

三维荧光二阶校正同时测定人体液中伊立替康及其代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱的含量

尹小丽 吴海龙* 张晓华 谷惠文 俞汝勤

(化学生物传感与计量学国家重点实验室 湖南大学化学化工学院 长沙 410082)

摘要 提出了激发发射矩阵荧光光谱与化学计量学二阶校正方法相结合用于同时快速定量人体液(血浆和尿液)中的伊立替康(CPT11)和其代谢产物 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN38)的绿色、高灵敏分析策略。尽管其分析物之间以及分析物和背景之间的光谱存在严重重叠现象,采用基于交替归一加权残差(ANWE)算法的二阶校正方法进行解析仍能得到令人满意的定性定量分析结果。当该体系的组分数选取为 3 时,可以得到血浆和尿液中 CPT11 的平均回收率分别为(96.8±6.3)%和(101.7±1.1)%, SN38 在血浆和尿液中的平均回收率分别为(100.4±4.9)%和(101.6±1.1)%。另外,通过品质因子,如灵敏度(SEN)、选择性(SEL)、检测下限(LOD)和定量检测限(LOQ)评估了该方法的准确性。实验结果表明,该方法能以“数学分离”代替繁琐的“物理和化学分离”,成功地解决实际复杂体系中内源干扰物质与分析物光谱重叠所引起的难分辨的问题,可用于人体液中 CPT11 和 SN38 含量的直接快速定量测定。

关键词 伊立替康; 7-乙基-10-羟基喜树碱; 三维荧光; 二阶校正; 交替归一加权残差算法

Simultaneous Determination of Irinotecan and Its Metabolite 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin in Biological Fluids Using Excitation-emission Matrix Fluorescence Coupled with Second-order Calibration Method

Yin, Xiaoli Wu, Hailong* Zhang, Xiaohua Gu, Huiwen Yu, Ruqin

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract Irinotecan (CPT-11) belongs to the class of topoisomerase I inhibitors, which is an anticancer agent widely employed in the treatment of colorectal, lung, cervical, and ovarian cancer. 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38) is a main metabolite of CPT-11 in human body, which is approximately 100~1000-fold more cytotoxic than the parent drug. Several analytical techniques such as HPLC, LC-MS/MS have been proposed for determination of CPT-11 and SN38 in biological samples. But all of these methods are not only expensive, but also involve careful sample pretreatment or rigorous liquid chromatographic separation steps when conducting the experiments in the practical application. In this paper, a new and effective strategy that combines the excitation-emission matrix fluorescence (EEMF) with second-order calibration method based on alternating normalization-weighted error (ANWE) algorithm was developed for simultaneous determination of CPT-11 and SN38 in body fluids including human plasma and urine samples. Although the fluorescence spectra of CPT-11 and SN38 overlapped and unknown and uncalibrated fluorescent components coexisted in the matrices, the methodology enables accurate concentrations together with reasonable resolution of excitation and emission profiles for the compounds of interest, which is often referred to as the “second-order advantage”. The assay was linear over the concentration range of 0.0141~0.0987 µg/mL for CPT-11 and 0.04~0.28 µg/mL for SN 38, respectively. When the component number was chosen to 3, the obtained average recoveries were (96.8±6.3)% and (101.7±1.1)% for CPT11, (100.4±4.9)% and (101.6±1.1)% for SN38 in plasma and urine, respectively. In order to evaluate the performances of the proposed approach, the figures of merit such as sensitivity, selectivity, limit of detection and limit of quantification were investigated. The satisfactory qualitative and quantitative results indicated that it is an attractive alternative strategy for the routine resolution and quantification of CPT-11 and its metabolite SN 38 even in the presence of unknown interferences or when complete separation is not easily achieved.

Keywords irinotecan; 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin; three-dimensional fluorescence; second-order calibration; alternating normalization-weighted error

* E-mail: hlwu@hnu.edu.cn; Tel.: 0731-88821818; Fax: 0731-88821818

Received January 16, 2013; published January 31, 2013.

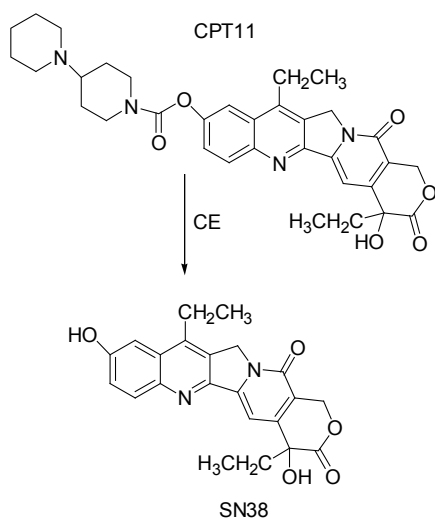
Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21175041) and the National Basic Research Program (No. 2012CB910602) as well as the Innovative Research Groups of NSFC (No. 21221003).

项目受国家自然科学基金(No. 21175041)和中国科技部“973”计划(No. 2012CB910602)以及国家自然科学基金创新研究群体科学基金(No. 21221003)资助。

1 引言

伊立替康(CPT11)是一种半合成的喜树碱类抗癌药物,喜树碱是1966年Wall等^[1]从珙桐科植物喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)中提取的一种细胞毒性生物碱。由于其本身毒副作用强及水溶性差等问题,对它的研究曾一度陷入停顿。直到1985年,研究发现喜树碱类衍生物是拓扑异构酶 I 的特异性抑制剂^[2],使其又成为了抗癌药物的研究热点,出现了许多的衍生物应用于临床实践。CPT11 就是水溶性衍生物中的一种,主要用于直肠癌的治疗,但对其他癌症如非小细胞肺癌、宫颈癌、胰腺癌及脑部恶性肿瘤也表现出很好的治疗效果^[3-5]。CPT11 是 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN38)的前药(结构式见图式 1),在代谢过程中被肝脏、肠道或血浆中的羧酸酯酶水解,生成一个活性代谢物,即 SN38,它的细胞毒性是 CPT11 的 100~1000 倍。CPT11 的药代动力学研究^[6]表明,其他的代谢途径主要是通过细胞色素 P-450 3 家族 A 亚家族第 4 种酶(CYP3A4)进行,代谢产物包括 7-乙基-10-(4-(N-氨基戊酸)-1-哌啶)羧基喜树碱(APC)、7-乙基-10-(4-(1-哌啶)-1-氨基)羧基喜树碱(NPC)等。



图式 1 CPT11 和 SN38 的结构式,CE 为羧酸酯酶
Scheme 1 The structure of CPT11 and SN38, CE (Carboxylesterases)

作为一种广泛使用的抗癌药物,该药物的过量使用或长期治疗,会产生细胞毒性和血液毒性,引发严重腹泻,中性粒细胞减少症,血小板减少症及白细胞减少等症状。由于个体差异较大,依立替康在治疗剂量、疗程等方面仍然存在较大争议^[7,8]。目前的药代动力学研究^[6]表明 CPT11 的口服剂量为 100~350 mg/m²,服药后 24 h 内发现在尿液中服药量的 10%~22%以 CPT11 形式排出,0.18%~0.43%以 SN38 形式排出。而血浆中的代谢略微不同于尿液,CPT11 和 SN38 的血药浓度分别为 10⁻³~10 μg/mL 和 5×10⁻⁴~0.4 μg/mL。为了优化治疗的用量和最小化毒性风险,做到剂量个体化,实现直接

快速地定量检测 CPT11 和其活性代谢产物 SN38 的血药浓度和人尿液中的含量意义重大。

目前,主要的检测方法是液相色谱与各种检测器联用^[9-12],如 HPLC-紫外检测器、HPLC-荧光检测器、HPLC-质谱检测器、UPLC-MS 用于生物体液(血浆、尿液)和组织(肾脏、肝脏、肺、心脏、肠道、肿瘤细胞)中 CPT11 和 SN38 的定量检测。但这些方法都会涉及到繁杂的样品预处理步骤和耗时的分离条件优化选择,这样会耗费大量的有机试剂和耗材,其中不乏很多有毒有害的物质;另外,过多的预处理会导致样品的损失而使回收率偏低。荧光检测技术具有灵敏度高、重现性好以及成本耗费低等特点,近年来已被广泛应用于物质的定性定量分析。CPT11 和 SN38 都具有内源荧光,Rodríguez-Cáceres 等^[13,14]研究了 CPT11 和 SN38 的荧光特性,研究了它们在酸性条件下和碱性条件下的荧光强度,研究发现 CPT11 在 pH 为 5.61 时的荧光强度最大,在 pH 为 3~7 之间荧光性质稳定,在强酸和强碱性条件下 CPT11 的荧光都会减弱,而 SN38 的荧光强度随 pH 的变化略有不同,酸性条件下,在 pH 为 5.71 处有最大荧光强度,在碱性条件下,随 pH 的增大荧光强度逐渐增加,且在 pH 为 4~8 之间,荧光性质稳定。由于体液中潜在荧光物质的干扰,用荧光光谱法直接定量体液中的 CPT11 和 SN38 的报道很少^[15-17],其中本实验室报道过三维荧光结合二阶校正测定人体液中的 CPT11^[16],但三维荧光结合二阶校正同时测定人体液中的 CPT11 和 SN38 还未见报道,随着化学计量学三线性分解算法不断发展以及广泛深入的应用^[18-22],其三线性分解唯一性以及二阶校正的二阶优势越来越受到特别的关注。本文利用 CPT11 和 SN38 的强荧光特性,在 pH 为 5.28 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液中,结合二阶校正方法 ANWE 以准确、简洁、快速的方式实现了人血浆和尿液中的 CPT11 和 SN38 的直接同时定量测定。

2 理论部分

2.1 三线性模型

将 K 个样本在选定的激发波长数为 I 、发射波长数为 J 条件下进行测定,得到的激发发射荧光光谱矩阵可构成三维响应数据阵 $\underline{X}(I \times J \times K)$,它满足三线性成分模型(见图式 2 所示),这个三维响应阵 $\underline{X}$ 中的元素 x_{ijk} 表达如下:

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad (i=1, \dots, I; j=1, \dots, J; k=1, \dots, K) \quad (1)$$

其中: N 代表组分数(包括感兴趣的物质和有荧光响应信号的未知干扰成分); a_{in} , b_{jn} 和 c_{kn} 分别是具有明确物理意义的成分相对激发光谱矩阵 $\mathbf{A}(I \times N)$ 、成分相对发射光谱矩阵 $\mathbf{B}(J \times N)$ 和各成分相对浓度矩阵 $\mathbf{C}(K \times N)$ 中的元素, e_{ijk} 是相应于三维残差矩阵 $\mathbf{E}$ 的组成元素。

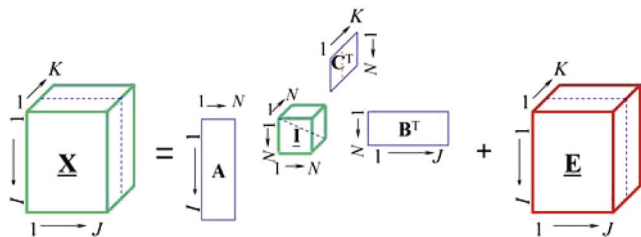


图2 二阶校正三线性成分模型

Scheme 2 The Scheme of trilinear decomposition model for second-order calibration

2.2 交替归一加权残差(ANWE)算法

ANWE 算法^[23]是基于交替最小二乘原理, 通过最小化以下目标函数来分解模型:

$$S(C) = \sum_{i=1}^I \|D_B B^+ (X_{i..} - B \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}) C^T)\|_F^2 + \sum_{j=1}^J \|D_A A^+ (X_{.j.} - C \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}) A^T)\|_F^2 \quad (2)$$

$$S(A) = \sum_{j=1}^J \|D_C C^+ (X_{.j.} - C \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}) A^T)\|_F^2 + \sum_{k=1}^K \|D_B B^+ (X_{..k} - A \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}) B^T)\|_F^2 \quad (3)$$

$$S(B) = \sum_{k=1}^K \|D_A A^+ (X_{..k} - A \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}) B^T)\|_F^2 + \sum_{i=1}^I \|D_C C^+ (X_{i..} - B \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}) C^T)\|_F^2 \quad (4)$$

矩阵 A 、 B 以及 C 的求解可由下列式子获得:

$$A = \left[\sum_{j=1}^J X_{.j.}^T (C^+)^T D_C^2 \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}) + \sum_{k=1}^K X_{..k} (B^T)^+ D_B^2 \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}) \right] \times \left[\sum_{j=1}^J (D_C \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}))^2 + \sum_{k=1}^K (D_B \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}))^2 \right]^+ \quad (5)$$

$$B = \left[\sum_{k=1}^K X_{..k}^T (A^+)^T D_A^2 \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}) + \sum_{i=1}^I X_{i..} (C^T)^+ D_C^2 \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}) \right] \times \left[\sum_{k=1}^K (D_A \text{diag}(\mathbf{c}_{(k)}))^2 + \sum_{i=1}^I (D_C \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}))^2 \right]^+ \quad (6)$$

$$C = \left[\sum_{i=1}^I X_{i..}^T (B^+)^T D_B^2 \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}) + \sum_{j=1}^J X_{.j.} (A^T)^+ D_A^2 \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}) \right] \times \left[\sum_{i=1}^I (D_B \text{diag}(\mathbf{a}_{(i)}))^2 + \sum_{j=1}^J (D_A \text{diag}(\mathbf{b}_{(j)}))^2 \right]^+ \quad (7)$$

其中, $D_A = \text{diag}(\sqrt{1./\text{diag}(A^+(A^T)^+)})$,

$D_B = \text{diag}(\sqrt{1./\text{diag}(B^+(B^T)^+)})$,

$D_C = \text{diag}(\sqrt{1./\text{diag}(C^+(C^T)^+)})$.

它的求解迭代过程与平行因子分析算法基本相同, 即先随机初始化 A 和 B , 用等式(7)计算得到 C , 然后代入(5)和(6)分别计算得到 A 和 B , 列归一化 A 和 B , 再用等式(7)计算 C , 如此重复, 直到满足终止标准.

2.3 核一致诊断法(CORCONDIA)

在三线性成分模型的建立过程中, 事先确定适当的组分数(N)对三维数阵的分解来说是重要的, 化学计量学已有部分文献报道了一些估计三维数阵秩的方法^[24~27]. 在本文我们采用核一致诊断法(Core Consistency Diagnostic)来估计成分数. 核一致诊断法由 Bro 提出^[28], 该方法通过比较两个三维模型 PARAFAC 和 Tucker 3 的核矩阵的差别估计三维数据体系的显著成分数(N), 其判别标准是比较两个矩阵的核一致程度. 在核一致诊断方法中认为当选择拟合用模型的因子数的核一致程度大于 60%时, 该因子应被考虑是拟合三维数阵必须的因子. Bro 定义了如下核一致函数:

$$\text{core-consistency} = 100 \times \left[1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right] \quad (8)$$

这里 F 表示模拟的因子数, g_{def} 表示核矩阵元素, 核矩阵用 Tucker 3 方法处理数据阵得到, t_{def} 表示超对角矩阵元素为 1, 其他元素是 0 的三维矩阵(理想情况下, 取正确的因子数时, Tucker 3 方法得到的核矩阵).

2.4 品质因子

分析品质因数(FOM), 包括灵敏度(SEN)、选择性以及检测限(LOD)、检测量(LOQ), 通常用于评价预测结果的准确性或算法比较. 在二阶校正中, SEN 是指单位浓度的纯分析信号, 而 SEL 是指灵敏度和总信号的比值. 在已报道的文献中用来计算 SEN 和 SEL 的方法常常有 MKL^[29]和 HCD^[30,31]两种, 但最近有文献报道这两种方法并不能用来准确地估算具有“二阶优势”的二阶校正方法的 SEN 和 SEL. Olivieri 等^[32,33]提出了一种更为完善的方法, 可以用来准确估算具有“二阶优势”的二阶校正方法的 SEN 和 SEL:

$$\text{SEN} = s_n \left\{ [(A_{\text{exp}}^T P_{a, \text{unx}} A_{\text{exp}}) * (B_{\text{exp}}^T P_{b, \text{unx}} B_{\text{exp}})]^{-1} \right\}_{nn}^{-1/2} \quad (9)$$

$$\text{SEL} = \left\{ [(A_{\text{exp}}^T P_{a, \text{unx}} A_{\text{exp}}) * (B_{\text{exp}}^T P_{b, \text{unx}} B_{\text{exp}})]^{-1} \right\}_{nn}^{-1/2} \quad (10)$$

其中下标 nn 指矩阵中的 (n,n) 个元素; s_n 代表单位浓度中组分 n 的总信号, 同时也是浓度得分参数值; * 表示 Hadamard 积. $\mathbf{A}_{\text{exp}}$ 和 $\mathbf{B}_{\text{exp}}$ 是含有感兴趣组分光谱信息的矩阵, $\mathbf{P}_{a,unx} = \mathbf{I} - \mathbf{A}_{unx} \mathbf{A}_{unx}^+$, $\mathbf{P}_{b,unx} = \mathbf{I} - \mathbf{B}_{unx} \mathbf{B}_{unx}^+$, $\mathbf{I}$ 是相应大小的单位矩阵, $\mathbf{A}_{unx}$ 和 $\mathbf{B}_{unx}$ 是含未知干扰物光谱信息的矩阵.

根据下式来估算检测限 (LOD) 和最小检测量 (LOQ)^[34,35]:

$$\text{LOD} = 3.3s(0) \quad (11)$$

$$\text{LOQ} = 10s(0) \quad (12)$$

$s(0)$ 是 3 个空白样本, 即 3 个空白血浆样和 3 个空白尿液样的预测浓度的偏差值.

3 结果与讨论

3.1 因子数的选择

本文采用核一致诊断法 (CORCONDIA) 对混合体系进行了组分数估计, 血浆和尿液中的分析结果见图 1, 使用 CORCONDIA 分析后显示前三个因子所对应的核一致大于 60%, 当选择的因子数为 3 或取更多的因子时, 核一致迅速减小到 0, 因此可以认为模型的成分数为 3. 说明在这两个体系中, 一个组分是由 CPT11 贡献给模型的, 另一个组分则是由 SN38 贡献给模型的, 第三个组分是由血浆或者尿液贡献给模型的, 这是因为体液中的复杂化学成分的荧光非常相似, ANWE 不能把它们分辨为单独的因子, 因而可以看成是一个因子.

3.2 二阶校正方法对人体液中 CPT11 和 SN38 的数学分离

ANWE 算法是本实验室提出的一种性能优良的算法, 诸多的研究^[19,23]表明 ANWE 算法对复杂体系中感兴趣组分测定的应用很成功, 而且性能要略优于 PARAFAC, 基于以往的研究, 本文选择 ANWE 算法对得到的三维矩阵进行解析.

根据秩估计选取组分数为 3, 用 ANWE 算法对得到的校正样和预测样 (含血浆或尿液背景) 构成的三维数阵进行解析. 图 2 给出了 ANWE 算法在两个体系中解析得到的 CPT11 和 SN38 的激发光谱图、发射光谱图和相对浓度图. 由图可以看到, CPT11 和 SN38 的激发光谱严重重叠, 同时体液基质中的潜在荧光物质的光谱也和分析物光谱之间重叠, 用一般的荧光分析方法不能直接定量体液中的 CPT11 和 SN38. 但经过二阶校正方法的数学分离, 我们可以得到感兴趣组分的光谱图和相对浓度图, 实现它们的定性定量分析. 我们可以看到, 由 ANWE 方法分辨得到的激发光谱和发射光谱与真实光谱吻合的很好, 这说明在血浆和尿液中存在的未知干扰下, 我们的方法能进行有效的数学分离, 得到感兴趣组分的精确光谱分辨.

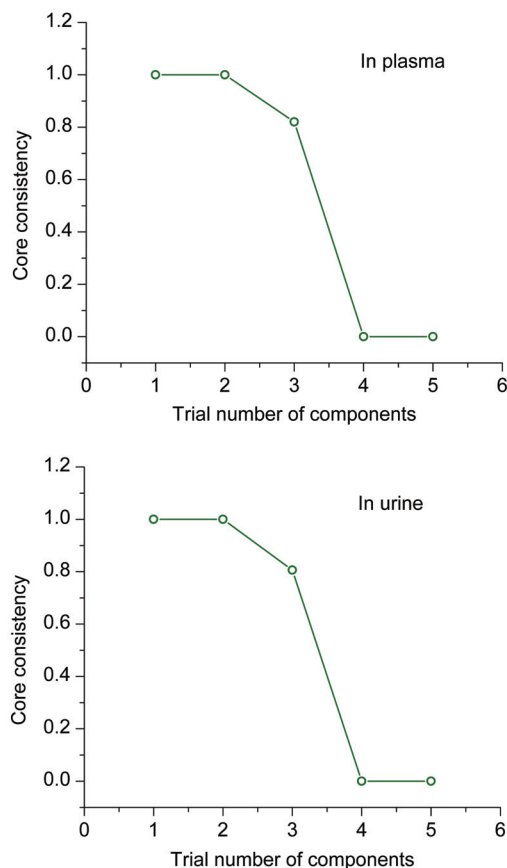


图 1 核一致诊断法估计三维响应阵的秩

Figure 1 Core consistency values as a function of the trial number of component for the analysis of the spiked plasma and urine

3.3 二阶校正方法对人体液中 CPT11 和 SN38 的定量分析

二阶校正方法的优势不仅只表现在对光谱的分辨这一方面, 其“二阶优势”越来越引起人们的关注, 即在未知干扰共存下, 对复杂生物样本中感兴趣组分的准确定量分析. 用解析得到的对应相对浓度与校正样中的 CPT11 和 SN38 的真实浓度做回归分析, 就可以得到血浆预测样和尿液预测样中 CPT11 和 SN38 的浓度. 表 1 列出了 ANWE 方法在血浆样中对 CPT11 和 SN38 的定量结果, 血浆预测样中 CPT11 和 SN38 的平均回收率分别为 $(96.8 \pm 6.3)\%$ 和 $(100.4 \pm 4.9)\%$. 表 2 列出了 ANWE 方法在尿液样中对 CPT11 和 SN38 的定量结果, 尿液预测样中 CPT11 和 SN38 的平均回收率分别为 $(101.7 \pm 1.1)\%$ 和 $(101.6 \pm 1.1)\%$.

3.4 品质因子

为了评价文章提出的方法的性能, 表 3 给出了 ANWE 方法在两种体系中得到的品质因子灵敏度 (SEN)、选择性 (SEL)、检测限 (LOD)、检测量 (LOQ). 表中结果显示, ANWE 方法可以得到好的品质因子, 而且能高灵敏选择性地定量测定两个体系中的 CPT11 和 SN38, 其中在尿液体系中 ANWE 算法得到的结果更好一些.

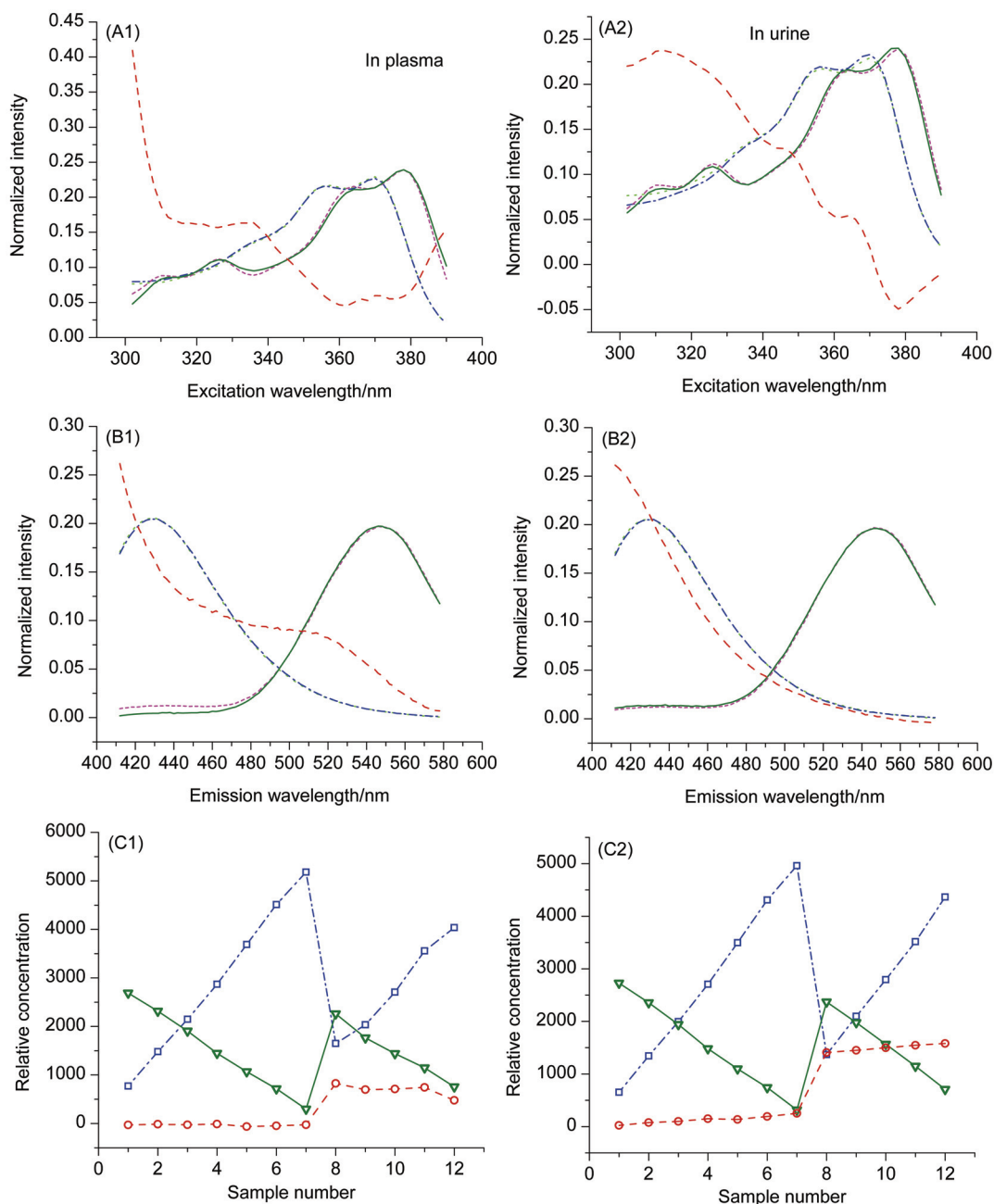


图 2 当组分数取 3 时, ANWE 二阶校正方法对体液 CPT11 及 SN38 分辨得到的激发光谱与发射光谱图与 CPT11 及 SN38 的真实光谱, 以及解析得到的相对浓度图. (A) 表示激发光谱图, (B) 表示发射光谱图, (C) 表示相对浓度图. “.....” 和 “——” 代表 CPT11 的真实光谱和分辨得到的光谱; “——” 和 “——” 代表 SN38 的真实光谱和分辨得到的光谱; “——” 代表分辨得到的血浆和尿液中潜在的荧光干扰物质; C 图中 (□) 表示 CPT11 的相对浓度图, (▽) 表示 SN38 的相对浓度图, (○) 表示背景干扰的相对浓度图. (A1)(B1)(C1) 为血浆体系中分辨所得; (A2)(B2)(C2) 为尿液体系中分辨所得

Figure 2 Normalized resolved excitation and emission spectra and relative concentration profiles of plasma and urine obtained from ANWE method with $N=3$ and the corresponding actual spectra. (A) Excitation spectra; (B) Emission spectra; (C) Relative concentration profiles. The dot lines represent the resolved profiles for CPT11; the blue dash dot lines stand for the actual profiles for CPT11; the shot dash lines denote the resolved profiles for SN38; the dark solid lines represent the actual profiles for SN38; the red dash lines denote the resolved profiles for the background of plasma (urine). (□) represent relative concentration profiles of CPT11; (▽) represent relative concentration profiles of SN38; (○) represent relative concentration profiles of background; (A1),(B1),(C1): in the background of plasma; (A2),(B2),(C2): in the background of urine

4 结论

本文提出了化学计量学二阶校正方法结合激发发射矩阵三维荧光光谱定量测定人体液中伊立替康

(CPT11)及其主要代谢产物 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN38) 的新方法, 利用 CPT11 和 SN38 的荧光特性及二阶校正算法的二阶优势, 有效地数学分离体液未知干扰共存下 CPT11 和 SN38 的三维荧光光谱, 实现了

表 1 ANWE 二阶校正方法得到的血浆样中 CPT11 和 SN38 的解析结果**Table 1** Resolved concentration of CPT11 and SN38 in plasma samples by using ANWE method

Sample	Added/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Predicted/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Recovery/%	
	CPT11	SN38	CPT11	SN38	CPT11	SN38
P1	0.0282	0.240	0.0318	0.237	112.6	98.7
P2	0.0423	0.200	0.0391	0.187	92.4	93.7
P3	0.0564	0.160	0.0518	0.155	91.9	96.9
P4	0.0705	0.120	0.0679	0.125	96.3	104.8
P5	0.0846	0.0800	0.0770	0.0868	90.9	108.4
Average recovery %					96.8 $\pm$ 6.3	100.4 $\pm$ 4.9

表 2 ANWE 二阶校正方法得到的尿液样中 CPT-11 和 SN38 的解析结果**Table 2** Resolved concentration of CPT11 and SN38 in urine samples by using ANWE method

Sam- ple	Added/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Predicted/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Recovery/%	
	CPT11	SN38	CPT11	SN38	CPT11	SN38
U1	0.0282	0.240	0.0290	0.244	102.9	101.5
U2	0.0423	0.200	0.0431	0.205	101.9	102.5
U3	0.0564	0.160	0.0567	0.164	100.5	102.7
U4	0.0705	0.120	0.0706	0.123	100.2	102.4
U5	0.0846	0.0800	0.0871	0.0793	102.9	99.1
Average recovery/%					101.7 $\pm$ 1.1	101.6 $\pm$ 1.1

表 3 用 ANWE 二阶校正方法获得的血浆和尿液中品质因子**Table 3** Figures of merit of CPT11 and SN38 in biological fluids by using ANWE method

Figures of merit	Plasma		Urine	
	CPT11	SN38	CPT11	SN38
SEN/($\text{mL}\cdot\text{ng}^{-1}$)	25	95	19	140
SEL	0.24	0.59	0.19	0.86
LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.39	0.24	0.12	0.24
LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.18	0.74	0.54	0.72

CPT11 和 SN38 在人体液中的精确光谱分辨与直接有选择性的含量预测. 与部分文献报道的结果相比, 如文献^[36]中, HPLC 方法测定羊血浆中的 CPT11 和 SN38, 得到的 LOQ 都是 5 ng/mL, 文献^[37]中采用 HPLC-MS 联用技术, 得到的人血浆中 CPT11 和 SN38 的 LOQ 分别是 31.25 和 62.50 pg, 而本文的三维荧光结合二阶校正方法所得到的血浆和尿液中 CPT11 的 LOQ 分别是 1.18 和 0.54 ng/mL, SN38 的 LOQ 分别是 0.74 和 0.72 ng/mL, 本文的分析方法逊于 LC-MS 的结果, 但却优于普通 HPLC 的分析水平, 而且本文方法仅用数学分离即实现了在未知干扰共存下的抗癌药物 CPT11 和其代谢物 SN38 的高灵敏检测. 与传统的液相色谱分离方法相比, 无需萃取和分离等样品前处理及色谱条件的优化步骤, 避免了由于前处理过程中的样品损失而造成的回收率偏低; 实验

过程中较少使用有毒的有机溶剂, 减少了对环境的污染; 对设备和工作人员的要求也不高, 是一种经济、高效、绿色的定量检测方法. 体现了这一分析策略在生物医学分析领域及其他复杂分析体系定量分析中的巨大应用潜力.

5 实验部分

5.1 溶液的配制

CPT11 标准溶液的配制: 精密称取 CPT11 标准品 1.41 mg, 用甲醇溶解, 转移到 10 mL 的棕色容量瓶中定容, 得到 141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中避光保存. 使用时, 将储备液用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液稀释 10 倍, 得到 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液.

SN38 标准溶液的配制: 精密称取 SN38 标准品 1 mg, 用甲醇溶解, 转移到 25 mL 的棕色容量瓶中, 得到 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中避光保存. 使用时, 将储备液用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液稀释到所需的浓度.

pH 为 5.28 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液的配制: 准确称取 KH_2PO_4 9.13508 g, 用 1000 mL 的水溶解, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.91859 g, 用 100 mL 的水溶解, 将二者以一定的比例混合, 调节 pH 到 5.28, 用 Delta 320-S pH 计测定.

5.2 实验方法

7 个只含有 CPT11 和 SN38 的样品作为校正集, 其中 CPT11 的浓度范围是 0.0141~0.0987 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SN38 的浓度范围是 0.04~0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 样品 P1~P5 包含 CPT11、SN38 及用缓冲溶液稀释的血浆($V:V=1:50$), 样品 U1~U5 包含 CPT11、SN38 及用缓冲溶液稀释的尿液($V:V=1:20$), 作为预测集. 详细浓度见表 4. 磷酸缓冲液量测三次, 用于扣除空白溶剂的影响和拉曼散射的影响. 3 个空白血浆样(由长沙中心血站提供)和 3 个空白尿液(来自未服药的健康志愿者)量测用于计算背景预测标准偏差 $s(0)$, 获得检测限和检测量.

表 4 校正集中 CPT11 和 SN38 的组成**Table 4** Composition of the different mixture used in the calibration set

Calibration set	[CPT11]/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[SN38]/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	0.0141	0.280
2	0.0282	0.240
3	0.0423	0.200
4	0.0564	0.160
5	0.0705	0.120
6	0.0846	0.080
7	0.0987	0.040

References

- [1] Wall, M. E.; Wani, M.; Cook, C.; Palmer, K. H.; McPhail, A.; Sim, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888.

- [2] Hsiang, Y. H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14873.
- [3] Langer, C. J.; Manola, J.; Bernardo, P.; Kugler, J. W.; Bonomi, P.; Cella, D.; Johnson, D. H. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 173.
- [4] Verschraegen, C. F. *Oncology (Williston Park, NY)* **2002**, *16*, 32.
- [5] Wagener, D. J. T.; Verdonk, H.; Dirix, L.; Catimel, G.; Siegenthaler, P.; Buitenhuis, M.; Mathieu-Boue, A.; Verweij, J. *Ann. Oncol.* **1995**, *6*, 129.
- [6] Mathijssen, R. H. J.; van Alphen, R. J.; Verweij, J.; Loos, W. J.; Nooter, K.; Stoter, G.; Sparreboom, A. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2182.
- [7] Nakagawa, H.; Saito, H.; Ikegami, Y.; Aida-Hyugaji, S.; Sawada, S.; Ishikawa, T. *Cancer Lett.* **2006**, *234*, 81.
- [8] Rothenberg, M. L. *The Oncologist* **2001**, *6*, 66.
- [9] Yang, X.; Hu, Z.; Chan, S. Y.; Goh, B. C.; Duan, W.; Chan, E.; Zhou, S. *J. Chromatogr. B* **2005**, *821*, 221.
- [10] Bardin, S.; Guo, W.; Johnson, J. L.; Khan, S.; Ahmad, A.; Duggan, J. X.; Ayoub, J.; Ahmad, I. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 249.
- [11] Zhang, Z.; Yao, J.; Wu, X.; Zou, J.; Zhu, J. *Chromatographia* **2009**, *70*, 399.
- [12] Goldwirth, L.; Lemaitre, F.; Zahr, N.; Farinotti, R.; Fernandez, C. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2012**, *66*, 325.
- [13] Rodríguez-Cáceres, M.; Durán-Merás, I.; Soto, N. E. O.; de Alba, P.; Martínez, L. L. *Talanta* **2008**, *74*, 1484.
- [14] Rodríguez-Cáceres, M. I.; Bohoyo Gil, D.; Durán-Merá, I.; Hurtado Sánchez, M. C. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 298.
- [15] Durán Martín-Merás, I.; Rodríguez-Cáceres, M. I.; Hurtado Sánchez, M. C. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 745.
- [16] Fu, H. Y.; Wu, H. L.; Nie, J. F.; Yu, Y. J.; Zou, H. Y.; Yu, R. Q. *Chin. Chem. Lett.* **2010**, *21*, 1482.
- [17] Sánchez, M.; Merás, I. D.; Cáceres, M.; Girón, A. J.; Olivieri, A. *Talanta* **2011**, *88*, 609.
- [18] Wu, H. L.; Shibukawa, M.; Oguma, K. *J. Chemom.* **1998**, *12*, 1.
- [19] Wu, H. L.; Yu, R. Q. *Chemistry* **2011**, *74*, 771. (吴海龙, 俞汝勤, 化学通报, **2011**, *74*, 771.)
- [20] Wang, J. Y.; Wu, H. L.; Chen, Y.; Sun, Y. M.; Yu, Y. J.; Zhang, X. H.; Yu, R. Q. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1264*, 63.
- [21] Li, S. F.; Wu, H. L.; Xia, A. L.; Zhu, S. H.; Nie, J. F.; Bian, Y. C.; Liu, J.; Yu, R. Q. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 947. (李淑芳, 吴海龙, 夏阿林, 朱绍华, 聂瑾芳, 边英超, 刘佳, 俞汝勤, 化学学报, **2008**, *66*, 947.)
- [22] Su, Z. Y.; Wu, H. L.; Liu, Y. J.; Xu, H.; Zhang, J.; Nie, C. C.; Yu, R. Q. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 459. (苏志义, 吴海龙, 刘亚娟, 许慧, 张娟, 聂重重, 俞汝勤, 化学学报, **2012**, *70*, 459.)
- [23] Xia, A. L.; Wu, H. L.; Zhu, S. H.; Han, Q. J.; Zhang, Y.; Yu, R. Q. *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 1171.
- [24] Chen, Z. P.; Liu, Z.; Cao, Y. Z.; Yu, R. Q. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *444*, 295.
- [25] Xie, H. P.; Jiang, J. H.; Long, N.; Shen, G. L.; Wu, H. L.; Yu, R. Q. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2003**, *66*, 101.
- [26] Hu, L. Q.; Wu, H. L.; Jiang, J. H.; Han, Q. J.; Xia, A. L.; Yu, R. Q. *Talanta* **2007**, *71*, 373.
- [27] Xia, A. L.; Wu, H. L.; Zhang, Y.; Zhu, S. H.; Han, Q. J.; Yu, R. Q. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598*, 1.
- [28] Bro, R.; Kiers, H. A. L. *J. Chromatogr.* **2003**, *17*, 274.
- [29] Zou, H. Y.; Wu, H. L.; Li, Y. N.; Nie, J. F.; Fu, H. Y.; Li, S. F.; Yu, R. Q. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 2739.
- [30] Qing, X. D.; Wu, H. L.; Li, Y. N.; Yu, R. Q. *Scientia Sinica Chimica* **2010**, *40*, 1. (卿湘东, 吴海龙, 李元娜, 俞汝勤, 中国科学: 化学 **2010**, *40*, 1.)
- [31] Shao, S. Z.; Wu, H. L.; Li, S. F.; Nie, J. F.; Wang, K. Y.; Liang, Y.; Yu, R. Q. *J. Anal. Sci.* **2010**, *26*, 373. (邵圣枝, 吴海龙, 李淑芳, 聂瑾芳, 王科云, 梁益, 俞汝勤, 分析科学学报, **2010**, *26*, 373.)
- [32] Olivieri, A. C.; Faber, N. K. M. *J. Chemom.* **2005**, *19*, 583.
- [33] Olivieri, A. C.; Faber, K. *Anal. Chem.* **2011**, *84*, 186.
- [34] de la Peña, A. M.; Mansilla, A. E.; Gómez, D. G.; Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2640.
- [35] Olivieri, A. C.; Faber, N. K. M. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *70*, 75.
- [36] Baylatry, M. T.; Joly, A. C.; Pelage, J. P.; Bengrine-Lefevre, L.; Prugnaud, J. L.; Laurent, A.; Fernandez, C. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 738.
- [37] D'Esposito, F.; Tattam, B. N.; Ramzan, I.; Murray, M. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 522.

(Cheng, F.)