

柱切换 HPLC 法研究活性炭用量对阿霉素吸附程度的影响

向莉, 聂中越, 李盾(暨南大学医学院第二附属医院, 广东 深圳 518020)

摘要:目的 以活性炭作为吸附剂, 确定阿霉素在血液灌流法治疗肝癌时所用吸附剂的最佳用量, 以减少阿霉素的不良反应。

方法 采用含阿霉素的血浆灌注于不同组合量的活性炭柱, 用柱切换高效液相色谱法测定阿霉素的灌注前后血药浓度。

结果 A 组(150g×1 支)、B 组(150g×2 支)、C 组(150g×3 支)、D 组(150g×4 支)及 E 组(150g×5 支)活性炭柱对阿霉素的吸附率分别为 20.19%、27.60%、55.98%、56.42%、57.13%, 经方差分析有极显著性差异, 经两两比较的 q 检验, C、D 及 E 组间无显著性差异。**结论** 除 D 组与 E 组 $P>0.05$ 外, 其它三个低剂量活性炭组中任意两组皆为 $P<0.01$, 故 150g×3 支活性炭柱为活性炭吸附剂的最佳用量, 该用量的确定为血液灌流法治疗肝癌提供了理论依据。

关键词: 血液灌流; 阿霉素; 柱切换; 高效液相色谱法; 血药浓度

Study on the effect of degree of adsorbing adriamycin according as dosage of activate carbonin by column switching HPLC

XIANG Li, LI Dun(The second affiliated hospital of Ji Nan university medical college, Guang Dong Shen Zhen 518020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To make sure the best dosage of sorbent which adsorbed Adriamycin(ADM) by activated carbon in hemoperfusion therapy the liver cancer, in order to reduce side effect of ADM. **METHOD** The blood plasma of ADM was perfused in the activated carbon columns which contained the different combination. The blood concentration of ADM was determined by column switching HPLC. **RESULTS** The adsorption ratio of ADM by A group(150g×1)、B group(150g×2)、C group(150g×3)、D group(150g×4)及 E group(150g×5) activated carbon columns were 20.19%、27.60%、55.98%、56.42%、57.13%. The mean difference is significant at the 0.01 level by ANOVA. It was no difference significant at the 0.05 level between groups of C, D and E by post hoc multiple comparisons. **CONCLUSION** There were difference significant at the 0.01 level between any two of three groups of low dosage activate carbon($P<0.01$), except D and E group($P>0.05$). The best dosage of activate carbon column was 150g×3. To make sure the dosage provided theoretics basis for therapy the liver cancer by hemoperfusion.

KEY WORDS: hemoperfusion; adriamycin; column switching; HPLC; blood drug concentration

肝癌通常指原发性肝癌, 是我国常见恶性肿瘤之一, 近年来, 对肝癌的早期诊断、治疗都有较大的进展和提高。介入疗法效果较好, 较常用, 但要提高抗癌疗效需要加大局部抗癌药物用量, 随之而来也会带来更大的不良反应。阿霉素(Adriamycin, ADM)是一种具有高度抗癌活性的广谱抗癌药物, 也是目前临床应用最为广泛和最有效的抗肿瘤药物之一, 被国内学者广泛应用治疗肝癌^[1]。由于其具有强烈的细胞毒性, 可引起骨髓抑制、心肌毒性反应等不良反应。其副作用发生率和外周血药浓度水平有关, 在一定范围随外周血 ADM 浓度升高, 其副作用加大^[2]。为选择最佳给药方案以保证用药的安全与有效, 采用血液灌流法降低外周血药浓度^[3], 在加大局部阿霉素用量的同时, 对逸出肝外的抗肿瘤药物予以清除, 对于减轻阿霉素的毒性作用有重大意义。血液灌流技术作为一种清除血中药物的方法已在临床应用^[4], 但其关键是吸附剂用量的多少。故确定阿霉素在血液灌流介入疗法治疗肝癌时所用吸附剂的最佳用量, 以减少阿霉素的不良反应, 非常有必要。

柱切换高效液相色谱技术, 就是利用多通路切换阀, 达到样品的预净化、富集、分离等目的。该技术可便于生物样品(血清、血浆等)直接进样^[5], 为准确、方便地测定阿霉素血药浓度, 特采用不需样品处理的直接进样的柱切换高效液相色谱方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

美国 Waters 高效液相色谱仪; 2010 系统工作站; 996 光电二极管阵列检测器; 510 双泵; 7000 柱切换阀(美国 Rheodyne); HL-1 型恒流泵(上海医疗器械厂); Rios 超纯水器(美国 Millipore 公司); 分析柱 Shim-pack C₁₈(150×4.6mm); 预处理柱 50mm×5mm, 内装 μ Bondapak C₁₈ 填料 37~50 μ m, 湿法装柱。

1.2 试剂

炭肾 150(活性炭 150g, 血流量 100mL)瑞典金宝公司(Gambro)生产; 盐酸阿霉素标准品(意大利法玛西亚普强公

司);盐酸阿霉素冻干粉针剂 10mg/支(深圳万乐药业有限公司);甲醇(色谱纯,天津四友生物医学技术开发公司);冰醋酸及无水醋酸钠(天津第二试剂厂);血浆(深圳市血液中心)。

1.3 色谱条件

分析流动相:甲醇-0.01M 醋酸钠溶液-冰醋酸(70: 30: 1)混合液 pH:8.6, 流速:1.0mL/min, 检测波长:235nm, 灵敏度 0.01AuFs;预处理流动相:0.01M 醋酸钠溶液-冰醋酸(30: 1), 流速:2.5mL/min, 室温下操作。

1.4 测定方法

测定时取经高速离心后的待测血浆 400μL, 以醋酸缓冲液稀释至 600μL, 旋涡混匀, 取 500μL, 直接注入 HPLC 系统, 分别经预处理柱浓缩净化和分析柱分离测定。

1.5 柱切换操作

柱切换系统流程图见图 1、图 2。样品先进入预处理柱, 在预处理柱上被净化和富集, 经预处理流动相冲洗, 待血浆中杂质基本冲洗干净后, 高压阀切换, 使预处理柱和分析柱成串联状态, 分析流动相进入预处理柱将保留在预处理柱中的阿霉素洗脱入分析柱进行分离测定。然后切换阀再经切回使分析柱和预处理柱断开, 用预处理流动相平衡预处理柱后, 即可供下次进样。柱切换操作时间表见表 1, 血浆测定色谱见图 3、图 4。

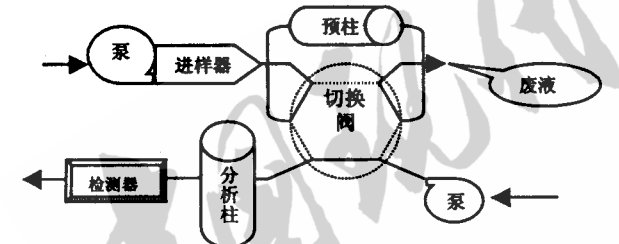


图 1 柱切换预处理操作流程

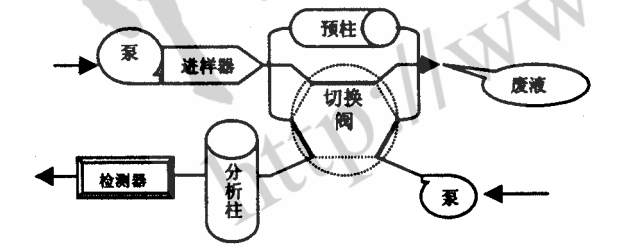


图 2 柱切换分离测定操作流程

表 1 柱切换操作时间表

时间(min)	切换阀位置	分析柱中流动相	预处理柱中流动相
0~6	预处理	分析流动相	预处理流动相
6~12	分离测定	分析流动相	分析流动相
12~15	预处理	分析流动相	预处理流动相
15~	预处理	分析流动相	待进样

2 结果

2.1 标准曲线

精密称阿霉素对照品适量, 用 0.1mmol 的 HCl 溶液溶解, 得浓度为 1mg/mL 的储备液, 冷藏备用。取上述储备液, 用 0.1mmol 的 HCl 溶液稀释至一定浓度作为工作溶液。

分别取健康人血浆, 加入不同量的阿霉素溶液, 使浓度分别为:25,50,100,200,400,800ng/mL。取上该系列浓度的血浆 400μL, 以醋酸缓冲液稀释至 700μL, 旋涡混匀, 取 500μL, 进样, 以峰面积对浓度进行线性回归。阿霉素血药浓度在 25~800ng/mL 范围内线性关系良好, 回归方程为: $Y = 3579X + 12746$, $r = 0.9987$ 最低检测浓度为 10ng/mL。



图 3 空白血浆色谱图

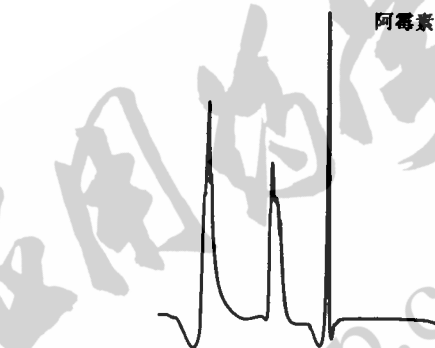


图 3 阿霉素血浆色谱图

2.2 精密度

配制 50ng/mL、200ng/mL、800ng/mL 三个浓度的血样, 按上操作法测定, 一日内连续测定 5 次, 得日内精密度; 数日内复测 6 次, 得日间精密度。结果见表 2

表 2

加入量(ng/mL)	测得均数 ± 标准差(ng/mL)	RSD(%)
日内(n=5)		
50	49.22 ± 4.63	9.41
200	199.58 ± 10.56	5.29
800	777.13 ± 38.17	4.89
日间(n=6)		
50	49.51 ± 4.95	9.99
200	207.29 ± 17.67	8.52
800	784.94 ± 40.61	5.18

2.3 相对回收率

于空白血浆中加入不同量阿霉素标准溶液, 按 2.2 项下操作(n=5), 测定方法的相对回收率, 用标准曲线方程计算, 结果见表 3

表 3 相对回收率测定结果

加入量(ng/mL)	测得均数(ng/mL)	回收率%
50	49.22	98.44
200	199.58	99.9
800	777.13	97.14

2.4 样品测定结果及数据处理

将炭肾按 A 组(150g × 1 支)、B 组(150g × 2 支)、C 组(150g × 3 支)、D 组(150g × 4 支)及 E 组(150g × 5 支)的用量分别串联安装, 模拟血液灌流时的临床最大用量 120mg。

m⁻²,配制成 240ng/mL 的血浆溶液。利用恒流泵维持 200mL/min 左右血流速度,分别灌注不同装量的炭肾,同时

表 4 样品测定结果

编组	炭肾装量(n=5)	血药浓度(ng/mL)		阿霉素透过率%	阿霉素吸收率%	吸收率均数%	
		柱前	柱后			平均数	标准差
A	150g×1 支	240	189.78	79.08	20.93	20.19	3.09
A	150g×1 支	240	196.51	81.88	18.12		
A	150g×1 支	240	187.45	78.10	21.90		
A	150g×1 支	240	201.37	83.90	16.10		
A	150g×1 支	240	182.63	76.10	23.90		
B	150g×2 支	240	177.15	73.81	26.19	27.60	2.06
B	150g×2 支	240	169.49	70.62	29.38		
B	150g×2 支	240	172.82	72.01	27.99		
B	150g×2 支	240	180.36	75.15	24.85		
B	150g×2 支	240	168.94	70.39	29.61		
C	150g×3 支	240	106.54	44.39	55.61	55.98	0.63
C	150g×3 支	240	105.92	44.13	55.87		
C	150g×3 支	240	104.45	43.52	56.48		
C	150g×3 支	240	103.82	43.26	56.74		
C	150g×3 支	240	107.52	44.80	55.20		
D	150g×4 支	240	105.63	44.01	55.99	56.42	0.41
D	150g×4 支	240	104.74	43.64	56.36		
D	150g×4 支	240	105.39	43.91	56.09		
D	150g×4 支	240	103.36	43.07	56.93		
D	150g×4 支	240	103.81	43.25	56.75		
E	150g×5 支	240	103.57	43.15	56.85	57.13	0.29
E	150g×5 支	240	101.83	42.43	57.57		
E	150g×5 支	240	102.61	42.75	57.25		
E	150g×5 支	240	103.42	43.09	56.91		
E	150g×5 支	240	102.95	42.90	57.10		

表 5 方差分析表

差异源	离差平方和	自由度	均方	F 值	临界值	P 值
组间	0.652383	4	0.163096	564.3729	F(0.01)=4.4307	2.98E-20
组内	0.00578	20	0.000289		F(0.05)=2.8660	
总计	0.658163	24				

经 SPSS10.0 统计学软件处理,统计结果见方差分析表 5。再经多组均数间的两两比较的 q 检验,A 组和 B 组分别与其余各组均有极显著性差异(P<0.01),C 组、D 组、E 组只与 A 组和 B 组有极显著性差异(P<0.01)。C 组、D 组和 E 组三组间无显著性差异(P>0.05)。

3 讨论

3.1 由样品数据处理结果可知,五组不同活性炭装量的炭肾对阿霉素均有吸附作用,且 A、B、C 组随活性炭用量的增加其吸附作用增强,即 C 组(150g×3 支炭肾)对阿霉素的吸附效果较 A 组和 B 组强,在统计学上有极显著性差异;C、D 和 E 组随活性炭用量的增加其吸附作用无明显变化,C 组与 D 组和 E 组无显著性差异。故 150g×3 支为活性炭吸附剂的最佳用量。该用量的确定可为临床采用阿霉素血液灌流治疗肝癌提供理论依据,对于减轻阿霉素的毒性作用有重大意义。

3.2 在测定血药浓度时采用了仅对样品进行离心处理后便直接进样这一简便的样品处理过程,这是因为在柱切换 HPLC 法测定生物样品时,生物样品只需离心处理,不需要任

测定灌注前后的阿霉素浓度,结果见表 4。

何其它预处理即可进样。由于蛋白质及其它内源性杂质(通常极性较大)受亲水性外表面的作用和孔径大小的限制,被直接洗脱下来,而被分析物在洗脱至分析柱之前被吸附在填料孔隙之中,得到净化和富集,然后切换至与分析柱相连接,以分析流动相将被分析物从预柱洗脱至分析柱,进行分离测定。从而提高了检测效率,避免了传统的 HPLC 法因蛋白质与流动相中的有机溶剂发生作用、产生沉淀,使色谱柱堵塞所至不能直接进样的缺点^[6]。

3.3 由于预处理柱为手工湿法装柱,对阿霉素的色谱峰有一定影响。为避免阿霉素的色谱峰在预处理柱中的展宽,采用预柱反冲方式进行柱切换操作,同时也提高了方法的灵敏度。为提高选择性,可加入离子对试剂,使能形成离子对的组分在一级柱上展宽的可能性降低。

3.4 柱切换为高效液相色谱法测定生物样品开拓了广阔的空间,本实验充分利用柱切换法不需内标物等优点^[7],同时保证了进样体积大,且处理样品的全过程由仪器程序控制。

3.5 本实验的回收率是相对回收率,是血浆为标准品时所

测定的相对回收率,该回收率结果比以水为溶媒进样时的绝对回收率要高百分之二十左右。

参考文献

- [1] Vchino-j, Ven-Y, Sao-y. Chemohormonal of unresectable hepatocellular carcinoma, AM-J-Clin-Oncol, 1993,16(3):206.
- [2] Young RC, The anthracycline antineoplastic drugs, New Engl J Med, 1981, 305(3): 139.
- [3] Eggermont AMM, Schrafferdt KH, Klaubner JM. *et al.* Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb sarage in 186 patints with locally advanced soft tissue extremity sarcomas:the cumulative multicenter European experience [J]. Ann Surg, 1996, 224(6):756.
- [4] 盛江,韩斐. 血液灌流救治药物中毒 32 例体会:[J]. 北京医学 197,19(4):235.
- [5] 顾云. 柱切换 HPLC 技术在生物样品测定中的应用. 天津药学. 2003,3(15):80.
- [6] 朱彭玲,王多加,屈莹. 直接进样分析用固定相. 中国药学杂志,1994,29(3):129.
- [7] 李章万,郭平. 高效液相色谱柱切换技术在药代动力学与生物利用度研究中的应用. 色谱. 1994,5(12):397.

收稿日期:2004-05-31