

· 基础研究 ·

不同填料固相小柱对多烯紫杉醇血浆样品萃取回收率的影响

王杰, 余瑜

(重庆医科大学药学院 400016)

摘要:目的 以多烯紫杉醇为研究对象,考察固相萃取小柱的洗脱条件以及不同填料固相萃取小柱的萃取效率,从而确定固相萃取多烯紫杉醇血浆样品的实验方法。方法 以水、乙腈及不同浓度的甲醇作为洗脱液对固相小柱进行洗脱,使用 Phenomenex LUNA C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),甲醇-乙腈-水(42:26:32,v/v/v)作为流动相进行高效液相色谱分析,确定多烯紫杉醇在固相萃取小柱上的洗脱条件;通过比较不同固相填料的萃取回收率,选择最佳的固相萃取小柱。结果 可用 60%~80% 的甲醇清洗;3 种固相填料中以 Waters Oasis HLB 柱为固相填料时样品的萃取回收率最高。结论 Waters Oasis HLB 柱的萃取回收率在 95%~105%,适用于血浆中多烯紫杉醇的分析。

关键词:固相萃取;多烯紫杉醇;高效液相色谱法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)22-2629-02

Study on the extraction recovery of docetaxel in plasma by different solid-phase cartridges

Wang Jie, Yu Yu

(College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To optimize the solid-phase extraction method by comparison of the extraction recovery of docetaxel plasma samples. **Methods** After extracted by different solid-phase cartridges with water, acetonitrile, and different content methanol elution, the plasma samples were analyzed on an Phenomenex LUNA C₁₈ column(4.6 mm×250 mm,5 μm) with methanol; acetonitrile; water(42:26:32,v/v/v) as the mobile phase. From the recovery achieved, the best solid phase cartridge was found. **Results**

This method consists of using 60%—80% methanol for the elution. Among the three kinds of solid-phase being tested, Waters Oasis HLB cartridge was found to be the best one. **Conclusion** The average extraction recovery of the Waters Oasis HLB cartridges was between 95%—105%, and it can be used in the analysis of docetaxel in plasma samples.

Key words: solid-phase extraction; docetaxel; HPLC

多烯紫杉醇(docetaxel)为一类半合成的紫杉醇类抗肿瘤药,它作用于细胞微管蛋白,抑制细胞有丝分裂而发挥抗肿瘤作用,是现有药物中治疗转移性乳腺癌(MBC)和非小细胞肺癌(NSCLC)最有效的单剂化疗药物^[1]。目前,有关多烯紫杉醇及其相关制剂在生物体内的药代动力学研究已经在国内外得到了较为广泛的开展^[2-5]。本实验采用固相萃取法(SPE),选择不同的固相填料,对多烯紫杉醇血浆样品进行前处理研究,考察最适合的固相萃取条件。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);GL-88B 型旋涡混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);PB602-E 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多上海公司);DCY-16S 型氮吹仪(青岛海科仪器有限公司);TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Waters Oasis HLB 柱(美国 Waters 公司),Sep-pak vac c₁₈ 小柱(美国 Waters 公司),Strata 小柱(美国 Phenomenex 公司)。

多烯紫杉醇购自中国药品生物制品检定所(批号:10666-201002,纯度大于或等于 99.5%),紫杉醇购自中国药品生物制品检定所(批号:10382-200301,纯度大于或等于 99.5%),甲醇、乙腈为分析级色谱纯(阿达玛斯公司),实验用水为高纯水。

1.2 色谱条件 Phenomenex LUNA C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,广州菲罗门科学仪器有限公司);流动相为甲醇-乙腈-水(42:26:32,v/v/v);流速:1.0 mL/min;检测波

长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

1.3 固相萃取小柱洗脱条件考察

1.3.1 溶液的配制 分别取多烯紫杉醇对照品及内标紫杉醇适量,精密称定,用流动相稀释成浓度均为 0.1 g/L 的多烯紫杉醇对照液及紫杉醇内标液;空白人血浆稀释成多烯紫杉醇和内标紫杉醇浓度分别为 0.05 g/L 和 0.02 g/L 的样品液;另外采用纯甲醇和高纯水分别配制成浓度为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%及 90%的甲醇溶液。

1.3.2 血浆样品的固相萃取 将 Waters Oasis HLB 小柱用 1 mL 甲醇活化,1 mL 水平衡,加入 1.3.1 项下的样品液 1 mL,用水分别预洗 3 次(A1~A3),每次 1 mL,弃去预洗液,再用 1 mL 乙腈洗脱(A4);另取 Waters Oasis HLB 小柱 10 支,分别用 1 mL 甲醇活化,1 mL 水平衡,加入上述样品液 1 mL,分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 的甲醇各 2 mL 进行洗脱(B1~B10),洗脱液用 40 ℃氮气吹干,1 mL 流动相重新溶解后 0.45 μm 微孔滤膜过滤。分别取 20 μL 按上述 HPLC 色谱条件进样分析。

1.4 不同填料固相小柱的萃取效率 取 1.3.1 项制备的多烯紫杉醇对照品溶液和内标溶液,用空白人血浆稀释成多烯紫杉醇低、中、高浓度分别为 0.1、1.0、10.0 μg/mL 的血浆样品溶液(内标紫杉醇浓度均为 1 μg/mL),每个浓度 5 份,用水稀释 1 倍,作为样品液。对 Waters Oasis HLB 小柱, Waters Sep-pak vac C₁₈ 小柱及 Strata C₁₈-E 小柱进行比较。分别用 1 mL

甲醇活化上述固相小柱, 1 mL 水平衡, 加入多烯紫杉醇血浆样品液, 分别用 1 mL 水预洗 3 次, 弃去预洗液, 2 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 40 °C 氮气吹干, 适量流动相重新溶解, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取 20 μL 按上述高效液相色谱法 (HPLC) 条件进行分析, 得多烯紫杉醇与内标紫杉醇峰面积比为 A1。

另取 1 mL 高纯水代替人血浆配制低、中、高 3 个浓度为 0.1、1.0、10.0 μg/mL 的多烯紫杉醇对照品溶液 (内标紫杉醇浓度均为 1 μg/mL), 不经萃取, 按上述 HPLC 色谱条件进样 20 μL 分析, 得多烯紫杉醇与内标紫杉醇峰面积比为 A2, 按下式计算: 回收率 (%) = (A1/A2) × 100%。

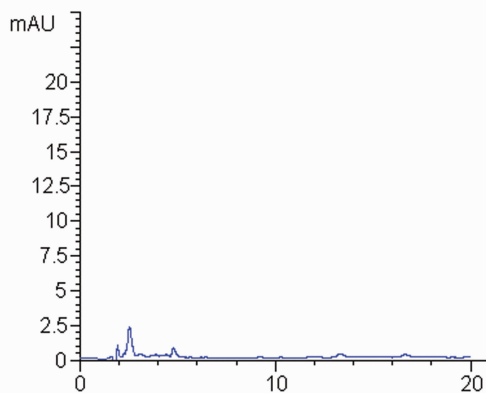
2 结果

2.1 血浆样品固相萃取洗脱条件考察

采用 Waters Oasis HLB 小柱为固相填料, 以不同浓度的甲醇以及纯乙腈作为洗脱剂时, 结果见表 1。从表 1 可知, 采用 Waters Oasis HLB 小柱为固相填料, 最大可用甲醇清洗的浓度为 60%, 而最小洗脱浓度为 80%, 乙腈的洗脱能力与甲醇相差不大。考虑价格因素, 故以纯甲醇进行洗脱。

表 1 多烯紫杉醇和内标紫杉醇的清洗洗脱比较

样品	多烯紫杉醇峰面积	紫杉醇峰面积
A1	0.0	0.0
A2	0.0	0.0
A3	0.0	0.0
A4	884.7	639.5
B1	0.0	0.0
B2	0.0	0.0
B3	0.0	0.0
B4	0.0	0.0
B5	0.0	0.0
B6	0.0	0.0
B7	36.8	42.3
B8	750.7	556.6
B9	832.2	622.4
B10	868.5	651.0



保留时间 t/min。

图 1 空白血浆 HPLC 色谱图

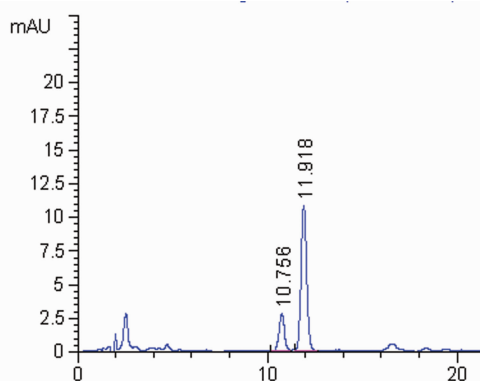
2.2 不同填料固相小柱的萃取效率

不同填料固相小柱对多西紫杉醇的萃取回收率见表 2, HPLC 色谱图见图 1 和图 2。

由表 2 可知, 当以 Waters Oasis HLB 小柱为固相填料进行多烯紫杉醇的血浆样品萃取时, 萃取回收率在 95% ~ 105%, RSD 平均值为 4.26%, 适合用于血浆中多烯紫杉醇的测定。使用该小柱的回收率和精密度均高于另外 2 种固相小柱。

表 2 不同填料固相小柱的萃取回收率 (% , n=5)

含量 (μg/mL)	HLB 小柱		Sep-pak 小柱		Strata 小柱	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
0.1	94.8	7.52	84.1	11.8	89.1	8.61
1.0	104.3	3.57	85.5	10.9	91.2	5.24
10.0	103.8	1.68	91.7	6.75	93.5	3.21



保留时间 t/min (A: 内标; B: 多烯紫杉醇)。

图 2 空白血浆加多烯紫杉醇和内标 HPLC 色谱图

3 讨论

血浆由于含有胆红素而呈淡黄色液体, 是血液的重要组成部分; 血浆的化学成分中, 水分占 90% ~ 92%, 其他 10% 以溶质血浆蛋白为主, 并含有电解质、营养素、酶类、激素类、胆固醇和其他重要组成部分。多烯紫杉醇为白色结晶性粉末, 易溶于有机溶剂。多烯紫杉醇血浆样品的前处理是体内药物分析工作的关键步骤, 直接影响整个测定的准确性^[6-7]。样品预处理技术——固相萃取是由液固萃取和柱液相色谱技术相结合, 主要用于样品的分离、纯化和浓缩; 与液-液萃取法相比, 可以更有效地分离分析物与干扰组分, 减少样品预处理过程, 从而分析物的回收率^[8-9]。固相萃取技术建立在液-固相色谱理论, 采用选择性吸附和洗脱的方式对样品进行富集、分离和纯化, 利用选择性吸附与洗脱的分离原理^[10-11]。常用方法先让液体样品通过吸附剂 (保留其中被测物质), 之后选用适当强度溶剂除去杂质, 最后用少量溶剂洗脱出被测物质, 达到快速分离净化与浓缩的目的^[12-13]。固相萃取作为样品前处理技术, 在实验室中得到了越来越广泛的应用^[14-15]。

固相萃取主要分为 3 类: 正相固相萃取、反相固相萃取和离子交换固相萃取。正相固相萃取所用的吸附剂都是极性的, 主要取决于目标化合物的极性官能团与吸附剂表面的极性官能团之间相互作用, 其中包括了氢键和 π-π 键的相互作用、偶极-偶极相互作用和偶极-诱导偶极相互作用以及其他的极性-极性作用; 反相固相萃取所用的吸附剂和目标化合物通常是非极性的或极性较弱的, 主要是靠范德华力或色散力 (非极性-非极性相互作用); 离子交换固相萃取是靠目标化合物与吸附剂之间的相互作用是静电吸引力。Waters Oasis HLB 小柱的填料是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烷基 (下转第 2634 页)

实验依据。

参考文献:

- [1] Yada T, Kaji S, Akasaka T. Changes of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, tetrahydrobiopterin, and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction by medical treatments[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2007, 37(3):269-276.
- [2] Jiang JL, Wang S, Li NS, et al. The inhibitory effect of simvastatin on the ADMA-induced inflammatory reaction is mediated by MAPK pathways in endothelial cells[J]. Biochem Cell Biol, 2007, 85(1):66-77.
- [3] Gschwend S, Buikema H, Henning RH, et al. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2003, 5(2):147-154.
- [4] Iino K, Watanabe H, Iino T, et al. Candesartan improves impaired endothelial function in the human coronary artery[J]. Coronary Artery Disease, 2012, 23(4):278-283.
- [5] Dohi T, Miyauchi K, Iesaki T, et al. Candesartan with pioglitazone protects against endothelial dysfunction and inflammatory responses in porcine coronary arteries implanted with sirolimus-eluting stents[J]. Circul J, 2011, 75(5):1098-1106.
- [6] Suzuki T, Nozawa T, Fujii N, et al. Combination therapy of candesartan with statin inhibits progression of athero-

sclerosis more than statin alone in patients with coronary artery disease[J]. Coronary Artery Disease, 2011, 22(5):352-358.

- [7] Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation[J]. J Clin Invest, 1999, 104(7):925-935.
- [8] Bergaya S, Hilgers RH, Meneton P, et al. Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT₂ receptors[J]. Circ Res, 2004, 94(12):1623-1629.
- [9] De Gennaro Colonna V, Rigamonti A, Fioretti S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT₁-receptor antagonism equally improve Endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 516(3):253-259.
- [10] Kiya Y, Miura S, Matsuo Y, et al. Abilities of candesartan and other AT₁ receptor blockers to impair angiotensin II-induced AT₁ receptor activation after wash-out[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2012, 13(1):76-83.
- [11] Perrone-Filardi P, Corrado L, Brevetti G. Effects of AT₁ receptor antagonism with candesartan on endothelial function in patients with hypertension and coronary artery disease[J]. J Clin Hypertens, 2009, 11(5):260-265.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)

(上接第 2630 页)

吡咯烷酮 2 种单体按一定比例聚合成而成,吸附容量高,批次间重现性好;美国 Phenomenex 公司的 Strata C₁₈-E 小柱的填料是高度疏水的十八烷基键合硅胶基质端基封尾键合相;美国 waters sep-pak vac C₁₈ 小柱的填料是十八烷基键合硅胶。HLB 小柱的另一优点是柱床干涸对提取影响不大,而另 2 种小柱在样品上样前,柱床不能干涸,否则需重新活化。

本研究表明,使用 Waters Oasis HLB 小柱为固相填料进行多烯紫杉醇的血浆样品萃取,比使用其他 2 种填料更加适用于血浆中多烯紫杉醇的测定。

参考文献:

- [1] 庞廷媛,程国华.多西紫杉醇新制剂的研究进展[J].中国药房,2010,21(40):3835-3838.
- [2] 任丽莉,沈艳,陈国广,等.多烯紫杉醇-β-环糊精包合物冻干制剂在大鼠体内的药代动力学[J].南京工业大学学报:自然科学版,2010,32(6):89-93.
- [3] 刘立中,吕竹芬,陈燕忠,等.多西紫杉醇泡囊的大鼠药代动力学研究[J].中国现代药物应用,2009,3(4):1-3.
- [4] Li X, Tian X, Zhang J, et al. In vitro and in vivo evaluation of folate receptor-targeting amphiphilic copolymer-modified liposomes loaded with docetaxel[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6:1167-1184.
- [5] Zhao L, Wei YM, Zhong XD, et al. PK and tissue distribution of docetaxel in rabbits after i. v. administration of liposomal and injectable formulations[J]. J Pharm Biomed

Anal, 2009, 49(4):989-996.

- [6] 孔琦,张振清.药物代谢转化和样品前处理技术的研究进展[J].国际药学研究杂志,2008,35(2):124-127.
- [7] 王明强,李潇,姜金廷,等.固相萃取技术在体内药物分析中的应用与发展[J].黑龙江医药,2005,18(1):29-31.
- [8] 陈蕾.固相萃取技术在中药分析中的应用[J].中国药事,2012,26(2):159-161.
- [9] 茅向军,章晨峰,孙棣,等.不同填料的固相小柱对人参皂苷 Re 血浆样品萃取回收率的研究[J].中国中药杂志,2005,30(19):1516-1518.
- [10] 朱静燕,钱晓萍.固相萃取技术及其在体内药物分析中的应用[J].海峡药学,2007,19(10):115-117.
- [11] 高立勤.不同填料的固相小柱对替诺昔康血浆样本萃取回收率的研究[J].中国药学杂志,2002,37(10):774-775.
- [12] 牟英,彭少平,顾振纶,等.固相萃取-高效液相色谱法测定沙苑子苷含量[J].中国野生植物资源,2009,28(3):62-64.
- [13] 张吟,陈一农,陈崇宏.固相萃取-高效液相色谱法分析血浆中的 13 种药物[J].中国药学杂志,2010,45(21):1648-1651.
- [14] 李娟,王荟.固相萃取法提取水中酚类化合物的研究[J].环境监测管理与技术,2012,24(6):46-52.
- [15] 张振巍,石磊.自制固相萃取小柱用于中药提取液除杂的效能评价[J].中国药业,2012,21(19):46-48.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)