

中国药理学报 1981年6月; 2(2): 138—144

蒿甲醚在动物的抗疟作用和毒性

顾浩明 刘明章 吕宝芬 许建一 陈丽娟 王美英 孙伟康 胥 彬 嵇汝运

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

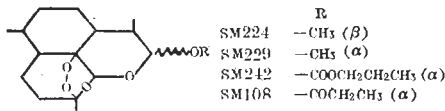
提要 从各方面综合考虑, 选定蒿甲醚重点进行了临床前疗效和毒性试验。蒿甲醚对伯氏疟原虫抗氯喹株

和敏感株, 食蟹猴疟原虫的疗效都表明效价比青蒿素高, 对鼠疟的抗性指数为 1.7, 疗效影响因素试验表

明 im 油剂, 分 3-4 d 给有较好的疗效。小鼠、大鼠、兔、狗和猴的急性毒性比氯喹低。狗、猴的亚急性毒性试验通过生化检验、心电、血尿常规, 病理组织及一般观察表明该药安全度大。狗每旬 qd × 3d 每次 36mg/kg 凡 3 月组主要中毒表现为体重减轻, 肝实质细胞中度油肿, 水样变性。所有受试动物未见 im 局部刺激性。对 SM242 和 SM108 进行了初步试验。

关键词 蒿甲醚, 丙氧酰胺二氢青蒿素 (SM242); 丙酰二氢青蒿素 (SM108); 伯氏疟原虫; 食蟹猴疟原虫

青蒿素的一些衍生物对伯氏疟原虫 (*P. berghei*) 的抗氯喹株 (RC 株) 的抗疟作用远比青蒿素为高⁽¹⁾, 从化学稳定性, 制备工艺, 鼠疟疗效及小鼠预初毒性等方面考虑, 重点对醚型中的蒿甲醚 (为甲基二氢青蒿素的差向异构体混合物, 其中 β 体即 SM224 占 98%, α 体即 SM229 占 2%) 进行了临床前疗效和毒性试验, 同时也对碳酸酯型中的丙氧甲酰二氢青蒿素 (SM242) 和酯型中的丙酰二氢青蒿素 (SM108) 进行了初步试验。SM224, SM229, SM242 及 SM108 的结构式如下:



实 验

一、药物配制

除另外注明特定剂型外, 药物均溶于注射用茶油内, 用作兔、狗、猴试验者还进行加热灭菌处理。

二、疗效

1. 对伯氏疟原虫的治疗作用 1) 蒿甲醚, SM242, SM108 及青蒿素对 RC 株的疗效比较: 方法同前文⁽¹⁾, 结果见表 1。可见若以 90% 疟原虫抑制剂量 (SD_{90}) 为比较标准, 则蒿甲醚, SM242 及 SM108 的效价分别为青蒿素的 6, 12 及 9 倍; 若以实验组内 5 只小鼠药后 5 d 疟原虫全部转阴最低量 (CD_{100}) 为比较标准, 则分别为 14, 31 及 28 倍。2) 蒿甲醚对氯喹敏感株 (N 株) 的疗效: 方法同前文⁽¹⁾, 结果 50% 疟原虫抑制剂量 (SD_{50}) 为 0.60 mg/kg, SD_{90} 为 1.0 mg/kg, 药后 5 d 50% 小鼠原虫转

表 1 Therapeutic tests on RC strain of *Plasmodium berghei* (daily dose: mg/kg)

	suppressive dose curative dose			
	SD_{50}	SD_{90}	CD_{50}	CD_{100}
artemether	0.60	1.0	1.22	1.8
SM242		0.50	0.47	0.82
SM108	0.32	0.66	0.76	0.91
artemisinin		6.2		25
dihydro-artemisinin		3.7		

阴量 (CD_{50}) 为 0.72 mg/kg, CD_{100} 为 1.6 mg/kg。由 1) 和 2) 求得抗性指数为 1.7。3) 蒿甲醚, SM242 及青蒿素对 RC 株明显期原虫血症的疗效: 每组小鼠 5 只, 方法为感染后第 6 d, 各组感染率达 $1.2 \pm (SD) 0.6$ 至 $2.9 \pm 0.5\%$, 第 7 d (day0) 开始给药, 连给 3 d, 第 10 d (day4) 及 21 d (day15) 涂片镜检, 结果见表 2。可见衍生物的效价明显比青蒿素高。4) 对疗效的影响因素: (1) 剂型: 蒿甲醚分别用西黄蓍胶和茶油配制, 小鼠接种 RC 株后第 2-4 d 灌胃 (ig) 不同剂量, qd, 第 6 (day6), 15 (day15), 21 (day21) d 涂片镜检, 结果见表 3。day6 项下, 西胶 30 mg/kg 的疗效还不如茶油 3.8 mg/kg 组, 故应用油剂的疗效比西黄蓍胶剂高得多。(2) 给药途径: 蒿甲醚及青蒿素分别 ig 和 im 给药, 次数和涂片镜检日期同 4) (1) 剂型项内所述, 结果见表 4。day6 项下, 青蒿素 ig 60 mg/kg 组的疗效还不如 im 15 mg/kg, 也可见 day15 及 day21 项下蒿甲醚, ig 15 mg/kg 组的疗效只与 im 1.9 mg/kg 组相当, 故无论青蒿素或蒿甲醚对 RC 株均以 im 效佳。(3) 给药次数: SM224 油剂对带 RC 株小鼠的给药方案分 6 种, 总剂量均为 6 mg/kg。结果见表 5。以 3-4 d 方案疗效好。

1979 年 12 月 28 日收稿 1981 年 1 月 28 日修回
部分内容于 1978 年全国抗疟药研究会议及 1978 年度全国药学会议上报告过。

表 2 Therapeutic tests against RC strain of *P. berghei*. 5 mice/group. ($\bar{x} \pm SD$)

	daily dose (mg/kg)	day 0		day 4		day 15	
		infective rate (%)	positive parasitemia blood	infective rate (%)	negative blood	infective rate (%)	recrudescence rate
control	—	1.8±1.1	5/5	4.5 ±2.2	0/5	(5/5)*	
artemether	3	2.9±0.5	5/5	0.02±0.04	4/5	2.0 ±1.5	5/5
	6	1.6±1.3	5/5	0	5/5	2.1 ±2.9	5/5
	12	1.2±0.6	5/5	0	5/5	0.2 ±0.4	1/5
SM242	1.5	1.9±0.8	5/5	0	5/5	2.7 ±2.4	5/5
	3	1.4±1.0	5/5	0	5/5	2.5 ±4.9	2/5
	6	2.1±1.0	5/5	0	5/5	0.04±0.08	1/5
artemisinin in tea seed oil	30	2.9±1.0	5/5	0	5/5	3.9 ±2.9	5/5
	60	2.3±0.5	5/5	0.04±0.08	4/5	6.0 ±2.3	5/5
	120	1.6±0.7	5/5	0	5/5	5.5 ±2.1	5/5
artemisinin in peanut oil by solubilization	31	1.4±0.4	5/5	0	5/5	(2/5)*	
	63	1.7±0.8	5/5	0	5/5	1.7 ±2.2	3/5
	125	2.7±1.3	5/5	0	5/5	4.2 ±1.3	5/5

* death rate of mice

表 3 Therapeutic effects against RC strain of *P. berghei*. 5 mice/group

	daily dose (mg/kg)	negative rate (death rate) of mice		
		day 6	day 15	day 21
artemether in tragacanth gum suspension	7.5	0/5	(4/5)	(4/5)
	15	0/5	(5/5)	(5/5)
	30	0/5	(5/5)	(5/5)
artemether in tea seed oil solution	3.8	3/5	1/5	0/5
	7.5	5/5	3/5	2/5
	15	5/5	5/5	5/5

2. 对食蟹猴疟原虫 (*P. cynomolgi*) 的治疗作用 用 4.6 ± 0.6 kg 的恒河猴 (*M. mulatta*) 11 只, ♀ ♂ 皆有, iv 疟原虫后 7 d, 原虫密度达高峰, im 蒿甲醚, SM 242, SM 108 及青蒿素进行治疗, qd × 3 d, 观察转阴期及复燃情况, 阴性标准为查满厚片 100 个视野未见无性体, 阳性片以 WBC 比例法计数原虫。转阴后定期复查。某些复燃猴在其原虫达高密度后进行复治, 以观察是否产生快速抗性。结果见

表 6。足够量的青蒿素和衍生物杀灭原虫速度很快。一般用药后 24 h 已使原虫密度下降 98% 以上。即使幸存原虫, 其形态也大都产生较大变化, 严重者胞质消失, 仅残留呈深紫色圆或不规则的核点, 1-2 d 内可使血片转阴。表 6 还指出病猴 2 d 内疟原虫转阴的最低量蒿甲醚为 1 mg/kg 以下, 而青蒿素则在 10 mg/kg 以上。无复燃量蒿甲醚为 4 mg/kg 以上, 而青蒿素油剂需 20 mg/kg。

表 4 Therapeutic effects via ig and im administrations against RC strain of *P. berghei*. 5 mice/group

	route of administration	daily dose (mg/kg)	negative rate of mice		
			day 6	day 15	day 21
artemether	ig	3.8	3/5	1/5	0/5
		7.5	5/5	3/5	2/5
		15	5/5	5/5	5/5
	im	1.9	5/5	5/5	5/5
		3.8	5/5	5/5	5/5
		7.5	5/5	5/5	5/5
artemisinin	ig	15	0/5		
		30	0/5		
		60	0/5		
	im	15	4/5		
		30	4/5		
		60	4/5		

表 5 Effects of artemether against RC strain of *P. berghei*. 20 mice/group

group	dosage regimen	post medication day 8		day 13
		inhibition rate (%)	negative parasitemia (%)	survival rate of mice (%)
A	qd × 1d	91.0	35**	55**
B	qd × 2d	84.9	45**	80**
C	bid × 2d	99.9	80	80**
D	qd × 3d	99.9	85	95
E	qd × 4d	99.9	95	100
F	qd × 5d	92.6	61*	94

compared with group E * P<0.05 ** P<0.01

三、毒性

1. 小鼠 18-22 g, ♀, 按 Finney's 法计算 LD₅₀⁽²⁾, 1次 im 观察给蒿甲醚, SM242及 SM 108 后第 13 d 的 LD₅₀ 值分别为 263(234—295), 203(185—223), 146(130—163)mg/kg, 并由此算得 im 蒿甲醚油剂的化疗指数 (LD₅₀/SD₅₀) 为 447。这 3 个衍生物的急性中毒症状和氯喹明显不同, 氯喹所致死亡大多数发生于 im 后 5 min 内, 这是因为氯喹直接对心肌抑制

而引起急性心源性脑缺血综合症, 而这 3 个衍生物的毒性表现缓慢, 抑制, 静伏不食, 死亡陆续发生在 7 d 内。

2. 大鼠 20 只, 179±17 g, ♀ ♂ 各半, 分 4 组。3 组 im 蒿甲醚 5—40 mg/kg, qd × 14 d, 对照组 im 油。第 15 d 全部解剖。SM 224 对大鼠生长的影响列于表 7。360 mg/kg 组体重减轻 (P<0.05), 130 及 40 mg/kg 组无影响。组织切片镜检, 高剂量组肝实质细胞轻度

表 6 Therapeutic tests against *P. cynomolgi*

	mon-key	daily dose (mg/kg)	number of asexual forms/100 WBC						days for clearance of asexual forms	recrudescence	days of recrudescence or following-up
			day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6			
artemether	A	8	132	occ	0	0			2	-	128
	B	8*	510	4	0	0			2	-	14
	F	4	896	10	0	0			2	-	115
	I	4	652	0	0				1	-	118
	K	4	3336	10	0	0			2	+	20
	O	2	640	0	0				1	-	71
	J	2	1040	26	0	0			2	-	132
	O	1	290	6	0	0			2	+	16
SM242	D	1.7	368	occ	0	0			2	+	33
	D	0.15	2200	1800	195	occ	0	0	4	+	17
SM108	E	1.7	1180	0	0				1	-	81
	E	0.30	2500	64	0	0			2	+	10
artemisinin	K	20	3060	occ	0	0			2	-	120
	D	20	24	2	0	0			2	-	49
	H	10	1680	9	0	0			2	+	20
	C	10	374	occ	0	0			2	+	23
	G	4	1408	255	4	occ	0	0	4	+	8
	C	4	2820	occ	0	0			2	+	24
	O	1	22	2	occ	0	0		3	+	9

*only once occ: the parasites were found occasionally

表 7 Effect of im artemether for 14 days on growth of rats. 5 rats/group

	total dose (mg/kg)	body weight (g) $\bar{x} \pm SD$		
		before medication	post day 9	medication day 14
artemether	40	174±22	197±30	234±36
	130	181±18	203±19	223±20
	360	178±17	177±25	163±31*
control (tea seed oil)	—	182±16	203±13	211±15

*compared with control group, $P < 0.05$

脂肪变性, 其它与对照组相比未见异常。另取 15 只 284 ± 39 g 大鼠, ♂, 分 3 组。第 1 组 im SM224 每次 33 mg/kg。第 2 组 ip 复方氨基比林, 其中氨基比林每次 85 mg/kg。第 3 组为合用蒿甲醚及复方氨基比林组, 剂量同单方组。3 组均 qd × 3 d, 观察 7 d, 未见任何毒性

反应。

3. 兔 33 只, 2.6 ± 0.6 kg 于后腿 im 蒿甲醚, SM242 及 SM108, 剂量为 80—160 mg/kg, 药液容量为 1—2 ml。结果各兔均能良好耐受, 大体解剖及肝、肾组织切片检查均正常。

表 8 Effect of im medication of artemether for 3 months on growth of dogs

	total dose (mg/kg)	number of dogs	body weight (kg)	
			before medication	$\bar{x} \pm SD$ after last dose
artemether	972	1	10.5	8.5
	486	3	12.5 \pm 0.3	15.8 \pm 2.9
	194	2	12.5 \pm 0	14.3 \pm 1.1
control(tea seed oil)	—	1	14.0	17.5

4. 狗 1) ig 给药: ♀狗 1 条, 13 kg, 第 1 次 ig 蒿甲醚, 130 mg/kg, 尿常规化验正常, 24 h 后再 ig 260 mg/kg, 未见呕吐, 外观正常。2) im 给药: 第 1 批选用 13 kg 狗 10 条, ♀♂ 皆有, 蒿甲醚每次 im 剂量为 4—6 mg/kg, SM242 及 SM108 为 2.5—10 mg/kg, 每周内 qd \times 3 d 后停药 4 d, 共 2 周。第 2 批选用 12 kg 狗 7 条, ♀♂ 皆有, im 蒿甲醚 7.2—36 mg/kg, 每旬内 qd \times 3 d 后停药 7 d, 共 9 旬, 对照组只给油。观察项目包括体重、食量、大便、巩膜、视觉、听觉、行为、肝功能(SGPT, ZnT, TTT)、肾功能(NPN)、血象(RBC 计数, WBC 总数和分类计类, Hb)、ECG、尿蛋白、尿糖、尿离心物镜检。停药后不同时间解剖, 进行肉眼检查, 取脑各部、肝、肾、脾、肺、胃、肠各部、膀胱、子宫、肾上腺、胸腺、唾液腺、甲状腺、前列腺、淋巴结、卵巢、睾丸、坐骨神经作组织切片及骨髓涂片镜检。结果表明, 用药后狗耐受良好。每次 36 mg/kg 凡 3 月组在给药期间食量减少, 体重明显减轻(见表 8), 毛发松蓬, 肝实质细胞有中度浊肿与水样变性, 其它组织均无异常。

5. 猴 用 6.6 \pm 0.8 kg 恒河猴 3 只, im 11 mg/kg, 给药及检查项目基本与狗实验相同。结果未见异常, 恒河猴 1 只, 7 kg, im 蒿甲醚 141 mg/kg, 外观良好。

6. im 局部刺激性试验 上述用作 im 实验的小鼠, 大鼠、兔、狗、猴 im 处肌肉经肉眼和组织切片, 与对照组及未注处肌肉相比均未见有药物刺激反应。

四、SM108 对大鼠及兔凝血功能的影响

100 g 大鼠 20 只, ♀♂ 各半, 2.6 \pm 0.2 kg ♀兔 10 只分成两组, 一组 im SM108 20 mg/kg qd \times 3 d, 另一组 im 茶油作对照。大鼠用毛细管法, 兔用玻片法, 测定用药前后凝血时。结果与对照组相比 $P > 0.05$ 。

五、动物到人的剂量换算 以对食蟹猴疟原虫的疗效为例, 按体表面积法换算, K 值参考文献(3), 结果得出人的治疗量为 3.1 mg/kg/d \times 3d。

六、制剂条件及贮存时间对效价的影响

用伯氏疟原虫 RC 株进行效价检定。方法同前文⁽¹⁾。灌封后 100 $^{\circ}$ C 加温 30 min 后效价未见降低。制成的蒿甲醚针剂经 28 个月室温贮藏, 效价未见降低。更长时间待试。

讨 论

伯氏疟原虫是目前用于抗疟治疗药物初筛的主要模型, 亦是精确测定化疗指数(CI)的较好模型。但若以 CI 进行优劣比较时, 只有当所比药物具有同一类型化学结构时才有意义, 而当用于不同类型比较时, 就有局限性。本文采用伯氏疟原虫 RC 株来比较具有青蒿素母体结构的同一类型化合物, 应有一定的可比性⁽⁴⁾。

表 2 中药前感染率个别组间如 1.6 \pm 0.7 组与 2.9 \pm 0.5 组间统计测定 $P = 0.02$, 但从青蒿素 30, 60 mg/kg 组结果分析, 未见明显影响。

用喹啉甲醇类衍生物治疗感染在夜猴 (*Aotus trivirgatus*) 上的人疟 (*P. falciparum* 和 *P. vivax*) 抗药性虫株实验时认为疗效仅是

总剂量的函数, 与给药次数无关⁽⁵⁾。而本实验在总剂量相同的情况下, 分多次给的疗效比 1 次给药为好。这种差异值得探讨。

蒿甲醚的中毒量与临床应用量 10 mg/kg (总量) 相比的安全系数远比氯喹高。小鼠 ip 氯喹的 LD₅₀ 为 68-78 mg/kg, 狗 im 氯喹耐受量为 6 mg/kg, 而氯喹的临床 im 量为 4-5 mg/kg, 这是比较危险的。

致谢 本研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究训练计划的资助, 中国医学科学院寄生虫病研究所供给疟原虫株, 上海市公费医疗第

四门诊部化验室协助血液化验, 我所药物合成室及植物化学室提供蒿甲醚等衍生物。

参 考 文 献

- 1 顾浩明、吕宝芬、瞿志祥. 中国药理学报 1980 年 9 月; 1(1):48
- 2 Finney DJ. *Probit analysis*. 2nd ed. London: Cambridge Univ Press, 1952: 236-45
- 3 Spector WS, ed. *Handbook of biological data*. 1st ed. Philadelphia: Saunders, 1956:175
- 4 Peters W. *Ann Trop Med Parasitol* 1975 Jun; 69 (2): 115
- 5 Schmidt LH, Crosby R, Rasco J, Vaughan D. *Antimicrob Agents Chemother* 1978 Nov;14(5):680

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Jun; 2 (2) : 138-144

ANTIMALARIAL EFFECT AND TOXICITY OF METHYL-DIHYDRO-ARTEMISININE IN ANIMALS

GU Hao-ming, LIU Ming-zhang, LÜ Bao-feng, XU Jian-yi, CHEN Li-juan, WANG Mei-ying, SUN Wei-kang, XU Bin (B Hsu), JI Ru-yun (Z Y Kyi)

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Methyl-dihydro-artemisinin (artemether) possessed higher efficacy against both *Plasmodium berghei* (both chloroquine sensitive and resistant strains) and *P. cynomolgi* than its parent compound, artemisinin. The resistance index = 1.7. The factors affecting the antimalarial effect: 1) The tea seed oil preparation was better than the tragacanth gum suspension; 2) Using oil preparation, intramuscular administration gave a better result than intragastric administration; 3) The therapeutic effect was better by dividing same dose into 3-4 times within 3-4 days than once, twice or five times. Toxicity experiments included acute toxicity in mice, rats, rabbits, dogs and monkeys, and subacute toxicity in dogs and monkeys. The observed items in subacute toxicity included general appearance, biochemical examinations, ECG, routine

tests of blood and urine, and histological examinations. The results showed that its toxicity was lower than that of chloroquine, thus giving a broader safety margin for artemether although there were some loss of body weight and slight damage of liver parenchymal cells in the group dosing 36 mg/kg once for 3 months. There was no irritant reaction at the site of im injection. α -Propoxy-carbonyl-dihydro-artemisinin (SM242) and α -propionyl-dihydro-artemisinin (SM108) were more potent than artemether against both *P. berghei* and *P. cynomolgi*, but their syntheses were more difficult and solubility in oil were lower than artemether.

KEY WORDS methyl-dihydro-artemisinin (artemether); α -propoxy-carbonyl-dihydro-artemisinin; α -propionyl-dihydro-artemisinin; *Plasmodium berghei*; *P. cynomolgi*