

高效液相色谱法测定人体血浆中替加氟的方法研究

黎远冬,梁宁生,韦劲松,陆益(广西医科大学附属肿瘤医院,南宁 530021)

摘要:目的 建立一种高效液相色谱法测定人体血浆中替加氟浓度的方法。方法 色谱柱为 Zorbax - ODS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 检测波长为 273 nm, 流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐(用磷酸溶液调 pH 5.2) - 甲醇(85:15), 流速 1.0 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}$ C。结果 替加氟血药浓度在 0.1 ~ 20 μ g/mL ($r=0.9997$) 内线性关系良好, 最低检测浓度为 0.1 μ g/mL, 绝对回收率均在 95% 以上, 相对回收率在 94% ~ 104%, 日内、日间 RSD 分别为 3.0% 和 4.1%。结论 本方法简单、快速、准确, 适用于临床药动学研究及血药浓度监测。

关键词: 替加氟; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)02-0145-03

Study on the Determination of Tegafu in Human Plasma by HPLC Assay

LI Yuan-dong, LIANG Ning-sheng, WEI Jing-song, LU Yi (Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of tegafur in human plasma. **METHODS** The determination was performed by HPLC with the Zorbax-ODS C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) under 35 $^{\circ}$ C, the mobile phase was consisted of 0.01 mol/L phosphate buffer (adjusted pH to 5.2 with orthophosphoric acid) - methanol (85:15) with the flow rate at 1.0

作者简介: 黎远冬, 男, 42岁, 1986年毕业于武汉大学物理化学专业。电话: 0771 - 5310576, E-mail: lyd641209@163.com

mL/min, the UV detected wavelength was at 273 nm. **RESULTS** The linear ranges for determination of tegafur was 0.1 ~ 20 g/mL ($r = 0.9997$), and the limit concentration of detection was 0.1 g/mL. Absolute recovery were more than 95%, relative recovery were 94% ~ 104%; The RSDs of intra-day and inter-day were 3.0% and 4.1%. **CONCLUSION** This method was simple, quick, and accurate and can be used for studying the pharmacokinetics of tegafur and the therapeutic drug monitoring.

KEY WORDS: tegafur; human plasma concentration; HPLC

替加氟 (tegafur) 为氟尿嘧啶的衍生物, 在体内经肝脏活化逐渐转变为氟尿嘧啶而起抗癌作用。能干扰和阻断 DNA, RNA 及蛋白质合成, 主要作用于 S 期, 是抗嘧啶类的细胞周期特异性药物, 其作用机制、疗效及抗癌谱与氟尿嘧啶相似, 但作用持久, 吸收良好, 毒性较低。化疗指数为氟尿嘧啶的 2 倍, 毒性仅为氟尿嘧啶的 1/4 ~ 1/7。因此目前广泛用于治疗胃癌、结肠癌、直肠癌等消化道肿瘤。

有关测定人体血浆中替加氟浓度的方法国外有不少报道^[1-2], 国内有少量报道^[3-4]。目前, 国内尚未见该药的药动学研究报告, 为使该药在临床应用更安全、有效, 需要药动学数据对该药在我国人群体内代谢过程进行评价, 目前的测定方法前处理多数操作复杂繁琐。本实验旨在建立一种快速、灵敏、准确的该药人体内血药浓度测定方法, 为进一步研究该药在我国人体的药动学模型和参数打下基础。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT VP 泵, SPD-10A VP 紫外检测器, LC-10AT VP 柱温箱, 威玛通用色谱数据工作站; 替加氟 (中国药品生物制品检定所, 含量 > 99.5%); 甲硝唑 (中国药品生物制品检定所, 含量 > 99.5%), 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱: Zorbax-ODS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 0.01 mol/L 磷酸盐 (用磷酸溶液调 pH 5.2) 甲醇 (85:15), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 273 nm, 柱温: 35 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L。在此条件下替加氟与内标峰型良好, 其保留时间分别为 12.50 min 和 10.20 min。

2.2 标准溶液的配制

精密称取替加氟对照品 20.0 mg, 于 50 mL 量瓶中用蒸馏水溶解并稀释至刻度, 得浓度为 400.0 μ g/mL 替加氟对照品贮备液, 于冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存; 精密称取甲硝唑对照品 15.0 mg 于 100 mL 量瓶中, 用蒸馏水溶解并稀释至刻度, 得浓度为 150.0 μ g/mL 内标溶液, 于冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 血浆样品处理

精密取血浆样品 200 μ L 置于 2.0 mL 离心管中, 加内标溶液 10.0 μ L, 混匀, 加 60 μ L 硝酸银 (30%), 涡旋 3 min, 水浴 45 $^{\circ}$ C 放置 5 min, 加 30 μ L 氯化钠 (30%), 涡旋 3 min, 离心 (15 000 r/min, 10 min), 取上清液 10 μ L 进样分析。

2.4 标准曲线的制备

取替加氟标准贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用空白血浆稀释并定容到刻度, 得浓度为 40.0 μ g/mL 标准血浆样

品。取标准血浆样品适量分别用空白血浆稀释成系列浓度 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 μ g/mL 的对照品血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下处理后作 HPLC 分析, 以替加氟浓度为纵坐标 (Y), 替加氟的峰面积与内标物峰面积的比值为横坐标 (X) 作标准曲线, 替加氟的回归方程 $Y = 1.45X - 0.210$, $r = 0.9997$ ($n = 5$), 结果显示在 0.1 ~ 20 μ g/mL 浓度内具有良好的线性关系。

2.5 回收率与精密度

在空白血浆样品中精密加入标准溶液适量, 使替加氟为 0.1, 2.5, 20 μ g/mL 低、中、高 3 个浓度的血浆样品各 5 份, 按“2.3”方法处理后进样, 由标准曲线求出各样品的浓度, 将求得的浓度与已知加入浓度相比, 计算血浆样品中替加氟的相对回收率。同法配制替加氟为 0.1, 2.5, 20 μ g/mL 低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 同日各处理 5 批, 计算日内 RSD。以后取低、中、高 (0.1, 2.5, 20 μ g/mL) 的对照血浆样品各一份, 每日测定 1 次, 共测定 5 d, 计算日间 RSD。

同法配制替加氟为 0.1, 2.5, 20 μ g/mL 低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 按“2.3”方法处理后进样; 另取替加氟标准贮备液适量, 用流动相配制成相应浓度的替加氟对照品溶液, 不经处理直接进样, 以此为标准, 将两组峰面积进行比较, 计算替加氟在血浆中的绝对回收率。其结果见表 1。

表 1 回收率及精密度 ($n = 5$)

Tab 1 Recovery and precision of the assay ($n = 5$)

added /(g/mL)	relative recovery /%	absolute recovery /%	with in-day RSD/%	between-day RSD/%
0.1	97.2 \pm 3.6	96.5 \pm 1.5	4.1	4.8
2.5	101.2 \pm 2.2	96.8 \pm 1.0	2.8	4.1
20	99.7 \pm 2.0	98.7 \pm 3.6	2.2	3.3

2.6 稳定性考察

取替加氟对照品和内标贮备液, 用流动相分别配制成 2.5, 5.0 μ g/mL 的溶液于冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存, 分别在 1, 5, 10, 15, 20 d 进样, 记录峰面积。替加氟对照品和内标的峰面积的 RSD 分别为 0.5% 和 0.4%, $n = 5$ 。表明替加氟对照品和内标溶液在 20 d 内稳定。

取空白血浆样品, 加入替加氟标准及内标溶液适量, 室温留样, 在 (0, 2, 4, 8, 16, 32, 48 h) 时间点处理进样, 记录替加氟对照品及内标峰面积, 替加氟对照品及内标峰面积的 RSD 分别为 2.7%, 2.5%, $n = 5$ 。表明替加氟对照品加内标血浆至少在 48 h 内稳定。加有替加氟标准及内标溶液的空白血浆样品, 反复冻融 5 次处理进样, 考察其冻融稳定性, 结果替加氟及内标峰面积 RSD 分别为 3.4%, 3.0%, $n = 5$ 。

2.7 临床上应用

用建立的方法对口服 0.4 g 替加氟的 4 例患者的血药浓度进行监测,口服 2 h 血药浓度达到峰值,24 h 血药浓度降为峰值的 25% 左右,检测方法快速、准确,从取样到测定结束只需要 40 min,方法可对治疗药物进行有效监测。有关替加氟药动学参数的研究将在下一步工作中进行。

3 讨论

3.1 在蛋白质沉淀剂的选择上,考察了三氯醋酸、高氯酸,发现用三氯醋酸、高氯酸处理血浆样品时,样品杂质峰非常多,分离效果不理想。采用硝酸银(30%)作为蛋白质沉淀剂,待蛋白质变性后,将多余的硝酸银用氯化钠沉淀,此方法蛋白质沉淀完全。用硝酸银沉淀蛋白质的同时也会有少量替加氟与硝酸银结合产生沉淀,在离心前加入氯化钠,产生氯化银沉淀,竞争性使替加氟重新释放出来,另外还消除溶液中硝酸银对色谱柱污染的影响。温度对蛋白质变性速度有影响,为使蛋白质沉淀完全,采用水浴 45℃ 放置 5 min。

3.2 内标的选择,考察了阿糖胞苷、阿昔洛韦、肌苷、甲硝唑等同系物及结构相似的物质,它们在本实验条件下,保留时间分别为 3.37, 3.69, 4.70, 10.20 min,可以推断阿糖胞苷、阿昔洛韦、阿昔洛韦的色谱峰受到血浆中杂质峰的干扰,以甲硝唑的保留时间适中,分离也好。

3.3 缓冲溶液 pH 选择,实验发现流动相缓冲溶液的 pH 改变对内标保留时间影响不明显,但对替加氟保留时间影响很大,缓冲溶液 pH 为 7.0 时替加氟以内酰胺结构为主,在本色

谱条件下的保留时间是 9.90 min,与内标保留时间接近,随着 pH 的减小,替加氟的内酰胺和双内酰胺增加,保留时间后移,当 pH 为 5.2 时,替加氟的保留时间是 12.50 min,此时,分离效果最好,因此流动相缓冲溶液的 pH 选择为 5.2。

3.4 本实验采用一种新的血浆样品处理方法,所需样品量少,样品处理简单、快速,方法回收率高、重复性好、灵敏度高、线性范围广,适用于临床药动学研究及血药浓度监测。

参考文献

- [1] ZUFIA L, ALDAZ A, CASTELLANOS C, GIRALDEZ J. Determination of 5-fluorouracil and its prodrug tegafur in plasma and tissue by high-performance liquid chromatography in a single injection: validation for application in clinical pharmacokinetic studies[J]. *Ther Drug Monit*, 2003, 25(2): 221-228.
- [2] JARUGULA V R, BOUDINOT F D. High-performance liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil and its prodrugs, tegafur and 4-deoxy-5-fluorouracil, in rat plasma[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 677(1): 199-203.
- [3] YE M, ZHU Z, FU Q. Study on determination of tegafur in human plasma by HPLC assay[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2005, 40(12): 928-930.
- [4] SONG L Y, CHEN X H. Determination of radiately solidified tegafur in blood by HPLC[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 1998, 33(5): 300-301.

收稿日期: 2006-02-28