

验采用甲醇直接沉降处理血浆, 样品处理简单、快速, 测得卡马西平、拉莫三嗪、氯硝西洋和地西洋的最低检出限均 $<1.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 奥沙西洋为 $3.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 准确度、精密度和提取回收率等均良好。由于建立的 5 个化合物的检测方法灵敏度高, 浓度为 $2.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品检测信号值较为接近饱和值, 为了避免仪器被污染, 所以线性关系考察时, 最高浓度点 $<1.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。但临床治疗癫痫患者的药物有效血药浓度基本都在几个微克, 浓度较高, 目前也多用液相色谱检测, 但过程费时, 消耗流动相试剂也多。为此, 本实验建立了一种液相色谱质谱检测方法, 在检测临床生物样本时, 取少量样本, 用空白人血浆稀释 10 倍~20 倍左右, 混匀后再按样品处理方法处理后进行检测。考虑到空白血浆稀释的样本与临床样本是否有差别, 选了线性范围内的高、中浓度点进行稀释后考察, 检测结果与不稀释直接处理后得到的结果比较, 其 RSD $<10\%$, 在可接受范围内。

所以, 本实验建立的人血浆中卡马西平、拉莫三嗪、氯硝西洋、地西洋和奥沙西洋浓度的 UPLC-MS/MS 测定方法具有分析时间短、操作简便、准确度和灵敏度较高、重复性好等特点, 在 5 min 内可完成一个样品多个成分的定性定量分析, 适用于上述 5 种化合物血药浓度测定及药动学研究。

REFERENCES

- [1] YAN J, QIN Q, ZHANG T, et al. A study on the relations of serum concentration of carbamazepine, phenytoin and Phenobarbital to adverse reactions and to therapeutic efficacy [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2011, 31(7):

- 580-584.
 [2] SUN H, XU X M, HAO K Y, et al. The analysis of reasonable application of antiepileptic drugs [J]. Guid China Med(中国医药指南), 2010, 8(33): 221-222.
 [3] HAN L P, LUO K, ZHANG Y J. Simultaneous determination of antiepileptic drugs in serum by HPLC [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm(广东药学院学报), 2002, 18(1): 24-26.
 [4] WANG G, GU R, HE Q M, et al. Determination of antiepileptic drugs and the metabolite of carbamazepine in serum by high performance liquid chromatography [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2004, 39(4): 300-302.
 [5] LIU Y, WANG L, HE D K. Determination of carbamazepine, lamotrigine, phenobarbital, phenytoin sodium and 10,11-epoxycarbamazepine in human serum by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2005, 10(8): 846-851.
 [6] YANG J, JIAO Z, SHI X J. Determination of Phenobarbital, Lamotrigine, Oxcarbazepine and its metabolites in human serum by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2006, 37(6): 415-417.
 [7] NGWA G, FRITCH D, BLUM K, et al. Simultaneous analysis of 14 benzodiazepines in oral fluid by solid-phase extraction and LC-MS-MS [J]. J Anal Toxicol, 2007, 31(7): 369-376.
 [8] MARIN S J, COLES R, MERRELL M, et al. Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS [J]. J Anal Toxicol, 2008, 32(7): 491-498.
 [9] LAJUNESSE A, VERNUILLET G, EULLAFFROY P, et al. Determination of carbamazepine in aquatic organisms by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Environ Monit, 2009, 11(4): 723-725.
 [10] NAKAMURA M, OHMORI T, ITOH Y, et al. Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a highresolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(4): 357-364.
 [11] HOTH K K, KUMAR S S, BHARATHI D V, et al. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(4): 491-496.

收稿日期: 2013-04-13

HPLC 测定甲苯磺酸索拉非尼片及其在大鼠血浆中的含量

何春晓^{1,2}, 黄翔², 孙燕雯², 何昱², 张茹萍², 卢红阳¹, 严叶萍², 张沂平^{1*} (1.浙江省肿瘤医院化疗中心, 杭州 310022; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定索拉非尼含量, 并探索大鼠血浆中索拉非尼浓度的测定方法。方法 采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05%甲酸和 0.05%三乙胺的水溶液-乙腈(35: 65); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 265 nm。结果 索拉非尼浓度在 0.4~12 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, $r=0.9999$; 加样回收率为 100.8%,

基金项目: 浙江省中医药科学研究基金计划(2012ZA022); 浙江省医药卫生科学研究基金(2007B025); 吴阶平医学基金(320.6750.11059、320.6750.11091、320.6799.1106)

作者简介: 何春晓, 女, 硕士生 Tel: 15858225472 E-mail: chunxiao_he@163.com *通信作者: 张沂平, 女, 主任医师 Tel: (0571)88122188 E-mail: zyp@medmail.com.cn

RSD 为 1.470%。大鼠按 65 mg·kg⁻¹灌胃给药, 给药 2.5 h 后, 其血浆中索拉非尼的药物浓度为 2.830 μg·mL⁻¹。结论 本法可用于甲苯磺酸索拉非尼片中药物含量的测定, 方法简单、灵敏, 同时可检测大鼠血浆中索拉非尼的浓度。

关键词: 高效液相色谱法; 索拉非尼; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)11-1219-04

Determination of Sorafenib in Tablet and Rat Blood Plasma by HPLC

HE Chunxiao^{1,2}, HUANG Xiang², SUN Yanwen², HE Yu², ZHANG Ruping², LU Hongyang¹, YAN Yeping², ZHANG Yiping^{1*} (1. Department of Medical Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high-performance liquid chromatography method for determination of sorafenib, explore a method of measuring the sorafenib concentration in rat blood plasma. **METHODS** Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was 35%(0.05% formic acid and 0.05% triethylamine) in aqueous solution and 65% acetonitrile while the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 265 nm. **RESULTS** The standard curve of sorafenib concentration was linear in the range of 0.4–12 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9). The average recovery rate of the method was 100.8%, RSD was 1.470%. The rat was treated by gavage with sorafenib at the dosage of 65 mg·kg⁻¹. The sorafenib concentration in rat blood plasma was 2.830 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method is suitable for the determination of sorafenib. It is practicable, simple, sensitive, and can be used to measure the sorafenib concentration in rat blood plasma.

KEY WORDS: HPLC; sorafenib; determination

索拉非尼(sorafenib, 商品名多吉美, Nexavar)是拜耳和 Onyx 公司共同研制的一种多靶点的生物靶向抗肿瘤新药。目前已被 FDA 批准用于治疗晚期肾细胞癌和晚期肝细胞癌。该药属于二芳基脲类, 临床上用的是索拉非尼的甲苯磺酸盐, 化学名为 4-(4-3-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]脲基苯氧基)-N2-甲基吡啶-2-羧酰胺-4-甲苯磺酸盐, 分子式为 C₂₁H₁₆ClF₃N₄O₃·C₇H₈O₃S, 分子量为 637.03 g·mol⁻¹。目前国内外关于索拉非尼含量检测的方法报道较少, 国外以研究鼠血清、人血清或腹膜透析液中索拉非尼含量测定为主^[1-2], 国内有少量关于索拉非尼原料药的含量检测研究及索拉非尼在大鼠肠吸收特性的研究^[3-5]。本实验采用 HPLC 检测索拉非尼含量, 方法简单、检测时间短, 流动相中缓冲液无需调节 pH, 且峰形良好。本实验进一步对灌胃给药后大鼠血浆中的索拉非尼浓度测定方法进行了相关研究, 为索拉非尼的质量评价和其在动物体内的药动学研究提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司, 包括 G1316A 柱温箱、G1329B 标准型自动进样器、G1311C 四元低压梯度系统、G1315D DAD 检测器); 超纯水仪(美国 Milipore 公司); FA2204B 电子天平(上海维菱科学仪器有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声

仪器有限公司); D-37520 离心机(德国 Kendro 公司); WH-866 涡旋混合器(太仓华利达实验室设备有限公司); UFC500396 超滤管(杭州浩克生物技术有限公司)。

索拉非尼对照品(美国 Selleckchem 公司, 批号: S104004, 纯度: 100%); 甲苯磺酸索拉非尼片(德国拜耳医药保健有限公司, 批号: H20110599, 规格: 200 mg×60 片×1 盒); 甲酸(美国 ROE 公司, 色谱纯, 批号: F8124-0500); 乙腈(批号: 102489)、甲醇(批号: 101437)均为色谱纯, 均购于美国 Fisher 公司; 三乙胺(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20110419, 分析纯); 肝素钠注射液(上海第一生化药业有限公司, 批号: 100909, 规格: 2 mL: 12 500 U×10 支×1 盒); 流动相用水为超纯水, 其他溶液配制用水为蒸馏水。

Wistar 大鼠, ♂, 体质量 300 g 左右, 购于浙江省实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(浙)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 甲苯磺酸索拉非尼片药物含量测定

2.1.1 溶液制备

2.1.1.1 对照品溶液的制备 精密称取索拉非尼对照品 2 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 配制成 400 μg·mL⁻¹的索拉非尼对照品储备溶液。精密吸取 0.125 mL 对照品储备溶液,

置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 配制成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.1.2 供试品溶液的制备 取甲苯磺酸索拉非尼片, 去包衣后用研钵研碎成均匀粉末。精密称取甲苯磺酸索拉非尼片粉末 5 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 配制成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的索拉非尼供试品储备溶液。精密吸取 0.05 mL 供试品储备溶液, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 EclipseXDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: (0.05%甲酸和 0.05%三乙胺)的水溶液-乙腈(35:65); 柱温 30 °C; 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

液相中的 DAD 检测器可在色谱分析过程中自动记录色谱峰对应组分的光谱图。索拉非尼对照品的紫外-可见光谱在 265 nm 有最大吸收, 由此确定检测波长为 265 nm。

在所选择的色谱条件下, 索拉非尼对照品和供试品溶液的色谱图见图 1。

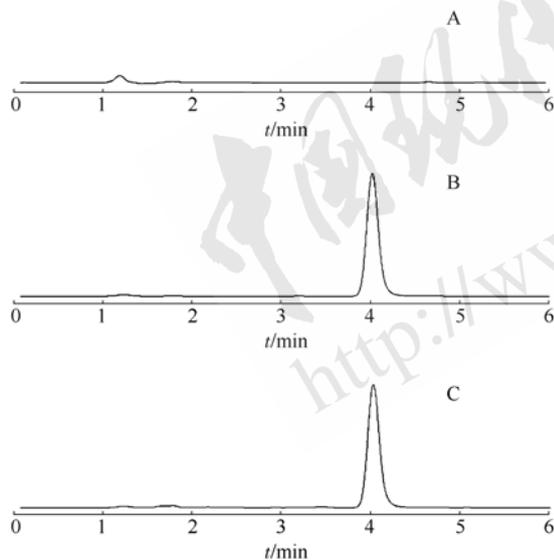


图 1 对照品溶液和供试品溶液的高效液相色谱图

A-阴性对照溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液

Fig 1 HPLC chromatograms of the control and sample solutions

A-negative control solution; B-control solution; C-sample solution

2.1.3 线性关系 精密吸取 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的索拉非尼对照品储备溶液 5, 25, 50., 100, 125, 150 μL , 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 配制成浓度分别为 0.4, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0,

$12.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 依次进样量 20 μL , 记录色谱图, 计算峰面积。以索拉非尼峰面积(Y)为纵坐标, 以浓度(X, $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标进行线性回归, 回归方程为 $Y=98.893X-5.9274$, $r=0.9999$ 。结果表明, 索拉非尼检测浓度在 $0.4\sim 12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4 仪器精密度试验 取 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件, 于 1 d 内连续进样 6 次, 分别进样 20 μL , 记录色谱峰, 测定峰面积, 计算日内精密度。结果对照品索拉非尼峰面积的 RSD 为 0.25%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 中间精密度试验 以在不同时期、不同实验人员按“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 对同一样品分别测定。测得 RSD 为 1.7%。表明中间精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一批索拉非尼 6 份, 按“2.1.1”项下方法配制 6 份供试液, 各取 20 μL 进样, 记录色谱图, 测定峰面积。结果 6 份供试液中索拉非尼含量的 RSD 为 0.31%。表明此方法的重复性好, 操作误差小。

2.1.7 稳定性试验 取质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的同一供试品溶液, 在制备好后的 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样 20 μL , 记录色谱峰, 测定峰面积。结果索拉非尼峰面积的 RSD 为 0.63%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收试验 精密吸取已知含量的按“2.1.1”项下方法配制的 9 份甲苯磺酸索拉非尼溶液各 2 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 再精密加入一定量的对照品溶液(约相当于样品中对照品 80%, 100%, 120%), 加甲醇定容至刻度, 混匀, 即为加样回收试验供试液。按“2.1.2”项下色谱条件, 进样 20 μL , 结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果(n=6)

Tab 1 Recovery of sorafenib(n=6)

| 含量/ μg | 加入量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/ % | 平均回 收率/% | RSD/ % |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-------------|-----------|
| 11.47 | 8.00 | 20.03 | 102.9 | | |
| 11.48 | 8.00 | 19.52 | 100.2 | | |
| 11.46 | 8.00 | 19.21 | 98.70 | | |
| 11.48 | 10.00 | 21.75 | 101.3 | | |
| 11.47 | 10.00 | 21.68 | 101.0 | 100.8 | 1.470 |
| 11.49 | 10.00 | 21.59 | 100.5 | | |
| 11.48 | 12.00 | 24.14 | 102.8 | | |
| 11.45 | 12.00 | 23.16 | 98.80 | | |
| 11.46 | 12.00 | 23.67 | 100.9 | | |

2.1.9 样品含量测定 取甲苯磺酸索拉非尼片粉末适量,按“2.1.1”项制备方法配制供试品溶液3份,分别进样20 μL ,记录色谱峰,测定峰面积。计算得供试品溶液中索拉非尼浓度为5.741 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,故药片中索拉非尼的含量为57.41%。

2.2 大鼠血浆中索拉非尼的浓度测定研究

2.2.1 灌胃液的制备 取甲苯磺酸索拉非尼片1片,去包衣后用研钵研碎成均匀粉末,加生理盐水40 mL,制成5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

2.2.2 血样采集 大鼠实验前禁食12 h,水自由饮取。在清醒状态下以甲苯磺酸索拉非尼片65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药。给药后1 h用10%水合氯醛按4 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 将大鼠麻醉,颈部剃毛后分离出颈静脉,插入聚乙烯管。在给药后2.5 h,在涂有肝素的试管中收集颈静脉血3 mL。

2.2.3 血浆样品的处理 取采集血液的离心管,5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,吸取上清液置于另一离心管中,贮存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。取0.2 mL血浆样品,加甲醇0.8 mL,涡旋振荡混合1 min,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。取0.5 mL上清液加入到超滤管中,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。

2.2.4 血浆样品检测结果 将血浆样品按“2.1.2”项下色谱条件,进样100 μL ,记录色谱图,测定峰面积。结果索拉非尼色谱图见图2。按“2.1.3”项下的回归方程计算血浆样品中索拉非尼的药物浓度为1.132 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,故大鼠血浆中索拉非尼的药物浓度为2.830 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

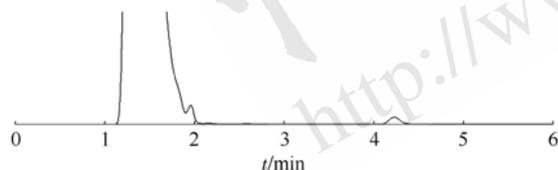


图2 大鼠血浆中索拉非尼色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of the sorafenib in rat serum

3 讨论

3.1 溶液配制

索拉非尼热稳定性好,不吸水。在水溶液中溶解度低,在强酸条件下溶解度稍增加,略溶于酒精,溶于聚乙烯甘油400^[6]。考虑到索拉非尼的溶解特性,故采用甲醇来溶解索拉非尼。当配制质量浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液时,对照品溶液澄清,无悬浮颗粒,供试品溶液有极少量的小的白色悬浮颗粒,可能是甲苯磺酸索拉非尼片的辅料。

3.2 流动相的选择

流动相的组成和比例对索拉非尼的峰形和与杂质的分离度影响较大。故本试验参考了相关文献^[3-4]和预试验,确定流动相为(0.05%甲酸和0.05%三乙胺)的水溶液:乙腈(35:65)。在此流动相的色谱条件下,不仅可以检测甲苯磺酸索拉非尼片中的药物含量,还能检测到大鼠血浆中索拉非尼的药物含量,并且峰形良好,与杂质达到很好的分离。

3.3 血浆样品处理方法的确定

血浆样品用高效液相色谱进行分析前,需经去蛋白处理。目前去蛋白的常用方法有加有机溶剂、强酸等^[7-8]。本试验曾尝试用6%高氯酸沉淀蛋白,但在血浆样品中未能检测索拉非尼的峰形,原因可能是索拉非尼的血浆蛋白结合率过高^[9],高氯酸在沉淀蛋白的同时,将索拉非尼一并除去。故本试验最终采取加有机溶剂的方法,在沉淀蛋白的同时,将索拉非尼溶解在甲醇中,能较好地检测索拉非尼含量。

REFERENCES

- [1] AFIFY S, RAPP UR, HOGGER P. Validation of a liquid chromatography assay for the quantification of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in small volumes of mouse serum [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 809(1): 99-103.
- [2] HEINZ W J, KAHLE K, HELLE-BEYERSDORF A, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of sorafenib in human serum and peritoneal fluid [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 68(1): 239-245.
- [3] HUANG Z T. Determination of sorafenib and its related substances by HPLC [J]. Heilongjiang Sci Technol(黑龙江科技信息), 2007(19): 148.
- [4] ZHANG H, ZHANG F M, YAN S J. Comparative study of HPLC and UV method for the determination of sorafenib [J]. China Pharm(中国药业), 2012, 21(16): 43-45.
- [5] SHEN X P, LUAN L B. Sorafenib tosylate in rat intestinal absorption characteristics [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2011, 7(3): 39-41.
- [6] ZHOU A P, SUN Y. Recent advances in sorafenib: a multiple targeted anti-tumor agent [J]. Oncol Prog(癌症进展杂志), 2006, 4(6): 529-533.
- [7] QIN H Y, WEI Y H, ZHAO Y G, et al. Determination method of plasma level of potassium sodium in rat and study on its pharmacokinetics [J]. China Pharm(中国药房), 2008, 19(36): 2814-2815.
- [8] MA Z Q, HONG Z Y, WANG W S, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of modafinil in mice [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2012, 47(1): 101-104.
- [9] MINAMI H, KAWADA K, EBI H, et al. Phase I and pharmacokinetic study of sorafenib, an oral multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced refractory solid tumors [J]. Cancer Sci, 2008, 99(7): 1492-1498.

收稿日期: 2013-03-25