

与其他成分及辅料完全分离,可满足分析要求。

黑糯玉米色素具有抗氧化、抗肿瘤、延缓衰老、降血压、调节血脂、降血糖等功能^[1]。若将其开发成为保健片剂、功能性饮料或皮肤外用等食用及药用产品,有望对人体黑色素缺乏或自身合成有碍等情况加以改善。本研究从黑糯玉米轴中提取黑色素并将其制备成凝胶,将玉米轴变废为宝,提高了玉米轴的利用价值,而且建立的黑糯玉米轴黑色素凝胶的含量测定方法,样品处理简便,方法稳定、结果准确可靠,为黑糯玉米轴黑色素凝胶的质量控制提供了一种可行的方法,对于黑色素的开发具有一定的实际应用价值。

参考文献

- [1] 郭文场,丁向清,于红宇,等.黑玉米的生物学特性与品种简介[J].特种经济动植物,2015(3):31-34.
- [2] 杨萍,李琳.黑糯玉米黑色素的提取工艺的研究[J].东北农业大学学报,2009,40(6):97-100.
- [3] Jankowski A, Jankowska B, Niedworok J. The effect of anthocyanin dye from grapes on experimental diabetes[J]. Folia Med Cracov, 1999, 41(3-4):5-15.
- [4] Stintzing FC, Carle R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants food, and in human nutrition[J]. Trend Food Sci Technol, 2004, (15):19-38.
- [5] Espin JC, Soler-Rivas C, Wiehers HJ, et al. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for food-stuff[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(5):1588-1592.
- [6] 王金亭.天然黑玉米色素研究与应用进展[J].粮食与油脂,2013(2):44-49.
- [7] 缪少霞,王鹏,徐渊金,等.植物源天然食用色素及其开发利用研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(7):211-216.
- [8] Aoki H, Kuze N, Kato Y, et al. Anthocyanins isolated from purple corn[J]. Foods and Food Ingredients of Jap, 2002, 199:41-45.
- [9] 薛晓丽.高效液相色谱法测定黑米提取物中矢车菊色素的成分及含量[J].食品科技,2010(2):268-270,274.
- [10] 岳喜庆,张超,王宇滨,等.双标样高效液相色谱法测定紫玉米花青素的含量[J].食品研究与开发,2010,3(6):126-129.
- [11] 赖剑峰,杨荣玲,林耀盛,等.杨梅花色苷分离纯化制备矢车菊素-3-葡萄糖苷的研究[J].热带作物学报,2013,34(7):1354-1358.
- [12] 张晓芳,高伟,邓慧颖,等.红米红中矢车菊-3-葡萄糖苷含量与色价的相关性分析[J].食品科学,2013,34(20):135-138.

(收稿日期:2015-11-15)

抗血小板药物盐酸阿那格雷胶囊的药代动力学研究

崔雪靖 刘林杰 穆晓燕

原发性血小板增多症(primary thrombocytosis, ET)为一类骨髓增生性疾病,其临床特点主要表现在骨髓巨核细胞发生异常增生以及血小板计数持续增高^[1]。当前临床对ET的治疗多采用同位素磷进行放射治疗和化学治疗,也有中医活血化瘀法,其最终目的均是为了对骨髓细胞的增生产生抑制作用,然而前2种治疗方法所采用的药物均会产生不同程度的不良反应,如患者可能出现红、白细胞减少的情况,而且不少其他类型的并发症也将一并发生^[2]。阿那格雷别名氯唑咪唑酮,为咪唑喹啉唑琳衍生物,同时也是近几十年内成功研发的比较有效的唑琳酮类抗血小板药物之一^[3]。前期临床研究显示^[4],阿那格雷盐酸盐口服易吸收,代谢后随尿液排出,又降低血小板生成和抑制血小板聚集的两重作用。此外,对过高的血小板水平具有选择性降低作用,只要将给药剂量控制在合理范围内,患者机体的红、白细胞计数均不会出现明显降低的情况,可在很大程度上降低白血病等不良病症的继发性率,故在ET的临床治疗方面愈发受到青睐。但很长一段时间以来,与阿那格雷有关的文献资料基本都集中在其合成与

制备方面,而其药理学相关的报道较少^[5],且经过查阅大量文献^[9-12]发现本试验采用液相二级质谱法(LC-MS/MS)并选用其盐酸胶囊制剂进行了人体药代动力学研究,旨在为临床更合理与安全用药提供一定的参考依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与对象

1.1.1 药品、试剂与仪器

盐酸阿那格雷胶囊,1 mg/粒,美国西尔公司生产,批号:NC27834,盐酸阿那格雷对照品,纯度>99%,购自上海士锋生物科技有限公司,批号:20120328;内标物选用格列吡嗪^[1],纯度>99%,购自武汉远启医药化工有限公司,批号:121108;甲醇选用色谱纯,购自广州贝特生物科技有限公司,批号:20130305;乙腈选用色谱纯,购自美国Sigma公司,批号:20130513;二氯甲烷选用分析纯,购自青岛雅各化学试剂销售有限公司,批号:20120812;试验用水选用超纯水。仪器主要包括:Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国Agilent公司),API 4000 型三重四极杆,Analyst 1.3 型质谱仪(美国Applied Biosystem公司),CAY1 型样品混合器(北京长安仪器公司),HY-2 型多用振荡器(国华电器有限公司),ESJ60-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),HY-4 型涡旋混合器(金坛市

DOI:10.11655/zgywylc.2016.02.019

作者单位:462000 漯河医学高等专科学校第二附属医院药剂科

通信作者:穆晓燕,Email:muxy1965@163.com

江南仪器厂), XW-01 型多用调速震荡仪 (金坛市江南仪器厂), DA5002E5 型高速离心机 (江苏仙洛医疗科技有限公司), TGL-16G 型高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.1.2 试验对象选择

选择于 2013 年 1 月至 2014 年 10 月在漯河医学高等专科学校第二附属医院接受健康体检的 28 名志愿者为本试验的研究对象, 均为男性, 年龄 20~30 岁, 平均 (25.4±2.7) 岁, 所有受试者的体格检查与实验室检查结果均显示无任何异常, 同时在近 3 个月内未服用任何药物或参与临床药物试验, 本试验研究均获得受试者的知情同意以及漯河医学高等专科学校第二附属医院伦理委员会的审批同意。

1.2 实验方法

1.2.1 标准液及内标液的配制

1.2.1.1 阿那格雷标准溶液的配制: 定量精密称取盐酸阿那格雷对照品 25 mg 置于 25 ml 容量瓶内, 加入甲醇溶解并摇匀, 最后定容至刻度并作为阿那格雷储备液 (1 mg/ml), 分次取适量该储备液用甲醇:水=1:1 的混合液进行稀释, 最终获得浓度分别为 0.3、0.9、3.0、9.0、30.0、90.0、300.0 ng/ml 的系列阿那格雷标准溶液。

1.2.1.2 内标溶液的配制: 定量精密称取格列吡嗪对照品 25 mg 置于 25 ml 容量瓶内, 同上法配置获得浓度为 1 mg/ml 的格列吡嗪储备液, 再同上法制得浓度为 100 ng/ml 的内标溶液。

1.2.2 服药方法和血浆样本的采集与处理

1.2.2.1 服药方法及样品采集: 受试者服药前晚均给予清淡饮食并在之后严格禁食过夜, 次日晨空腹用水服药 1 粒, 服药后 2 h 内禁饮, 4 h 内禁食, 分别于服药前与服药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2、3、4、6、8、12、24 h 等时间点进行静脉血采集, 采血量均为 4 ml, 即得单次服药法的样品。自上述受试者服药第 2 天开始, 1 粒/次, 2 次/d, 连续服用 5 d, 且第 2~4 天均在服药前及服药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2、3、4、6、8、12、24、48、72 h 时间点进行静脉血采集, 且采血量均为 4 ml, 即得多次服药法的血液样品。将 2 批血液样本置于放有肝素的食管内并尽快对其进行离心处理, 转速 3 000 r/min, 离心时间为 10 min, 离心后即刻将分离到的血浆置于 -80 °C 的冰箱内保存待检。

1.2.2.2 血浆样本的处理: 从冰箱取出待检血浆样本在室温下解冻, 涡流混匀后精密吸取 300 μ l 样品放入到有塞的 10 ml 试管内, 再向其中加入已制得的格列吡嗪内标溶液 100 μ l 与甲醇-水 (体积比 1:1) 100 μ l, 充分混合后再加入提取试剂乙醚-二氯甲烷 (体积比 2:1) 3.5 ml, 涡流充分混合 1 min 左右再往复震荡 10 min, 之后再离心处理, 转速 3 500 r/min, 离心时间 5 min, 完成离心后即将上层的有机相吸取到一新试管中, 并用 40 °C 的氮气流将其吹干, 吹干后加入流动相 (MP) 150 μ l 进行复溶, 涡流混匀后取 30 μ l 进行进样分析。

1.2.3 质谱及色谱条件^[13-15]

质谱条件的离子对选择为 m/z 256.3 [M+H]⁺→ m/z 199.0

(阿那格雷)与 m/z 446.1 [M+H]⁺→ m/z 321.0 (格列吡嗪); 色谱条件为: 色谱柱为 Ascentis C18 柱 (4.6×150 mm 5 μ m 粒径), 流动相为甲醇-0.1%甲酸水 (体积比 4:1), 流速为 1.0 ml/min, 分流体积比为 1:1, 柱温为 35 °C, 进样量为 30 μ l。

1.2.4 专属性评价

随机选择其中的 6 名受试者空白血浆样本, 在不加入内标溶液的情况下加入甲醇-水 (体积比 1:1) 100 μ l, 接着同 1.2.2.3 项下方法进行处理后即取 30 μ l 进样获得经典色谱图, 在空白血浆中加入阿那格雷标准溶液与格列吡嗪内标溶液, 同上法处理获得经典色谱图, 取服药后 1.25 h 血浆样品同法处理获得经典色谱图; 然后对以上色谱图进行比较分析, 我们发现阿那格雷与格列吡嗪的测定不受血浆样品中内源性活性物质的影响, 故认为本检测方法具良好专属性。

1.2.5 标准曲线方程制备^[16]

精确取得空白血浆 300 μ l, 分别加入不同浓度阿那格雷标准溶液以配制获得浓度梯度为 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0、100.0 ng/ml 的血浆样品, 同 2.2.2 项下处理后进样 30 μ l, 记录色谱图, 之后再以浓度为横坐标以峰面积为纵坐标, 采用加权最小二乘法进行现行回归, 得到回归方程为 $Y=0.14X+0.000452$ ($C=0.9972$), 本方法的线性范围为 0.1~100 ng/ml; 定量限为 0.1 ng/ml, 提示本方法具良好线性, 可用于盐酸胶囊制剂的人体药代动力学研究。

1.2.6 准确度与精密度实验

分别配制阿那格雷浓度为 0.3、3.0、30.0 ng/ml 3 个浓度梯度的样品溶液各 6 份, 在 3 d 内连续配制并分别于配制当日完成测定, 并依照当日工作曲线来测量各样品溶液中的阿那格雷浓度, 最后根据测定结果计算准确度与精密度, 结果为准确度为 3.12%~4.01%, 精密度 $RSD=5.83$, 提示本法准确度和与精密度均能满足测定需求。

1.2.7 考察指标

主要药动学参变量有血药峰浓度值 (C_{max})、达峰时间 (T_{max})、药时曲线下面积 (AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$)、消除半衰期 ($t_{1/2}$), 其中 C_{max} 与 T_{max} 为实测值。

1.3 统计学方法

根据本组受试者的用药后血药浓度-时间数据, 采用 DAS 3.0 软件与非房室模型进行分析, 计算阿那格雷上述药代动力学参变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示; 单次与多次给药的数据比较采用 SPSS 19.0 进行分析, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。其中, 因为 T_{max} 为不连续分布的, 故统计学分析采用非参数检验模式, 而其余采用参数检验模式。

2 结果

2.1 血药浓度-时间曲线: 受试者在连续口服盐酸阿那格雷胶囊后, 阿那格雷在机体内的消除时间比较快, 基本在 12 h 后其血药浓度在 5 个药物血浆半衰期内, 其体内血药浓度的量时曲线已达到趋于水平方向, 且单次与多次服药后, 其药时曲线基本一致, 各时间点血药浓度无明显差异 ($P>0.05$, 见图 1)。

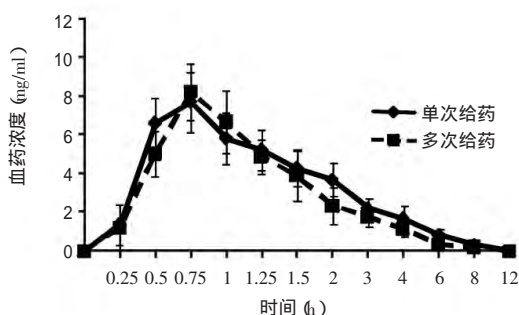


图 1 单次和多次口服阿那格雷 1 mg 后的平均药-时曲线图

2.2 阿那格雷在人体内的药代动力学参数^[7]:本组受试者单次、多次服用盐酸阿那格雷胶囊 1 mg 的阿那格雷,其各参变量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$,见表 1)。此外,单次服药相对生物利用度为 102.36%,多次服药相对生物利用度为 101.82%,且差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 阿那格雷单次与多次给药的药代动力学参数的比较 ($\bar{x}\pm s$)

给药方法	例数	Cmax (ng/ml)	t _{1/2} (h)	Tmax (h)	AUC _{0-t} (ng·ml ⁻¹ ·h ⁻¹)	AUC _{0-∞} (ng·ml ⁻¹ ·h ⁻¹)
单次给药	28	8.46±2.06	1.68±0.71	0.61±0.12	16.48±4.31	16.48±4.31
多次给药	28	8.85±2.30	1.82±0.70	0.77±1.13	13.46±3.60	13.46±3.60
P值		0.67	0.63	0.89	0.07	0.07

法、免疫分析法和色谱-质谱串联技术为主。色谱法主要有 GC-气相色谱法和高压液相色谱法 (HPLC)。色谱法优点是较好的分离效果,但使用的荧光、紫外吸收检测系统,没有较高的选择性,灵敏度也差。对要求低定量下线的生物样品达不到检测要求,此法在体内药物研究的使用领域也就有了一定的局限性。酶联免疫吸附试验 (ELISA)、竞争性饱和分析法 (RIA) 和荧光免疫分析法 (FIA) 都是常用的免疫分析法。免疫分析法迅速、简单方便且灵敏度较高,缺点是成本高且不能分析复杂的多组分样品。结合质谱法 (MS) 检测时,具有的高灵敏性,而色谱法可以把多组分进行分离的特性,药理学过程中常采用色谱-质谱串联方法,使灵敏性高、专属性强及准确度高的定量分析方法得以建立。主要有 LC-MS、GC-MS^[8] 及 LC-MS/MS^[9]。GC-MS 分析方法的缺点是仅能检测低沸点且热稳定性高的小分子物质,所以有些药物不能使用 GC-MS 检测。应用高效液相色谱质谱串联技术对沸点高且热不稳定的化合物中各组分进行分离,那么准确且灵敏度高的定量讯息就会被检测出来。

在本次试验中,我们建立了采用 LC-MS/MS 法测定人血浆样品中阿那格雷浓度的具体办法,实践证明,该方法具有成本低廉与处理时间较短的优点,同时在 0.1~100 ng/ml 的浓度范围内具有良好的线性关系,最低定量下限为 0.1 ng/ml,准确度为 3.12%~4.01%,精密度 RSD=5.83,故认为其方法确证指标都满足食品药品监督管理局 (FDA) 的相关规定。另外,本方法在试验中所需要的血浆样品比较少,故还能在临床的具体应用中提升志愿者的顺从性,继而确保有更好地降低志愿者的心理压力和生理负担,总之采用本分析方法进行阿那格雷胶囊人体药代动力学的研究比较适合,具有快

2.3 质谱分析:将阿那格雷及内标格列吡嗪用流动相甲醇-0.1%甲酸水 (体积比 4:1) 稀释后进样,获得阿那格雷及内标格列吡嗪的二级全扫描质谱图,可知 m/z 256.3 [M+H]⁺→ m/z 199.0 (阿那格雷) 与 m/z 446.1 [M+H]⁺→ m/z 321.0 (格列吡嗪)。

3 讨论

临床研究显示^[8],阿那格雷是最早被准许用来治疗原发性血小板增多症的药物,1997 年在美国获准上市,可选择性降低过高血小板水平,不超过治疗剂量范围,红细胞或白细胞的数目不会明显减少,白血病等不良病症继而不产生^[9]。通过查阅阿那格雷的制备合成有大量相关文献发现,阿那格雷人体药理学的相关报道少之又少。但就药代动力学的分析方法而言,通常情况下,在进行体内药物分析时,我们需创建一个准确、灵敏、可靠的定量分析方法才可以准确反映体内药物浓度随时间的变化规律。目前体内药物分析主要以色谱

速、可靠、特异性强、准确度和灵敏度高、再现性好等特点。试验结果显示,受试者在连续口服盐酸阿那格雷胶囊后,阿那格雷在机体内的消除时间比较快,基本在 12 h 后其血药浓度在 5 个药物血浆半衰期内,其体内血药浓度的量时曲线已达到趋于水平方向,即说明已成比较稳定状态;另外,从单次与多次服药的情况比较来看,各项主要药理学参数均未表现有显著性差异。

综上所述,连续口服阿那格雷的主要药理学特征无明显异常,且未出现大量残留物体内堆积的现象,因此,我们认为连续口服阿那格雷是安全有效的。

参考文献

- [1] 江亚军,李秀梅,王红霞,等.以血栓形成为首发表现的原发性血小板增多症二例并文献复习[J].白血病·淋巴瘤,2014,23(1):53-54.
- [2] 蓝海峰,方志鸿,张悦,等.438 例原发性血小板增多症的临床分析[J].中华血液学杂志,2008,29(9):2587-2591.
- [3] 高静.中医活血化瘀治疗血小板增多症临床研究[J].亚太传统医药,2015,11(8):92-93.
- [4] 高捷音.原发性血小板增多症中医证候分析及益气活血解毒法干预的临床观察[D].北京:北京中医药大学,2014.
- [5] 赵琳,邱仲川,朱小勤.清肝化瘀汤治疗原发性血小板增多症以及与 JAK2 V617F 突变相关性的临床研究[J].辽宁中医杂志,2013,14(7):393-394.
- [6] Rey J, Viallard JF, Keddad K, et al. Characterization of different regimens for initiating anagrelide in patients with essential thrombocythemia who are intolerant or refractory to their current cytoreductive therapy: results from the multicenter FOX study of 177 patients in France [J]. Eur J Haematol, 2014, 92(2):127-

- 136.
- [7] 康影,王瑞,孙铁民,等. 血小板凝聚抑制剂阿那格雷的合成 [J] 中国医药工业杂志 2001, 32 (2): 51-52.
- [8] 翁志洁,李建其,周斌. 盐酸阿那格雷的合成 [J] 中国医药工业杂志 2012, 43 (6): 405-408.
- [9] 裘福荣,朱蕾蕾,蒋健,等. 中国健康受试者口服非布司他片的药代动力学研究 [J] 中国临床药理学杂志 2015, 31 (31): 199-202.
- [10] 盛玉成,何迎春,杨娟,等. 药代动力学比例化剂量反应关系的研究方法及其线性评价 [J] 中国临床药理学杂志 2010, 26 (5): 376-381.
- [11] 杨常成,郭歆,苏桃,等. 盐酸美普他酚胶囊在中国健康受试者中的药代动力学研究 [J] 中国临床药理学杂志 2014, 30 (8): 685-688.
- [12] Zhao HL, Cao RM, Fang ZJ, et al. Pharmacokinetics of lipoic acid in healthy Chinese volunteers after single and multiple doses of lipoic acid dispersible tablets [J] J Chinese Pharm Sci 2015, 24 (5): 336-341.
- [13] González-Curbelo M, Lehotay SJ, Hernández-Borges J, et al. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J] J Chromatogr A 2014, 1358: 75-84.
- [14] Meyer MR, Maurer HH. Absorption distribution metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse [J] Pharmacogenomics 2011, 12 (2): 215-233.
- [15] Santhi VA, Hairin T, Mustafa AM. Simultaneous determination of organochlorine pesticides and bisphenol A in edible marine biota by GC-MS [J] Chemosphere 2012, 86 (10): 1066-1071.
- [16] 陈辞,石迎迎,张莉蓉. HPLC 法测定人血浆中司帕沙星及其在健康志愿者中的药代动力学 [J] 中国处方药 2015, 13 (5): 24-26.
- [17] 刘茜,刘翠,尚宏伟,等. 盐酸非索非那定胶囊药物动力学及人体相对生物利用度研究 [J] 药物分析学杂志 2007, 27 (11): 1707-1710.
- [18] 薛薇,谢潘潘,史爱欣,等. 伊拉地平胶囊在中国健康人体的药代动力学研究 [J] 临床药物治疗杂志 2014, 12 (5): 31-34.
- [19] Gugliotta L, Besses C, Griesshammer M, et al. Combination therapy of hydroxycarbamide with anagrelide in patients with essential thrombocythemia in the evaluation of Xagrid (R) efficacy and long-term safety study [J] Haematologica 2014, 99 (4): 679-687.
- [20] Ansari P, Stoppacher N, Baumgartner S. Marker peptide selection for the determination of hazelnut by LC-MS/MS and occurrence in other nuts [J] Anal Bioanal Chem 2012, 402 (8): 2607-2615.

(收稿日期:2015-02-16)

超高效液相色谱法测定大鼠体内多西他赛血药浓度及其药动力学研究

金祝萍 胡晓霞 胡国新

多西他赛 (Docetaxel, DOC, 多西紫杉醇)是从欧洲紫杉树针叶中提取的无活性化合物经化学处理后得到的活性药物,是一种亲脂性新型紫杉类抗肿瘤药,它通过促进微管发挥其抗肿瘤活性^[1]。多西他赛为细胞周期特异性抗肿瘤药,可特异性作用于 M 期细胞。多西他赛可促进小管聚合成稳定的微管,并抑制其解聚,也可通过破坏微管的网状结构,抑制细胞有丝分裂,从而达到抗肿瘤的目的^[1]。临床上多用于乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、软组织肉瘤、头颈癌、胃癌、卵巢癌和前列腺癌等,单独用药和联合用药均有显著疗效。

药物在血浆中的浓度高低决定着毒性发生的可能性及严重程度。由于肿瘤患者药物代谢的个体差异性,对多西他赛的血药浓度进行监测有着重要意义。目前测定血浆中多西他赛浓度的方法主要有液相色谱-紫外检测 (LC-UV)法、

液相色谱-质谱联用 (LC-MS)法和液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS)法^[2-6]。样品前处理方法有固相萃取法^[7]和蛋白沉淀法^[8,9]等。这些方法每个样本分析的运行时间达 5 min^[7]、7.5 min^[8]和 10 min^[9],不能满足在药代动力学研究中大批量测定的要求。本文在此基础上建立并验证了样品经液-液萃取后测定大鼠血浆样品中多西他赛浓度的超高效液相色谱法 (UPLC)法,并进行药动力学研究。

1 材料与方法

1.1 仪器:超高效液相色谱仪 (H-class ACQUITY, 美国 Waters 公司),电子分析天平 (AB204-A, 梅特勒-托利多上海仪器有限公司,灵敏度 0.1 mg),涡旋仪 (QL-901, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司),高速离心机 (TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂),氮气吹干仪 (D10, 杭州蓝焰科技有限公司)。

1.2 试剂:多西紫杉醇 (C₄₃H₅₃NO₁₄, 99.0%, 上海创赛科学仪器有限公司,批号: NF-20140415),地西洋注射液 (天津金耀氨基酸有限公司,批号: 1310311),肝素钠注射液 (上海第一生化药业有限公司,批号: 140303)。多西他赛注射液 (杭州赛

DOI: 10.11655/zgywylc2016.02.020

作者单位: 317016 浙江省临海市第二人民医院药剂科 (金祝萍),温州医科大学药学院 (胡晓霞、胡国新)