

# 固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定人血浆长春瑞滨的浓度

闫克里, 朱秀卿, 赵丽, 白玉

(山西省肿瘤医院药物检测室, 太原 030001)

**摘要** 目的: 建立固相萃取 - 反相高效液相色谱法测定人血浆中长春瑞滨的浓度。方法: 样品经  $C_{18}$  固相萃取小柱净化后, 采用 HPLC 紫外检测法, 色谱柱为 Hypersil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈: 0.05 mol L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (68:32 含 0.1% 三乙胺, 磷酸调 pH=4), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为室温, 检测波长 268 nm。结果: 长春瑞滨在 0.1~4.8 μg · mL<sup>-1</sup> 内呈良好的线性关系 ( $r=0.9994$ ), 最低检测浓度为 50 ng · mL<sup>-1</sup>, 方法回收率在 96.8%~103.0%, 萃取回收率在 76.7%~83.0%。日内、日间 RSD ( $n=5$ ) 均小于 6.2%。结论: 本方法简便、准确、可靠, 可用于人体血浆中长春瑞滨浓度的测定。

**关键词:** 长春瑞滨; 固相萃取; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-399-04

## Detemination of vinorelbine in human plasma by solid phase extraction RP high performance liquid chromatography

YAN Ke-li ZHU Xiu-qing ZHAO Li BAI Yu

(Department of Drug Detection, Shanxi Provincial Tumor Hospital, Taiyuan 030001, China)

**Abstract Objective** To develop an SPE-HPLC method for the determination of vinorelbine in human plasma. **Method** The sample was cleaned with an SPE- $C_{18}$  cartridge, separated and quantitatively determined by reversed-phase HPLC with an ultraviolet detector. The analytical column was packed with Hypersil ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate solution (68:32 containing 0.1% triethaniline, adjusted to pH 4.0 by phosphoric acid), the flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup>, and detection wavelength was set at 268 nm. **Results** The linear range was 0.1-4.8 μg · mL<sup>-1</sup> for vinorelbine in human plasma. The correlation coefficient was 0.9994. The limit of detection was 50 ng · mL<sup>-1</sup>. The method recoveries were 96.8% - 103.0%. The extraction recoveries were 76.7% - 83.0%. Within-day and between-day RSDs ( $n=5$ ) were less than 6.2%. **Conclusion** The method is simple, reliable and sensitive for determination of vinorelbine in human plasma.

**Key words** vinorelbine; solid phase extraction (SPE); HPLC

长春瑞滨是一种半合成的长春花类生物碱, 是周期特异性抗癌药。主要用于治疗非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、淋巴瘤等。目前血浆中长春瑞滨 HPLC 的检测方法国外多有报道, 由于该药的消除半衰期大于 40 h, 在现有的给药剂量治疗下, 血浆浓度非常低<sup>[1]</sup>。早期使用放射免疫法进行体内血浆浓度测定<sup>[2,3]</sup>, 之后研究发表了高效液相色谱紫外检测法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱荧光检测<sup>[5-9]</sup>、高效液相色谱电喷雾检测法<sup>[10]</sup>、高效液相库伦检测法<sup>[11]</sup>。国内有使用高效液相色谱荧光法检测的研究报

道<sup>[12]</sup>, 但未见使用固相萃取小柱直接纯化血浆, 进行反相高效液相色谱紫外检测法的测定。本文采用固相萃取 - 反相高效液相色谱紫外检测法进行了人血浆中长春瑞滨的浓度测定方法学研究, 并对 5 例用药病人进行了血药浓度的测定, 证明该方法简单、有效, 适用于该药临床药物浓度的监测和药代动力学的研究工作。

### 1 仪器与试剂

日本日立 L-2130 高效液相色谱仪; 日本日立 L-2420 紫外检测器; 大连依利特 Echrom 98 型色谱

工作站; 分析天平 (上海良平精密仪器有限公司,  $M_{ax}100\text{ g}$   $D=0.0001\text{ g}$ ); ZH-1 自动涡旋混合器。固相萃取柱 ( $C_{18}$ ,  $500\text{ mg}\cdot 6\text{ mL}^{-1}$ ), 大连思谱精工有限公司; 长春瑞滨对照品 (纯度大于 99.5%) 购于化工杭州民生药业集团有限公司; 化学试剂乙腈、甲醇为色谱纯 (天津四友化工厂生产); 水为纯蒸水。

## 2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS 柱 ( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 -  $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾水溶液 (68:32, 0.1% 三乙胺, 用磷酸调  $\text{pH}=4$ ); 流速:  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 室温; 检测波长为  $268\text{ nm}$ 。

## 3 对照品溶液配制

取长春瑞滨对照品  $5\text{ mg}$  精密称定, 置  $10\text{ mL}$  量瓶中, 加流动相定容至刻度, 制成每  $1\text{ mL}$  含长春瑞滨  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 即得。

## 4 血浆样品的处理

取固相萃取小柱, 加甲醇  $5\text{ mL}$ , 流完后, 再加  $5\text{ mL}$  水洗涤活化备用。取血浆  $1\text{ mL}$ , 加在经活化的固相萃取小柱上面, 待血浆流出后, 加 20% 甲醇水

溶液  $10\text{ mL}$  淋洗, 加含 50% 甲醇的乙酸乙酯溶液  $5\text{ mL}$  洗脱, 收集洗脱液,  $40\text{ }^\circ\text{C}$  以下氮气吹干, 残渣加流动相  $0.5\text{ mL}$  充分溶解, 取  $50\text{ }\mu\text{L}$  进行 HPLC 检测。

## 5 方法专属性试验

分别取空白血浆、含对照品血浆溶液 (含长春瑞滨  $2.4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 按“4”项下方法操作, 记录色谱图 (见图 1)。含药血浆中长春瑞滨的保留时间为  $10.80\text{ min}$  左右, 色谱峰峰形良好, 血浆内源性物质不干扰样品测定, 无杂质峰干扰, 本方法具有较高的专属性。

## 6 线性关系及最低检测限试验

取空白血浆  $0.9\text{ mL}$ , 置  $10\text{ mL}$  离心管中, 分别加入用长春瑞滨对照品溶液制成的含长春瑞滨浓度为  $0.1$   $0.3$   $0.6$   $1.2$   $2.4$   $4.8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品血浆, 按“4”项方法处理,  $50\text{ }\mu\text{L}$  进样, 以长春瑞滨血浆浓度为横坐标, 测定的峰面积为纵坐标, 作直线回归处理, 得长春瑞滨回归方程为:

$$Y = 0.696X \quad r = 0.9994$$

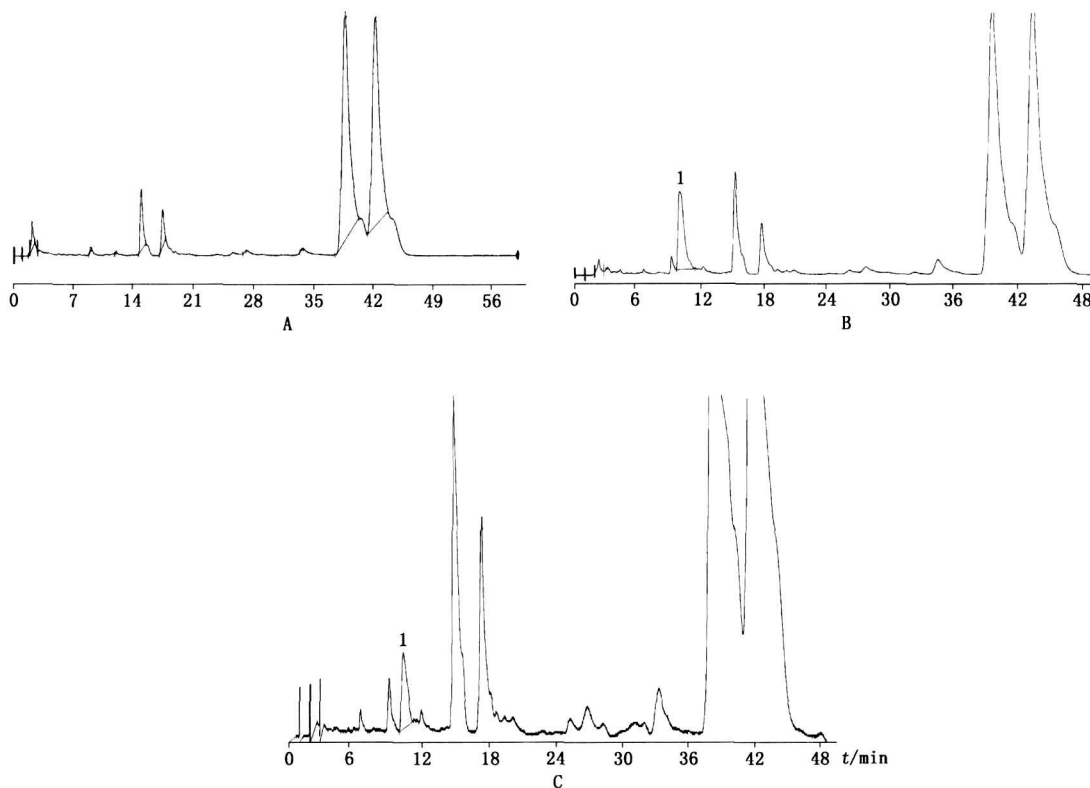


图 1 人血浆中长春瑞滨 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of vinorelbine in human plasma

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆加长春瑞滨 (blank plasma with vinorelbine) C. 病人静脉输注  $30\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  长春瑞滨 1 h 后的血浆样品 (a patient plasma sample 1 hour after spiked with  $30\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  vinorelbine)  
1 长春瑞滨 (vinorelbine)

长春瑞滨血浆浓度在  $0.1 \sim 4.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。长春瑞滨最低检测浓度为  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $S/N = 3$ )。

7 稳定性试验

取空白血浆  $0.9 \text{ mL}$ , 置  $10 \text{ mL}$  离心管中, 分别加入用长春瑞滨对照品溶液制成含长春瑞滨浓度分别为  $0.1, 0.6, 2.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品血浆, 每个浓度制备 3 份, 置  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存, 分别于第 10, 20, 30 d 取出血浆样品按“4”项方法处理, 进行测定, 测定结果表明, 各浓度的 RSD 均小于  $3.5\%$ , 说明血浆中的长春瑞滨在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下, 至少可以稳定 30 d。

8 回收率及精密度试验

取空白血浆  $0.9 \text{ mL}$ , 置  $10 \text{ mL}$  离心管中, 分别加入用长春瑞滨对照品溶液制成的含长春瑞滨浓度

分别为  $0.1, 0.6, 2.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品血浆, 每个浓度各 5 份, 按“4”项方法处理, 测定色谱峰面积, 用回归方程计算检出量, 并与加入量比较, 计算方法回收率 ( $n = 5$ )。同时, 同一浓度的血浆样品分别于 1 d 内连续测定 5 次, 5 d 内每天测定 1 次, 测定色谱峰面积并计算浓度, 计算日内和日间精密度。

将空白血浆  $0.9 \text{ mL}$  换成流动相, 同法配制上述 3 种浓度的长春瑞滨溶液, 每个浓度各 5 份, 加入长春瑞滨对照品溶液, 制成含长春瑞滨 3 种浓度分别为  $0.1, 0.6, 2.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每个浓度各 5 份, 取  $10 \mu\text{L}$  直接进样, 将同浓度对照品血浆和流动相制备的样品峰面积进行比较, 计算提取回收率 ( $n = 5$ ), 结果见表 1。

表 1 血浆中长春瑞滨回收率及日内日间精密度试验结果 ( $n = 5$ )

Tab 1 Method recoveries and extraction recoveries of vinorelbine and precision results

浓度 (plasma concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	方法回收率 (method recoveries) %	RSD %	提取回收率 (extraction recoveries) %	RSD %	RSD %	
					日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
0.1	96.8	2.4	83.0	4.0	5.1	5.0
0.6	103.0	3.2	76.7	4.9	4.1	3.6
2.4	99.0	3.3	78.8	2.1	3.6	3.1

9 方法应用

5 名非小细胞肺癌患者, 年龄 ( $57 \pm 10$ ) 岁, 体重 ( $61 \pm 11$ ) kg 给药剂量为  $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。给药方法为: 将药物用生理盐水稀释至  $50 \text{ mL}$ , 于  $8 \text{ min}$  内静脉输入, 然后用  $300 \text{ mL}$  生理盐水冲洗静脉。静脉输入  $8 \text{ min}$  给药结束后开始计时, 在 ( $0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 12, 18, 24, 36, 48 \text{ h}$ ) 采集病人静脉血  $2 \text{ mL}$ , 置于抗凝管中。血样采集后,  $4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ , 取血浆  $1 \text{ mL}$ , 按“4”项方法处理, 测定血药浓度, 绘制血药浓度 - 时间曲线, 见图 2。

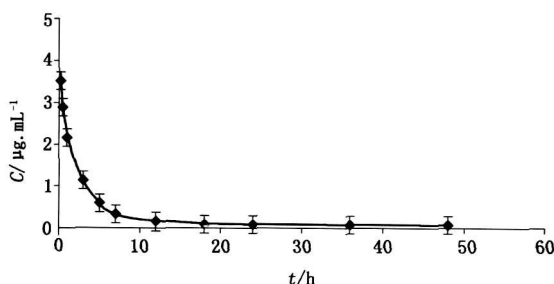


图 2 5 名非小细胞肺癌患者静脉输注长春瑞滨  $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  后的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration - time curve of short intravenous vinorelbine infusions  $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  dose in five patients with non-small cell lung cancer

10 讨论

为确定固相萃取小柱合适的淋洗液和洗脱液, 保证除去最多的杂质, 尽可能多地保留待测物质于小柱上, 考察了不同配比的甲醇水溶液 ( $10\%, 20\%, 30\%, 40\%, 50\%, 60\%, 70\%, 80\%, 90\%, 100\%$ ) 的淋洗效果。实验结果表明, 以  $20\%$  的甲醇水溶液作淋洗液时, 可保留更多的长春瑞滨在固相萃取柱上, 同时去除的杂质更多, 且血浆样品中的杂质干扰最少。在确定了淋洗液后, 又对洗脱液的洗脱用量进行了选择试验。在洗脱液体积相同时, 比较了使用甲醇、乙腈、含不同浓度的甲醇乙酸乙酯溶液 ( $10\%, 20\%, 30\%, 40\%, 50\%, 60\%, 70\%, 80\%$ ) 洗脱长春瑞滨的能力, 试验结果表明,  $50\%$  的甲醇乙酸乙酯溶液的洗脱效果最佳, 洗脱液在  $5 \text{ mL}$  时, 即可达到最大洗脱效果。

对于血浆样品的处理, 曾采用多数文献报道的液液萃取方式。实验中, 比较了下面 3 种对血浆样品处理方式的回收率: 氯仿 - 乙醚 ( $3:7$ ) 直接萃取血浆样品; 氯仿 - 乙醚 ( $3:7$ ) 萃取碱化后的血浆样品溶液; 使用乙腈直接沉淀血浆样品中的蛋白, 高速离心后, 取上清液直接进样。试验结果表明, 在血浆样品浓度相等的情况下, 碱化血浆溶液后再进行萃取比直接萃取的回收率高。用乙腈直接沉淀血浆蛋

白的方法较碱化血浆后再进行萃取的回收率高。但是,实验中发现,使用乙腈直接沉淀血浆蛋白后,取上清液直接进样对血浆样品中待测物稀释过多,使用 HPLC 紫外检测法的灵敏度达不到临床药代动力学研究的需求。如用氮气吹干浓缩沉淀蛋白后的上清液,因上清液含有水分,且长春瑞滨怕光、不耐热,浓缩操作时间较长,提取回收率较低,也无法满足分析测定的要求。为了增加测定灵敏度,改进样品处理方式,减少样品处理时间,提高回收率,改用固相萃取小柱直接处理样品,达到了使用紫外法分析测定的目的。

应用本文建立的测定方法,对 5 名使用长春瑞滨的病人静脉输注给药后,进行了血药浓度测定,测定结果表明,本方法可以很好地满足长春瑞滨临床药浓度检测和临床药代动力学研究的需求,为临床药物的深入研究打下基础。

#### 参考文献

- 1 State Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation (国家食品药品监督管理局药物评价中心). Clinical Drug Reference(药物临床信息参考). Sichuan(四川): Sichuan Science and Technology Publishing House(四川科学技术出版社), 2004: 66
- 2 Rahmani R, Zhou XJ, Bore P, et al. Oral administration of [<sup>3</sup>H]navelbine in patients: comparative pharmacokinetics using radioactive and radioimmuno logic determination methods. *Anticancer Drugs*, 1991, 2(4): 405
- 3 Bore P, Rahmani R, van Cantfort J, et al. Pharmacokinetics of a new anticancer drug navelbine in patients: Comparative study of radioimmuno logic and radioactive determination methods. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989, 23(4): 247
- 4 Nitot G, Lachatre G, Marquet P, et al. High- performance liquid

- chromatographic determination of navelbine in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1990, 8(1): 258
- 5 Gauvin A, Pinguet F, Poujol S, et al. High- performance liquid chromatographic determination of vinorelbine in human plasma and blood: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, 10(2): 389
- 6 Robieux J, Vitali V, Aita P, et al. Sensitive high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for measurement of vinorelbine plasma concentrations. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996, 12(1): 183
- 7 Leveque D, Jehl F. Determination of vinorelbine in biological fluids by high- performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995, 20(2): 314
- 8 Debal V, Morjani H, Millot JM, et al. Determination of vinorelbine (navelbine) in tumour cells by high- performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1992, 2(1): 93
- 9 Van Tellingen O, Kuijpers A, Beijnen JH, et al. Bio- analysis of vinorelbine by high- performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*, 1992, 17(2): 328
- 10 Ragot S, Sauvage FL, Rousseau A, et al. Sensitive determination of vinorelbine and its metabolites in human serum using liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 5(2): 167
- 11 Mouchard- Delmas C, Goudier B, Vistelle R. Determination of vinorelbine in rabbit plasma by high- performance liquid chromatography with coulometric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995, 20(2): 390
- 12 WANG Zhuo(王卓), ZHANG Yu(张喻), HU Jin- hong(胡晋红), et al. Determination of vinorelbine in human blood by HPLC using fluorescence detector(高效液相色谱荧光法测定人血中去甲长春花碱的浓度). *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2004, 24(10): 596

(本文于 2008 年 10 月 22 日修改回)