技术方法 文章编号:0253-3626(2009)04-0452-03

肿瘤细胞内外长春新碱的高效液相色谱法测定

罗 婵,母昭德
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立测定肿瘤细胞内外长春新碱(Vincristini sulfas,VCR)浓度的反相高效液相色谱法。方法:色谱柱,C18(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相,0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH=6.6):甲醇(30:70),流速 0.8 ml/min;检测波长:267 nm;柱温:30℃。结果:长春新碱样品在 12.5 ~ 160.0 μg/ml 范围和 0.125 ~ 12.5 μg/ml 范围内线性关系良好。细胞外液平均提取回收率为 73.84%,平均加样回收率为 99.83%,日内 RSD 为 3.14%,日间 RSD 为 3.99%;细胞内液日内 RSD 为 2.15%,日间 RSD 为 1.77%。最低检测限为 0.04 μg/ml。结论:本法简单、快速、选择性好,适合长春新碱含量的测定。

【关键词】高效液相色谱法;长春新碱;细胞培养液
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-17

Determination of vincristini sulfas in tumor cells culture media and intracellular fluid

LUO Chan, et al
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical Univercity*)

【Abstract】*Objective*: To develop a method for the determination of vincristini sulfas(VCR) in tumor cells culture media and intracellular fluid by high performance liquid chromatography (HPLC). *Methods*: VCR can be separated on C18(4.6 mm × 250 mm,5 μm)column by using 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate : methanol(30:70)(pH = 6.6)as mobile phase with UV detector at a wavelength of 267 nm.The flow rate was 0.8 ml/min. *Results*: The standard curve was linear in the concentration range 12.5 ~ 160.0 μg/ml(r =0.997 4, n =7)and 0.125 ~ 12.5 μg/ml(r=0.998 5,n=6).The average extracting recovery and average recovery of VCR in tumor cells culture media, RSD of intra-day and inter-day was 73.84%,99.83%,3.14% and 3.99% respectively. The RSD of intra-day and inter-day in intracellular fluid was 2.15% and 1.77% respectively. The detection limit was 0.04 μg/ml. *Conclusion*: This method is simple, rapid, accurate and selective for the determination of VCR.

【Key words】High performance liquid chromatography; Vincristini sulfas; Cell culture media

肿瘤患者反复用药产生的耐药性,是治疗失败的重要原因。因此,深入开展逆转多药抗药性(Multidrug resistance,MDR)药物的实验和临床研究,探讨耐药机制、寻找疗效好、毒性低的逆转剂,是国内外十分活跃的课题。长春新碱(Vincristini sulfas,VCR)是常用的化疗药物,对急慢性白血病、恶性淋巴瘤、小细胞肺癌及乳腺癌有很好的治疗效果[1,2],但是长期使用会产生耐药性。监测细胞内的 VCR 浓度,可直接观察到细胞内对药物的摄入和外流量,从而筛选出耐药细胞的逆转剂[3]。目前有关测定硫酸长春新碱的方法较多[4-8],但检测细胞内外 VCR 的方法较少报道,为此,本文建立了一种快速检测肿瘤细胞内外 VCR 浓度的高效液相色谱法。

1 材料和方法

1.1 研究材料

经 VCR 处理后的肿瘤原代细胞和耐药细胞培养液、细胞内液;经 VCR 和逆转剂处理后的肿瘤原代细胞和耐药细胞培养液、细胞内液(所有样品均在处理后 1 h、3 h、6 h 收集)。

1.2 主要试剂和仪器

日本岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪,TGL-16 高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),超声波清洗器(KQ2200B 型,昆山市超声仪器有限公司),SK-1 快速混匀器(江苏国华仪器)。硫酸长春新碱对照品(纯度≥98%),注射用硫酸长春新碱(深圳万乐有限公司,0806V1),甲醇(色谱纯,江苏汉邦

作者介绍:罗 婵(1985-),女,硕士,研究方向:药物分析。
通讯作者:母昭德,女,副教授,E-mail:MZD2008@tom.com。

科技有限公司），乙腈（色谱纯，江苏汉邦科技有限公司），其他试剂均为分析纯。

1.3 研究方法

1.3.1 长春新碱对照品储备液配制 取 1mg 长春新碱对照品用“1.3.2”项下流动相配成 200 μg/ml 备用。

1.3.2 色谱条件 色谱柱：Lichrospher C18 柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相：甲醇：0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 70:30（pH=6.6）；流速：0.8 ml/min；柱温：30℃；紫外检测波长：267 nm；进样体积：20 μl。

1.3.3 样品的收集 选指数生长期的原代细胞和耐药细胞各两份，计数后接种于培养瓶中（1.0×10^7 个 / 瓶），培养于 1640 培养液中 72 h 后，分别加入 VCR，使培养液中的 VCR 浓度均为 180 μg/ml，同时每种细胞分别加或不加逆转剂，于 1、3、6 h 各取 1 瓶，1 000 r/min 离心 10 min，分离细胞和培养液（细胞外液），细胞用生理盐水 1 ml 清洗 3 次，计数活细胞数，加入适量的生理盐水，使每瓶中的细胞数浓度均为 1×10^7 个 /ml，将细胞按冻融法破膜后超声 3 min，12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液放入 -20℃冰箱保存。

1.3.4 样品的预处理 取培养液或细胞内液于 1.5 ml 离心管中，按与样品 1:0.3（V/V）比例加入乙腈，混匀 1 min，12 000 r/min 离心 15 min，取上清液供高效液相色谱法（High performance liquid chromatography，HPLC）分析，记录峰面积，以外标法定量。

2 结 果

2.1 标准曲线的绘制

细胞外液标准曲线的绘制：取空白培养液 7份，加入长春新碱对照品储备液适量，分别配制成浓度为 12.5、25.0、50.0、80.0、100.0、125.0、160.0 μg/ml 的长春新碱对照品培养液，按“1.3.4”项下处理后，取 20 μl 进样，按上述色谱条件测其峰面积，以峰面积对其质量浓度 c 作图，其线性回归方程为：Y=19 534X-22 676，r=0.997 4（n=7）。

细胞内液标准曲线的绘制：取空白细胞液 6份，加入长春新碱对照品储备液适量，分别配制成浓度为 0.125、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μg/ml 的长春新碱细胞样品，按“1.3.4”项下处理后，取 20 μl 进样，按上述色谱条件测其峰面积，以峰面积对其质量浓度 c 作图，其线性回归方程为：Y=18 547X +3 773.3，r=0.998 5（n=6）。长春新碱的最低检测限为 0.04 μg/ml。

2.2 回收率实验

取空白培养液 9 份，分别加入长春新碱对照品储备液，配成浓度为 25.0、80.0、160.0 μg/ml 的培养液长春新碱对照品样品各 3 份，按照“1.3.4”项下处理后，进样 20 μl 进行 HPLC 分析，与同浓度的长春新碱对照品溶液直接进样所得峰面积比较，计算培养液提取回收率。另取空白培养液 15 份，分别加入长春新碱对照品储备液，配成浓度为 25.0、80.0、160.0 μg/ml 的培养液长春新碱对照品样品各 5 份，按照“1.3.4”项下处理后，进样 20 μl 进行 HPLC 分析，计算加样回收率，结果见表 1。

2.3 精密度实验

取“2.2”项下 25.0、80.0、160.0 μg/ml 的长春新碱培养液 20 μl 于同一天内进样 5 次，同法每天测定 1 次，连续测定 5 d，计算日内和日间精密度。取空白细胞内液，分别加长春新碱对照品储备液配成浓度为 2.5、7.5、12.5 μg/ml 的样品，按照“1.3.4”项下处理后，同上操作，计算日内日间精密度。结果见表 2。

2.4 方法专属性实验

在选定的色谱条件下，长春新碱与其它杂质分

表 1 培养液中长春新碱的回收率结果

	样品浓度（μg/ml）	提取回收率(%)	平均值(%)	加样回收率（%）	平均值（%）
培养液	25.0	70.55	73.84	99.72	99.83
	80.0	73.27		99.14	
	160.0	77.70		100.64	

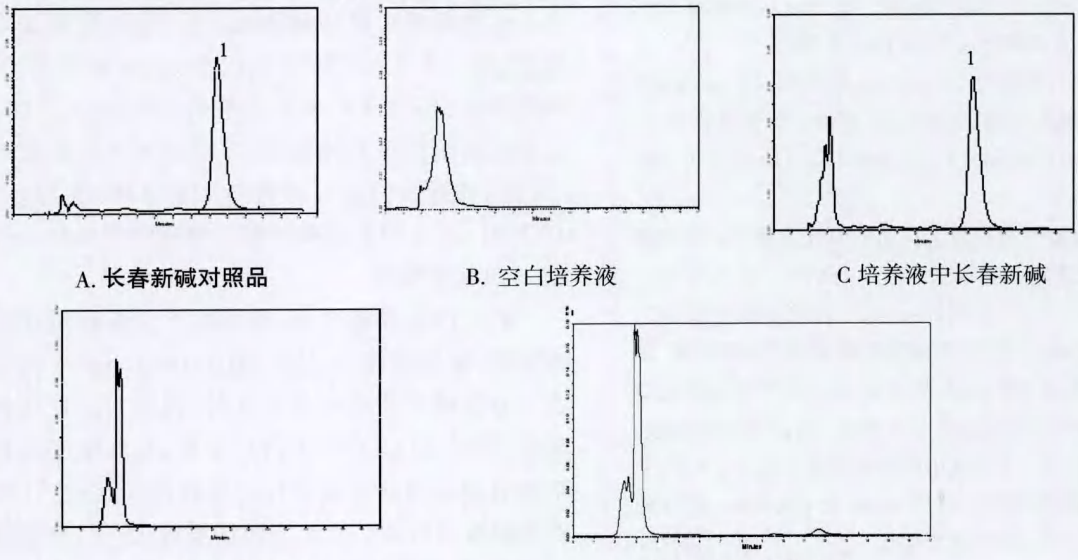
表 2 培养液和细胞内液中长春新碱的的精密度结果（n=5）

	样品浓度（μg/ml）	日内 RSD(%)	平均值（%）	日间 RSD（%）	平均值（%）
培养液	25.0	4.14	3.14	4.64	3.99
	80.0	2..43		3.35	
	160.0	2.84		3.99	
细胞内液	2.5	1.71	2.15	1.94	1.77
	7.5	2.98		1.23	
	12.5	1.75		2.14	

离完全，峰形良好，保留时间约为 11.0 min（图 1）。

2.5　样品测定

按照“1.3.4”项下方法处理培养液和细胞内液样品，进样 20 μl，进行 HPLC 分析，结果见表 3。



A. 长春新碱对照品　　B. 空白培养液　　C 培养液中长春新碱

D .空白细胞内液　　E. 细胞内液中长春新碱

峰 1　长春新碱

图 1　长春新碱色谱图

表 3　样品的测定结果（n=3）

时间(h)	原代细胞(μg/ml)		原代细胞 + 逆转剂(μg/ml)		耐药细胞(μg/ml)		耐药细胞 + 逆转剂(μg/ml)	
	培养液	细胞内液	培养液	细胞内液	培养液	细胞内液	培养液	细胞内液
1	128.49	4.43	123.15	8.98	148.27	0	127.84	0
3	117.90	7.57	132.63	13.49	127.57	0	147.55	0
6	126.81	6.88	134.86	15.55	140.84	0	140.01	0.17

3　讨　论

乙腈、甲醇、高氯酸等均能沉淀蛋白，经试验发现乙腈沉淀蛋白时易于离心分离，且色谱分离效果理想，故本实验采用乙腈沉淀蛋白。本实验同时考察了 0.2、0.3、0.5、1.0、1.5 等不同的乙腈沉淀比例，结果显示样品与乙腈比例为 1:0.3 时，既保证蛋白质沉淀完全而不堵塞色谱柱，又能使样品不被过分稀释而影响 VCR 的检测。

培养液和细胞内的长春新碱含量相差悬殊，采用培养液和细胞内液 2 条标准曲线，避免了使用 1 条标准曲线带来的误差，使结果较为准确。

逆转剂的加入使得长春新碱较易进入原代细胞以及耐药细胞，使其在细胞内的药物浓度增大，原代细胞受这种影响更加明显。

参　考　文　献

[1]　孙　勇，张其清，周海英，等.反相高效液相色谱法测定硫酸长春新碱的含量[J]. 中国药房，1999，10(6)：274-275.

[2]　王小刚，惠俊峰，雷闫盈.HPLC 法测定培养植物细胞中长春新碱的含量[J]. 食品与药品，2006，8(11)：47-49.

[3]　黎丹戎，涂文升，李　力，等.肿瘤细胞中长春新碱的高效液相色谱法测定[J]. 色谱，1998，16(1)：50-52.

[4]　李晓蕾，任其龙. 抗肿瘤药长春碱的提取纯化与分析方法研究概况[J]. 中国医药工业杂志，2004，4(35)：248-250.

[5]　刘开敏.血液中长春新碱的快速检测[J].中国热带医学，2007，7(8)：1437.

[6]　罗　猛，付玉杰，祖元刚，等.反相高效液相色谱法快速测定长春花中 4 种生物碱[J]. 分析化学，2005，33(1)：87-89.

[7]　唐国风.流动注射化学发光测定硫酸长春新碱[J]. 遵义师范学院学报，2004，6(4)：53-54.

[8]　Groninger E，Koopmans P，Kamps W，et al. An automated HPLC method to determine intracellular vincristine concentrations in mononuclear cells of children with acute lymphoblastic leukemia[J]. Therapeutic Drug Monitoring，2003，25(4)：441-446.

（责任编辑：冉明会）