

超声辅助离子液体分散液液微萃取/高效液相色谱法 测定新型抗艾药 ACC007

龚爱琴*, 金党琴

(扬州工业职业技术学院 化学工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 该文提出了一种基于超声辅助离子液体分散液液微萃取/高效液相色谱(HPLC)测定血清及药片中 ACC007 含量的新方法。在超声辅助下, 无需分散剂即可将疏水性离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($[C_8mimPF_6]$)形成的细小液滴分散于样品溶液中, 从而有效萃取 ACC007, 萃取率在 94.0% 以上。实验对萃取剂种类、萃取剂用量、溶液 pH 值、萃取时间、冷却和离心时间等萃取条件进行了考察。在优化条件下, ACC007 的线性范围为 0.20~10.0 $\mu\text{g/mL}$, 检出限分别为 0.062 $\mu\text{g/mL}$ (药片)和 0.068 $\mu\text{g/mL}$ (血清)。采用该方法对药片和血清中 ACC007 进行测定, 加标回收率为 90.5%~103%, 相对标准偏差为 2.9%~5.1%, 结果令人满意。

关键词: ACC007; 离子液体; 分散液液微萃取; 高效液相色谱(HPLC)

中图分类号: O657.7; R914.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2021)03-0396-05

Determination of a Novel Anti-AIDS Drug ACC007 by High Performance Liquid Chromatography with Ultrasound-assisted Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

GONG Ai-qin*, JIN Dang-qin

(College of Chemical Engineering, Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225127, China)

Abstract: In this paper, a simple and efficient method was developed and applied to the separation and determination of ACC007, a novel orally anti-AIDS drug in serum samples and its tablets, based on high performance liquid chromatography(HPLC) coupled with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. The hydrophobic ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate($[C_8mimPF_6]$) was used as extraction solvent. With the help of ultrasound, the ionic liquid could be divided into fine drops and dispersed entirely into sample solution without any dispersive solvent, promoting the analyte more easily migrating into the ionic liquid phase, and increasing the extraction rate up to 94.0%. Several important parameters affecting the extraction efficiency were investigated and optimized, including the type and volume of extraction solvent, pH value of sample, volume of sample, ultrasonication time, cooling time and centrifugation time. Under the optimized conditions, the calibration curves were linear over the range of 0.20-10.0 $\mu\text{g/mL}$, with limits of detection(LOD) of 0.062 $\mu\text{g/mL}$ for tablet and 0.068 $\mu\text{g/mL}$ for serum, respectively. The proposed method was applied to the detection of human serum samples and ACC007 tablets with satisfactory results. The spiked recoveries ranged from 90.5% to 103% with relative standard deviations of 2.9% - 5.1%.

Key words: ACC007; ionic liquid; dispersive liquid-liquid microextraction; high performance liquid chromatography(HPLC)

收稿日期: 2020-07-03; 修回日期: 2020-07-18

基金项目: 江苏高校“青蓝工程”(苏教师[2018]12号); 江苏省高等学校优秀科技创新团队(苏教科[2017]6号); 江苏省大学生实践创新课题(202013754024Y)

* 通讯作者: 龚爱琴, 博士, 副教授, 研究方向: 仪器分析、药物分析, E-mail: 578288049@qq.com

艾滋病又名获得性免疫缺陷综合征,是由人免疫缺陷病毒感染导致的一种致死性较高的疾病。目前国际上治疗艾滋病的药物有6类30多种,分别为核苷类逆转录酶、非核苷类逆转录酶、蛋白酶、整合酶、融合酶和细胞内 β 趋化因子受体(CCR5)抑制剂^[1]。ACC007属于第三代口服非核苷类逆转录酶抑制剂,中文名为3-{[3-乙基-2,6-二氧-5-(丙基-2-基)-1,2,3,6-四氢嘧啶-4-基]羰基}-5-甲基苯脒。作为一类抗艾滋病新药,ACC007具有优良的抗病毒活性和安全性,在2017年获得国家“十三五”重大新药创制科技重大专项^[2]。药品质量直接关系到用药者健康和生命安全,药物从研发到临床必须进行质量监控,包括对药物制剂进行质量检验及对生物体液中的药物浓度进行监测,最常见的是对血清中药物浓度进行监测以了解药动学特征^[3]。目前关于ACC007含量的测定方法报道很少。黄洁琼^[4]采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定复方制剂和比格犬血浆中的ACC007,但液质联用仪价格较高,一般实验室难以普及。当分析基体比较复杂、物质含量较低的样品时,常需结合使用分离富集技术。近年来分离富集技术向着简单化、微型化、有机试剂消耗最小化方向发展,其中液相微萃取技术显示了较高的样品萃取能力和良好的富集效果^[5-7]。疏水性离子液体具有在水中溶解度小、挥发性低、毒性低、环境友好等特点,逐渐取代传统的有机溶剂而作为萃取剂使用。当使用离子液体作为萃取剂时,由于离子液体黏度较大,常需使用分散剂(甲醇^[8]、乙腈^[9]、丙酮^[10-11]等)以改善离子液体在样品溶液中的分散效果,提高萃取率,但会增大有机试剂消耗量。而使用超声对溶液进行萃取时,溶液中会形成亚微米尺寸的液滴,增大互不相溶的两相间接触面,加速物质转移,甚至无需分散剂也可获得很高的萃取率,从而减少有机溶剂的使用^[12-13]。

本文首次采用超声辅助离子液体分散液液微萃取/高效液相色谱(HPLC)法测定人血清及药片中的ACC007。实验结果表明,在超声的作用下无需分散剂即可获得较高的萃取率(>94.0%)。该方法减少了有机溶剂的使用,简单、环保,可为ACC007的药动学和药物研究提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司),配紫外检测器;KQ3200 超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司);L2-4K 台式低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司);FE28 pH计(瑞士梅特勒-托利多)。

ACC007 标准物质(含量99.7%)与药片(标示量75.0 mg/片)均由江苏艾迪制药有限公司提供。

离子液体1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐[C₈mimPF₆]⁺、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐[C₆mimPF₆]⁺、1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐[C₄mimPF₆]⁺购于上海笛柏生物科技有限公司。乙醇、甲醇、冰乙酸、乙酸钠购于国药集团化学试剂有限公司,甲醇为色谱纯,其他均为分析纯。实验用水为高纯水。

1.2 溶液配制

0.10 mg/mL ACC007 标准溶液:称取0.10 g ACC007 标准物质置于烧杯中,用适量乙醇溶解后,转入容量瓶中并用乙醇定容至100 mL,质量浓度为1.0 mg/mL,置于暗处保存。使用前取适量用乙醇稀释至0.10 mg/mL。

pH 4.5 的缓冲溶液:称取5.0 g 三水合乙酸钠,用水溶解后,加入6.3 mL 冰乙酸,用水稀释至500 mL,于酸度计上调至pH 4.5。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 ACC007 药片:取5片准确称重,研磨均匀,精密称取约1片质量的药品粉末,用乙醇溶解定容至100 mL,过0.45 μ m 滤膜,取0.1 mL 续滤液萃取测定。

血清样品:取健康志愿者的血清1.0 mL,加入1.0 mL 1.0 mg/mL 的 ACC007 标准溶液和8.0 mL 乙腈,以1 200 r/min 离心15 min^[14],取0.5 mL 上清液萃取分析。

1.3.2 萃取过程 在10 mL 离心管中,依次加入适量的 ACC007 标准溶液或样品溶液、2.0 mL 缓冲溶液、80 μ L 离子液体[C₈mimPF₆]⁺,用水稀释至刻度线,摇匀。超声10 min 后取出,于5 $^{\circ}$ C 冷却15 min,以2 500 r/min 离心5 min,溶液分层,下层即为离子液体萃取相。将萃取相用乙醇稀释至1.0 mL,待测。

1.3.3 HPLC 法测定 色谱柱: Dionex C_{18} (4.60 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇: 水 (90 : 10), 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 260 nm; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

实验分别测定了未萃取药物、萃取试剂空白、萃取后药物在 200 ~ 350 nm 的吸收曲线, 结果见图 1。由图可知: 药物有 2 个吸收峰 (图 1a); 萃取试剂空白在药物第 2 个吸收峰处 (260 nm) 无吸收 (图 1b); 药物经萃取后第 1 个吸收峰消失 (图 1c), 这可能是以萃取试剂空白作参比, 而空白产生的吸收比样品强所致。由于萃取试剂空白在第 2 个吸收峰无吸收, 对测定无干扰, 实验选择检测波长为 260 nm。

2.2 萃取条件的优化

2.2.1 萃取剂的选择 离子液体的水溶性、粘度、萃取能力等会影响萃取率, 当离子液体阴离子部分固定不变时, 这些特性与离子液体的阳离子部分有关。[C_4 mimPF₆]、[C_6 mimPF₆] 和 [C_8 mimPF₆] 3 种疏水性离子液体在水中的溶解度分别为 18.8、7.5、2.0 μ g/L^[15], 因此分别考察了 200 μ L [C_4 mimPF₆]、150 μ L [C_6 mimPF₆]、60 μ L [C_8 mimPF₆] 在不使用分散剂的情况下对 ACC007 萃取率的影响 (图 2)。萃取率计算如下: 萃取率 = $C_{ex} V_{ex} \times 100\% / (C_0 V_0)$, 式中 C_{ex} 、 C_0 分别为萃取相和萃取溶液中 ACC007 的质量浓度 (μ g/mL), V_{ex} 、 V_0 分别为萃取相和萃取溶液的体积 (mL)。由图 2 可知, 少量的 [C_8 mimPF₆] 即可达到较高的萃取效果, 故后续研究采用 [C_8 mimPF₆] 作为萃取剂。

实验同时考察了 [C_8 mimPF₆] 用量的影响, 结果发现 ACC007 的萃取率随着离子液体用量的增加而增大, [C_8 mimPF₆] 用量为 70 μ L 时达到最大萃取率 (94.7%), 之后萃取率随离子液体用量的增加基本不变。为便于操作, 最终选择离子液体 [C_8 mimPF₆] 的用量为 80 μ L。

2.2.2 溶液 pH 值的选择 考察了溶液 pH 值在 3.0 ~ 6.0 范围内对 ACC007 萃取率的影响, 结果显示, 当溶液 pH 为 4.5 时萃取率达到最大值 (95.0%), 此后萃取率随着 pH 值的增大而降低。可能是因为 ACC007 发生了酮式和烯醇式结构的转变, 其在水中的溶解度随着 pH 值增加而增大, 导致萃取率下降。实验中控制萃取溶液 pH 值为 4.5。

2.2.3 萃取时间的选择 超声辅助离子液体分散液微萃取是一种平衡萃取, 超声波有利于疏水性离子液体形成微小液滴分散于水相中, 从而加速萃取物的转移。固定超声频率为 40 kHz, 实验考察了超声时间 (2、5、7、10、15、20 min) 对萃取率的影响, 结果表明 ACC007 的萃取率随着超声时间的增加而增大, 当超声时间为 10 min 时萃取率达到最大值 (95.4%), 之后随超声时间的增加萃取率基本不变。实验选择超声时间为 10 min。

2.2.4 冷却时间与离心时间的选择 超声时溶液温度升高会增大离子液体的溶解度, 冷却可降低其在水中的溶解度而有利于相分离。在 5 $^{\circ}$ C 冷却温度下, 实验考察了冷却时间对 ACC007 萃取率的影响,

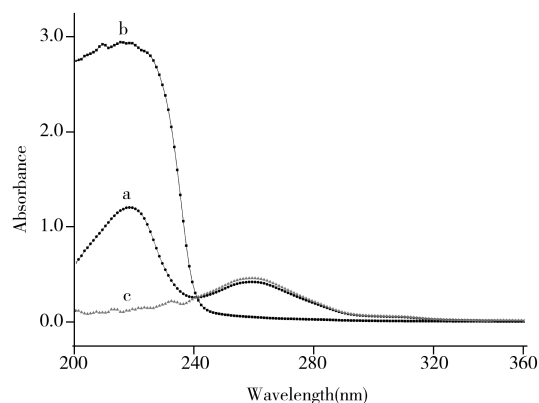


图 1 未萃取药物 (a)、萃取试剂空白 (b) 与萃取后药物 (c) 的吸收曲线

Fig. 1 Adsorption curves of unextracted drug (a), extraction blank (b) and the extracted drug (c)

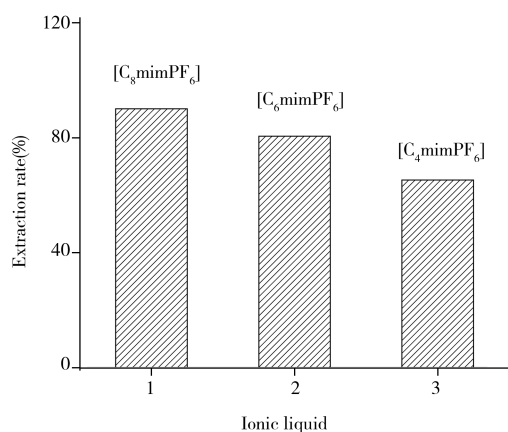


图 2 离子液体种类对 ACC007 萃取率的影响

Fig. 2 Effect of ionic liquid type on extraction rate of ACC007

发现冷却时间超过 10 min 时即可相分离完全, ACC007 的萃取率在 94.0% 以上。为保证分相完全, 实验选择冷却时间为 15 min。

冷却后立即离心, 在转速 2 500 r/min 条件下, 考察了离心时间对 ACC007 萃取率的影响, 发现离心时间为 5 min 时即可相分离完全, 因此实验选择离心时间为 5 min。

2.2.5 离子强度的选择 通过加入不同量的 1 mol/L NaCl 考察了离子强度对萃取率的影响, 结果发现在 10 mL 萃取体系中, 当 NaCl 的加入量超过 0.9 mL (离子强度约为 0.09 mol/L) 时 ACC007 的萃取率会明显下降。实验使用的缓冲溶液浓度为 0.2 mol/L, 计算得离子强度为 0.04 mol/L, 可满足离子强度的要求。

2.2.6 溶液体积的选择 考察了溶液体积对 ACC007 萃取率的影响, 发现溶液体积超过 15 mL 后萃取率下降明显, 原因可能是溶液体积增大使得离子液体在水中的溶解量增大, 萃取能力降低所致。本研究控制溶液体积为 10 mL, 萃取后为降低离子液体黏度的影响, 将萃取相用乙醇稀释至 1.0 mL 后测定。

2.3 分析应用

2.3.1 专属性实验 图 3 显示了空白药片(曲线 1)、空白血清(曲线 2)、ACC007 标准溶液(曲线 3)、ACC007 药片(曲线 4)、加标血清(曲线 5)经萃取后的色谱图。由图可知, ACC007 的出峰时间为 3.6 min, 空白药片与空白血清在该处均无色谱峰, 表明空白药片和空白血清中共存组分对测定无干扰。

2.3.2 线性关系与检出限 通过 student's 检验法比较工作曲线与标准曲线的斜率, 考察了样品基体对测定的影响。标准曲线通过萃取和分析 ACC007 标准溶液而得, 工作曲线则通过萃取和分析加标空白药片和血清而得。在优化条件下, 以峰面积对 ACC007 的质量浓度绘制曲线。结果表明, 在 $P < 0.05$ 时标准曲线斜率与工作曲线斜率无明显差异, 因此实际样品分析时均采用标准曲线法。由表 1 可知, ACC007 的线性范围为 0.20 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在空白药片和血清中的检出限 ($S/N = 3$) 分别为 0.062、0.068 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

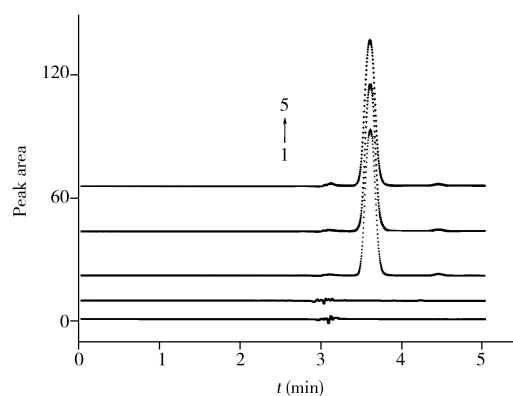


图 3 经萃取后 ACC007 的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of ACC007 after extraction curve(1-5): blank tablet, blank serum, standard solution, ACC007 tablet and addition serum sample

表明, 在 $P < 0.05$ 时标准曲线斜率与工作曲线斜率无明显差异, 因此实际样品分析时均采用标准曲线法。由表 1 可知, ACC007 的线性范围为 0.20 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在空白药片和血清中的检出限 ($S/N = 3$) 分别为 0.062、0.068 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同样品中 ACC007 的线性参数及检出限

Table 1 Linear parameters and limits of detection for ACC007 in different matrices

Sample	Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (r)	Detection limit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Standard solution(标准溶液)	0.20 ~ 10.0	10.75	-0.433	0.999 4	0.049
Blank tablet(空白药片)	0.20 ~ 10.0	10.58	-0.362	0.999 1	0.062
Blank serum(空白血清)	0.20 ~ 10.0	10.23	-0.517	0.998 9	0.068

2.3.3 重现性 分别配制质量浓度为 2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 按照本方法萃取后测定峰面积, 每个浓度平行测定 6 次, ACC007 峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 2.8% ~ 4.3%, 表明方法的重现性较好。

2.3.4 样品测定与回收率 采用本方法测定了药片与血清中 ACC007 的质量浓度 (见表 2), 将测定结果换算成原始量为: 73.8 mg/片 (药片), 98.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (血清)。而 ACC007 药片的标示量为 75.0 mg/片, 加标血清中 ACC007 的质量浓度为 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果显示, 测定值与标示值无显著性差异。

在 2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加标水平下, 对上述药片和血清样品进行加标回收实验, ACC007 的回收率为 90.5% ~ 103%, RSD 为 2.9% ~ 5.1% (见表 2), 表明方法的准确性和重复性较好, 可以满足样品的测定要求。

表 2 样品测定及回收率实验结果($n=3$)
Table 2 The analytical results of ACC007 in real sample and recovery experiments($n=3$)

Sample	Spiked($\mu\text{g/mL}$)	Found($\mu\text{g/mL}$)	Recovery(%)	RSD(%)
ACC007 tablet	0.0	7.38	–	3.9
	2.0	9.43	102	2.9
	5.0	12.28	98.0	4.5
	10.0	17.06	96.8	3.3
Serum	0.0	4.93	–	3.6
	2.0	6.74	90.5	4.5
	5.0	9.79	97.2	3.2
	10.0	15.27	103	5.1

3 结 论

本文建立了超声辅助离子液体分散液液微萃取/HPLC 测定血清和药片中 ACC007 含量的分析方法。该方法无需使用分散剂, 萃取率可达 94.0% 以上, 减少了有机溶剂的使用和环境污染, 降低了实验成本; 超声作用提高了萃取效率。准确度、精密度、线性范围、检出限等实验结果表明, 该方法可用于血清和药物的分析, 为 ACC007 的药动力学和药物研究提供了分析技术支持。

参考文献:

- [1] Liu S F, Peng Z R, Shen Z Y. *Appl. Prev. Med.* (刘帅凤, 彭振仁, 沈智勇. 应用预防医学), **2016**, 22(3): 282–285.
- [2] Hu X L, Liu S X, Shen X N. *Chin. J. New Drugs*(胡雄林, 刘三侠, 沈小宁. 中国新药杂志), **2020**, 29(6): 686–691.
- [3] Mostafa A M, Regeh A H, Ali M F B, Mohamed F A. *Spectrochim. Acta A*, **2019**, 207: 251–261.
- [4] Huang J Q. LC–MS/MS Method for Determination of a Novel Anti-HIV Tablet and Its Application to Pharmacokinetics Study in Beagle Dogs. Suzhou: Suzhou University(黄洁琼. 新型抗 HIV 复方制剂 LC–MS/MS 检测方法的建立及比格犬药动学研究. 苏州: 苏州大学), **2016**.
- [5] Zhang Q, Cui J, Gu H, Yu X F, Shan X F, Zhu G. *J. Instrum. Anal.* (张强, 崔君, 顾华, 余肖峰, 单晓锋, 朱鹤. 分析测试学报), **2020**, 39(4): 492–499.
- [6] Gong A Q, Zhu X S. *Talanta*, **2015**, 131: 603–608.
- [7] Markina N E, Markin A V, Weber K, Popp J, Cialla–May D. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, 1109: 61–68.
- [8] Hatami M, Karimnia E, Farhadi K. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, 85: 283–287.
- [9] Liu X, Fu R, Li M, Guo L P, Yang L. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(12): 1919–1922.
- [10] Nagaraju D, Huang S D. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1161: 89–97.
- [11] Zhang Y, Ding J H, Xiang H L, Liu P F. *J. Instrum. Anal.* (张英, 丁健桦, 向虹霖, 刘鹏飞. 分析测试学报), **2017**, 36(11): 1352–1356.
- [12] Zhang Y F, Lee H K. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 750: 120–126.
- [13] Duan F M, Zhang S W, Shao W J, Gao H L, Kuang X G, Rao J, Bao Z J. *China Meas. Test*(段凤敏, 张绍旺, 邵维炯, 高华磊, 匡兴贵, 饶杰, 保志娟. 中国测试), **2019**, 45(5): 66–73.
- [14] Gong A Q, Zhu X S. *Fluid Phase Equilib.*, **2014**, 374: 70–78.
- [15] Gao S Q, Yang X, Yu W, Liu Z L, Zhang H Q. *Talanta*, **2012**, 99: 875–882.

(责任编辑: 丁 岩)