

离子色谱积分脉冲安培法同时测定血浆中阿仑膦酸钠、 帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠

陈 郁¹, 刘玉秀², 陈智栋², 陈梅兰^{3*}, 朱 岩⁴

(1. 杭州职业技术学院, 浙江 杭州 310018; 2. 常州大学化学化工学院, 江苏 常州 213164;

3. 浙江树人大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310015; 4. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310028)

摘要: 建立了离子色谱积分脉冲安培检测器(IPAD) 同时检测血浆中阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠的方法。采用 Dionex AS18 (250 mm × 2 mm) 和 AG18 (50 mm × 2 mm) 色谱柱在 24 mmol/L NaOH 溶液中进行分离; 对多电位波形参数优化以达到最大信噪比; 采用优化后的波形方法对 4 种双膦酸盐类药物进行检测, 具有良好的线性(r^2 为 0.997 2 ~ 0.999 5) 和重现性(峰面积的相对标准偏差(RSD) 为 0.84% ~ 1.37%) 及较高的灵敏度(检出限为 0.061 ~ 0.18 $\mu\text{g/mL}$)。4 种双膦酸盐在该方法中有很好的保留且有较好的分离度, 与之前报道的衍生后检测方法相比, 该方法不用衍生, 更简单而易于操作。将该方法成功地用于人体血浆中双膦酸盐类的检测, 其回收率为 80.81% ~ 97.32%, RSD 为 1.46% ~ 3.02%。

关键词: 离子色谱; 积分脉冲安培检测; 阿仑膦酸钠; 帕米膦酸钠; 伊班膦酸钠; 利塞膦酸钠; 血浆

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012) 04-0414-05

Simultaneous determination of alendronate, pamidronate, ibandronate and risedronate using ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection

CHEN Yu¹, LIU Yuxiu², CHEN Zhidong², CHEN Meilan^{3*}, ZHU Yan⁴

(1. Hangzhou Vocational and Technical College, Hangzhou 310018, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

3. College of Biology and Environment Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China;

4. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of alendronate, pamidronate, ibandronate and risedronate using ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection (IPAD) has been developed. The electrochemical behavior showed the catalytic currents of these bisphosphonates are based on the oxidation of amines in their structures. Because the bisphosphonates are polar compounds and present as anions under alkaline condition, therefore, they can be separated by anion exchange chromatography. A Dionex AS18 column (250 mm × 2 mm) and an AG18 column (50 mm × 2 mm) and 24 mmol/L NaOH solution were used for the separation. Multi-step potential waveform parameters were optimized to maximize the signal-to-noise ratio (S/N), which exhibited adsorption/desorption catalytic features at the gold electrode surface in alkaline solution. Utilizing the optimized waveform, the method showed good linearity ($r^2 = 0.9972 - 0.9995$), satisfactory repeatability (relative standard deviations (RSDs) of the peak areas in the range of 0.84%–1.37%) and sufficient sensitivity (limits of detection of 0.061–0.18 $\mu\text{g/mL}$) for the identification of the four bisphosphonates. The recoveries were 80.81%–97.32% with the RSDs of 1.46%–3.02%. It is demonstrated that this method is a rapid and simple one for the determination of the four bisphosphonates in human plasma.

* 通讯联系人: 陈梅兰, 教授, 研究方向为环境化学. Tel: (0571) 88297103, E-mail: rain-lake@163.com.

基金项目: 浙江省自然科学基金一般项目(Y2110945) 和浙江省科技计划项目(2011C37065).

收稿日期: 2011-12-26

Key words: ion chromatography (IC); integrated pulsed amperometric detection (IPAD); alendronate; pamidronate; ibandronate; risedronate; plasma

双膦酸盐是一类广泛用于治疗骨骼病症的化合物,包括恶性高钙血症、骨质疏松和佩吉特氏病^[1]。最常见的口服含氮制剂的副作用是胃部不适和食管炎症^[2]。该类化合物是具有 P-C-P 结构,两个磷酸基团之间连接一个碳原子(见图1)。双膦酸盐如阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠均为极性化合物,这使得其在非极性固定相如 C18 或 C8 柱上很难保留。另外,由于其缺乏生色基团,没有紫外吸收和荧光,因而不易被检测。双膦酸盐不适合用气相色谱(GC)分析,因为其挥发性低,且有离子的性质,易导致峰展宽和峰不对称^[3]。

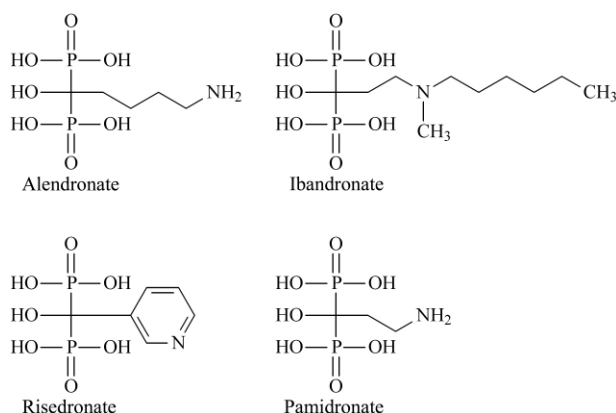


图1 双膦酸盐的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of bisphosphonates

由于双膦酸盐的口服剂量较小(通常为 10 ~ 20 mg),因此在人血浆中的浓度很低。为了更有效地研究其药代动力学,需要更为灵敏的方法对其在血液、尿液样品中的含量进行有效准确的测定。近几年国内外分析血浆、尿液样品中双膦酸盐的方法主要有反相高效液相色谱法(RP-HPLC)^[4-10]、离子对高效液相色谱法(IPC)^[10,11]和离子色谱法(IC)^[12-14]等,涉及的检测器主要有荧光检测器^[4-7]、质谱检测器^[8,9]、紫外检测器^[12-14]等。这些方法主要通过柱前衍生方法得到较低的检出限,最低可达 1 ~ 5 ng/mL;所用的衍生试剂主要包括茚甲氧羰酰氯(FMOC)^[4-7,10]、氯甲酸异丙酯(BCF)^[8]和 Fe³⁺^[12,13]等。

衍生化反应的缺点包括其步骤复杂,耗费时间,其衍生物可能不稳定。由于阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠在碱性条件下可电离为阴离子,因此可以用阴离子交换色谱法(AEC)分

离;而且结构中都包含胺基基团,碱性条件下可直接在金电极上氧化。本研究建立的离子色谱积分脉冲安培检测法(IC-IPAD)可同时测定阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠。实验结果表明该方法是简单快速测定人体血浆中的4种双膦酸盐的一种新方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

DX-600 离子色谱仪,配有 GP50 梯度泵、LC25 色谱柱温箱和 ED50A 电化学检测器,数据采集系统为 Chrome 6.8 的变色龙软件(Dionex 公司)。阿仑膦酸钠(纯度 98%)、帕米膦酸钠(纯度 99%)、伊班膦酸钠(纯度 98%)和利塞膦酸钠(纯度 98%)(中国药物生物样品研究所)。HPLC 级乙腈(Tedia 公司)。所用氢氧化钠溶液由 50% (质量分数)氢氧化钠储备液配制。其他试剂均为试剂纯。实验用水为超纯水,电阻率为 18.2 MΩ·cm(由 Milli-Q 水纯化系统制备)。Organomation N-EVAP-42 氮吹仪(Organomation Associates 公司)。固相萃取柱:Dionex OnGuard II RP 柱(2.5 mL, Dionex 公司)。无药品人体血浆由浙江省血库提供。

阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠储备液由超纯水配制并置于 4 °C 冰箱中保存。其工作溶液通过水稀释储备液得到,于 4 °C 冰箱中保存。

1.2 色谱条件

实验采用填有阴离子交换树脂的 Dionex AS18 柱(250 mm × 2 mm)和 AG18 柱(50 mm × 2 mm); NaOH 溶液浓度为 24 mmol/L,流速为 0.25 mL/min;进样量为 10 μL;检测温度为 30 °C;通过配有金电极为工作电极和 pH-Ag/AgCl 为参比电极的检测池检测。

1.3 样品前处理

在 4 mL 离心管中以 400 μL 水稀释 400 μL 血浆,加入 800 μL 乙腈沉淀蛋白质,漩涡振荡器上充分混合 1 min,以 10 000 r/min 离心 10 min。收集上层清液,于 30 °C 水浴中在氮气流下吹干,残渣中加入 400 μL 水溶解后加载到 RP 柱(预先过 5 mL 乙腈、10 mL 水,静置活化 30 min),以 2 mL 水冲洗 RP 柱,洗脱液过 0.45 μm 滤膜后直接进样分析。

2 结果与讨论

2.1 金电极上的伏安响应

通过循环伏安法研究阿仑膦酸钠在氢氧化钠溶液中的金电极的伏安响应。图 2 显示了阿仑膦酸钠在 0.10 mol/L NaOH 溶液中的金电极的循环伏安图。在正向扫描时,在 0.40 V 附近的氧化峰 (AuOH 和 AuO) 是电极表面生成的氧化物所形成的。反向扫描时,在 0.20 V 附近的还原峰是由于表面氧化物的还原形成的,而在 -0.2 V 的峰是由溶解氧还原造成的。在 10 mg/L 阿仑膦酸钠(实线)存在下,观察到阳极电流增加,可能是其氧化与表面氧化物的形成同时发生(正向扫描)。发现在 0.1 V 和 0.3 V 之间有氧化物形成产生的阳极峰。观察其他化合物如帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠(数据未显示)也有类似的伏安响应。

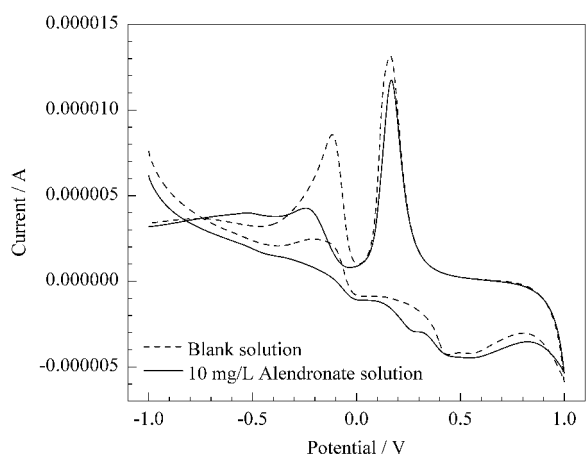


图 2 0.10 mol/L NaOH 中金电极的循环伏安图
Fig. 2 Voltammetric response at Au electrode
in 0.10 mol/L NaOH solution
Scan rate: 50 mV/s.

循环伏安图中显示的结果与 Johnson 和 La-Course^[5] 记载的胺类化合物在金电极上的电化学反应一致,这些化合物以氮原子的非成键电子对吸附在金表面上。在碱性条件下,吸附物被氧化脱附,与金的氧化物的形成过程同时发生,氧化形成的中间产品 (Au-OH) 可作为催化活性中心催化金电极表面的分析物的电化学氧化。从上述结果中可看出,在金电极上检测 4 种双膦酸盐类药物是可行的。

2.2 IPAD 波形优化

多电位波形应用于干净和有活性的电极表面,能够提高信噪比 (S/N)。本实验优化了在离子色谱中积分脉冲安培检测 4 种双膦酸盐 6 电位波形,以 S/N 为被优化参数的函数,做图优化得到最优化结

果。波形图包括 3 个区: 吸附/引发 (电位 E_1/E_2)、积分 (电位 E_3/E_4) 和清洗/活化 (电位 E_5/E_6), 其中 E_1 、 E_2 和 E_3 是影响检测灵敏度的重要因素。

以 0.2 μg/mL 4 种双膦酸盐混合溶液为标准,将 E_1 从 -0.4 到 -0.15 V 以 0.05 V 为间隔变化, E_1 对 S/N 的影响如图 3a 所示。从图 3a 中可看出,除了伊班膦酸钠的最大响应在 -0.25 V 外,其他双膦酸盐的最大响应在 -0.3 V,综合考虑选择 $E_1 = -0.3$ V。固定 $E_1 = -0.30$ V, E_2 从 -0.25 到 -0.05 V 变化,如图 3b 所示,4 种双膦酸盐的最大响应均在 -0.15 V,因此选择 $E_2 = -0.15$ V。使 $E_1 = -0.30$ V, $E_2 = -0.15$ V,从 0.15 到 0.30 V 优化 E_3 ,如图 3c 所示,最佳值为 $E_3 = 0.22$ V。实验采用的波形如表 1 所示。图 4 显示了在最优条件下 0.1 μg/mL 阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠混合标准溶液的色谱分离图。

表 1 测定阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠的积分脉冲安培电位波形

Table 1 Waveform specifications of IPAD for the determination of alendronate, pamidronate, ibandronate and risedronate

Time / s	Potential (vs Ag/AgCl) / V	Integration
0.00	-0.30	begin
0.04	-0.30	
0.05	-0.15	
0.21	-0.15	
0.22	0.22	
0.46	0.22	end
0.47	-0.15	
0.56	-0.15	
0.57	-2.00	
0.58	-2.00	
0.59	0.60	

2.3 线性方程、检出限和精密度

排除基质效应对定量干扰的最好方法是采用基质匹配方法制备工作曲线或采用内标法。实验中比较了直接配制和用空白血浆配制的相同浓度的标准溶液,得到的结果显示无基质效应,且加标回收率显示结果较好,故本文用直接配制的混合标准溶液制备工作曲线。精密量取标准储备液配制阿仑膦酸钠和帕米膦酸钠分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、0.8 μg/mL,伊班膦酸钠和利塞膦酸钠分别为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 μg/mL 的混合标准溶液,以峰面积 Y 对分析物质量浓度 X (μg/mL) 进行线性回归,其线性方程、线性范围、相关系数、定量限、检出限及精密度见表 2。

表 2 AEC-IPAD 法检测 4 种双膦酸钠标准溶液的线性方程、线性范围、相关系数、定量限、检出限及精密度
Table 2 Calibration curves, linear ranges, correlation coefficients (r^2), limits of quantification (LOQs, $S/N \geq 10$), limits of detection (LODs, $S/N \geq 3$) and precisions (RSDs of peak areas) for determination of pamidronate, alendronate, ibandronate, risedronate by anion exchange chromatography-integrated pulsed amperometric detection (AEC-IPAD)

Analyte	Calibration curve	Linear range / ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	LOQ / (ng/mL)	LOD / (ng/mL)	RSD / %	
						Intra-day ($n = 5$)	Inter-day ($n = 3$)
Pamidronate	$Y = 0.9919X + 0.0028$	0.01 – 0.80	0.9989	5.48	1.66	1.03	3.34
Alendronate	$Y = 0.9928X + 0.0028$	0.01 – 0.80	0.9995	10.01	3.02	0.84	1.87
Ibandronate	$Y = 0.9967X + 0.0014$	0.02 – 1.00	0.9972	8.12	2.46	1.37	3.65
Risedronate	$Y = 0.9717X + 0.0099$	0.02 – 1.00	0.9991	17.21	5.21	1.07	2.94

Y: peak area; X: mass concentration, $\mu\text{g/mL}$.

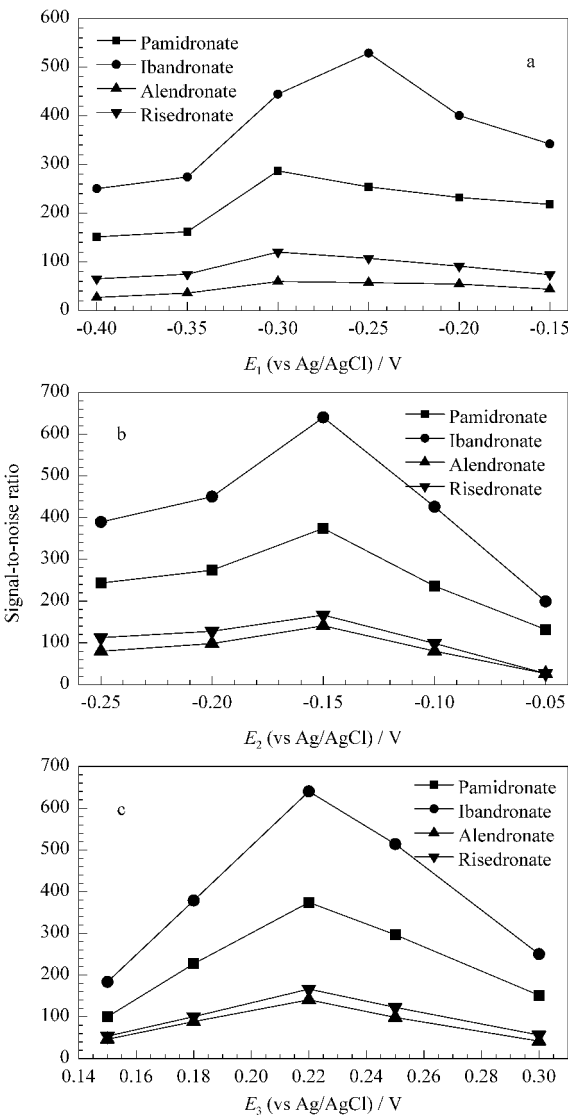


图 3 (a) E_1 、(b) E_2 和 (c) E_3 对信噪比的影响

Fig. 3 Effects of (a) E_1 , (b) E_2 and (c) E_3 on the signal-to-noise ratio

Mass concentrations of the four bisphosphonates: 0.2 $\mu\text{g/mL}$.

2.4 加标血浆样品的测定

分别在空白血浆中加入 5、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠, 样品处理后稀释 10 倍, 平行测定 5 份样品, 得到的

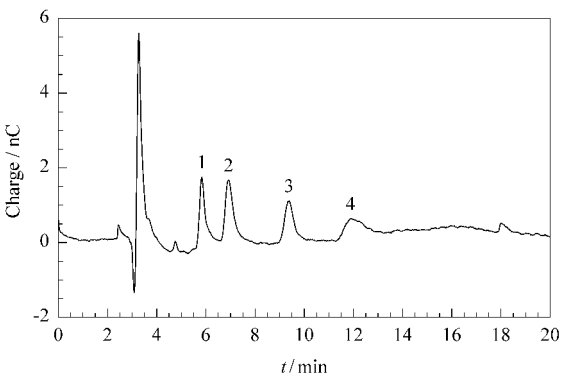


图 4 4 种双膦酸盐混合标准溶液(0.1 $\mu\text{g/mL}$) 的色谱图
Fig. 4 Typical AEC-IPAD chromatogram of a mixed standard solution of 0.1 $\mu\text{g/mL}$

Column: Dionex AS18 (250 mm $\times$ 2 mm) plus a guard column; eluent: 24 mmol/L NaOH solution at a flow rate 0.25 mL/min.

Peaks: 1. pamidronate; 2. alendronate; 3. ibandronate; 4. risedronate.

回收率及相对标准偏差(RSD) 列于表 3。实际加标样品中阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠的检出限(按信噪比($S/N \geq 3$)计)分别为 0.061、0.13、0.075、0.18 $\mu\text{g/mL}$; 定量限($S/N \geq 10$)计)分别为 0.13、0.22、0.19、0.27 $\mu\text{g/mL}$ 。图 5 为血浆中加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠稀释 10 倍后的色谱图。

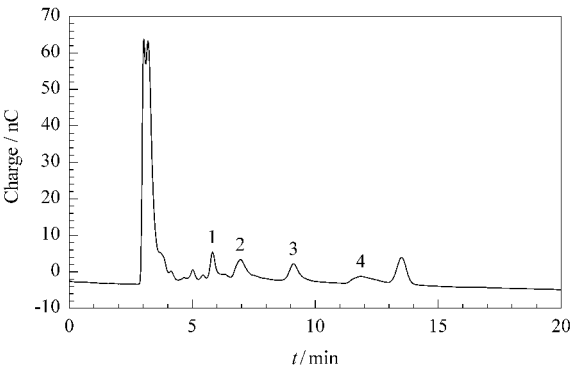


图 5 人体血浆中添加 4 种双膦酸盐(0.5 $\mu\text{g/mL}$) 的色谱图
Fig. 5 Typical AEC-IPAD chromatogram of human plasma spiked with 4 bisphosphonates at 0.5 $\mu\text{g/mL}$

For peak identifications, see Fig. 4.

表 3 人体血浆中添加阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠的回收率($n=5$)

Table 3 Recoveries of pamidronate, alendronate, ibandronate, risedronate spiked in a plasma sample ($n=5$)

Analyte	Added / ($\mu\text{g/mL}$)	Found / ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery / %	RSD / %
Pamidronate	0.50	0.46	92.01	1.46
	0.1	0.091	91.02	1.52
	0.05	0.043	86.03	1.83
Alendronate	0.50	0.45	90.28	1.71
	0.1	0.088	88.04	2.01
	0.05	0.041	82.07	2.40
Ibandronate	0.50	0.48	97.32	1.54
	0.1	0.095	95.32	1.94
	0.05	0.042	84.54	2.24
Risedronate	0.50	0.44	88.37	2.13
	0.1	0.083	83.26	2.57
	0.05	0.040	80.81	3.02

3 结语

实验结果表明 AEC-IPAD 是一种检测血浆中阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠、伊班膦酸钠和利塞膦酸钠简单快速的方法,可用于血浆中该类药物残留分析的快速定量。4 种双膦酸盐在该方法中有很好的保留且有很好的分离度,与之前报道的衍生后检测方法相比,该方法不用衍生,更简单而易于操作。

参考文献:

[1] Coleman R E. Oncologist, 2004, 9(4) : 14
[2] Zavras A I. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1218: 55
[3] Santos F J, Galceran M T. Trends Anal Chem, 2002, 21: 672
[4] Lu T L, Hu H J, Zhao W, et al. J Liq Chromatogr Related Technol, 2010, 33: 349
[5] Meng J, Meng Q, Zheng L Y. Biomed Chromatogr, 2010, 24: 169
[6] Apostolou C, Dotsikas Y, Kousoulos C, et al. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 1151
[7] Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Garcia-Martinez M D. J Chromatogr A, 2009, 1216: 1312
[8] Tarcomnicu I, Silvestro L, Savu S R, et al. J Chromatogr A, 2007, 1160: 21
[9] Warnke M M, Breitbach Z S, Dodbiba E. Anal Chim Acta, 2009, 633: 232
[10] Jia H J, Li W, Zhao K. Anal Chim Acta, 2006, 837: 112
[11] Deeb S K, Hamdan I I, Najjar S M. Talanta, 2004, 64: 695
[12] Tarcomnicu I, Gheorghe M C, Silvestro L, et al. J Chromatogr B, 2009, 877: 3159
[13] Kuljanin J, Jankovic I, Nedeljkovic J, et al. J Pharm Biomed Anal, 2002, 28: 1215
[14] Fernandes C, Leite R S, Lanças F M. J Chromatogr Sci, 2007, 45: 236
[15] Johnson D C, LaCourse W R. Anal Chem, 1990, 62: 589