技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)03-0332-03

HPLC 法测定酒石酸长春瑞滨在细胞内外的含量

颜 波,韩文莉,辜鹏程,尚京川
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立细胞内外酒石酸长春瑞滨含量浓度的高效液相色谱测定方法。方法:色谱柱,Lichrospher C18(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(0.05 mol/ml 的磷酸二氢钾,pH 3.5):乙腈 = 70:30(v/v);柱温为 30℃;检测波长 269 nm;流速为 1 ml/min;进样体积为 10 μl。结果:酒石酸长春瑞滨在 0.5 ~ 25 μg/ml 范围内线性关系良好,细胞外液的平均提取回收率为 84.6 %,平均加样回收率为 100.3%,日内、日间 RSD≤4.84%;细胞内液平均提取回收率为 88.2%,平均加样回收率为 98.3%,日内、日间 RSD≤4.69%;最低检测限 0.1 μg/ml。结论:本法简单、快速、选择性好,适合酒石酸长春瑞滨含量的测定。

【关键词】酒石酸长春瑞滨;细胞;细胞外液;高效液相色谱;含量测定
【中国图书分类法分类号】TQ460.72 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-12

HPLC method for the determination of vinorelbine tartrate in and out of cells

YAN Bo, et al
(*Department of pharmaceutical analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish an HPLC method for the determination of vinorelbine tartrate in and out of cells. *Methods*: The vinorelbine tartrate was frozen and defrosted time and again. Then the sample was extracted with methanol and determined through Lichrospher C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column in a mobile phase of 50 mmol/ml potassium phosphate buffer (pH 3.5) and acetonitrile (70:30 v/v) with the flow rate of 1.0 ml/min at 30℃. The detection wavelength was 269 nm. *Result*: It was accurate and sensitive with a linear range from 0.5 μg/ml to 25 μg/ml for Vinorelbine Tartrate. The mean extraction recovery of extracellular fluid obtained was 84.6%, and the absolute recovery was 100.3%. Intra- and inter-day periods expressed as percent R.S.D. were ≤4.84%. For intracellular fluid, the mean extraction recovery was 88.2% and the absolute recovery was 98.3%. Intra-and inter-day periods expressed as percent R S D were ≤4.69%. The lowest limit of quantification was 0.5 μg/ml. *Conclusion*: This method is simple, rapid, accurate and selective for the determination of VCR.

【Key words】vinorelbine tartrate; cell; HPLC; content determination

酒石酸长春瑞滨(Vinorelbine tartrate, VBL, 结构如图 1)是长春碱半合成衍生物,临床多用于恶性肿瘤非小细胞肺癌和乳腺癌的化疗。在临床上酒石酸长春瑞滨是单药治疗非小细胞肺癌最有效的药物之一,有效率为 14% ~ 33%,高于其它长春生物碱类药物。体外试验对人肺鳞癌 N6L2 株的抑制作用比长春碱、长春地辛强 2 倍,比长春新碱强 22 倍。但肿瘤患者反复用药会产生多药耐药性,使细胞内药物积聚程度降低,低于有效浓度,导致化疗失败[1,2]。因此,酒石酸长春瑞滨脂质体成为增加细胞内药物浓度的手段之一。目前酒石酸长春瑞滨的测定方法较多[3-7],但检测细胞内外和酒石酸长春瑞滨脂质体的报道较少,为此,本实验建立一种快速检测细胞内外长春瑞滨浓度的高效液相色谱(High performerce liquid chromatopraphy, HPLC)测定法。

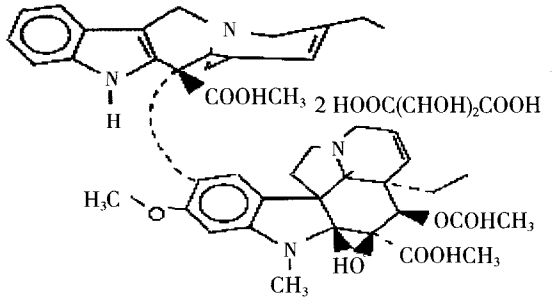


图 1 酒石酸长春瑞滨结构式

1 仪器与试剂

1.1 试剂

标准品:酒石酸长春瑞滨(批号 20051002,含量 99.8%,海南长春花药业有限公司提供),酒石酸长春瑞滨脂质体(本实验室自制,批号 20090622),乙腈(江苏汉邦科技有限公

作者介绍:颜 波(1986-),男,硕士,研究方向:药物分析。
通信作者:尚京川,男,副教授,Email:sjc20@126.com。

司,色谱纯),磷酸二氢钾(西安化学试剂厂,分析纯),磷酸(成都科龙化工试剂厂,分析纯),Triton X-100(Biosharp Amresco,美国),鼻咽癌 HNE-1 细胞株(由重庆医科大学耳鼻喉研究室提供)

1.2 仪器

美国 Agilent 1100 高效液相色谱系统(配 G1314A 型紫外检测器,G1313A 型自动进样器及 G2070-60069 色谱管理软件,Agilent 公司),BF2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司),TGL-16 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),SK-1 型快速混匀器(上海沪西分析仪器厂),KQ-3200E 型超声仪(江苏医疗仪器厂),BS210S 电子分析天平(精度 0.0001 g,Sartorious 公司),pH 计(奥力龙 828,美国),UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Lichrospher C18(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(0.05 mol/ml 磷酸二氢钾,pH3.5):乙腈 = 70:30(v/v);柱温:30℃;检测波长:269 nm;流速:1 ml/min;进样体积:10 μl。

2.2 标准储备液的制备

精密称取酒石酸长春瑞滨对照品 25 mg,用乙腈配成 1.0 mg/ml 储备液,放入冰箱中(4℃)保存备用。

2.3 样品的收集

选取对数生长期的 HNE-1 细胞,接种于 1640 培养液中(1.5×10^6 细胞/瓶),培养 24 h 后,弃去细胞外液,分别加入含不同质量浓度酒石酸长春瑞滨的 1640 培养液(1.0、5.0、25.0 μg/ml),药物作用 1、3、6 h 后终止培养,1 000 r/min 离心 10 min,分离细胞和培养液(细胞外液),收集细胞外液放入 20℃冰箱保存备用;细胞用生理盐水反复清洗 3 次,弃去洗涤液,再加入适量的生理盐水配成细胞密度为 10^6 个/ml 的悬浮液,放入 -20℃冰箱保存。

2.4 样品的处理

2.4.1 细胞样品的预处理 取细胞样品于 37 ℃水浴中解冻,然后放入 -20 ℃冰箱冷冻 1 h,如此反复冻融 5 次,取冻融后的细胞样品 0.5 ml,加入 0.5 ml 乙腈,涡旋 1 min,15 000 r/min 离心 15 min,吸取 0.8 ml 上清液,向残余物中加入 0.5 ml 乙腈,涡旋 1 min,15 000 r/min 离心 15 min,吸取 0.6 ml 上清液,合并 2 次上清液于 EP 管中,氮气吹干,流动相 100 μl 复溶,混匀,转移至棕色进样瓶中,供 HPLC 分析,记录峰面积,外标法定量。

2.4.2 细胞外液样品的预处理 取细胞外液 0.5 ml 于离心管中,加入 0.5 ml 乙腈,涡旋 1 min,15 000 r/min 离心 15 min,吸取 0.8 ml 上清液于 EP 管中,氮气吹干,流动相 100 μl 复溶,混匀,转移至棕色进样瓶中,供 HPLC 分析,记录峰面积,外标法定量。

2.4.3 含脂质体细胞外液样品的预处理 取含酒石酸长春瑞滨脂质体细胞外液样品 0.5 ml,加入 4% Triton X-100 的乙醇溶液 0.5 ml 及乙腈 0.3 ml,涡旋 1 min,15 000 r/min 离心 15 min,吸取 1.0 ml 上清液于 EP 管中,氮气吹干,流动相 100 μl 复溶,混匀,转移至棕色进样瓶中,供 HPLC 分析,记录峰面积,外标法定量。

2.5 方法可行性考察

在选定色谱条件下,考察标准品、空白培养液、空白细胞内液、空白细胞内液 + 标准品、空白细胞外液 + 标准品、细胞样品和细胞外液样品的色谱分离情况,酒石酸长春瑞滨保留时间约为 11.4 min,酒石酸长春瑞滨与细胞杂质及细胞外液杂质均达到基线分离(R>1.5),峰形对称,见图 2。

2.6 标准曲线

细胞外液标准曲线的绘制:取空白细胞外液 6 份,加入

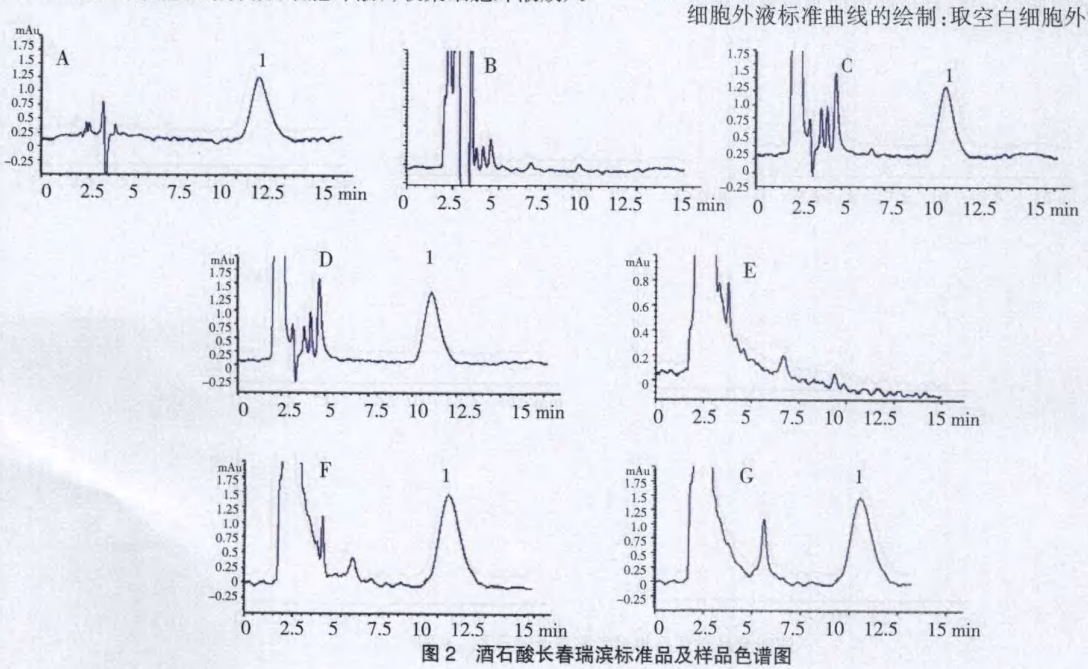


图 2 酒石酸长春瑞滨标准品及样品色谱图

适量的酒石酸长春瑞滨对照品储备液，配制成浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、15.0、25.0 μg/ml 的细胞外液标样。按 2.4 项下处理，取 10 μl 进样，按上述色谱条件测其峰面积，以峰面积 Y_1 对浓度 X_1 作图，其线性回归方程为：$Y_1=10.06X_1+27.51$，$r=0.999\ 3$（$n=3$）。

细胞内液标准曲线的绘制：取空白细胞内液 6 份，加入适量的酒石酸长春瑞滨对照品储备液，配制成浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、15.0、25.0 μg/ml 的细胞内液标样。按 2.4 项下处理，取 10 μl 进样，按上述色谱条件测其峰面积，以峰面积 Y_2 对浓度 X_2 作图，其线性回归方程为：$Y_2=9.383X_2+21.84$，$r=0.999\ 6$（$n=3$）。酒石酸长春瑞滨的最低检测限 0.1 μg/ml。

2.7 回收率实验

取空白细胞内液及空白细胞外液各 15 份，分别配制含浓度为 1.0、5.0、25.0 μg/ml 酒石酸长春瑞滨标样各 5 份，分别按细胞样品及细胞外液样品处理方法处理，进样 10 μl；另用流动相配制相应浓度酒石酸长春瑞滨标准品溶液，按相同量进样，分别记录峰面积，计算细胞内液及细胞外液中酒石酸长春瑞滨的提取回收率。另取空白细胞内液及空白细胞外液各 15 份，分别配制含浓度为 1.0、5.0、25.0 μg/ml 酒石酸长春瑞滨标样各 5 份，按细胞样品及细胞外液样品处理方法处理，进样 10 μl，进行 HPLC 分析，计算加样回收率，结果见表1。

2.8 精密度实验

取空白细胞液及细胞外液，分别加入酒石酸长春瑞滨储备液配制浓度为 1.0、5.0、25.0 μg/ml 的细胞液标样及细胞外液标样，按细胞样品及细胞外液样品处理方法处理，10 μl 进样，测定峰面积，1 d 内每个样品测定 5 次，连续测定 5 d。按回归方程求出对应浓度，计算其日内和日间变异系数。酒石酸长春瑞滨精密度实验结果见表 2。

2.9 稳定性实验

取 1.0、5.0、25.0 μg/ml 的细胞标样及细胞外液各 1 份，按细胞样品及细胞外液处理方法处理后，分别于配制当天0、4、8、14、20、24 h 后，分别进样，测定样品峰面积，按回归方程求出对应样品浓度，进而考察样品稳定性。试验结果表明样品处理后室温放置 24 h 内稳定。

2.10 细胞内外酒石酸长春瑞滨浓度的测定

HNE-1 细胞在 RPMI1640 培养液中培养，传代，弃去细胞外液，加入含 5.0 ug/ml 浓度 VBL（或 VBL-L）的 RPMI1640 培养液，药物分别作用 1 h、3 h、6 h 后终止培养，按 2.3 项“样品的收集”和 2.4 项“样品处理”方法操作，测定细胞内外酒石酸长春瑞滨浓度，结果见表 3。

3 讨 论

在细胞样品处理过程中，实验考查了反复冻融 2 次，反复冻融 4，反复冻融 5 次和直接处理几种情况，实验结果表明反复冻融 5 次的杂质最少，酒石酸长春瑞滨的回收率最高；在用乙腈沉淀蛋白过程中，同时考查了不处理残余物，加 500 μl 乙腈处理残余物两种情况，结果表明加 500 μl 乙腈再处理 1 次的回收率明显提高。

本方法的特点是加入了酒石酸长春瑞滨脂质体的处理，

表 1 细胞内液和细胞外液中酒石酸长春瑞滨的回收率实验（$n=5$）

样 品	浓度（μg/ml）	提取回收率（%）	平均值（%）	加样回收率（%）	平均值（%）
细胞内液	1.0	89.8	88.2	98.5	98.3
	5.0	88.6		97.7	
	25.0	86.2		98.8	
细胞外液	1.0	83.4	84.6	100.9	100.3
	5.0	84.6		99.4	
	25.0	85.8		100.6	

表 2 细胞内液和细胞外液精密度实验结果（μg/ml，$n=5$）

浓度（μg/ml）	日内精密度				日间精密度			
	细胞内液		细胞外液		细胞内液		细胞外液	
	平均值（μg/ml）	RSD（%）	平均值（μg/ml）	RSD（%）	平均值（μg/ml）	RSD（%）	平均值（μg/ml）	RSD（%）
1.0	0.98	2.81	0.97	1.73	0.93	2.60	0.96	4.84
5.0	4.92	1.10	4.54	2.91	4.69	4.11	4.78	4.26
25.0	24.56	2.72	23.86	2.74	24.01	4.69	24.28	3.35

表 3 细胞内外酒石酸长春瑞滨浓度的测定结果（μg/ml，$n=3$）

时间（h）	细胞内液		细胞外液	
	长春瑞滨	脂质体	长春瑞滨	脂质体
1	0.88 ± 0.02	1.81 ± 0.11	3.96 ± 0.10	3.10 ± 0.36
3	2.54 ± 0.09	4.25 ± 0.17	2.59 ± 0.05	0.71 ± 0.08
6	3.11 ± 002	4.75 ± 0.28	1.78 ± 004	0.17 ± 0.02

（下转第 355 页）

2.4 诊断的特异性和灵敏度

Cyst C 不同分期诊断的特异度和灵敏度如表 3 所示。

3 讨 论

已知的影响 Cyst C 合成的因素包括人口统计学因素、大剂量的糖皮质激素、甲状腺功能异常、超敏 C 反应蛋白水平、白蛋白水平和白细胞计数等[4]。与肌酐相比，胱抑素 C 受人口统计学因素的影响程度较小[1]。上述基本特性决定了 Cyst C 是极为理想的 GFR 标记物。本研究探讨血清 Cyst C 检测在儿童肾功能损害分期诊断中的作用。

本研究结果表明 Cyst C 和 SCr 水平随 CKD 分期的增高，水平依次增高，差异有统计学意义；而 GFR 则依次下降，差异也有统计学意义。并且 Cyst C、SCr 和 GFR 三者之间两两都存在相关关系。Dharyindharka 等[5]通过 meta 分析证实在成人，血 CysC 与 GFR 相关良好，无论轻、中或重度肾功能降低，其对应的 CysC 值都显示良好的相关性。这一结果和本研究相似，提示 Cyst C 可以成为 GFR 理想的标记物。进一步采用 ROC 曲线进行分期效果分析，显示 Cyst C 和 SCr 对 CKD各期的诊断均有价值，同时 Cyst C 要优于 SCr。而 Cyst C 对 CKD 2 期诊断的 AUC 值最大，提示 Cyst C 对肾功能损伤的分期诊断以早期尤为高。Cyst C 对 CKD 2 期、CKD 3 期、CKD 4～5 期诊断界值分别为 1.0 mg/L、1.5 mg/L 和 2.6 mg/L。国内王宏儒等[6]研究表明 Cyst C 对 CKD 2 期、CKD 3 期、CKD 4～5 期诊断界值分别为 0.88 mg/L、1.35 mg/L 和 2.38 mg/L，稍低于本研究。考虑主要和本研究研究对象为儿童有关。另外，各实验室检查方法对指标的取值也可能有影响。

Cyst C 对儿童肾功能损害有很好的分期作用。同时我们也应该注意到，新生儿血清 Cyst C 浓度较高，约是成人的 2 倍，1 岁以上的儿童即达到成人水平[7]。因此，Cyst C 对儿童肾功能损害的诊断不适用于 1 岁以下的婴儿。

当然，本研究中儿童 GFR 计算公式采用 Schwartz 公式，而 Schwartz 公式是针对欧美人设计，对于我国儿童 GFR 的估计可能存在一定的偏差。因此有待联合使用 Cyst C、CCr 和身高等指标建立适用于我国儿童的 GFR 计算公式。从而更好对肾功能损伤进行分期。

总之，本研究表明：Cyst C 对儿童肾功能损害有很好的分期作用；并且 Cyst C 对儿童肾功能损害分期作用要优于SCr；同时，Cyst C 对儿童肾功能损害的早期分期应用效果更好。

参 考 文 献

[1] 弓孟春，胡蓉蓉，李雪梅，等.胱抑素 C 的临床应用进展[J].中华内科杂志，2009，48 (10)：880-885.

[2] Stevens L A，Coresh J，Schmid C H，et al.Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine：A pooled analysis of 3，418 individuals with CKD[J].American Journal of Kidney Diseases，2008，51(3)：395-406.

[3] Tidman M，Sjostrom P，Jones I. A comparison of GFR estimating formulae based upon s-cystatin C and s-creatinine and a combination of the two [J]. Nephrology Dialysis Transplantation，2008，23(1)：154-160.

[4] Stevens L A，Schimid C H，Greene T.Factor other than glomemlar filtration rate affect serum cystatin C levels[J].Kidney Int，2009，75：652-660.

[5] Dharyindharka V R，Kwon G，Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney functi on：a meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis，2002，40 (2)：221-227.

[6] 王宏儒，杜国伟，鲍晓荣.血清胱抑素 C 在评价慢性肾脏病患者肾小球滤过率中的价值[J].中国中西医结合肾病杂志，2010，11(5)：421-427.

[7] Massey D.Commentary：Clinical diagnostic use of cystatin C[J]. J Clin Lab Anal，2004，18 (1)：31-35.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 334 页)

因此本方法能用于酒石酸长春瑞滨脂质体对细胞作用的研究，该测定方法简单、灵敏、快速，适合细胞内外酒石酸长春瑞滨浓度的测定。

参 考 文 献

[1] 许爱英.一种新型的治疗非小细胞肺癌的抗肿瘤药长春瑞滨[J].国外医学(药物分析)，1997，24(2)：82-84.

[2] 潘启超.长春碱类的新进展－失碳长春碱[J].癌症，1996，15(3)：228-231.

[3] Puozzo C，Ung H L，Wolfgang G Z. A high performance liquid chromatography method for vinorelbine and 4-O-deacetyl vinorelbine：A decade of routine analysis in human blood[J].J Pharmaceutical and Biomedical Analysis，2007，44(1)：144-149.

[4] 杨雯姝，邱利焱，金 一. RP-HPLC 法测定脂质体中重酒石酸长春瑞滨的含量[J].药物分析杂志，2006，26 (5)：646.

[5] Damena C W，Tibbena M M，Van Mannen M L，et al.A sensitive assay for the quantitative analysis of vinorelbine in mouse and human EDTA plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry[J].Journal of Chromatography，2008，868 (1-2)：102-109.

[6] 张 蹭.注射用重酒石酸长春瑞滨的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志，2006，37(8)：561-562.

[7] Zorza G，Van Heugenb J C，De Graeve J.et al.Development of a sensitive liquid chromatography method coupled with a tandem mass spectrometric detection for the clinical analysis of vinflunine and 4-O-deacetyl vinflunine in blood，urine and faeces[J].Journal of Chromatography，2007，853(1-2)：294-302.

(责任编辑：冉明会)