



羟基喜树碱微透析回收率的体外研究

谢毅, 凌家俊*, 古锦辉

(广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的:建立羟基喜树碱微透析探针回收率的测定方法,考察影响回收率的因素,为体内微透析研究提供依据。方法:采用浓度差法(增量法、减量法)测定羟基喜树碱探针回收率,考察流速、浓度、温度对回收率的影响,并考察回收率的稳定性。结果:增量法和减量法测得的回收率一致;回收率与探针周围媒介浓度无关,稳定性良好,随温度升高而升高。结论:微透析技术可用于羟基喜树碱药动学研究,反透析法可用于羟基喜树碱体内微透析回收率的体内测定。

[关键词] 羟基喜树碱;微透析;回收率

微透析技术(microdialysis)是一种新型的瘤体组织取样技术,以透析原理为基础^[1],通过在瘤体中植入有带半透膜的探针,实现对实体瘤细胞外液中的内源性及外源性化合物直接、连续取样,为肿瘤局部采样提供方便快捷的手段,是研究实体瘤局部药物代谢过程的一种新型工具,具有广阔的应用前景。

羟基喜树碱(HCPT)系珙桐科喜树的皮、果实中提取得到的一类色氨酸-萜烯生物碱类抗癌药物,对 DNA 拓扑异构酶 I 具有抑制作用,对多种恶性肿瘤具有良好疗效^[2]。作者考察将微透析技术应用于羟基喜树碱相关制剂的肿瘤局部药动学研究的可行性以及采用反向透析法测定探针回收率的可行性,优化体内微透析取样参数。

1 材料

1.1 仪器 微透析系统包括线性探针(CMA30,膜长 10 mm,直径 0.24 mm),灌注器推进泵(CMA402 Syringe Pump),灌注器(CMA 1.0 mL Exmire Microsyringe, MS-GAN100);Water 高效液相色谱(HPLC)系统(Waters515 泵,2487 双波长紫外检测器,浙大 N3000 色谱工作站);pHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);HJ-3 型恒温磁力搅拌器(常州澳华仪器有限公司);分析天平(日本岛津 AUW120D,1/10 万)。

1.2 试药 HCPT 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100526-200301);HCPT 纯品(纯度 $\geq 99\%$);

成都兰贝植化有限公司,批号 100903);甲醇(色谱纯,DIMA 公司);乙腈(色谱纯,DIMA 公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性实验

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m);流动相为乙腈-甲醇-0.05 mol \cdot L⁻¹ KH₂PO₄ (pH 6.4) (6:49:45);流速 0.8 mL \cdot min⁻¹;检测波长 384 nm;柱温 25 $^{\circ}$ C。在此色谱条件下,HCPT 峰形对称,出峰时间 4.7 min。

2.1.2 HCPT 对照品溶液的制备 精密称取经 P₂O₅ 干燥至恒重的 HCPT 对照品适量,滴加 1.0 mol \cdot mL⁻¹ NaOH 液溶解,用双蒸水定容至 100 mL 得 0.102 g \cdot L⁻¹ 的对照品母液,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱低温避光保存。

2.1.3 HCPT 供试品液配制 精密称取经 P₂O₅ 干燥至恒重的 HCPT 纯品适量,滴加 1.0 mol \cdot mL⁻¹ NaOH 液溶解,用生理盐水定容至 500 mL,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,超声脱气 15 min,得 0.005 g \cdot L⁻¹ 的 HCPT 供试品液。

2.1.4 专属性试验 取 10 μ L 空白生理盐水液注入 HPLC 仪检测,在 HCPT 的出峰位置无其他色谱峰,表明空白生理盐水液不存在干扰,分析条件可行。

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取 2.1.2 项下标准品液适量,用双蒸水定容得质量浓度为 10.2, 5.1, 3.06, 2.04, 1.02, 0.51, 0.102 mg \cdot L⁻¹, 进样 HPLC 仪 10 μ L,以峰面积(Y)对进样浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y = 102\ 676X - 2\ 081.6$ ($r = 0.999\ 9$),表明 HCPT 在 0.102~10.2 mg \cdot L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.1.6 精密度试验 取 1.02 mg \cdot L⁻¹ 的 HCPT 标

[稿件编号] 20110919017

[基金项目] 广东省科学技术厅重点引导项目(2010B030700035)

[通信作者] *凌家俊,教授,硕士生导师,研究方向为现代药物制剂及药代动力学研究, Tel: (020) 39358043, E-mail: piglion88@gmail.com



准品液连续进样 5 次,每次 10 μL , HPLC 分析。HCPT 峰面积 RSD 0.13%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 供试品溶液稳定性试验 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h, 精密吸取 2.1.3 项下供试品溶液 10 μL , 进样 HPLC 仪分析。结果, HCPT 峰面积 RSD 2.7%, 表明供试品液在 24 h 内稳定。

2.1.8 定量限与检测限 按 2.1.2 项下方法分别配制一系列浓度的 HCPT 标准品液, 进样 HPLC 仪 10 μL , 得检测限约为 5.1 pg ($S/N=3$), 定量限约为 51 pg ($S/N=10$)。

2.2 微透析实验

2.2.1 浓度差法(减量法、增量法)考察流速对回收率的影响 增量法: 将探针浸于 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 生理盐水液, 分别以 1, 1.5, 2, 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流空白生理盐水液, 每更换一种流速, 探针平衡 60 min, 每种流速收集 6 份透析液, 每份 15 μL 。HPLC 测定透析液中 HCPT 浓度 ($C_{\text{dialysate}}$) 及探针外液 HCPT 浓度 (C_{ECF}), 按式 $R = C_{\text{dialysate}}/C_{\text{ECF}} \times 100\%$ (公式 1) 计算增量法下 HCPT 回收率 R 。以灌流流速 v 为横坐标, 回收率 R 为纵坐标作图, 并以 R 对 v 的自然对数进行线性回归, 见图 1, 表 1。

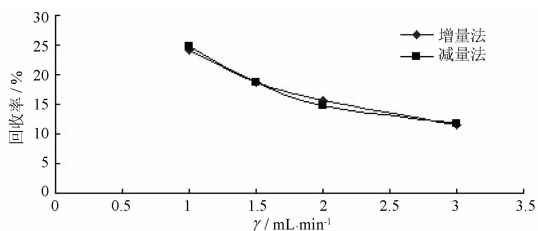


图 1 增量法和减量法测定流速对回收率影响
Fig. 1 Effect of flow rates on HCPT recovery with increment and decrement methods

表 1 增量法和减量法下回收率 R 与 $\ln v$ 线性关系 ($n=5$)
Table 1 Linear relationship of recovery with $\ln v$ ($n=5$)

方法	回归方程
增量法	$R = -11.5321\ln v + 23.86$ ($r=0.9975$)
减量法	$R = -11.8811\ln v + 24.001$ ($r=0.9861$)

减量法: 将探针浸于空白生理盐水液中, 分别以 1, 1.5, 2, 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度灌流 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 生理盐水液, 每更换一种流速, 探针平衡 60 min, 每种流速收集 6 份透析液, 每份 15 μL 。HPLC 测定透析液中 HCPT 浓度 ($C_{\text{dialysate}}$) 及灌流液 HCPT 浓度

($C_{\text{perfusate}}$), 按式 $R = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}})/C_{\text{perfusate}} \times 100\%$ (公式 2) 计算减量法下 HCPT 回收率 R 。以灌流流速 v 为横坐标, 回收率 R 为纵坐标作图, 并以 R 对 v 的自然对数进行线性回归, 见图 1, 表 1。

增量法和减量法测得的 HCPT 探针回收率随着流速的增加, 回收率呈指数下降的趋势; 单因方差分析表明, 对于同一根探针而言, HCPT 回收率和释放率近似相等, 2 种方法下 HCPT 探针回收率在各流速下均保持一致, 这为反向透析法测定 HCPT 体内回收率可行性提供了实验依据。

2.2.2 浓度对回收率的影响 将探针分别浸于 0.5, 1, 3, 5, 8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 生理盐水液, 以 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速灌流空白生理盐水液, 每更换一种浓度, 探针平衡 60 min, 余下同 2.2.1 项下增量法。按增量法公式 1 计算探针在不同质量浓度下的回收率, 见图 2。

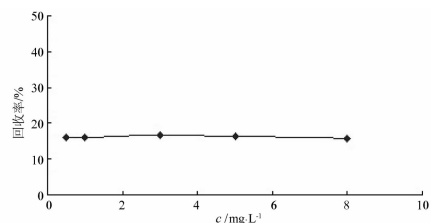


图 2 增量法测定不同浓度对 HCPT 回收率的影响
Fig. 2 Effect of different concentrations on HCPT recovery with increment method

以回收率对浓度作图, 结果为一条大致与 x 轴平行的直线; 5 个浓度下测得的回收率为 (16.21 ± 1.93)%; 以透析液中 HCPT 浓度对探针外液 HCPT 浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.1591X + 0.0041$ ($r=0.9996$), 显示两者线性关系良好。由此表明在所研究的浓度范围内, 羟基喜树碱微透析探针回收率与浓度无关, 呈浓度非依赖性。

2.2.3 温度对回收率的影响 将探针浸于含 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 生理盐水液, 用恒温磁力搅拌器控制探针外液温度 25, 37, 50, 60 $^{\circ}\text{C}$, 以 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速灌流空白生理盐水液, 每更换一种温度, 探针平衡 60 min, 余下同 2.2.1 项下增量法。按增量法公式 (1) 计算探针在不同温度下的回收率, 见图 3。随着温度的升高, 回收率随之升高。

2.2.4 回收率的日内稳定性 将探针浸于含 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 生理盐水液, 用恒温磁力搅拌器控制探针外液温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 以 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速灌流空白

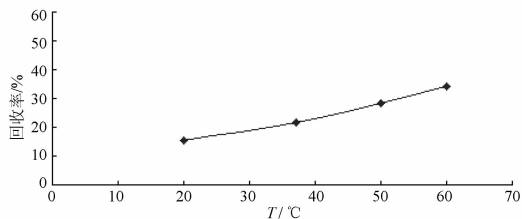


图 3 温度对回收率的影响

Fig. 3 Effect of temperatures on HCPT recovery

生理盐水液,每 15 min 收集一份透析液,共收集 8 h。HPLC 测定透析液中 HCPT 浓度($C_{\text{dialysate}}$)及探针外液 HCPT 浓度(C_{ECF})。按增量法公式 1 计算回收率,见图 4。以 $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度进行灌流,HCPT 回收率在 8 h 内保持稳定,平均回收率为 18.53%,RSD 为 5.1% (RSD < 10%),符合微透析采样的前提条件。

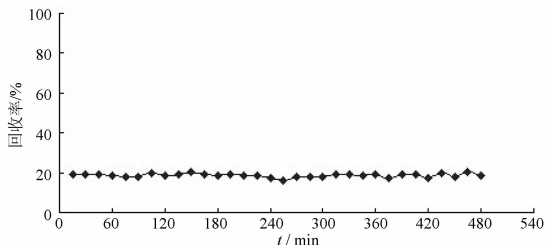


图 4 HCPT 回收率日内稳定性

Fig. 4 Intraday stability of HCPT recovery

3 讨论

本课题拟将微透析技术应用到羟基喜树碱肿瘤局部药动学研究之前,通过体外模拟实验,探讨了将微透析技术结合高效液相技术检测透析介质中的 HCPT 浓度的可行性,验证了反透析法(即浓度差法

中的减量法)作为校正 HCPT 微透析回收率的可行性;验证了 HCPT 回收率与探针外液浓度变化无关,探针回收率日内稳定性达 8 h; HCPT 回收率随温度升高而增大,显示了微透析探针物质转运性能的温度依赖性,为体内采样提供借鉴; HCPT 半衰期短,结合考虑回收率、流速、取样间隔、检测灵敏度等因素,初步建立了体内微透析取样的相关参数:灌流流速 $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,取样量 $15 \mu\text{L}$,取样间隔 7.5 min。最佳参数组合还须经体内研究最终确定。

探针回收率由于个体差异差别很大,因此回收率校正是微透析技术中的一个关键性问题,直接关系到研究结果的可靠性。探针回收率有多种校正方法^[3],最简单实用且准确易行的方法是反透析法。反透析法通过测定药物经过半透膜的流失量(即释放率)来间接计算探针的回收率。一般情况下药物的回收率等于释放率,但也有特殊的情况^[4]。因此,在利用反透析法测定药物回收率之前需验证其回收率和释放率是否一致。

[参考文献]

- [1] 陈翔,凌家俊,陈亮. 烟碱微透析回收率的体外测定方法及影响因素研究[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(2):159.
- [2] J Zunino F, Dallavalle S, Lacey D, et al. Current status and perspectives in the development of camptothecins[J]. Cur Pharm Des,2002,8(27):2505.
- [3] 张英丰,周莉玲,汪小根,等. 青藤碱微透析体外回收率的测定及影响因素的研究[J]. 中药材,2005,28(12):1066.
- [4] Plock N, Buerger C, Kloft C. Successful management of discovered pH dependence in vancomycin recovery studies: novel HPLC method for microdialysis and plasmasamples[J]. Biomed Chromatogr,2005,19(3):237.

Study on *in vitro* microdialysis recovery of hydroxycamptothecine

XIE Yi, LING Jiajun*, GU Jinhui

(School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method to detect the microdialysis recovery of HCPT and to investigate the influencing factors, thus to supply experimental basis for *in-vivo* microdialysis of HCPT. **Method:** The *in vitro* recovery of HCPT was detected by concentration difference method (increment method and decrement method). The influence of flow rates, medium concentration and temperature on the HCPT recovery and the stability were studied. **Result:** The recovery detected by increment method was the same as by decrement method. The recovery was independent of HCPT concentrations in the medium. The Hydroxycamptothecine recovery had good stability and increased as the temperature rose. **Conclusion:** Microdialysis sampling can be used for the pharmacokinetic study of HCPT. Retrodialysis can be used for the determination of the HCPT *in vivo* recovery.

[Key words] hydroxycamptothecine; microdialysis; recovery

doi:10.4268/cjmm20121030

[责任编辑 陈玲]