高效液相色谱法测定白血病人依托泊苷血药浓度及其药物动力学研究

陆基宗　许英华　贺　晴　朱　伊(无锡 214002 无锡市第一医院)

摘要　目的:测定10位白血病人8个时间点血清中VP16浓度,并进行药物动力学研究。方法:HPLC(内标法),流动相:甲醇-乙腈-水(50∶10∶40,v/v),波长254nm。结果:分离良好,回收率>92%,日内、日间精密度<5%,药动学参数为二房室开放模型,老年人 $t_{1/2\beta}$ 有较明显延长。结论:本法提取简便、灵敏度高,精密度高,肾功能不良者应减量,适用于基层医院VP16的临床监测。

关键词　HPLC;依托泊苷(VP16);TDM;药物动力学

Determination of Leukemia's Etoposide(VP-16) in serum by HPLC and its pharmacokinetic studies

Lu Jizong(Lu JZ), He QIng(He Q), Xu Yinghua(Xu YH), *et al*(*Frist pipoles Hospital of Wuxi, Wuxi* 214002)

ABSTRACT　OBJECTIVE: Determine the concentration of VP-16 in serum at eight time points from ten Leukemia's, and carry out pharmacokinetic studies. **METHODS:** HPLC(internal standard) was employed, the mobile phase was methanol-acetonitrite-water(50∶10∶40, v/v), the wavelength for detection was 254nm. **RESULTS:** Good spearation and recoveries over 92% were obtained. Coeffcients of variation within a day and between days were under 5%. Pharmacokenitic study indicated that it was two compartment open model with old persons' $t_{1/2\beta}$ extents distinctively. **CONCLUSION:** This method is simple with high sensitivity and good precision, and is suitable to the determination of VP16 in serum for basic level hospital.

KEY WORDS　HPLC, Etoposide(VP16), TDM, pharmacokenitic parameters

依托泊苷(Etoposide, VP-16)为一新型的半合成鬼臼酯素衍生物,具有广谱的抗肿瘤活性,为治疗白血病的首选药。且对复发性、难治性急性髓细胞性白血病(AML)和急性髓单核细胞白血病(AMML)有独特疗效[1]。但VP-16可出现骨髓抑制、嗜中性粒细胞减少等副作用[2]。迄今国内对VP-16治疗白血病的血药浓度和药动学参数的研究报告仅见一篇[3],更无VP-16最佳治疗浓度范围和最佳给药方案的报道。所以有必要对VP-16进行血浓监测。

1　仪器和试药

1.1　仪器

HP-1050高效液相色谱仪(美国惠普公司);HP-1050紫外检测仪;HP-3395积分仪;TDL-16C高速离心机,H66025T超声清洗机。

1.2　试药

对照品VP-16(北京制药工业研究所);内标苯妥英钠(南京军区总医院);甲醇、乙腈为色谱纯,其余为分析纯。

中国现代应用药学 http://www.chinjmap.com

2 色谱条件

流动相:甲醇-乙腈-水(50∶10∶40,v/v),使用前经过滤、超声脱气。色谱柱:Hypesil C_{18}柱(200×4.6mm ID,5μm);保护柱:同上。流速:0.7ml/min;灵敏度:0.2AUFS,ATT 7。检测波长254nm,进样量20μl。

3 方法和结果

3.1 血清样品的处理

取含药血清200μl,加内标苯妥英钠适量使成40μg/ml,加1.0mol/L HCl 0.1ml,混匀,再加氯仿(内含8%异丙醇)2.5ml,振荡3min,8000r/min离心10min(离心力3500g),取出下层,于45℃水浴中用氮气流吹干,加200μl流动相复溶,进样20μl。测得色谱图如图1。

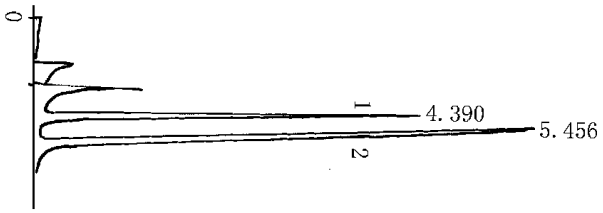

图1 样品血清提取后色谱图

1-VP-16;2-内标

3.2 标准曲线和线性范围

分别定量称取VP-16和内标对照品适量,用流动相溶解,稀释成500μg/ml,为标准贮备液。临用前配成6管系列浓度(加入健康人血清),分别含VP-16为1,2,5,20,50和100μg/ml(各含内标40μg/ml),按"血清样品处理"项下的操作,"内标法"定量,VP-16浓度C与两峰面积之比(x)呈良好的线性关系。回归方程为:$C=0.020078x-0.00583$($r=0.99986$),线性范围1~100μg/ml,最低检测浓度($S/n=3$)为0.1μg/ml。

3.3 方法学考察

3.3.1 回收率和精密度试验 用标准贮备液配制成VP-16高中低三种不同血清浓度(每浓度5管),按上操作,计算出回收率,见表1。另取上述高中低浓度血清样品,每浓度日内测定5次,计算日内误差;同上法每浓度连续5d,每天测5次,计算日间误差,结果见表1。

表1 VP-16回收率和精密度试验

浓度 / μg·ml⁻¹	回收率 / %	RSD/%	
		日内误差	日间误差
2	92.4	4.02	4.06
5	93.5	3.84	4.76
20	93.8	4.16	4.38

3.3.2 药物之间的干扰性试验 为避开今后临床合并用药时可能出现的色谱图上的干扰,我们选择十多种常与VP-16合用的药物进行进样观察。结果表明,安定、苯巴比妥、卡马西平、维拉帕米及多种抗癌药如氟脲嘧啶、阿霉素、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷和羟基脲等,均不干扰VP-16的色谱测定,以期将此结果作为今后临床上长期监测VP-16安全用药的依据。

4 临床应用及药物动力学研究

选择10名肝肾功能正常的白血病患者分别静滴VP-16 100mg/250ml盐水,70min内滴完,滴注完成后5,15,30min,1,2,5,8和12h静脉取血1ml,按法测定,结果如下。

表2 10名患者静滴VP-16 100mg后血浓表/μg·ml⁻¹

病例	年龄/岁	时间/h							
		0.083	0.25	0.50	1.0	2.0	5.0	8.0	12.0
1	63	15.26	14.20	12.11	10.20	9.02	6.59	4.58	2.76
2	55	14.20	13.19	11.15	9.38	8.15	5.40	3.48	1.96
3	60	14.80	13.96	12.13	10.08	8.84	5.86	3.80	2.28
4	35	12.31	11.39	9.78	8.06	7.16	4.36	2.74	1.69
5	63	16.60	14.96	12.98	10.96	9.52	6.22	3.98	2.35
6	29	16.24	14.70	12.59	10.33	8.79	5.53	3.40	1.91
7	26	16.91	15.10	12.32	9.87	8.41	5.23	3.18	1.75
8	41	13.28	12.10	10.10	8.41	7.11	4.50	2.82	1.62
9	19	11.63	10.90	9.18	7.61	6.49	3.92	2.31	1.29
10	27	16.08	14.89	12.40	10.19	8.76	5.40	3.36	1.88
平均	$\bar{x}\pm s$	14.73±1.84	13.56±1.58	11.47±1.34	9.51±1.11	8.23±0.98	5.30±0.84	3.36±0.66	1.95±0.42

上述血浓结果经PKBP-N药动学程序(南京军区总医院)拟合后,曲线为开放式二房室模型,见图2,药动学参数见表3。

5 讨 论

5.1 本实验取血量少,操作简单,提取完全,回收率高,重现性好。所用流动相基本同监测抗癫痫药的流动相,给医院常规TDM带来极大方便。"血样提取"中选用氯仿,因极性适中,加上高速离心使有机层与蛋白层分离彻底,进样结果血中杂质极少。"浓缩吹干"中水浴温度应控制于50℃以下,以防内标和主药的分解。

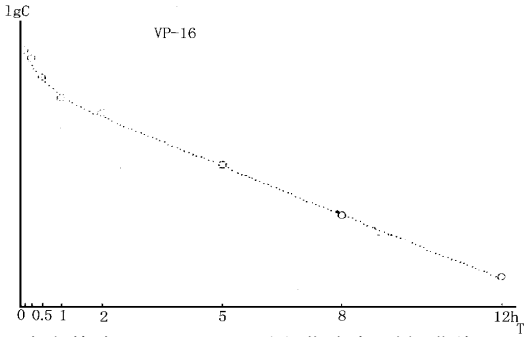

图 2　病人静滴 100 mg VP-16 后血药浓度-时间曲线

表 3　10 名患者静滴 VP-16 100 mg 后的药动学参数

病例	年龄 / 岁	A / ng• ml⁻¹	B / ng• ml⁻¹	α / h	β / h	K_{12} / h	K_{21} / h	K_{10} / h	$t_{1/2\alpha}$ / h	$t_{1/2\beta}$ / h	$V_{C/F}$ / l • kg⁻¹	AUC / μg• h• ml⁻¹
1	63	5.37	11.12	2.33	0.106	0.673	1.61	0.162	0.298	6.52	6.06	76.5
2	55	5.57	9.67	1.86	0.124	0.570	1.23	0.188	0.373	5.60	6.56	68.1
3	60	4.65	11.19	1.98	0.128	0.512	1.49	0.180	0.350	5.40	6.31	70.0
4	35	4.08	9.20	2.35	0.150	0.621	1.68	0.210	0.290	4.73	7.53	54.3
5	63	5.57	12.28	2.51	0.117	0.680	1.78	0.201	0.280	5.90	5.60	74.8
6	29	5.95	11.60	2.33	0.151	0.670	1.59	0.220	0.301	4.58	5.70	68.1
7	26	7.66	10.98	2.38	0.151	0.822	1.47	0.246	0.291	4.58	5.36	64.5
8	41	5.12	9.30	2.34	0.146	0.705	1.56	0.219	0.296	4.74	6.93	55.3
9	19	3.89	8.66	2.20	0.160	0.560	1.56	0.220	0.320	4.32	7.97	49.0
10	27	6.05	11.42	2.26	0.150	0.657	1.53	0.222	0.307	4.61	5.72	66.9
平均	$\bar{x} \pm s$	5.39 ±1.08	10.54 ±1.22	2.25 ±0.195	0.138 ±0.018	0.647 ±0.087	1.55 ±0.144	0.207 ±0.024	0.311 ±0.029	5.10 ±0.72	6.37 ±0.87	64.75 ±9.07

5.2　药动学参数表明,分布相 $t_{1/2\alpha}$ = 0.311 h,消除相 $t_{1/2\beta}$ = 5.10h,与国外文献报道基本相符[4]。说明本法是可行的,适用于临床 TDM。临床上可按其药动学参数和血浓高低来调整给药方案,以减少毒副作用,做到安全、有效、合理用药。

5.3　乙腈和异丙醇的作用　乙腈为流动相的重要组成部分。实验表明,乙腈的洗脱强度大于甲醇,对保留时间 t_R 的影响很大,其浓度增加时,t_R 缩短,各峰相邻太近而妨碍定量;反之亦然[5]。实验证明以 10 %为宜。振荡强烈程度和时间长短与提取率的高低密切相关[6]。使用氯仿时,有时出现"乳化"现象,加入 8 %异丙醇作破乳剂,因其界面活性强,碳链短,不能形成牢固的膜而使已被乳化的乳状液破坏,从而达到"破乳"的目的[7]。

5.4　VP-16 在体内不代谢,大部分以原形药物由肾脏排泄,尿中排出率完全依赖于肾功能。从药动学参数表中看出,老年人消除代谢缓慢($t_{1/2\beta}$值大),AUC 值增大,临床上相应毒副作用也较重,故应适当减少剂量。本实验组老年人(经挑选)肝肾功能基本正常,今后对肝肾功能不良者,剂量应适当减少,以策安全。在一定程度上 AUC 与年龄成正比,说明随年龄增大,药物排泄缓慢,$t_{1/2\beta}$延长,血药浓度相对增高,毒副作用随之加大[8]。

参考文献

1　于海盛.国外医药学分册,1991,18(5):260.

2　Peter JO. Reserch,1991,51:2041 April 15.

3　何晓英,朱运奎.HPLC 测定小细胞肺癌病人血中 VP-16.中国医院药学杂志,1994,14(5):199.

4　Fleming RA. J Liq Chromatogr,1991,14(7):1275.

5　陈幼亭,於学良.头孢拉定胶囊生物利用度的研究.中国医院药学杂志,1992,12(3):99.

6　曾经泽.生物药物分析.第 2 版.北京:中国医药科技出版社,1996:71.

7　曾经泽.中药提取鉴定原理.第 2 版.上海:上海科技出版社,±1992:70.

8　陈新谦.新编药物学.第 14 版.北京:人民卫生出版社,1997:14.

收稿日期:1999 - 06 - 18

中国现代医药杂志 http://www.chinjmap.com