旋混匀 40 s, 加入 300 μL 乙腈和 10 μL 内标工作液, 再次涡旋 1 min, 4 °C 条件下离心 (13 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min), 将上清液转移到液相小瓶, 进样采用 LC-MS/MS 法分析<sup>[15-18]</sup>。

**全血样品分析用 LC-MS/MS 方法学考察** 参考中美两国的食品药品监督管理局推荐的生物样品定量分析方法验证指导原则, 选取待测物不同浓度水平的质控样品, 对所建立分析方法的专属性、线性、定量限、精密性、提取回收率、基质效应 (matrix effect, ME) 进行验证<sup>[19,20]</sup>。

**专属性考察** 取 6 个不同个体的大鼠空白全血 (后续简称空白全血; 加入甲醇代替内标溶液)、空白全

血加内标溶液、空白全血加 CsA 标准样本 (加入甲醇代替内标溶液) 和受试大鼠在服药 4 h 后的血样加入内标溶液, 按照“全血样本处理”项下方法操作, 所得样品进行 LC-MS/MS 进样分析, 分别得到相应色谱图。

**标准曲线** 在室温和避光条件下, 精密称取 CsA 对照品适量溶于甲醇制得 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液, 用 50% 甲醇水-0.1% 甲酸稀释制得系列浓度作为标准曲线工作液, 分别取标准曲线工作液与内标及全血混合后, 制得内标浓度为 1 μg·mL<sup>-1</sup>, CsA 浓度分别为 1 250、1 000、500、250、100、50、25、20、10、5 ng·mL<sup>-1</sup> 的标准系列样本, 采用 LC-MS/MS 法分析。以 CsA 峰面积 (analyte area) 与内标峰面积 (IS area) 的比值对血药浓度作回归计算得到标准曲线。

**准确度和精密性** 按“标准曲线”项下的溶液配制方法制备 50、100、500 ng·mL<sup>-1</sup> 共 3 个浓度的质控样品。每个浓度 6 个平行样本, 分别进样分析, 以标准曲线求得 CsA 浓度, 计算 CsA 回收率, 并考察精密性。

**提取回收率** 制备低、中、高质控样品对应浓度下的未提取样品 E。按照“全血样本处理”项下方法操作, 使用沉淀蛋白法处理空白全血 (将内标工作液换为乙腈), 得处理后的空白样品溶液。在 3 个 EP 管中分别加入低、中、高浓度的药物工作液、内标工作液和处理后的空白样品, 吹吸混匀后进行液质联用分析, 测定未提取样品中的药物和内标的峰面积比值 (S<sub>E</sub>), 将对应的质控样品中药物和内标的峰面积比值 (S<sub>0</sub>) 代入公式  $R = S_E/S_0 \times 100\%$  计算提取回收率 (R)。每种样品平行制备 3 份, 计算不同浓度样品提取回收率及其 RSD。

**基质效应考察** 制备低、中、高质控样品对应浓度下的纯溶剂样品 S。使用沉淀蛋白法处理水, 在 3 个 EP 管中分别加入低、中、高浓度的药物工作液、内标工作液和处理后的水, 吹吸混匀后进行液质联用分析, 测定纯溶剂样品中的药物和内标的峰面积比值 (S<sub>S</sub>); 按照上述方法制备未提取样品 E 并测定药物和内标的峰面积比值 (S<sub>E</sub>), 代入公式  $ME = S_E/S_S \times 100\%$  计算基质效应 (ME)。平行制备 3 份各浓度的纯溶剂样品, 各浓度基质效应应处于 85%~115% 之间。

**CsA-COCA 在 SD 大鼠体内药代动力学研究** 将 SD 大鼠随机分为 A、B 组, 每组 6 只, 给药前禁食 12 h, 不禁水。A 组口服 CsA-COCA 制剂, 将 CsA-COCA 装入大鼠用胶囊给药; B 组灌胃 CsA 混悬液 (临用前用 1% CMC-Na 配成混悬液, 为 CsA-suspension), 两组给药剂量均为 10 mg·kg<sup>-1</sup>。给药后 0、0.5、1、2、4、6、8、12、16、21、26 h 在眼眶静脉丛取 0.5 mL 全血, 立即置于预装 EDTA-K2 的无菌抗凝管中, 保存于 -20 °C 待测。将上述血样按照“全血样本处理”项下方法处理制备成色

谱分析用样本, 采用上述 HPLC-MS/MS 方法分析, 标准曲线法计算每个时间点的药物浓度, 将平均血药浓度对时间作图, 并按下述方法计算药代动力学参数。

**药代动力学参数和统计学分析** 使用 DAS 2.0 软件以房室模型计算主要药代动力学参数平均药时曲线下面积 (AUC)、平均驻留时间 (MRT)、体内半衰期 ( $T_{1/2}$ )、药峰时间 ( $T_{max}$ )、最大血药浓度 ( $C_{max}$ ), 并结合 Excel 软件采用双侧  $t$  检验对药代动力学参数进行显著性检验<sup>[21]</sup>, 对各参数进行统计比较, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结果

### 1 COCA 的合成与表征

COCA 的合成路线如图 1A 所示, 合成所得的 COCA (1:2) 清澈透明、略带微黄色 (图 1B), 有松木香味, 其微观离子结构如图 1C。

**1.1 质谱表征** 对所合成的 COCA 采用质谱方法表征, 采用蠕动泵进样, 仪器调谐模式检测。质谱条件为: 电喷雾-正离子模式, IS: 5 500 V; CUR: 10 psi; Gas1: 13 psi; Gas2: 0 psi; 去簇电压 (declustering potential, DP): 120 V; TEM: 0 °C。采用上述条件在  $m/z$  50~500 Da 范围内扫描所得的 Q1 图谱如图 2A。图中显示胆碱的分子离子峰 105.0, 子离子峰 60.4, 离子簇峰 207.6。离子液体在质谱分析时常会形成  $[(AB)A]^+$  离子簇, A 为其阳离子基团, B 为其阴离子基团<sup>[22-25]</sup>。质荷比为 148.9 的离子峰归属为  $[AB+H+Na]^2+$ , 质荷比为 351.3 的离子峰归属为  $[AB+2K+H]^+$ 。质荷比为 377.1 的离子峰, 为  $[(AB)A]^+$  离子簇所对应的峰, 与文献所述离子液体的特征峰规则相符。质荷比为 462.3 的离子峰归属为  $[(A_2B)+IsoProp+Na+H]^+$ 。

**1.2 红外光谱分析** 采用 FITR 光谱仪测定 CA 和 COCA 的红外光谱 (图 2B)。CA 红外光谱图中 -COOH

的吸收峰在  $1\ 705.5\ \text{cm}^{-1}$  处, 而 COCA 红外光谱图中相应位置的峰明显减弱, 说明 COCA 中 -COOH 比例减少。此外, COCA 在  $3\ 303.2\ \text{cm}^{-1}$  处有特征吸收峰, 说明有胆碱引入的 -OH。同时, COCA 在  $1\ 376.08\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰强度增加, 说明体系内烷烃比例增加。

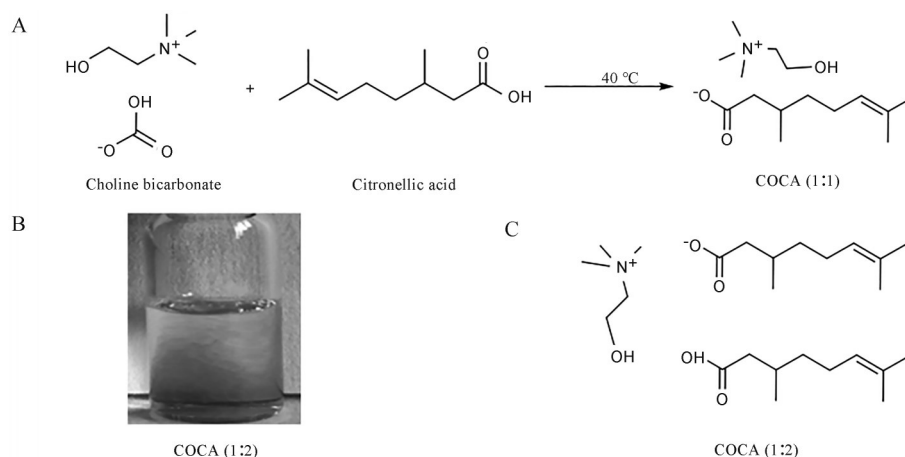
**1.3 核磁共振氢谱分析** 采用核磁共振氢谱  $^1\text{H NMR}$  对所合成的 COCA 进行表征, 所得图谱见图 2C。氢谱信号的归属是:  $\delta$  0.83 处为香茅酸编号 11 碳上 (C11) 甲基的质子峰;  $\delta$  1.11 处是香茅酸 C12 上亚甲基质子峰;  $\delta$  1.55 处是香茅酸 C16 和 17 上的甲基质子峰;  $\delta$  2.03 处为香茅酸 C9 和 C13 的亚甲基质子峰;  $\delta$  2.06 处为香茅酸 C10 上的质子峰;  $\delta$  3.12 处为胆碱上 C5、6 和 7 上的甲基峰;  $\delta$  3.41 和 3.83 处为胆碱上 C3 和 C2 上的质子峰;  $\delta$  3.57 处为胆碱上羟基质子峰, 限于被羰基氧屏蔽, 氢谱图信号弱, 如图 2C 所示;  $\delta$  5.04 处为香茅酸 C14 上质子峰; 而胆碱碳酸氢盐中的碳酸氢根上的氢一般在  $\delta$  12.00 处出现, 但在图 2C 中并未发现有相应的信号反应, 说明体系中的碳酸氢根反应完全。因而, 这些信息结合质谱及红外光谱的结果可验证离子液体 COCA 的合成。

### 2 CsA-COCA 中 CsA 的含量

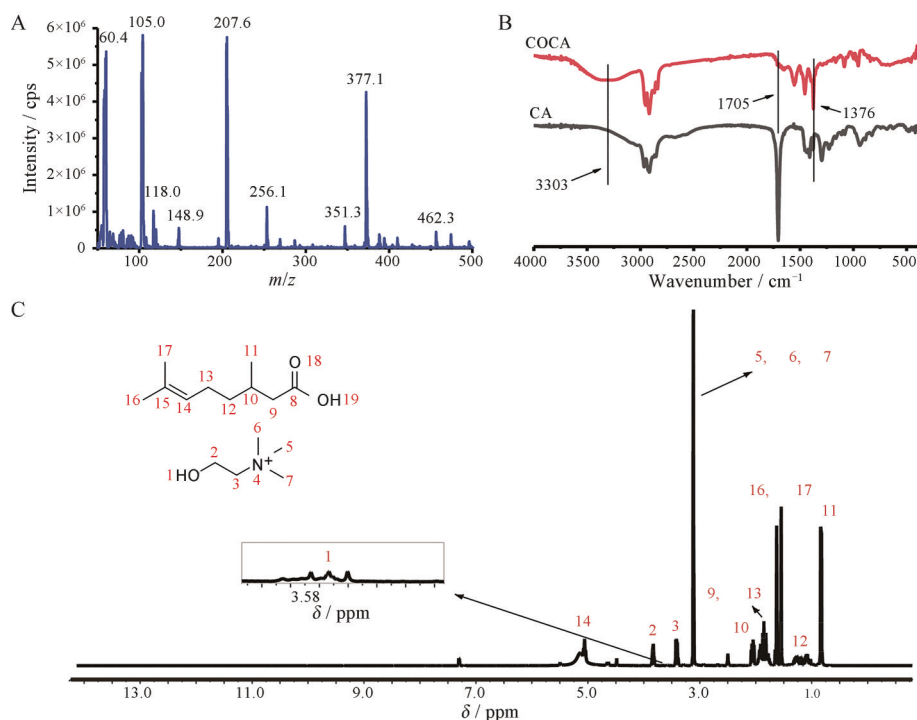
不含血的标准系列样本用 LC-MS/MS 法测定, 所得的标准曲线为  $y = 0.008\ 9x + 0.072\ 5$  ( $r^2 = 0.997\ 0$ ), 线性良好, 用该法测得 CsA-COCA 制剂中 CsA 的含量为  $49.43 \pm 4.76\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3 全血样品分析用 LC-MS/MS 方法学考察

经过对比分析, CsA 的药物峰保留时间为约 2.71 min, 空白全血样品在此液质分析条件下不出峰, 可见全血中内源性物质不干扰 CsA 的含量测定, 方法的专属性好。将标准系列样本用 LC-MS/MS 法分析, 所得数据赋予权重因子  $1/x$ , 得回归方程为  $y = 0.006\ 43x - 0.003\ 02$



**Figure 1** Synthesis of ionic liquid ([Cho][CA], COCA). A: Synthesis route of COCA; B: The image of COCA (1:2); C: Structure of COCA (1:2)

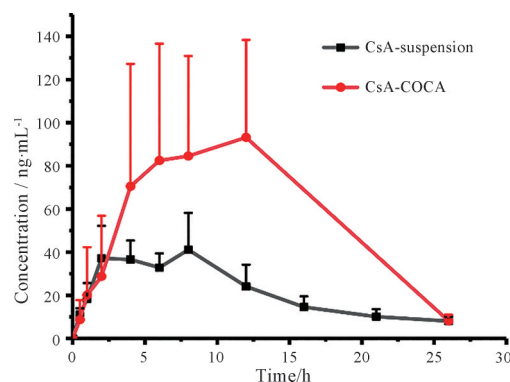


**Figure 2** Characterization of COCA. A: Mass spectrum of COCA; B: Fourier transform infrared (FTIR) spectrum of citronellol acid and COCA; C:  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum of COCA

( $r = 0.9992$ ), 表明 CsA 在  $5.0 \sim 1250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性良好。按上述方法测得全血中 CsA 的最低浓度为  $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (定量限)。采用上述 LC-MS/MS 法测得低、中、高 3 个浓度的平均回收率分别为 100.2%、99.2% 和 106.9%, 精密度 (RSD) 分别为 14.5%、13.1% 和 0.9%, 表明该法的准确度和精密度均符合含量测定要求。同时, 该法测得  $50$ 、 $100$ 、 $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的提取回收率分别为 77.82%、82.65% 和 75.36%, 相应 RSD 值分别为 12.5%、13.1% 和 5.1%。三组数据 RSD 均不超过 15%, 符合要求。此外, CsA 在低、中、高浓度下的 ME 值分别为 88.4%、93.8% 和 90.9%, RSD 值分别为 3.0%、3.1% 和 1.9%, 表明样本基质对 CsA 及其内标的检测无明显影响。

#### 4 CsA-COCA 在 SD 大鼠体内药代动力学研究结果

大鼠单次口服 CsA-COCA 制剂和 CsA-suspension 的平均血药浓度-时间曲线见图 3。使用 DAS 2.0 软件分析, 采用二室模型拟合得到 CsA-COCA 制剂及 CsA-suspension 的主要药动学参数, 见表 2。CsA-COCA 制剂组的 AUC 是混悬液组的 2.81 倍, MRT 是混悬液组的 1.77 倍,  $T_{1/2}$  是混悬液组的 4.40 倍, 两组间的 AUC、MRT 及  $T_{1/2}$  均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。两组的血药浓度分别在给药 9.67 和 4.33 h 达峰, 离子液体组的最大血药浓度 [ $C_{\max} = (135.00 \pm 37.24) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ] 远大于混悬剂组 [ $C_{\max} = (45.98 \pm 14.75) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ], 这些参数的差异说



**Figure 3** Blood mean concentration-time profile of CsA after single dose administration of CsA-COCA and CsA-suspension in rats respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$

**Table 2** Pharmacokinetic parameter of CsA in rat blood after oral administration of CsA-COCA and CsA-suspension.  $^*P < 0.05$  vs CsA-suspension ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Parameter/unit	CsA-COCA	CsA-suspension
AUC/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	1853.81 $\pm$ 447.73*	659.66 $\pm$ 221.04
MRT/h	25.61 $\pm$ 9.82*	14.47 $\pm$ 1.40
$T_{1/2}$ /h	37.94 $\pm$ 28.19*	8.61 $\pm$ 1.99
$T_{\max}$ /h	9.67 $\pm$ 2.66*	4.33 $\pm$ 2.34
$C_{\max}$ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	135.00 $\pm$ 37.24*	45.98 $\pm$ 14.75

明在相同剂量 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 下, 离子液体能有效提高 CsA 的口服吸收。相比于 CsA 混悬剂, CsA-COCA 制剂组 CsA 的血药浓度具有更大误差, 可能是由于 CsA-

COCA的口服吸收存在较大的个体差异性。

## 讨论

本研究以胆碱碳酸氢盐和香茅酸1:2的摩尔比采用一步中和法制备了COCA,将CsA原料药溶解在COCA中,只需超声即可完成CsA-COCA的制备,将CsA-COCA灌装于胶囊中即可给药,制剂的制备不需要特殊设备,具有操作工艺简单,易于放大的优点。

由于CsA在血中与血浆蛋白和红细胞结合率很高,33%~47%存在于血浆中,4%~9%存在于淋巴细胞,5%~12%存在于粒细胞,47%~58%集中在红细胞,且入血后药物能快速分布到红细胞中,故选择全血作为检测CsA的基质<sup>[26]</sup>,基于AB SCIEX API4000质谱平台及SHIMADZU LC-20AD液相平台,建立了LC-MS/MS分析方法。

离子液体已被广泛用于提高难溶性药物的溶解度,CsA固体粉末加入到离子液体COCA中短时超声后,即可得到澄清透明的液态制剂。目前药物的研究、生产和监管重点在固体活性成分,而忽略了液体形式。离子液体增溶难溶性药物制成液体制剂,与固体形式相比,液体形式制剂有更好的溶解性、吸收性和稳定性,更易被机体吸收<sup>[27]</sup>。此外,CsA离子液体制剂在水相中稀释可形成较稳定的纳米复合物,随着稀释倍数的增加,粒径变化没有显著性差异,与文献中疏水型离子液体在水相中可形成稳定的纳米复合物的结论一致<sup>[4,28]</sup>,表明CsA能很好地增溶在COCA中,还提示CsA-COCA口服后,可能在消化道内随着胃肠蠕动被消化液稀释成具有纳米结构的复合物。CsA可能以氢键及疏水相互作用力与COCA作用而增溶在离子液体中,在肠道内,随着消化液稀释形成易被吸收的具有微观结构的单元<sup>[4]</sup>,另外,IL结构中的长链烷基结构可能起到表面活性剂的作用,通过扰乱肠上皮细胞膜而提高药物的渗透性<sup>[28]</sup>,胆碱基IL的亲水基团还可促进药物的细胞旁转运<sup>[5]</sup>,因而CsA的口服吸收得到提高,相应机制还需要更进一步研究来证明。

此外,本研究选用了COCA这一种离子液体,对离子液体能否促进BCS IV类药物CsA的口服吸收进行了初步研究,后续还需筛选有潜力的其他离子液体,进一步优化处方,以期得到更理想的制剂,促进离子液体在难溶性药物口服递送方面的应用转化。

**作者贡献:** 闫鑫和曹玉珍负责研究工作的实施及论文初稿的撰写;姜小梅和汪馥协助论文修改;石玉杰负责论文选题、研究工作指导与论文修改。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Lei Z, Chen B, Koo YM, et al. Introduction: ionic liquids [J]. *Chem Rev*, 2017, 117: 6633-6635.
- [2] Deetlefs M, Faselow M, Seddon KR. Ionic liquids: the view from mount improbable [J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 4280-4288.
- [3] Egorova KS, Gordeev EG, Ananikov VP. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine [J]. *Chem Rev*, 2017, 117: 7132-7189.
- [4] Shi Y, Zhao Z, Gao Y, et al. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes [J]. *J Control Release*, 2020, 322: 602-609.
- [5] Banerjee A, Ibsen K, Brown T, et al. Ionic liquids for oral insulin delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 7296-7301.
- [6] Angsantikul P, Peng K, Curreri AM, et al. Ionic liquids and deep eutectic solvents for enhanced delivery of antibodies in the gastrointestinal tract [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 31: 2002912.
- [7] Guada M, Beloqui A, Kumar M, et al. Reformulating cyclosporine A (CsA): more than just a life cycle management strategy [J]. *J Control Release*, 2016, 225: 269-282.
- [8] Rohan G, Neha D. BCS class IV drugs: highly notorious candidates for formulation development [J]. *J Control Release*, 2017, 248: 71-95.
- [9] Wang K, Qi JP, Weng EF, et al. Enhancement of oral bioavailability of cyclosporine A: comparison of various nanoscale drug-delivery systems [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 4991-4999.
- [10] Guan P, Lu Y, Qi J, et al. Enhanced oral bioavailability of cyclosporine A by liposomes containing a bile salt [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 965-974.
- [11] Keohane K, Rosa M, Coulter IS, et al. Enhanced colonic delivery of ciclosporin A self-emulsifying drug delivery system encapsulated in coated minispheres [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42: 245-253.
- [12] Guada M, Lana H, Gil AG, et al. Cyclosporine A lipid nanoparticles for oral administration: pharmacodynamics and safety evaluation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 101: 112-118.
- [13] Tsipotis E, Gupta NR, Raman G, et al. Bioavailability, efficacy and safety of generic immunosuppressive drugs for kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Nephrol*, 2016, 44: 206-218.
- [14] Beig A, Miller JM, Lindley D, et al. Head-to-head comparison of different solubility-enabling formulations of etoposide and their consequent solubility-permeability interplay [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 2941-2947.
- [15] Yan R, Xu L, Wang Q, et al. Cyclosporine A nanosuspensions for ophthalmic delivery: a comparative study between cationic nanoparticles and drug-core mucus penetrating nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18: 4290-4298.
- [16] Zhao P, Zhang XQ, Jiang XH, et al. LC-MS/MS determination

- of cyclosporine A in Beagle blood and bioequivalence study of cyclosporine A microemulsion [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2015, 35: 1965-1970.
- [17] Wu ZH. A New Method for Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry Method by Detection of Four Immunosuppressants in Whole Blood and Dried Blood Spots (LC-MS/MS 法定量检测全血和干血斑中 4 种免疫抑制剂的研 究) [D]. Tianjin: Tianjin University, 2020.
- [18] Zhai XH, Liu XX, Lu JQ, et al. Establishment of LC-MS/MS assay for the determination of blood immunosuppressive agents level simultaneously [J]. *Chin Hosp Pharm (中国医院药学杂志)*, 2019, 39: 774-780.
- [19] Guo W, Chen WX, Shang H, et al. Recommendations for clinical application of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Lab Med (中华检验医学杂志)*, 2017, 40: 770-779.
- [20] Sobolesky PM, Smith BE, Hubbard JA, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analyzing cannabinoids in oral fluid [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 491: 30-38.
- [21] Song S, Yu HZ, Zhu CL, et al. Cyclosporin A osmotic pump tablets which can form supersaturated micelles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 22-28.
- [22] Han YH, Ouyang P, Zhang YF, et al. Comprehensive analysis of chloroaluminate and composite ionic liquids using direct analysis in real time mass spectrometry [J]. *Sci China Chem (中国科学: 化学)*, 2020, 50: 720-728.
- [23] Cecchini MM, Steinkoenig J, Reale S, et al. Universal mass spectrometric analysis of poly(ionic liquid)s [J]. *Chem Sci*, 2016, 10: 1039.
- [24] Steinkoenig J, Cecchini MM, Goldmann AS, et al. Just add salt: a mass spectrometric analysis method for imaging anion-exchanged poly(ionic liquid)s [J]. *Macromol Rapid Commun*, 2016, 37: 1662-1666.
- [25] Liu WH. Synthesis and Study on Extraction of Benzimidazolium Ionic Liquids (苯并咪唑类离子液体的合成及其萃取性能研究) [D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [26] Peng Y, Huang H, Nie B, et al. Research progress of individualized dosage regimens of cyclosporin A based on its population pharmacokinetics [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2020, 44: 426-432.
- [27] Shamshina JL, Kelley SP, Gurau G, et al. Chemistry: develop ionic liquid drugs [J]. *Nature*, 2015, 528: 188-189.
- [28] Nurunnabi M, Ibsen KN, Tanner EEL, et al. Oral ionic liquid for the treatment of diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 25042-25047.